

50376  
1989  
179

50376  
1989  
179

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS  
U.E.R. de BIOLOGIE

Année 1989

Thèse N° : 412

## THÈSE

présentée à l'Université de Lille I  
pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR EN BIOCHIMIE**  
(Nouveau Régime)

par

**Noureddine TBARKA**



# PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE LA PROTÉINE 90 KD DE CHOC THERMIQUE, ASSOCIÉE AU RÉCEPTEUR DES HORMONES GLUCOCORTICOIDES DU RAT

Présentée le 7 Septembre 1989 devant la Commission



030 024097 0

### JURY

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

Je tiens à associer à ce travail toute ma famille, pour son soutien durant toutes mes études.

Remerciements

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Biochimie Structurale, sous la direction de Monsieur le Professeur M. DAUTREVAUX. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accordé sa confiance.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à :

Monsieur le Professeur J. MONTREUIL qui me fait l'honneur de présider le jury de cette Thèse.

Messieurs les Professeurs J. KREMBEL et M. PORCHET qui ont spontanément accepté de juger ce travail.

Toute ma reconnaissance à P. FORMSTECHE, pour m'avoir intégré dans son équipe, m'avoir confié ce travail et l'avoir suivi avec intérêt.

Que tous mes collègues du laboratoire qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail soient remerciés: C. RICHARD, V.DUMUR, S. KALOWSKI, B. SABLONNIERE, P.M. DANZE , D,MANNECHEZ et L, STORME.

Je remercie également l'ensemble du personnel du laboratoire, B. MASSELOT, T-N. DAO, P. TOULOUSE, F. DELPORTE, Madame MOREL et, en particulier, Madame A. MORANDI, qui a effectué la frappe de ce mémoire.

### RESUME

Il semble admis maintenant que la transformation ( ou activation ) du complexe hormone glucocorticoïde - récepteur est concomitante d'une conversion de ce dernier d'une forme non transformée, ayant un haut poids moléculaire, à la forme transformée de petit poids moléculaire.

Plusieurs arguments indépendants plaident en faveur d'une structure hétérooligomérique pour le complexe non transformé qui comprend en plus de la sous unité protéique liant l'hormone glucocorticoïde;

- Deux sous-unités protéiques non liantes possédant chacune une masse moléculaire de 90 KD.
- Une molécule d'ARN d'environ 36 KD

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressé à l'étude de la protéine 90 KD non liante libre. Pour ce faire, nous avons mis au point un protocole de purification de cette protéine, rapide et simple. Celui-ci est basé sur l'usage consécutif des Chromatographies Liquides, d'échange d'ion et d'exclusion de taille, sur supports à Haute Performance (HPLC) ; la protéine ainsi purifiée nous a permis :

- . La détermination de ses paramètres physicochimiques.
  - . L'identification d'une partie de sa séquence N-terminale.
  - . Le développement d'un anticorps polyclonal, que nous avons utilisé en parallèle avec l'anticorps monoclonal(AC 88), fourni par TOFT pour :
  - . La localisation immunohistochimique intracellulaire de la protéine 90 KD, dans deux lignées cellulaires différentes.
-

ABREVIATIONS

Rappel de la nomenclature des acides aminés dans le code à une lettre.

A : ALA	G : GLY	M : MET	S : SER
C : CYS	H : HIS	N : ASN	T : THR
D : ASP	I : ILE	P : PRO	V : VAL
E : GLU	K : LYS	Q : GLN	W : TRP
F : PHE	L : LEU	R : ARG	Y : TYR

AC88 : Anticorps Monoclonal Anti 88 KD

ADN : Acide Desoxyribo Nucleique

ADNc : ADN complémentaire

ARE : Androgen Responsive Element

ARN : Acide Ribo Nucléique

ERE : Estrogen Responsive Element

GRE : Glucocorticoïd Responsive Element

HPIEC : High Performance Ion Exchange Chromatography

HPSEC : High Performance Size Exclusion Chromatography

HRE : Hormone Responsive Element

HSE : Heat Shock Element

HSP : Heat Shock Protein

HSTF : Heat Shock Transcriptional Factor

HTC : Hepatoma Tissue Culture

IS25 : Immunserum 25

KD : Kilo Dalton

LTR : Long Terminal Repeat

MMTV : Mouse Mammary Tumor Virus

nt<sup>i</sup> : nuclear transfer increased

PAGE/SDS : Poly Acrylamide Gel Electrophoresis / Sodium Dodecyl  
Sulfate

PVDF : Polyvinylidene DiFluoride

**PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

## INTRODUCTION

Les hormones glucocorticoïdes, comme les autres hormones stéroïdes (oestrogènes, progestérones, androgènes, minéralocorticoïdes, 1,25 dihydroxy Vitamine D3) exercent leur action en contrôlant la transcription des ARN messagers codés par des gènes dans les tissus hormono-sensibles. Ils modulent ainsi la synthèse des protéines responsable de leur effets biologiques, qui concernent des fonctions diverses et essentielles: la reproduction, la diurèse, le métabolisme du tissu osseux. La classe des hormones glucocorticoïdes possède la particularité d'influencer le métabolisme d'un grand nombre de tissus.

D'une façon générale, les glucocorticoïdes exercent des effets cataboliques impliquant la dégradation des lipides et des protéines dans le tissu adipeux, le tissu lymphoïde, le tissu conjonctif et dans le muscle, et des effets anaboliques, comme l'induction de certaines enzymes (par exemple les transaminases) dans les cellules hépatiques. Dans toutes ces réactions, l'action globale des glucocorticoïdes est de faire face à des situations de stress en renforçant la résistance de l'organisme.

Le mécanisme d'action des glucocorticoïdes et des hormones stéroïdes en général est globalement bien établi :

Dans une première étape, le stéroïde se lie à un récepteur protéique dans le cytosol ; ce complexe formé subit ensuite une étape de transformation (ou activation), qui lui permet la migration vers le noyau cellulaire, où il interagit avec l'ADN. Il est actuellement admis

qu'à l'état non transformé, et en absence du stéroïde, le récepteur se trouve associé à d'autres facteurs protéiques, en plus de la sous-unité liant le stéroïde. Parmi ceux-ci figure la protéine 90 KD non liante qui a fait l'objet de plusieurs publications. En effet, il s'avère que cette protéine fortement conservée au cours de l'évolution est induite par le choc thermique et d'autres stress chimiques.

Dans le cadre de cette thèse, l'objet de notre travail concerne la purification et la caractérisation de cette protéine 90 KD chez le rat.

Avant d'exposer nos résultats, voici une revue bibliographique, traitant du choc thermique et des protéines associées, ainsi que du récepteur des hormones glucocorticoïdes.

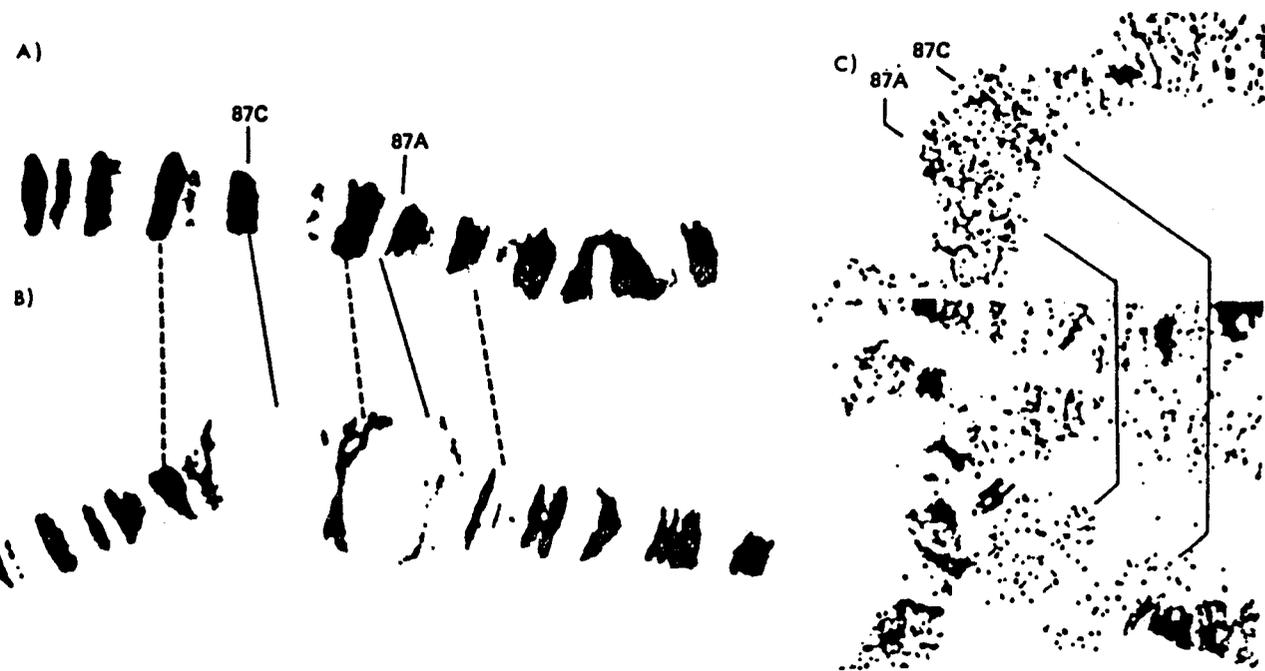
## I - CHOC THERMIQUE ET PROTEINES ASSOCIEES

### 1.1. Généralités

Comme l'estiment tous les biologistes, il existe une relation étroite entre la vie et l'environnement, et la température y joue un rôle critique. La croissance des plantes est notamment sensible à la température. Les étapes critiques dans la vie d'une plante telle que la germination, la floraison et la fin de la dormance peuvent être manipulées en appliquant certains traitements thermiques. La vie animale se limite à une fourchette étroite de température, néanmoins, on sait qu'une exposition de quelque temps à une température proche de la température létale conduit souvent à un degré d'adaptation connu sous le nom de thermotolérance. Cette réponse particulière au choc thermique a considérablement attiré l'attention des biochimistes et des biologistes moléculaires cette dernière décade, d'où une accumulation rapide de données expérimentales, non seulement au niveau moléculaire de la thermotolérance acquise, mais aussi au niveau du métabolisme du stress (thermique, chimique) en général.

### 1.2 - Caractérisation de la réponse au choc thermique

L'étude de la réponse au choc thermique a commencé en 1962, en effet, RITOSSA, 1962, rapporte qu'une exposition brève des larves de *Drosophila hydei* à 30°C, soit 5°C au-dessus de la température normale, induit des altérations dramatiques dans l'activité génétique de cette drosophile, tels qu'en témoignent les changements observés dans les chromosomes des glandes salivaires (figure 1). Pendant une dizaine d'années, cette réponse est étudiée seulement au niveau cytologique ;



**Figure 1** - Réponse des chromosomes de *Drosophila mélanogaster* à un choc thermique. Dans la nature, ces mouches croissent normalement à des températures inférieures à 37°C. Lorsqu'elles sont exposées à une température de 37°C pendant 40 min, (des "puffs" apparaissent à des sites caractéristiques (87C et 87 A) sur les chromosomes des glandes salivaires. Les photos a et b comparent ces sites sur des chromosomes provenant d'animaux soumis à un choc thermique. La synthèse active d'ARN est décelée par incorporation de  $^3\text{H}$  uridine et autoradiographie C). La photo du haut montre l'incorporation du marqueur après un choc thermique et celle du bas, l'incorporation à une température normale. D'après ASHBURNER et BONNER (1979), BONNER et PARDUE (1976).

néanmoins, de nombreuses et importantes observations ont été tirées. Il a été montré notamment que ces "puffs" sont :

- aussi induits par d'autres types de stress (ASHBURNER, 1970 ; BERENDES, 1968)
- ils sont produits dans l'intervalle de quelques minutes
- ils sont associés à des ARN messagers nouvellement synthétisés
- ils se trouvent dans d'autres espèces que la drosophile dans différents tissus (RITOSSA, 1964)
- et finalement, leur apparition est concomittante à la disparition ou répression d'autres "puffs" qui étaient actifs (LEENDERS et BERENDES, 1972) avant le traitement.

En 1974, TISSIERES *et al.* inaugurent l'analyse moléculaire de cette réponse thermique en rapportant que l'induction des "puffs" coïncide avec la synthèse d'un petit nombre de nouvelles protéines. A partir de là, des investigations aussi bien sur le plan biochimique que sur le plan génétique ont été rapportées chez les cellules de drosophile en culture. On sait actuellement que ces cellules poussent normalement à 25°C, qu'il y a induction des protéines de choc thermique "HSPs" quand la température est élevée entre 29-38°C (LINDQUIST, 1980). A de telles températures, des ARN messagers correspondant aux HSPs apparaissent dans le cytoplasme pendant quelques minutes et sont énergiquement traduits aussi longtemps que les cellules sont maintenues à température élevée. Dans le même temps, la transcription d'autres gènes (JAMRICH *et al.*, 1977 ; FINDLEY *et al.*, 1981 ; SPRADLING *et al.*, 1975) ainsi que la traduction des ARN messagers préexistants sont réprimés (LINDQUIST, 1981 ; KELLEY *et al.*, 1982).

C'est seulement après retour à une température normale que les cellules reprennent leur rythme de vie normal (DI DOMENICO *et al.*, 1982a, 1982b). On sait désormais que la réponse au choc thermique se produit chez les bactéries, les plantes et les animaux et que l'induction des HSPs est aussi rapide dans tous les organismes (SCHLESINGER *et al.*, 1982). Seule la température maximale d'induction varie selon les organismes. Généralement, les organismes qui tolèrent une large fourchette de température répondent à un choc thermique à une température se situant entre 10°C et 15°C au-dessus de la température optimale de croissance. Par contre, les organismes qui ne supportent qu'une échelle restreinte de température, présentent une induction maximale de HSPs à la température d'environ 5°C au-dessus de leur optimum.

### 1.3 - Protéines de choc thermique

On définit les protéines de choc thermique comme étant des protéines dont la synthèse est dramatiquement induite à des températures élevées. De telles protéines existent à l'état normal et à des concentrations relativement importantes selon les organismes. L'estimation de leur poids moléculaire est basée sur la technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (voir Tableau I). A côté du traitement thermique il existe une multitude d'inducteurs de la synthèse de ces HSPs, tel que l'éthanol (LI, 1983), les métaux de transition, l'arséniate de sodium, les réactifs de thiols

Class	Species	Size range (kDa)	Covalent modifications	Intracellular location	Comment
hsp 110	Mammals	110		Nucleolus	Normal nucleolar component
hsp95	Vertebrates	92-105	Phosphorylation	Golgi	Normal cell component identical with membrane proteins induced by glucose deprivation
	Plants	95	Phosphorylation		
hsp 84	Vertebrates	83-90	Methylation, phosphorylation and ADP-ribosylation	Cytosol	Normal cell component; associates with steroid receptors
	Yeast	84			
	<i>Drosophila</i>	84			
	Plants	80			
hsp 70	All	68-74	Phosphorylation	Cytoplasm, cytoskeleton; migration to nucleus and nucleolus after heat shock	Mainly constitutive cell proteins; <i>E. coli</i> equivalent is the <i>hspK</i> protein
hsp 60	Plants	60		Mitochondria	Encoded by mitDNA
Small hsps	Vertebrates	23-30	Glycosylation	Nuclear matrix after heat shock	
	<i>Drosophila</i>	22			
		23			
		26			
		28			
	Yeast	26			
	Plants	15-27		Aggregate after heat shock to give cytoplasmic granules	Hsp 21, hsp 22 transported to chloroplasts

**TABLEAU I** - Les protéines de choc thermique chez les eucaryotes.  
(D'après ASHBURNER et BONNER (1979), SCHLESINGER et al. (1982), NEIDHART et al. (1984) et KEY et al. (1982).

Inducers	Non-inducers
Heat *	Cyclic AMP *
Ethanol *	Butyrate *
Sodium arsenite *	Dimethyl sulphoxide *
Heavy metals (e.g. Cd <sup>2+</sup> ) *	Phorbol esters †
Amino acid analogues *	Colchicine †
	Cytochalasin B †
	Cycloheximide †
	Azacytidine *
Glucose starvation followed by refeeding †	Ouabain †
	Calcium ionophore †
	Amiloride †
Anoxia followed by oxygenation †	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> †
	NaCN †
	NaF †
	Dinitrophenol †
	Azide †

**TABLEAU II** - Inducteurs de la synthèse des protéines de choc thermique dans les cellules de mammifères.

Références : <sup>a</sup>BURDON et al., 1982, <sup>b</sup>LI, 1983, <sup>c</sup>THOMAS et MATHEWS, 1984, <sup>d</sup>SCIANDRA et SUBJECK, 1983, <sup>e</sup>LIETSCHRIEVE, 1982, BURDON et GILL (travail non publié).

(LEVINSON *et al.*, 1982), et des analogues structuraux de certains acides aminés quand ils sont incorporés dans les protéines (Tableau II) (THOMAS et MATHEWS, 1984). D'autres situations de stress sont connues pour intensifier l'anabolisme de ces HSPs par exemple la réoxygénation après anoxie (SCIANDRA et SUBJECK, 1983, SCIANDRA *et al.*, 1984) ou encore l'apport de glucose chez des cellules préalablement soumises à une privation (KASAMBALIDES et LANKS, 1983) (voir Tableau II).

A travers cette discussion, il est important de se rappeler que la réponse des cellules au choc thermique est très complexe, si bien que dans la littérature, il existe plusieurs sources de confusion. Par exemple les produits de dégradation des HSPs sont identifiés à tort comme de nouvelles HSPs (MITCHELL *et al.*, 1985). De plus, plusieurs auteurs ont mis en évidence des protéines mineures dont la synthèse est certes augmentée par le traitement thermique (ANDERSON *et al.*, 1982 ; REITER et PENMAN, 1983), mais dont l'étude n'a pas été poursuivie. Ne serait-ce que pour ces deux raisons, nous nous limitons à deux familles de protéines de choc thermique : les HSPs 90 KD et les HSPs 70 KD, qui sont hautement conservées au cours de l'évolution, et bien connues à la fois sur les plans biochimique et génétique. Par ailleurs, au cours de l'étude de la réponse primaire dans les fibroblastes embryonnaires de poulet soumis au stress, on a identifié une protéine de choc thermique : l'ubiquitine. Elle comporte 76 résidus d'acides aminés et est fortement conservée chez tous les eucaryotes (BOND et SCHLESINGER, 1985, 1986). Deux fonctions lui sont attribuées : tout d'abord, la modification des histones H2A et H2B durant l'interphase de la croissance cellulaire, puis la dégradation protéolytique de certaines protéines cellulaires.

Cette dernière activité, qui a déjà été postulée pour les protéines normales ayant une demi-vie courte (CIECHANOVER *et al.*, 1984) est requise aujourd'hui pour expliquer l'élimination des protéines anormales accumulées dans les cellules stressées (HERSHKO et CIECHANOVER, 1982) (voir figure 3).

#### 1.4 - Régulation de la réponse au choc thermique

A part le facteur température, l'induction de la synthèse des HSP<sub>s</sub> dans les cellules de mammifères peut être provoquée par une multitude d'autres facteurs physico-chimiques (voir Tableau II), qui sont aussi la cause d'une accumulation massive de protéines endommagées ou dénaturées, suite à une augmentation du métabolisme cellulaire. Ceci explique les difficultés pour établir un mécanisme moléculaire responsable du déclenchement de ce processus d'induction chez ces cellules. Néanmoins à l'aide du modèle génétique des HSP<sub>s</sub> 70 KD de la drosophile apparaît un mécanisme fondamental d'induction de ces protéines hautement conservées au cours de l'évolution. En effet, quand les gènes de HSP<sub>s</sub> 70 KD de drosophile sont introduits dans des cellules de souris, de singe, dans des oocytes de Xénope, de levures ou encore dans du tissu de tabac, ils sont activement et exclusivement transcrits lorsque les cellules réceptrices sont exposées à des températures élevées (PELHAM, 1982, 1985 ; CORCES *et al.*, 1981 ; BIENZ, 1984 ; VOELLMY et RUNGGER, 1982 ; Mc MAHON *et al.*, 1984 ; Ayme et TISSIERES, 1985 ; de BANZIE *et al.*, 1986 ; SPENA *et al.*, 1985). Cette approche expérimentale a été abordée pour évaluer les effets de délétions de la séquence d'ADN introduite, dans le but de déterminer la position, et la nature des éléments de la

séquence d'ADN responsables de la régulation de l'induction de la transcription des gènes des HSPs (PELHAM, 1985 ; AYME et TISSIERES, 1985). C'est ainsi que dans le cas des gènes HSPs 70 KD, PELHAM (1982) a identifié une petite séquence spécifique du choc thermique chez les cellules COS de singe, localisée à environ -20 nucléotides en amont de la séquence "TATA BOX" et conservée dans tous les promoteurs chez les eucaryotes. En plus, la comparaison de cette séquence minimale avec les séquences d'autres gènes HSPs chez la drosophile, donne une homologie apparente baptisée séquence "consensus", et comportant en particulier les nucléotides C---GAA---TTC---G, que PELHAM (1985) appelait élément du choc thermique ou HSE (voir figure 2). Une séquence similaire a été détectée dans différents gènes provenant de différentes espèces, y compris les plantes (SCHOFFL et BAUMANN, 1985). En outre, il paraît que cet HSE possède, comme les séquences activatrices (Enhancer), la même efficacité quelle que soit sa distance de la séquence "TATA BOX". Ces résultats sont extrêmement précieux, ils laissent clairement supposer l'existence d'une séquence spécifique et commune de la réponse au choc thermique, mais ils ne peuvent pas expliquer le mécanisme de régulation des gènes des HSPs. D'autres facteurs transcriptionnels interviennent à n'en pas douter dans le contrôle de cette régulation. A ce propos, et suite à des expériences de digestions chromatiniennes réalisées chez la drosophile, il a été possible à WU (1984) d'établir que la séquence "TATA BOX" est protégée par des protéines avant et après le choc thermique, alors que la séquence "HSE" l'est seulement après le traitement thermique. WU montre que la transcription des gènes HSP semble corrélée avec la présence dans le noyau de la drosophile d'une

protéine liant l'élément "HSE" (PARKER et TOPOL, 1984). Cette protéine a été isolée par ces auteurs, elle se lie effectivement à l'HSE des gènes HSPs 70 KD, mais uniquement chez la drosophile. Quoi qu'il en soit, ce facteur est appelé facteur transcriptionnel de choc thermique ou "HSTF" ; cependant, une question reste posée : le choc thermique modifie-t-il les modalités de l'interaction HSTF-HSE ? Des expériences d'extraction de le "HSTF" montrent que ce dernier ne possède pas la même structure dans les cellules de drosophile prétraitées que dans les cellules intactes (PARKER et TOPOL, 1984). Ces auteurs envisagent donc que suite au choc thermique, l'HSTF subit des altérations à la fois structurales et spécifiques nécessaires pour se lier à la séquence "HSE" et permettre ainsi à l'ARN polymérase II de coulisser sur l'ADN, comme le montre la figure 2.

Le mécanisme réel d'activation de cet "HSTF" est mal connu ; néanmoins, en tenant compte de toutes les connaissances acquises sur le choc thermique, on peut l'imaginer comme suit (figure 3) : l'induction des gènes tronqués dans les cellules de mammifères, ou le traitement avec des analogues d'acides aminés produira la synthèse de protéines aberrantes. D'autres traitements, tel que le chauffage ou l'éthanol, endommageront les protéines cellulaires par dénaturation ou par des mécanismes impliquant des radicaux libres.

Les protéines aberrantes ou endommagées sont ensuite reconnues par le système de dégradation dépendant de l'ubiquitine et requérant de l'ATP. Toutefois, il est suggéré que la forme normalement "inactive" de HSTF existe sous une forme liée à l'ubiquitine. Ainsi, la déplétion des taux cellulaires d'ubiquitine libre, dûe à l'augmentation du taux de

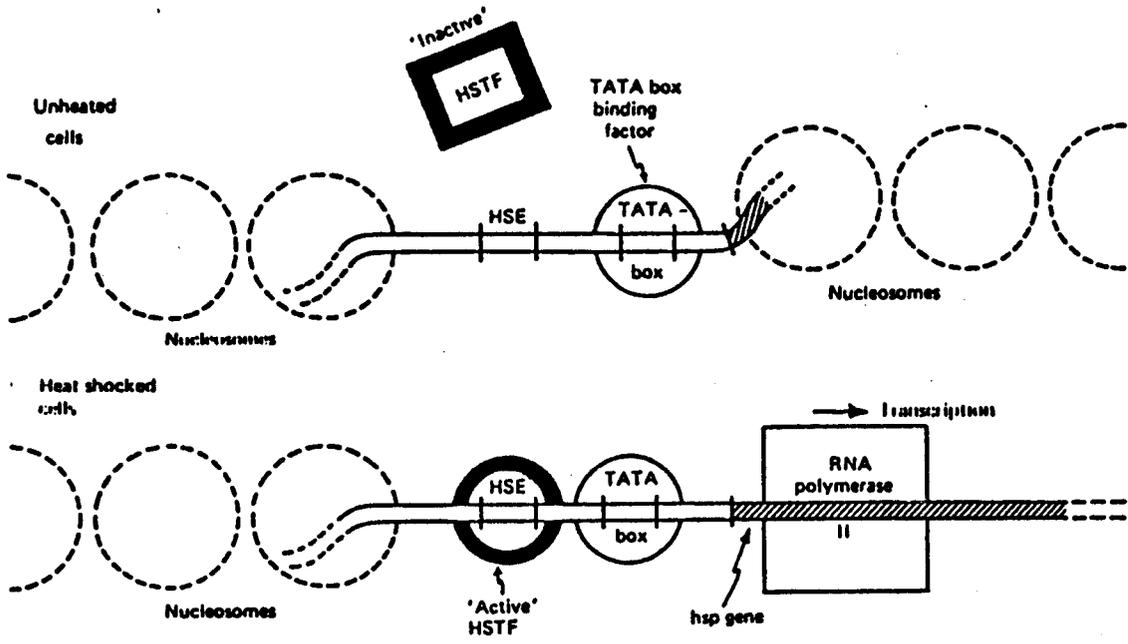


Figure 2 - Mécanisme hypothétique d'activation du gène HSP par des facteurs de transcription. D'après BURDON (1986)

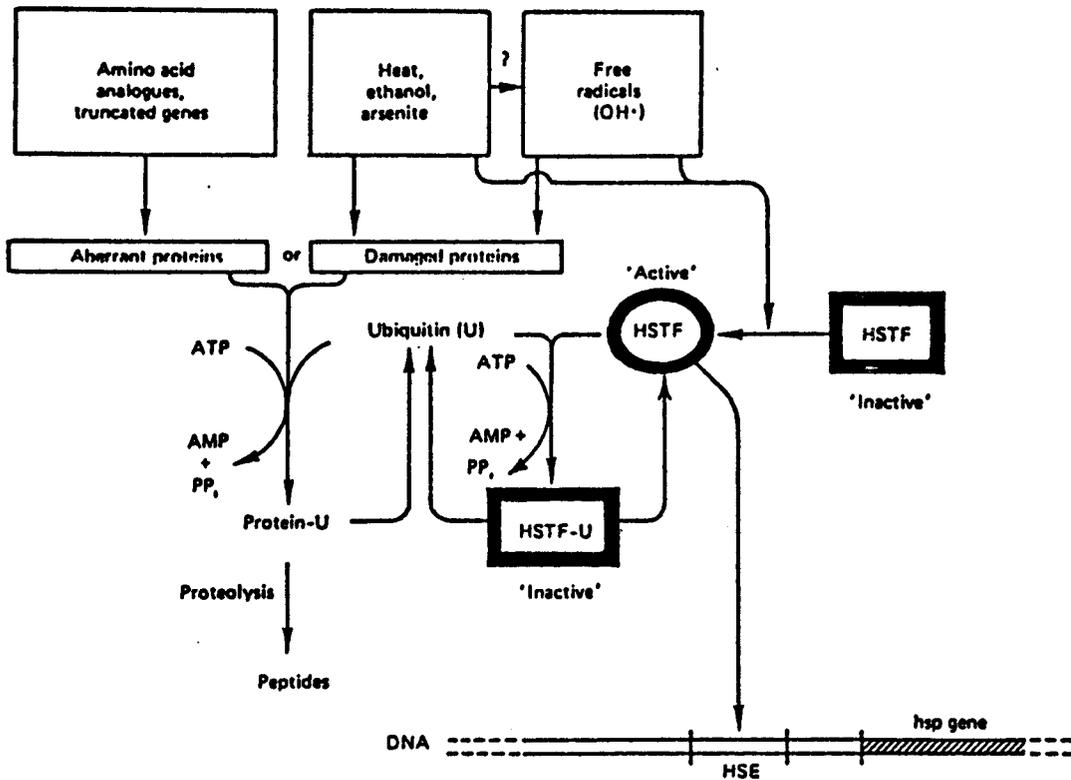


Figure 3 - Comment des protéines cellulaires endommagées peuvent stimuler l'induction de la transcription du gène HSP. D'après BURDON (1986)

protéines aberrantes provoquera une élévation des taux d'HSTF libre (non liée à l'ubiquitine). Alternativement, d'autres mécanismes qui n'impliquent pas l'ubiquitine peuvent générer une altération de la structure de l'HSTF "inactive" en HSTF "active" (e.g. Dénaturation, dommages par radicaux libres, clivage protéolytique).

D'autre part, DI DOMENICO *et al.*, 1982b ont montré que l'activation transcriptionnelle des gènes HSP est un phénomène transitoire, dont la régulation dépend de l'accumulation des protéines HSPs elles-mêmes. En d'autres termes, l'accumulation spécifique des protéines HSPs peut à elle seule réprimer ses propres gènes. Cette hypothèse d'autorégulation, qui n'est pas nouvelle, prévaut au dépend d'une autre qui stipule une migration complète des HSPs 70 KD vers le noyau après le choc thermique (WELCH et FERAMISCO, 1984). Le même phénomène est visualisé pour l'HSP 90 KD des cellules d'embryons de souris, soumises à deux chocs thermiques successifs (COLLIER et SCHLESINGER, 1986). Ainsi, les HSPs 70 KD ont été associées aux ribonucléoprotéines nucléaires (KLOETZEL et BAUTZ, 1983). De telles associations peuvent avoir un rôle important dans le phénomène d'autorégulation.

## 1.5 - Fonctions des protéines de choc thermique

### 1.5.1 - *Interaction HSP 70 KD - Protéines*

A partir des données présentées dans les paragraphes précédents, il est évident que les HSPs 70 KD et leurs gènes sont impliqués dans une variété d'activités cellulaires dont la pertinence physiologique dans des conditions normales de croissance reste discutable. Parmi celles-ci, nous distinguons:

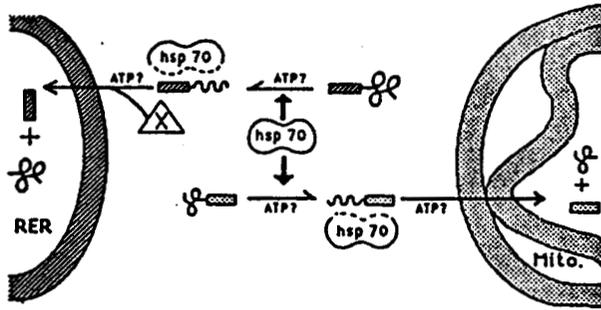
i) le désassemblage des cages de clathrine (appelées encore "triskelions" des vésicules recouvertes).

ii) la catalyse chez *E. coli* (dont l'homologue de l'HSP 70 KD est appelé DNA-K) de l'étape d'initiation de la synthèse de DNA du phage.

iii) la protection du nucléole après dommages thermiques.

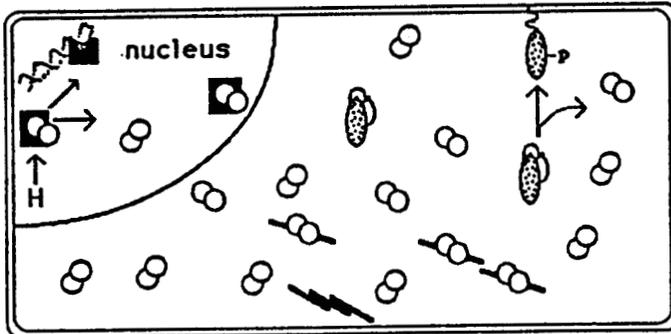
iiii) enfin, les HSPs 70 KD possèdent un rôle dans la reconnaissance de certaines protéines qu'elles lient dans le but de leur faciliter le passage à travers les membranes compartimentales (figure 4). Elles peuvent se lier également à des protéines endommagées pour empêcher leur agrégation dans la cellule. (FINLEY *et al.*, 1984 ; PELHAM, 1986). Notons que ces activités qui semblent a priori disparates se résument toutes à une rupture ( intermoléculaire ou intramoléculaire) d'interactions du type protéine-protéine. Ce sont en outre des réactions mettant en jeu l'hydrolyse d'ATP, énergie nécessaire et suffisante à ce type de processus selon LINDQUIST et CRAIG, 1988 ; DESHAIES *et al.*, 1988). Cela est confirmé par le fait que toutes les HSPs 70 KD possèdent une affinité importante vis-à-vis des molécules d'ATP.

Sur la base de tels résultats (PELHAM, 1986 ; LEWIS et PELHAM, 1985) suggèrent un modèle général dans lequel les HSPs 70 KD se lient à des régions hydrophobes des protéines, régions exposées soit naturellement ou suite à une dénaturation. Cette liaison peut avoir un caractère réversible par hydrolyse de l'ATP, cela dans le but de prévenir ou de rompre des interactions inappropriées entre protéines. Par ailleurs des études récentes portant sur la translocation transmembranaire de protéines et de facteurs nouvellement synthétisés (ZIMMERMANN *et al.*,



**Figure 4** - Fonctions de l'HSP 70KD

Rôle dans la translocation des protéines  
(l'interaction hsp 70-protéine reste à définir :  
voir pointillés).  
Le facteur X est requis pour la pénétration de  
la protéine dans le réticulum endoplasmique  
D'après DESHAIES et al., 1988



**Figure 5** - Fonctions de l'HSP 90 KD

Interactions de l'HSP 90 KD avec les récepteurs des  
hormones stéroïdes (dissociées par l'hormone),  
avec les tyrosine kinases (avant insertion dans  
la membrane) et avec d'autres protéines cellulaires  
(dont l'actine et la tubuline).  
D'après LINDQUIST et CRAIG 1988.

1986 ; EILERS *et al.*, 1988) montrent que de telles protéines nécessitent un état de configuration déplié pour traverser la membrane (voir figure 4). D'autre part, il s'avère que le transport post-traductionnel de certains facteurs et protéines mitochondriaux requiert à la fois un (ou plusieurs) facteur(s) et l'hydrolyse d'ATP et qu'il est possible de transposer un tel rôle à la famille des protéines HSP<sub>s</sub> 70 KD.

Ce dernier rôle est valorisé par des travaux récents (CHIRICO *et al.*, 1988 ; DESHAIES *et al.*, 1988), portant sur la translocation des facteurs mitochondriaux (F1  $\beta$  sous-unités) et du réticulum endoplasmique (carboxypeptidase et facteur prépro  $\alpha$ ).

Les résultats de ces travaux suggèrent un rôle de protection par les HSP<sub>s</sub> 70 KD des précurseurs protéiques jusqu'à leur site d'insertion membranaire (voir figure 4).

Nous ne pouvons clore ce chapitre sur les fonctions possibles de la famille des HSP<sub>s</sub>, sans mentionner le développement de la thermotolérance (l'augmentation de la résistance des cellules aux stress chimiques et thermique). En effet plusieurs données dans la littérature issues de toute une variété d'organismes suggèrent une relation temporelle étroite entre la synthèse des HSP<sub>s</sub> et le développement de la thermotolérance, et entre la cinétique de la dégradation de ces HSP<sub>s</sub> nouvellement synthétisées et la disparition de cette thermotolérance (LANDRY *et al.*, 1982 ; HENLE *et al.*, 1978 ; LANDRY *et al.*, 1983). La même réponse physiologique semble être pertinemment développée chez les lymphocytes des mammifères (homme, souris, lapin). (RODENHISER *et al.*, 1985).

Ce phénomène de la thermotolérance, nous rappelle celui de la sporulation.

La formation de spores constitue une étape ultime, au cours de laquelle les cellules sont extrêmement résistantes à des traitements thermiques ou chimiques. Il ne serait pas inintéressant de comparer entre eux les éléments induisant les deux phénomènes.

#### 1.5.2 - Interactions HSP 90 KD-Protéines : (voir figure 5)

##### \* Interaction HSP90 KD- kinases

L'analyse biochimique de la classe des protéines de choc thermique 90 KD chez les cellules de mammifères et de poulet indique que celles-ci sont associées avec plusieurs protéines différentes.

La première association a été observée avec le produit de l'oncogène SRC du virus du Sarcome de Rous (OPPERMAN *et al.*, 1981). Il est actuellement bien établi que le virus du sarcome, appartenant à la famille de rétrovirus, contient le gène SRC codant pour une protéine baptisée pp60<sup>v-src</sup> ; il s'agit d'une phosphoprotéine de poids moléculaire égal à 60 000 daltons qui possède l'activité tyrosine kinase, caractéristique commune aux enzymes codés par les oncogènes. Aujourd'hui, on sait que la phosphorylation des protéines constitue l'un des principaux moyens de contrôle du métabolisme lors de la croissance cellulaire. Par ailleurs, et fait surprenant après sa synthèse, la pp60<sup>v-src</sup> interagit spécifiquement avec deux protéines cellulaires, une phosphoprotéine de 50 KD et la protéine HSP 90 KD (BRUGGE *et al.*, 1981 ; OPPERMAN *et al.*, 1981). Le départ de l'HSP 90 KD du complexe trimoléculaire permet la phosphorylation d'une tyrosine de la pp60<sup>v-src</sup>,

favorisant son intégration dans la membrane plasmique où elle est activée comme une kinase (BRUGGE *et al.*, 1983 ; COURTNEIDGE *et al.*, 1982). D'autres produits d'oncogènes (yes, fps, fes, fgr) montrent le même mode d'interaction avec la protéine HSP 90 KD et la protéine 50 KD (ADKINS *et al.*, 1982 ; LIPSICH *et al.*, 1982 ; ZIEMIECKI *et al.*, 1986). Il est possible que l'interaction de l'HSP 90 KD avec les produits d'oncogènes joue un rôle encore imparfaitement exploré dans la transformation maligne. Dans l'état actuel des connaissances, les auteurs se limitent à attribuer à l'HSP 90 KD un rôle général de transport de ces complexes sous forme soluble et inactive.

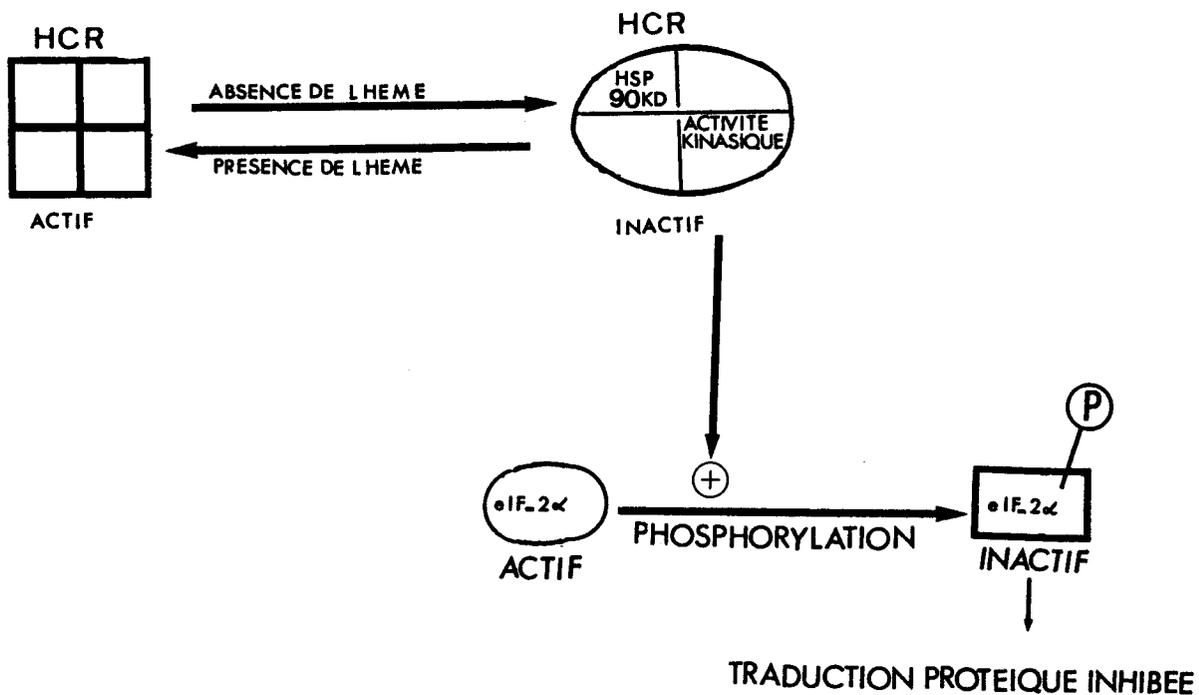
Quoi qu'il en soit, l'HSP 90 KD se trouve associée à d'autres kinases cellulaires. En effet, des préparations hautement purifiées de la kinase eIF-2 $\alpha$  contrôlée par l'hème, contiennent un composé majeur qui est l'HSP 90 KD (ROSE *et al.*, 1987, 1989). Le rôle de cette protéine dans cette association n'est pas non plus bien étayé. Néanmoins, et par opposition avec les tyrosines kinases, l'HSP 90 KD semble stimuler la kinase, augmentant de cette façon la phosphorylation de l'eIF-2 $\alpha$ , et par conséquent inhibant la synthèse protéique dans les lysats de réticulocytes selon le schéma de la figure 6.

D'autre part, ROSE *et al.*, 1987, 1989 ont mis en évidence l'interaction de l'HSP 90 KD avec d'autres kinases. Parmi celles-ci, la caséine kinase II où l'HSP cette fois-ci est montrée comme étant le substrat de cet enzyme *in vitro* voire même *in vivo* (LEES-MILLER & ANDERSON, 1989).

RETICULOCYTE DE LAPIN

La synthèse protéique est régulée par l'hème

Présence d'hème-----> Synthèse protéique favorisée  
Absence d'hème -----> Synthèse protéique inhibée



HCR : Heme-Controlled-Repressor  
Système enzymatique formé de plusieurs peptides dont l'HSP 90 KD et possédant une activité kinasique envers le facteur peptidique eIF-2α.

eIF-2α: Sous-unité 2α du facteur peptidique d'inhibition eucaryote.

FIGURE 6 : D'après ROSE et al., 1987, 1989.

\* Association HSP 90 KD - Actine F

Les propriétés de forme, d'organisation interne, et de mouvement que possède une cellule eucaryote, reposent sur des réseaux complexes de filaments protéiques situés dans le cytoplasme appelés cytosquelette cellulaire.

Les deux plus importants types de filaments du cytosquelette sont les filaments d'actine et les microtubules.

La concentration d'actine dans une cellule est extrêmement élevée. C'est l'unique raison pour laquelle toute protéine qui a tendance à se lier à l'actine, même faiblement, pourrait être trouvée, au moins temporairement, associée à l'actine, ou aux filaments d'actine, ou aux deux à la fois.

Dans cette optique, KOYASU *et al.*, 1986 ont mis en évidence pour la première fois une liaison de l'HSP 90 KD extraite de cellules de lymphomes de souris en culture avec l'actine filamenteuse (ou actine F) dans le cytosquelette du muscle de lapin.

De plus, une étude plus détaillée de la question par la même équipe (NISHIDA *et al.*, 1986) montre que la calmoduline possède une forte affinité pour l'HSP 90 KD de manière  $Ca^{++}$ -dépendante, si bien qu'elle est capable de déstabiliser le complexe HSP 90 KD-actine F. En outre ce phénomène semble être généralisé à d'autres tissus de mammifères (SANCHEZ *et al.*, 1988).

Si l'HSP jouait un rôle significatif dans le transport biologique des protéines comme par exemple la pp60<sup>v-src</sup> ou encore les récepteurs des hormones stéroïdiennes (PRATT *et al.*, 1989) à travers une interaction avec l'actine, la régulation de cette interaction par la calmoduline-Ca<sup>++</sup> serait une révélation importante.

\* Interaction HSP 90 KD-récepteurs des hormones stéroïdes

L'autre type d'association HSP 90 KD-protéine concerne les récepteurs des hormones stéroïdiennes. Tous les récepteurs d'hormones stéroïdes étudiés jusqu'à présent (récepteurs des oestrogènes, de la progestérone et des glucocorticoïdes) peuvent être isolés à l'état inactivé, en absence de l'hormone (SHERMAN *et al.*, 1983). Ces complexes sont constitués, outre la protéine liant l'hormone, de protéines 90 KD qui sont actuellement identifiées, comme étant une HSP 90 KD.

Cette association fut au départ suspecte en raison de l'abondance de l'HSP 90 KD et de son large excès dans la cellule par rapport à la protéine liant l'hormone. L'universalité de cette association est désormais bien acquise.

L'objet du chapitre suivant portera donc sur l'état actuel des connaissances acquises sur le récepteur des glucocorticoïdes et son interaction avec l'HSP 90 KD.

Mais nous ne pouvons oublier de mentionner des applications qui ont été faites au sujet du choc thermique, à savoir :

## 1.6 - Applications biotechnologiques et cliniques du choc thermique.

### \* Applications biotechnologiques

La compréhension au niveau moléculaire des effets du choc thermique et de la thermotolérance peut être d'une importance biotechnologique considérable.

Le choc thermique induit une tolérance vis-à-vis d'un autre choc thermique. Il conduit également à une augmentation de la tolérance contre d'autres stress. C'est le cas chez la levure où un choc thermique accroît de façon considérable sa tolérance ultérieure vis-à-vis de l'éthanol (WATSON & CAVICCHIOLI, 1983).

Par ailleurs, le choc thermique est utilisé dans la synchronisation des cellules en culture (ZEUTHEN, 1971).

### \* Applications cliniques

On sait que le pouvoir cytotoxique de l'hyperthermie fait l'objet actuellement d'applications médicales dans le traitement du cancer (HAHN, 1982). Mais par malchance, le développement de la thermotolérance constitue une entrave à son application (GERWICK, 1985). Les efforts portent actuellement sur l'emploi d'agents chimiques comme le benzaldéhyde dans le but d'éliminer le développement de la thermotolérance et d'accroître le pouvoir cytotoxique de l'hyperthermie.

## 2 - LES RECEPTEURS DES HORMONES GLUCOCORTICOIDES

### 2.1 - Mécanisme d'action (voir figure 7)

Du lieu de la biosynthèse jusqu'à la cellule cible, le stéroïde est transporté par des protéines sériques. Après pénétration cellulaire, vraisemblablement par diffusion simple du stéroïde (MILGROM *et al.*, 1973 ; ALLERA *et al.*, 1980), celui-ci se lie à une structure protéique nommée récepteur qui est capable de recevoir et de répondre au message hormonal. Le complexe hormone-récepteur ainsi formé subit une étape de transformation ou encore d'activation qui permet sa translocation (ou passage) vers le noyau cellulaire où il exerce un effet au niveau des régions spécifiques de la chromatine. Cette action aboutit à la mise en jeu de la synthèse des protéines le plus souvent enzymatiques.

### 2.2 - Localisation cellulaire des récepteurs stéroïdiens

Le problème de la localisation cellulaire du récepteur en présence ou non d'hormone reste discuté : est-il cytoplasmique ou nucléaire ?

Trois modèles ont été décrits dans la littérature :

- Le premier modèle qui semble communément admis, est cytoplasmique. Il se déroule en deux étapes : une première étape de fixation dans le cytoplasme de l'hormone sur le récepteur, et une deuxième durant laquelle il y a translocation du complexe ainsi formé vers le noyau cellulaire (ROUSSEAU *et al.*, 1983).

- Le second modèle décrit par SHERIDAN *et al.*(1979) est dit à l'équilibre. Les auteurs supposent que la distribution du récepteur

MECANISME D'ACTION DES HORMONES GLUCOCORTICOIDES  
AU NIVEAU DES CELLULES CIBLES

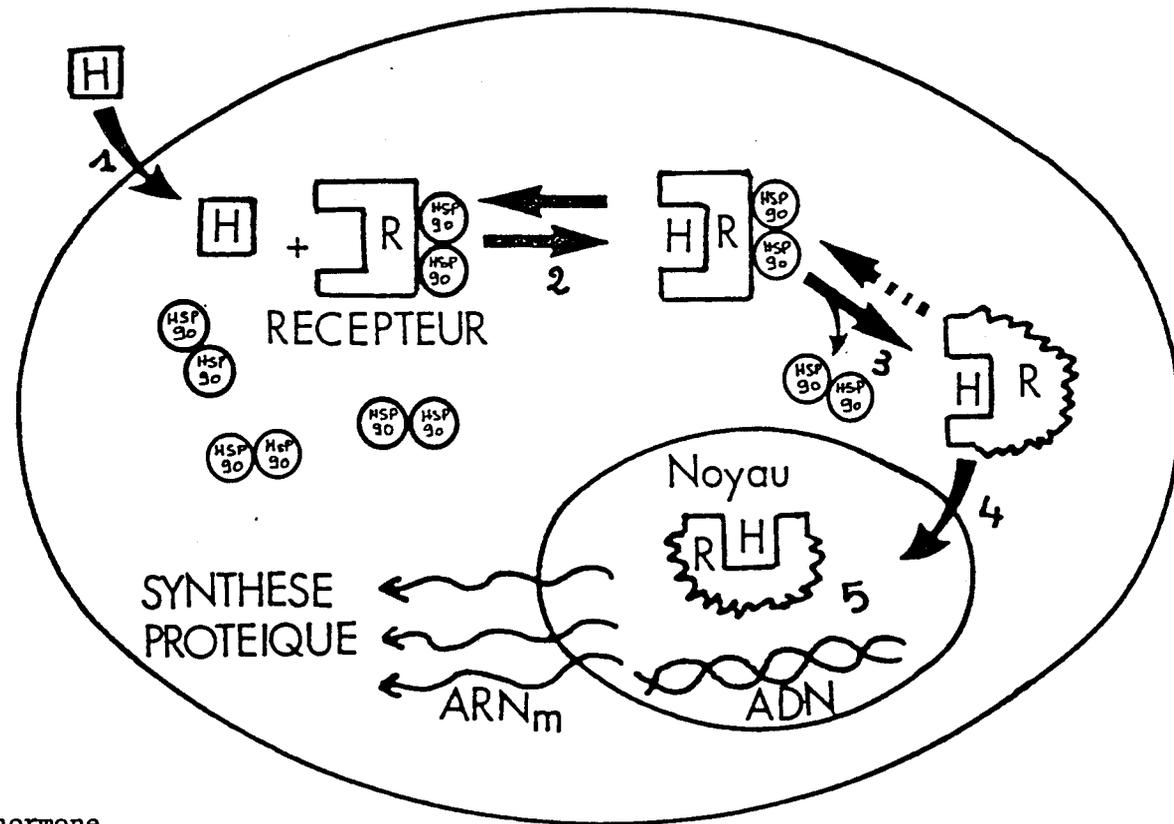


Figure 7 -

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 cellulaire

libre ou lié au niveau du cytoplasme est la même qu'au niveau du noyau et que cet équilibre pourra être rompu accidentellement par une homogénéisation tissulaire.

WELSHONS *et al.* (1984), KING et GREENE (1984) dans leurs récentes études sur la question proposent un troisième modèle nucléaire selon lequel le cytosol qui est surnageant de l'ultracentrifugation d'un homogénat cellulaire total n'est pas pour autant une fraction cytosoluble, et que la localisation initiale en absence d'hormone est nucléaire. Cela est démontré pour les récepteurs des oestrogènes (ER) et de la progestérone (PR) par deux techniques différentes :

- la technique d'énucléation cellulaire à la cytochalasine B qui a la propriété d'isoler les "nucléoplastes" des "cytoplastes" (WELSHONS *et al.*, 1984).

- et la technique d'immunocytochimie à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-récepteur des oestrogènes (KING et GREENE, 1984). Pour les hormones glucocorticoides (GR) les deux techniques pratiquées sur le foie de rat (GOVINDAN et MANZ, 1980) et sur des cellules humaines (PAPAMICHAIL *et al.*, 1980) donnent des résultats contradictoires.

Lors d'une étude comparative récente réalisée par immunohistochimie entre les GR et PR de tissus de poulet et de rat, GASC *et al.*, 1989 proposent une localisation nucléaire du GR avec ou sans hormone. Mais celui-ci apparaît moins lié aux structures nucléaires que le récepteur de la progestérone.

### 2.3 - Transformation

Le complexe hormone-récepteur une fois formé, subit un processus de transformation (ou d'activation), avant sa translocation (ou passage) vers le noyau cellulaire, où il déclenche l'effet biologique, à savoir la réponse cellulaire sous forme d'induction ou de répression de la synthèse des protéines. Le phénomène de transformation aussi bien *in vivo* que *in vitro* est résumé comme suit : apparition dans un premier temps d'une entité incapable de lier l'ADN et dans un second temps conversion de cette entité en une entité capable de lier l'ADN (MUNCK et FOLEY, 1979 ; MARKOVIC *et al.*, 1980 ; ANTAKLY et EISEN, 1984).

#### 2.3.1 - Transformation *in vitro*

Pour assurer sa stabilité, après le sacrifice de l'animal, le récepteur cytosolique est obtenu dans un tampon de faible force ionique et maintenu à 0°C. Une élévation de température, généralement 25°C pendant 30 min, induit la transformation du récepteur préincubé avec l'hormone (BAILLY *et al.*, 1978). Egalement, toute augmentation de la force ionique (par adjonction de sels de sodium ou de potassium) donne le même effet même en absence de l'hormone et à basse température (YANG *et al.*, 1982).

CAKE *et al.*, 1978 ; SATO *et al.*, 1980 mettent en évidence l'augmentation de la transformation entraînée par la dilution, la gel-filtration ou encore un abaissement de la concentration du récepteur (dialyse).

Par ailleurs, la littérature décrit certains facteurs comme inhibiteurs de la transformation. Au premier rang figure la famille des oxyanions des métaux de transition du groupe VI, tels que les ions tungstate, vanadate et surtout le molybdate qui inhibe curieusement et réversiblement la transformation à la concentration de 10 mM (DAHMER *et al.*, 1984). La biologie moléculaire de l'action du molybdate de sodium est encore hypothétique. Pour SHERMAN *et al.*, 1983 celui-ci exerce indirectement un effet sur le récepteur. Hypothèse qui est totalement controversée par GRANDICS *et al.* (1984), IDZIOREK *et al.* (1985) qui reconnaissent une action directe du molybdate sur le récepteur hautement purifié. Ceci conforte les travaux de PRATT (1987) expliquant que l'action stabilisatrice du molybdate sur le récepteur non transformé passe par la formation d'un complexe entre cet ion métallique et des résidus de cystéine.

La transformation reste un phénomène très complexe. Voici en résumé les caractéristiques fondamentales qui lui sont liées:

i - Le coefficient de sédimentation ( $S_{20,w}$ ) en gradient de sucrose passe de la valeur 8-10 S pour le complexe glucocorticoïde-récepteur non transformé à la valeur 4S pour le complexe transformé (ALEXIS *et al.*, 1983 ; HOLBROOK *et al.*, 1984 ; SABLONNIERE *et al.*, 1986).

ii - En général, le complexe hormone-récepteur transformé devient très acidophile, se liant aux noyaux isolés et à des supports de type DNA-cellulose, sans doute par exposition des résidus d'acides aminés basiques (lysyl, arginyl) (SIMONS *et al.*, 1979). Son point isoélectrique semble augmenté (DANZE *et al.*, 1987, BEN-OR et CHRAMBACH, 1983).

Une fonction thiol au moins serait nécessaire à la transformation (BLICQ *et al.*, 1988 ; BODWELL *et al.*, 1984).

### 2.3.2 - La transformation *in vivo*

Des études menées sur des tissus et des cellules intactes démontrent la réalité de la forme 8S des récepteurs en absence d'hormone (HOLBROOK *et al.*, 1983 ; MENDEL *et al.*, 1986 et 1987) par plusieurs méthodologies :

- l'utilisation du RU 486 (antiglucocorticoïde), reconnu pour stabiliser le récepteur sous sa forme non transformée (LEFEBVRE *et al.*, 1988a).
- le marquage des protéines (MENDEL et ORTI, 1988 ; HOWARD et DISTELHORST, 1988a).
- l'utilisation d'agents de couplage des protéines (REXIN *et al.*, 1988).

Dans la mesure où la reconstitution du récepteur non transformé à partir de récepteur transformé n'a pu être réalisée *in vitro*, la réversibilité de la transformation *in vivo* reste une notion discutable et discutée : en effet, RAAKA et SAMUELS (1983), proposent un modèle réversible, alors que MUNCK et HOLBROOK, 1984 développent un modèle cinétique postulant l'irréversibilité de la transformation.

#### 2.4 - Interaction du récepteur avec les constituants du noyau.

Des expériences réalisées sur les cellules HTC (cellules d'hépatome de rat en culture) (BLOOM *et al.*, 1980) et sur les thymocytes de souris (DAUSSE *et al.*, 1977) ont montré qu'il existe une relation entre le taux d'occupation des récepteurs des glucocorticoïdes et la réponse biologique (induction de la tyrosine aminotransférase (TAT) ou inhibition de l'incorporation de l'uridine).

D'autre part, les cellules HTC infectées par le virus de tumeur mammaire de souris (MMTV), et en présence des hormones glucocorticoïdes, synthétisent des ARN messagers dont le taux d'expression est de 10 fois le taux de base (RINGOLD *et al.*, 1977). Au vu de ces observations, plusieurs auteurs se sont penchés sur l'étude de l'interaction du complexe récepteur-glucocorticoïde avec l'ADN et ont choisi comme modèle d'induction de la transcription le MMTV. Ce dernier, comme les autres rétrovirus, possède de part et d'autre de la région codante deux régions LTR (Longue région Terminale Répétée) (GRONER *et al.*, 1983 ; RINGOLD, 1984). La méthodologie de construction d'ADN recombinant, suivie de transfection, a permis de localiser dans le fragment LTR une séquence indispensable au contrôle de la transcription du provirus par les glucocorticoïdes et d'autres stéroïdes (HYNES *et al.*, 1983 ; PAYVAR *et al.*, 1982, 1983). Cette séquence est définie alors comme l'Elément de Réponse aux Hormones (HRE) (PONTA *et al.*, 1985). Cette séquence a été identifiée par des expériences de transfection cellulaire, et s'est révélée capable de conférer une inductibilité hormonale à des promoteurs hétérologues (CHANDLER *et al.*, 1983).

La séquence des sites de régulation sensibles aux glucocorticoides "GRE" apparaît hautement conservée dans différents gènes provenant de différentes espèces (homme, rongeur, poulet). Tous ces sites lient le récepteur des glucocorticoides du rat et présentent une homologie de séquence baptisée séquence "Consensus". Celle-ci comporte le motif hexanucléotidique TGTCTC retrouvé dans 90 % des séquences examinées. La synthèse de cette séquence hautement spécifique du récepteur des glucocorticoides constitue un moyen pour la purification de celui-ci. Selon WRANGE *et al.* (1986), la stoechiométrie de l'interaction serait de une molécule de récepteur par site de liaison.

#### 2.5 - Etude structurale du récepteur

La difficulté de cette étude réside dans l'instabilité et la faible concentration cellulaire du récepteur dans les tissus animaux les plus riches et accessibles tels que le foie ou le thymus de rat.

Plusieurs apports ont été réunis pour élucider cette structure :

- le développement de techniques rapides d'analyse comme la chromatographie d'exclusion de taille en mode haute performance, et le gradient de sucrose sur tubes verticaux.
- la synthèse de stéroïdes tritiés et la purification du récepteur par chromatographie d'affinité.
- la production d'anticorps anti-récepteurs.
- et enfin l'existence de souches cellulaires mutantes de souris fabriquant un récepteur tronqué (mutant nt<sup>i</sup>) (voir figure 16B)

### 2.5.1 - Récepteur non transformé

#### - Propriétés biochimiques

Grâce à l'effet inhibiteur du molybdate sur la transformation, le récepteur non transformé, analysé en chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose, est élué à une force ionique de 0,20-0,25 M KCl (SCHMIDT *et al.*, 1980 ; NORRIS et KOHLER, 1981). Par contre, sur les supports échangeurs de cations tels que DNA-cellulose, phosphocellulose, ou encore carboxyméthyl-sephadex, le récepteur non transformé n'est pas retenu (MILGROM *et al.*, 1973 ; KALIMI *et al.*, 1975).

L'ensemble de ces résultats montre que le récepteur non transformé possède un caractère basophile ; en effet, le point isoélectrique de celui-ci est compris entre 4 et 6 (MIDDLEBROOK et ARONOW, 1977 ; DANZE *et al.*, 1987).

#### - Caractéristiques physicochimiques

Elles sont obtenues pratiquement par deux techniques :

- la chromatographie de tamisage moléculaire qui mesure le rayon de Stokes et le gradient de sucrose donnant le coefficient de sédimentation. la masse moléculaire réelle ainsi que les paramètres de taille (rapport axial, rapport de friction) sont obtenus par calcul (SIEGEL et MONTY, 1966 ; SHERMAN, 1975).

Les premières caractérisations du récepteur non transformé ont été faites sur des préparations cytosoliques. Cependant, la purification de celui-ci, stabilisé par le molybdate (GRANDICS *et al.*, 1984a ; LUSTENBERGER *et al.*, 1985 ; IDZIOREK *et al.*, 1985) a contribué d'une manière décisive à sa caractérisation. Dans le tableau III figurent les

paramètres physicochimiques qui distinguent le récepteur des glucocorticoides non transformé de sa forme transformée. Notons que ces mêmes caractéristiques du récepteur des glucocorticoides non transformé sont observées en absence de molybdate (SABLONNIERE *et al.*, 1987) et également par le récepteur d'autres hormones stéroïdiennes (NIU *et al.*, 1981 ; REDEUILH *et al.*, 1981 ; COLVARD et WILSON, 1981).

La constante de sédimentation élevée (9,0 à 9,5 S) du récepteur non transformé et son rayon de Stokes important (7 à 8 nm) ne sont pas compatibles avec une structure monomérique.

Deux modèles proposés dans la littérature par SHERMAN *et al.*, 1983 et VEDECKIS, 1983b suggèrent que le récepteur non transformé serait un oligomère comportant plusieurs sous-unités dont la dissociation conduit à la forme transformée. Malheureusement les deux modèles ne tranchent pas entre une structure oligomérique où le récepteur serait constitué de l'assemblage de sous-unités liantes identiques, et une structure oligomérique où divers facteurs protéiques ou non seraient associés à une seule sous-unité liante.

Nous verrons dans le chapitre 2.6 que c'est la deuxième hypothèse qui est retenue depuis 1985. Ainsi, le récepteur non transformé de haut poids moléculaire comprend, en plus de la sous-unité liant l'hormone, une ou deux molécules non liantes (voir paragraphe 2.7.2) de protéine de choc thermique HSP 90 KD que perd le complexe hormone-récepteur au cours de la transformation (MENDEL *et al.*, 1986).

TABLEAU III - Comparaison des caractéristiques hydrodynamiques du récepteur des glucocorticoïdes sous formes non transformée et transformée

SOURCE	$S_{20,w}$	$R_s$ (nm)	$M_r$ (KDa)	F/Fo	Rapport axial a/b	Références
<b>*A</b>						
Foie de rat	9,2-9,6	7,8-8,2	300-320	1,6-1,7	11-12	SHERMAN et al. (1982, 1983)
Foie de rat	9,4	7,3	300	1,64	12	GRANDICS et al. (1984)
Foie de rat	9,4	7,0	280	1,50	9	IDZIOREK et al. (1985)
Foie de lapin	9,0	6,3	235	1,42	7	LUSTENBERGER et al. (1985)
Cellules AtT20 (tumeur pitui- taire de souris)	9	8,3	317	1,70	14	VEDECKIS (1981, 1983b)
<b>*B</b>						
Foie de rat	3,5-4,0	9,3-6,0	86-92	1,65-1,85	13-17	WRANGE et al. (1979)
Cellules AtT20	3,8	5,8	94	1,80	15	VEDECKIS (1983b)

\*A : Récepteur non transformé

\*B : Récepteur transformé

### 2.5.2 - Récepteur transformé

#### - Propriétés biochimiques

Sa purification à partir de foie de rat a fait l'objet d'une thèse dans notre laboratoire BELAHSEN, 1987). Cette forme transformée du récepteur est obtenue couramment par élévation de la température (généralement 30 minutes à 25°C) le pic d'élution du récepteur transformé sur DEAE-cellulose est plus faible (0,06 à 0,10 M KCl) que le récepteur non transformé (SAKAUE et THOMPSON, 1977 ; SCHMIDT *et al.*, 1980). Il possède un caractère acidophile, ainsi qu'en témoignent sa rétention sur les supports échangeurs de cations (MILGROM *et al.*, 1973 ; KALIMI *et al.*, 1975) et son point isoélectrique allant jusqu'à la valeur 7 (MIDDLEBROOK et ARONOW, 1977 ; DANZE *et al.*, 1987).

#### - Caractéristiques physicochimiques

Celles-ci sont résumées dans le tableau III et comparées à celle du récepteur non transformé.

### 2.6 - Structure fonctionnelle du polypeptide liant l'hormone

La notion d'organisation en domaines fonctionnels des récepteurs stéroïdiens est le fruit d'une combinaison de nombreux résultats d'ordre biochimique, obtenus directement à partir de la protéine réceptrice, et d'ordre génétique en interrogeant la séquence complète du cDNA codant pour le récepteur et en étudiant les propriétés fonctionnelles de toute une série de récepteurs recombinants mutés.

### 2.6.1 - Etude biochimique

Le récepteur des glucocorticoides soumis à des expériences de protéolyses ménagées, soit par la trypsine, soit par la chymotrypsine, donne des fragments de tailles différentes. L'étude des propriétés physicochimiques (poids moléculaire, coefficient de sédimentation, rayon de Stokes, point isoélectrique) et immunologiques de ces fragments montre deux formes de protéolyse bien définies. Nous distinguons :

- une forme a, de grande taille moléculaire engendrée par l'hydrolyse chymotrypsique, largement documentée par de nombreux auteurs (CARLSTEDT-DUKE *et al.*, 1977 ; MIDDLEBROOK et ARONOW, 1977 ; WRANGE, 1978 ; VEDECKIS, 1983a ; REICHMAN, 1984) ayant un rayon de Stokes de 3 à 4 nm et un coefficient de sédimentation entre 3,2 et 4,0 S ; cette forme a un poids moléculaire allant jusqu'à 53 KD et possède la propriété de se lier à la fois aux noyaux isolés et au stéroïde.

- une forme b, de petite taille moléculaire obtenue par hydrolyse trypsique conservant uniquement la capacité de lier le stéroïde, d'où son nom de méro-récepteur (voir figure 16 c) (SHERMAN *et al.*, 1978 ; WRANGE et GUSTAFSSON, 1978 ; WRANGE *et al.*, 1984). L'estimation du poids moléculaire de ce méro-récepteur, basée sur l'étude de ces caractéristiques physicochimiques, indique une masse allant de 20 à 30 KD. Cette forme se trouve fréquemment dans les cellules riches en

endopeptidase comme la calpaine, ou encore des métallo-enzymes calcium-dépendants (VEDECKIS *et al.*, 1983a ; KALIMI *et al.*, 1983 ; BODWELL *et al.*, 1985). Notons enfin que le traitement par la trypsine du récepteur des glucocorticoides du rat en présence du molybdate génère aussi une entité liant le stéroïde de masse moléculaire égale à 27 KD et que ce fragment reste associé avec l'HSP 90 KD, ce qui laisse penser que cette région comprend deux parties, dont l'une lie le stéroïde et l'autre l'HSP 90 (voir chapitre 3.5).

#### 2.6.2 - Etude immunologique

Ces dernières années, divers anticorps monoclonaux et polyclonaux ont été produits contre les récepteurs des glucocorticoides de rat (OKRET *et al.*, 1981 ; WESTPHAL *et al.*, 1982 ; GRANDICS *et al.*, 1982 ; GAMETCHU *et al.*, 1984), aussi contre le récepteur humain (EISEN *et al.*, HARMON *et al.*, 1984). Ils ont servi à l'étude de la structure réelle du récepteur, et à la caractérisation des formes de protéolyse (formes a et b) ; en effet, mis à part l'anticorps monoclonal de GAMETCHU qui reconnaît un épitope situé au voisinage du site de liaison à l'ADN (EISEN *et al.*, 1985), aucun anticorps ne reconnaît les formes de protéolyse a et b. Par contre, la plupart d'entre eux réagissent avec le fragment manquant du récepteur partiellement protéolysé par la chymotrypsine donnant la forme a, cela est justifié par la découverte (DELLWEG *et al.*, 1982 ; GEHRING *et HOLTZ*, 1983), dans des cellules mutantes (nt<sup>i</sup>) (nuclear transfer increasead) de lymphomes de souris, d'un récepteur anormal dépourvu de ce fragment, d'une masse de 40 Kd ne

réagissant pas avec ces anticorps anti-récepteurs et qui serait constitué seulement des domaines A et B (voir figure 8A).

### Conclusion

L'ensemble de ces résultats a conduit plusieurs auteurs (VEDECKIS *et al.*, 1985 ; GUSTAFSSON *et al.*, 1986) à proposer un modèle d'organisation en domaines fonctionnels du polypeptide de masse 94 KD, constituant la forme transformée du récepteur des glucocorticoides (voir figures 8A et 8B). Ainsi, le récepteur serait donc constitué de trois domaines fonctionnels bien définis :

- le domaine A comprenant le site de liaison à l'hormone
- le domaine B ayant le site de liaison au DNA
- et un domaine C au rôle inconnu, mais qui présente une forte antigénicité.

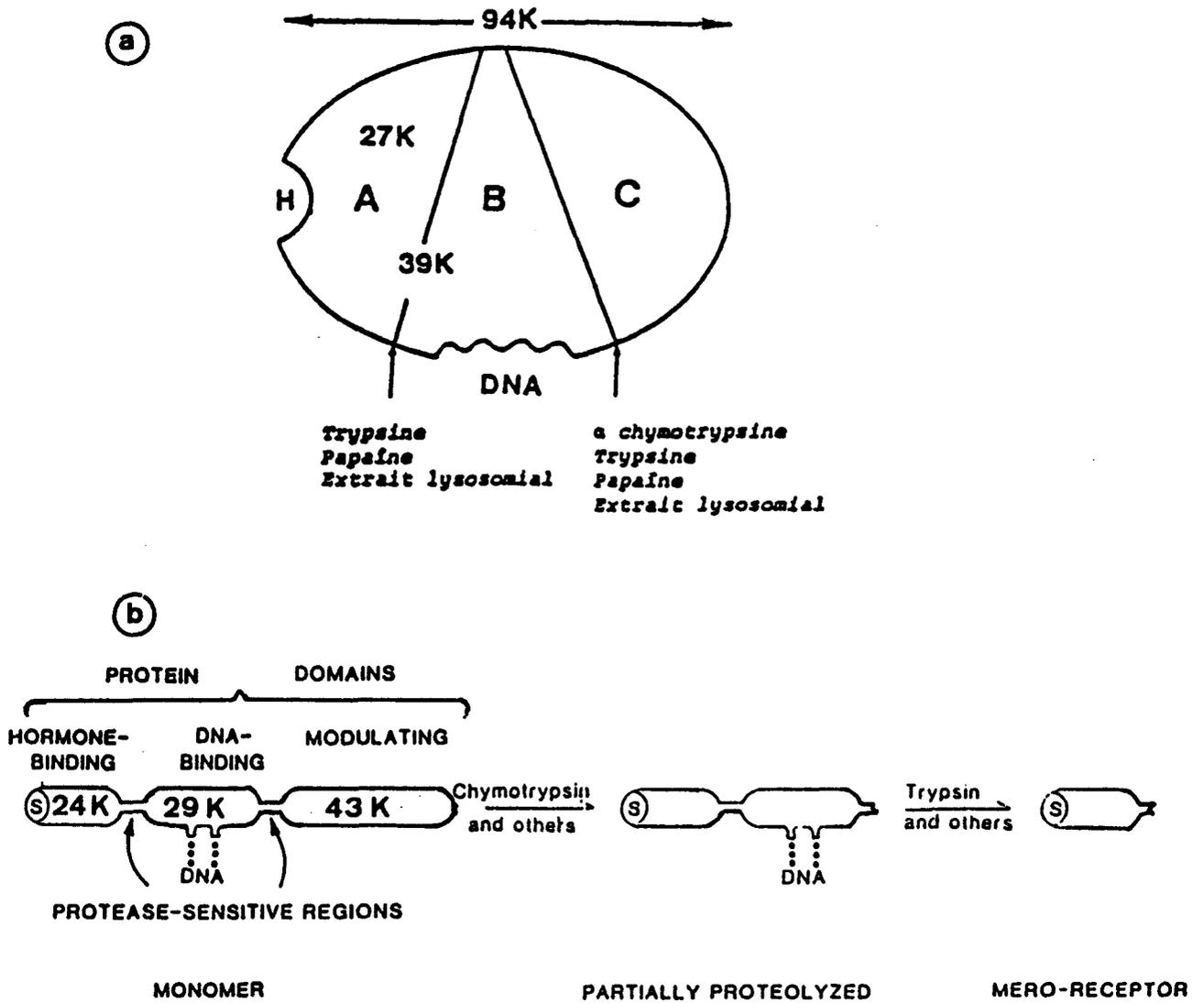
Quoiqu'il s'agisse d'un modèle simple, nous verrons dans le chapitre suivant qu'il s'accorde de manière satisfaisante avec les résultats de la biologie moléculaire.

#### 2.6.3 - *Etude génétique*

Le recours à la biologie moléculaire apparaissait encore plus nécessaire pour des protéines comme le récepteur des glucocorticoides qui existe en très faibles quantités dans la cellule cible.

Dans cette optique, de remarquables progrès ont été accomplis ces dernières années afin d'élucider le rôle des différents domaines du récepteur.

Cela est rendu possible par :



**Figure 8** - Modèles d'organisation en domaines du récepteur des glucocorticoïdes selon

(a) GUSTAFSSON et al., 1986

(b) VEDECKIS et al., 1985

- la détermination de la séquence nucléotidique d'ADN complémentaire (cDNA) codant pour le récepteur des glucocorticoides de l'homme (HOLLENBERG *et al.*, 1985), de rat (MIESFELD *et al.*, 1986) et de la souris (DANIELSON *et al.*, 1986), également pour les cDNA codant pour les autres récepteurs stéroïdiens.

- l'obtention de différents types de récepteurs provenant de différents mutants.

Les résultats découlant de ces études permettent de distinguer quatre régions communes aux récepteurs stéroïdiens. Celles-ci sont discutées ci-dessous de la partie N-terminale vers la partie C-terminale du récepteur (GIGUERE *et al.*, 1986 ; HOLLENBERG *et al.*, 1987) (voir figure 9).

#### 1. Domaines N-terminaux (A et B)

Il s'agit d'une région peu conservée parmi les différentes classes de récepteurs. Néanmoins, son degré important d'hydrophilie peut expliquer la variété des anticorps polyclonaux dirigés contre elle (WRANGE *et al.*, 1978 ; CARLSTEDT-DUKE *et al.*, 1977 et 1982). Quoique le rôle exact de ce domaine reste inconnu, certains travaux (GIGUERE *et al.*, 1986 ; MIESFELD *et al.*, 1987) ont souligné son effet modulateur sur l'activation de la transcription du récepteur, ainsi qu'en témoigne l'absence d'une telle activité chez les mutants nt<sup>1</sup> dépourvus de cette région (YAMAMOTO *et al.*, 1976).

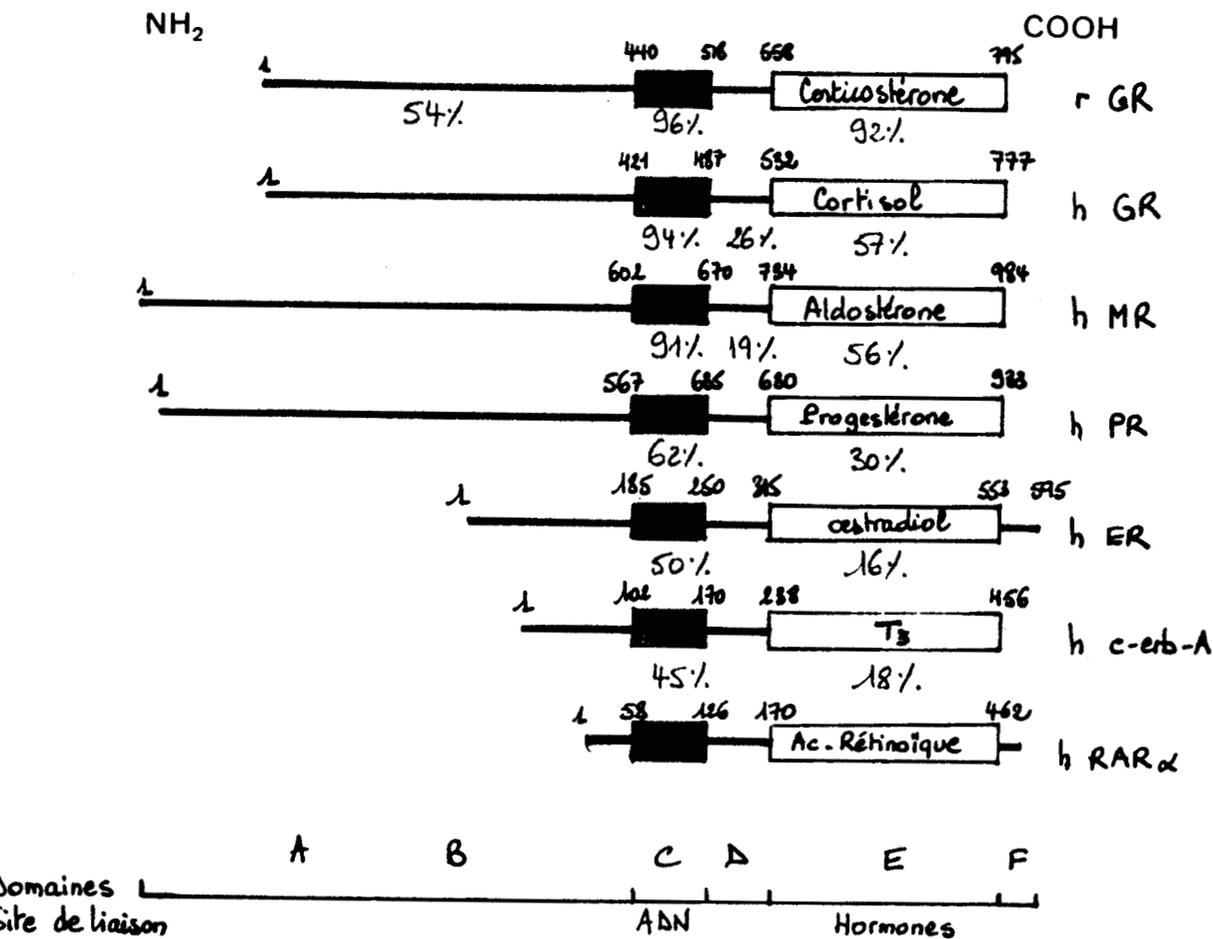


Figure 9 - Homologies de séquence entre les récepteurs des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. Cette figure décrit l'alignement des séquences d'acides aminés déduites de l'ADNc des gènes codant pour les récepteurs des glucocorticoïdes humains (hGR), qui sert de référence, de rat (rGR), des minéralocorticoïdes humains (hMR), de la progesterone humain (hc-erb-A) et de l'acide rétinoïque humain (hRAR). Les pourcentages d'homologies par rapport au hGR sont indiqués pour chaque récepteur.

## 2. *Domaine C*

C'est une région caractéristique des récepteurs stéroïdiens et thyroïdiens. Elle comporte 66 acides aminés, dont énormément de résidus cystéinyls, arginyls et lysyls (WEINBERGER *et al.*, 1985). Cette région qui constitue le domaine de liaison à l'ADN est susceptible de former deux "doigts à zinc". En effet, au cours de l'étude du facteur de transcription TFIIIA chez un amphibien, le xénope, MILLER *et al.*, 1985 ont montré l'existence de séquences similaires et répétitives capables de reconnaître des séquences spécifiques d'ADN et de s'y fixer.

L'analyse de ces séquences montre que celles-ci comportent une paire de cystéines (CYS) et une paire d'histidines (HIS) à des positions invariantes suivant la séquence consensus :

TYR PHE X CYS X<sub>2-4</sub> CYS X<sub>3</sub> PHE X<sub>5</sub> LEU X<sub>2</sub> HIS X<sub>3</sub> HIS X<sub>2-6</sub>

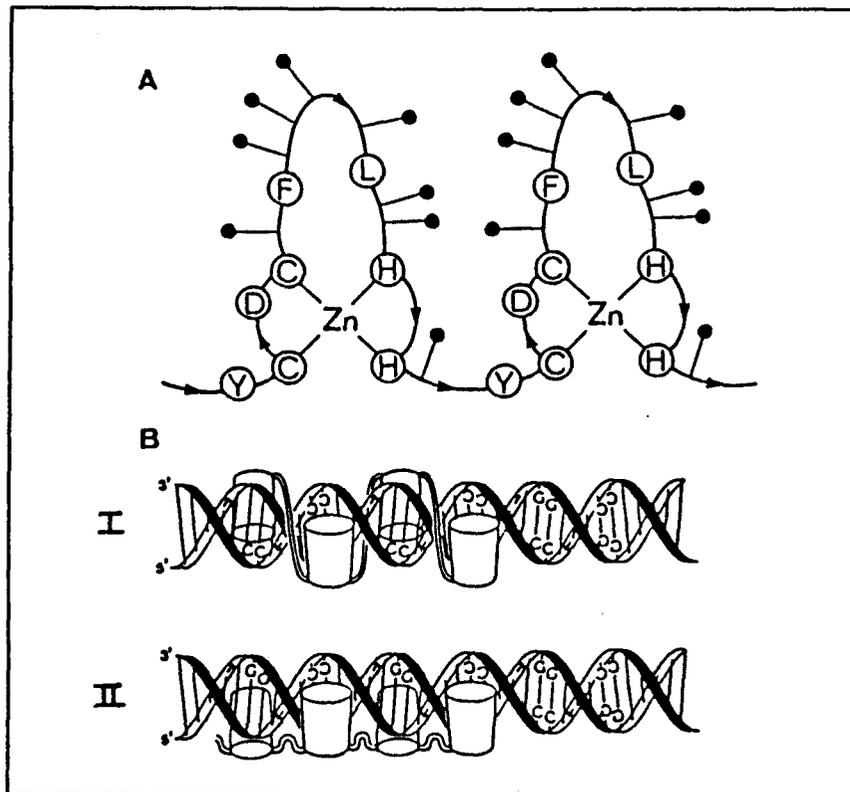
où X représente n'importe quel acide aminé.

En présence de zinc, ces segments forment des boucles de "doigts à zinc", impliquant les deux CYS et les deux HIS et un atome de zinc dans une liaison coordonnée tétrahédrique (voir figure 10-A).

Des expériences semblables ont été mises en évidence par la suite chez de nombreuses protéines liant l'ADN, parmi celles-ci les récepteurs des hormones stéroïdes où une deuxième séquence consensus a été caractérisée dans le domaine C :

CYS X<sub>2</sub> CYS X<sub>13</sub> CYS X<sub>2</sub> CYS.

Ici, la cystéine remplace l'histidine.



**Figure 10** - Protéines dactyles et modèle de leur interaction avec l'ADN.

En 10A sont représentés, selon MILLER *et al.*, 1985 deux "doigts" protéiques stabilisés par des liaisons de coordination entre un atome de zinc d'une part, 2 cystéines (C) et 2 histidines (H) d'autre part. Ces doigts sont constitués au niveau d'éléments répétitifs contenant, outre les cystéines et histidines invariantes, des acides aminés acides (D = acide aspartique) et hydrophobes (F = phénylalanine, L = leucine, y = tyrosine). Les points noirs indiquent les contacts probables avec l'ADN.

La figure 10B présente, selon FAIRALL *et al.* (1986) deux modèles possibles d'interaction entre le facteur TF IIIA et l'ADN. Les doigts sont représentés par les cylindres. Selon le modèle I, la protéine est enroulée le long d'un des brins d'ADN. Selon le modèle II, la protéine est parallèle au double brin, les doigts établissant des contacts alternativement sur l'une et l'autre face du double brin.

Selon GREEN et CHAMBON, 1988, il existe deux sous-régions C1 et C2 des récepteurs stéroïdiens dans le domaine C, répondant chacune à la séquence consensus (GREEN *et al.*, 1988).

D'après les mêmes auteurs, c'est la région C1 qui détermine la spécificité de reconnaissance des éléments Enhancer d'ADN nommés couramment HRE (Eléments de Réponse aux Hormones). Par la suite, MADER *et al.*, 1989, démontrent de façon remarquable par mutagénèse dirigée que la sous-région C1 comprend dans sa partie C-terminale 3 acides aminés capables de distinguer un ERE d'un GRE, alors que la sous-région C2 jouerait un rôle plutôt fonctionnel dans la transcription.

On ignore les modalités précises de l'interaction "doigts à zinc"-ADN. Néanmoins, FAIRALL *et al.*, 1986 proposent deux modèles possibles d'interaction entre TFIIIA et l'ADN (voir figure 10-B).

Au vu de cette remarquable organisation (en boucles à zinc) du domaine C des récepteurs stéroïdiens, l'existence d'un élément extérieur préservant la fonctionnalité du récepteur en absence d'hormone est probable. A ce propos, l'HSP 90 KD qui est associée généralement aux récepteurs stéroïdiens, semble être un bon candidat pour interagir avec le domaine C (BINART *et al.*, 1989) (voir plus loin).

### 3. *Domaine D*

Il s'agit d'une région hydrophile, peu conservée chez les différents récepteurs stéroïdiens et thyroïdiens. C'est une zone charnière qui sépare le domaine C du domaine E (comprenant le site de liaison au stéroïde). La position stratégique de cette région permet de penser que celle-ci sert d'intermédiaire pour transmettre le message hormonal du

domaine E au domaine C (GIGUERE *et al.*, 1986). "Ainsi, ce dernier domaine quitterait l'HSP 90 pour interagir avec l'ADN".

#### 4. *Domaine E*

C'est un domaine des récepteurs ayant la capacité de lier le stéroïde. Cela a été clairement rapporté par plusieurs arguments indépendants : d'une part, les études biochimiques de protéolyse des récepteurs (voir paragraphe 2.6) et d'autre part la construction de mutants (GIGUERE *et al.*, 1987 ; RUSCONI et YAMAMOTO, 1987) où l'introduction de mutation dans ce domaine abolit la capacité des récepteurs à lier les stéroïdes. A cela s'ajoute l'identification de cystéines indispensables à la liaison des stéroïdes. C'est le cas du résidu cystéinyl 656 du récepteur des glucocorticoides de rat, réagissant spécifiquement avec le mésylate de dexaméthasone, marqueur covalent du site de liaison des glucocorticoides (SIMONS *et al.*, 1987a, b).

Par ailleurs, et fait surprenant, HOLLENBERG *et al.* (1987) obtiennent un mutant dont la région C est délétée et qui induit la transcription même en absence d'hormone. Ces résultats, ajoutés à d'autres résultats d'ordre biochimique (DENIS *et al.*, 1988a), témoignent de l'existence d'une seconde séquence d'acides aminés dans le domaine E impliquée dans l'interaction du récepteur avec l'HSP 90 KD (voir paragraphe 3.5).

## 2.7 - Structure quaternaire du récepteur transformé

L'hypothèse d'une structure hétérooligomérique du récepteur non transformé est démontrée par deux arguments indépendants, mais combien convaincants :

- d'une part, ce sont les travaux de GEHRING et ARNDT, 1985 menés sur des cellules mutantes  $nt^i$  (nuclear transfer increased) de lymphomes de souris, parallèlement aux cellules du type sauvage S49.1 (GEHRING, 1980, YAMAMOTO *et al.*, 1976 ; GEHRING et HOLTZ, 1983).

Voici présentés dans le tableau suivant les paramètres physicochimiques de deux types de récepteurs sous la forme transformée ou non.

TABLEAU IV

Type du récepteur	R <sub>s</sub> (A)	S <sub>20,w</sub> (S)	*RNT Mr (KDa)	*RT Mr (KDa)
Type sauvage natif	81 ± 1	9,5 ± 0,3	325	94
Type sauvage (traité à la chymotrypsine)	69 ± 2	10,0 ± 0,2	291	39,6 ± 3
Type mutant (natif)	71 ± 1	9,5 ± 0,5	285	40

\*RNT : récepteur non transformé

\*RT : récepteur transformé

L'action de la chymotrypsine fait chuter le poids moléculaire de l'unité de liaison de 94 KDa à 40 KDa chez la souche sauvage, ceci n'est compatible avec la différence (320 - 290 KD) que s'il n'existe qu'une seule sous-unité liante.

D'autre part, des études d'ordre immunologique (OKRET *et al.*, 1985) ont conduit à la même conclusion. L'emploi d'un anticorps (IgG, 150 KD) anti-récepteur non transformé a montré un déplacement de poids moléculaire apparent de 320 KDa à la valeur 460 KD. La différence (460 - 320 KD) ne peut s'expliquer que s'il existe une seule sous-unité liante.

2.7.1 - *Preuves de l'existence de la 90 KD dans la forme 8 - 10 S des récepteurs stéroïdiens*

Arguments d'ordre immunologique

la protéine 90 KD non liante peut être d'abord clairement différenciée du polypeptide liant le stéroïde sur la base de leur réactivité immunologique. En effet, l'anticorps monoclonal appelé BF4 (RADANYI *et al.*, 1983) dirigé contre le récepteur de la progestérone purifié et stabilisé sous sa forme de haut poids moléculaire par le molybdate, reconnaît spécifiquement une protéine 90 KD ne liant pas le stéroïde (RENOIR *et al.*, 1984). Alors que l'immunsérum développé contre la protéine 110 KD liant la progestérone ne reconnaît pas la 90 KD non liante (TUOHIMAA *et al.*, 1984). Par ailleurs SULLIVAN *et al.*, (1985) ont préparé une série d'anticorps monoclonaux contre le récepteur de la progestérone associé à la 90 KD de l'oviducte de poulet, dont aucun ne reconnaît la forme transformée. De plus, l'anticorps monoclonal BF4, incubé séparément avec les cytosols de l'oviducte et du colon de poulet, est capable de déplacer le coefficient de sédimentation des complexes récepteur-hormones stéroïdiennes (oestrogène, androgène et glucocorticoïde), et les minéralocorticoïdes respectivement (JOAB *et al.*, 1984 ; OBLIN *et al.*, 1987). Des résultats similaires sont obtenus avec le récepteur des glucocorticoïdes de thymocytes de rat non transformé stabilisé par l'antiglucocorticoïde RU 486 (LEFEBVRE *et al.*, 1989).

Enfin, l'immunopurification du récepteur cytosolique des glucocorticoides utilisant des anticorps spécifiquement dirigés contre le polypeptide liant montre une coélution de la protéine 90 KD (HOUSLEY *et al.*, 1985 ; MENDEL *et al.*, 1986), alors qu'une immunoadsorption similaire du récepteur transformé ne le montre pas (SANCHEZ *et al.*, 1985 ; SANCHEZ et PRATT, 1986).

#### Arguments d'ordre biochimique

Récemment, REXIN *et al.*, 1988 utilisant des agents de couplage des protéines (réactifs bifonctionnels clivables), reconnus pour stabiliser le récepteur sous la forme de haut poids moléculaire, démontrent par des techniques immunochimiques que celui-ci contient l'HSP 90 KD aussi bien *in vivo* que dans l'extrait des cellules de lymphome de souris.

#### Arguments d'ordre génétique

Un récepteur anormal, dépourvu du domaine de liaison au stéroïde (domaine E) se comporte comme le récepteur des glucocorticoides de type sauvage sous forme 4S transformée. C'est comme si le domaine E était nécessaire pour transformer le récepteur non transformé 9S contenant l'HSP 90 KD (voir paragraphe 3.5).

### 2.7.2 - Stoechiométrie de l'association HSP 90 - récepteur

La protéine 90 KD trouvée dans toutes les cellules eucaryotes testées, représente jusqu'à 1 % des protéines cytosoliques (KELLEY *et al.*, 1982 ; SANCHEZ *et al.*, 1985). De plus, sa concentration molaire est en large excès par rapport à celle du récepteur. Cependant, une seule fraction s'associe avec celui-ci à l'état non transformé.

L'ensemble des travaux réalisés sur cette protéine à l'état libre natif, par mesure des caractéristiques physicochimiques arguent en faveur d'une structure dimérique (NEMOTO *et al.*, 1987 ; DENIS *et al.*, 1988a ; LEFEBVRE *et al.*, 1989). (voir le paragraphe 3.4.2). Par contre, la stoechiométrie réelle de l'HSP 90 - récepteur n'est pas bien établie, bien que le récepteur stabilisé par le molybdate ne contienne qu'une seule sous-unité liante (OKRET *et al.*, 1985).

D'une part, RENOIR *et al.*, 1984, utilisant la technique de couplage covalent pour examiner le récepteur de la progestérone stabilisé par le molybdate, montrent que ce dernier possède une protéine liant le stéroïde et deux protéines 90 KD non liantes. La même stoechiométrie est retrouvée pour le récepteur des glucocorticoides. (MENDEL *et al.*, 1988 ; LEFEBVRE *et al.*, 1988). Il est d'ailleurs tentant d'envisager une telle stoechiométrie (voir figure 16A) qui trouve toute sa part de vérité au vu des caractéristiques physicochimiques des récepteurs stéroïdiens non transformés (voir Tableau III).

D'autre part, l'approche immunologique de la 90 KD par un anticorps monoclonal spécifique (RIEHL *et al.*, 1985), sous sa forme libre et liée au récepteur, indique que seule la forme libre fixe deux molécules

d'anticorps, alors que le complexe glucocorticoïde-récepteur non transformé n'en fixe qu'une (LEFEBVRE *et al.*, 1989).

Plusieurs hypothèses, résultant de ces observations sont discutées :

- 1) L'interaction du dimère de la 90 KD avec le récepteur est asymétrique, par conséquent, un seul épitope est accessible à l'anticorps monoclonal. Ceci reste vrai à condition que chaque sous-unité du dimère porte une seule séquence épitopique.
- 2) Le récepteur à l'état non transformé ne possède qu'une seule sous-unité 90 KD non liante, celle-ci est perdue au cours de la transformation (MENDEL *et al.*, 1986), et s'associe avec une deuxième sous-unité 90 KD pour engendrer la forme dimérique cytosolique, largement étayée dans la littérature.
- 3) Une forme homodimérique du récepteur des glucocorticoïdes vient d'être récemment démontrée par WRANGE *et al.*, (1989) qui conduirait à une stoechiométrie de une molécule d'HSP 90 KD pour deux sous-unités liantes.

Tant qu'une démonstration absolue de la composition exacte des récepteurs stéroïdiens n'est pas apportée, d'autres facteurs liant le récepteur sous sa forme non activée sont énoncés. En effet, TAI *et al.*, (1986), grâce à l'anticorps monoclonal KN 382/EC1 spécifiquement dirigé contre le récepteur de la progestérone non transformé, ont détecté, outre la protéine 90 KD, la présence d'une protéine faisant 59 KD. Cette protéine qui ne semble pas dériver de la protéine 90 KD est présente en relation stoechiométrique avec celle-ci au sein de tous les récepteurs

stéroïdiens (ER, AR, PR et GR) dans l'oviducte, le foie et bien d'autres tissus du lapin.

Par ailleurs, un troisième candidat potentiel semble être impliqué dans la forme hétérooligomérique de haut poids moléculaire des récepteurs stéroïdiens non transformés. Cette fois-ci, il s'agit d'un facteur ribonucléique de petite taille dont la mise en évidence et la caractérisation ont fait l'objet d'une thèse dans notre laboratoire (SABLONNIERE, 1988). Le poids moléculaire de cette molécule d'ARN est estimé par plusieurs auteurs, et s'étale entre 21 KD et 36 KD (HOUSLEY et PRATT, 1984 ; KOVACIC-MILIVOJEVIC *et al.*, 1985 ; SABLONNIERE, 1988 ; SABLONNIERE *et al.*, 1988).

### 3 - L'HSP 90 KD : ETUDE DETAILLEE

#### 3.1 - Etude génétique de la classe des HSP 90 KD

La séquence nucléotidique complète codant pour l'HSP 90 KD humaine (REBBE *et al.*, 1987) est connue, et présentée sur la figure 11. Elle comporte 2562 nucléotides dont 2175 codant effectivement pour la protéine entière de masse 83 KD. La composition en résidus d'acides aminés de cette protéine est tout à fait semblable à l'HSP 90 KD humaine purifiée par WELCH et FERAMISCO (1982). Par comparaison avec les régions codantes pour les protéines HSP de drosophile et de levure, le triplet ATG se trouvant en position (-93) est assigné au codon d'initiation pour la méthionine. Un fait très important à signaler est la mise en évidence de la synthèse d'un messenger correspondant à ce cDNA, dans des conditions de choc thermique. En effet, des cellules HeLa exposées à une température de 42°C pendant 7 heures synthétisent des ARN messagers dont le taux est de 1,8 fois celui trouvé dans les conditions normales de température, le transfert sur filtres (Northern-blot) des ARN préalablement séparés par électrophorèse, puis la révélation par hybridation moléculaire avec la sonde cDNA isolée radioactive, donnent une seule bande (REBBE *et al.*, 1987). D'autre part, la digestion par les enzymes de restriction des 30 clones de cDNA isolés donne les mêmes polymorphismes de taille des fragments de restriction. Ces deux résultats démontrent qu'il n'existe qu'un seul et unique gène exprimant l'HSP 90 KD humaine. Pourtant, HICKLEY *et al.* (1986) avaient déjà identifié deux ARN messagers à partir des cellules HeLa codant pour des



protéines de choc thermique de 89 KD mais ne réagissant pas par hybridation. Par ailleurs, les levures possèdent deux gènes qui codent pour deux protéines 90 KD presque identiques. L'un de ces gènes est induit par le choc thermique, alors que l'autre s'exprime constitutivement (FARRELY et FINKELSTEIN, 1984 ; LINDQUIST, 1986).

Il a fallu attendre les travaux de LEES-MILLER et ANDERSON (1989) se rapportant à la purification et la caractérisation des HSP 90 KD chez les cellules HeLa pour savoir qu'il existe en réalité deux formes de polypeptides  $\alpha$  et  $\beta$  très similaires dont le taux d'expression est presque identique. L'analyse des séquences N-terminales de ces deux polypeptides comparées à la séquence d'acides aminés déduite de ce cDNA correspond au polypeptide  $\beta$ . HICKEY *et al.*, 1989 ont identifié un deuxième cDNA qui correspond à la forme  $\alpha$ .

La séquence du cDNA de souris est également déterminée (voir figure 12) (MOORE *et al.*, 1987), à l'aide d'une sonde oligonucléotidique synthétisée d'après une portion connue de la protéine HSP 84 KD purifiée (ULLRICH *et al.*, 1986). Cette séquence code pour une chaîne polypeptidique de 724 résidus d'acides aminés. Elle montre une homologie jusqu'à 74 % et 59 % avec la région codante des cDNA de la drosophile *mélanogaster* et de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) respectivement. L'étude structurale de ce cDNA montre que la région 3' non codante est impliquée dans la dégradation rapide des messagers exprimés (SHAW et KAMEN, 1986), ce qui ne semble pas être le cas de l'ARN messager et de l'HSP 90 KD humaine. D'autre part, l'analyse chromosomique indique que le gène de l'HSP 84 KD de souris est localisé

-94  
ACTCACCCCGCCGACCCCTAGCCNTGCCGTCCGAGTCGGACTTGGTCCGGGCCACCCACCCCTGCTGTACTACTCTCGGCTTCCCGTCAAG

1  
ATG CCT GAG GAA GTG CAC CAT GGC GAG GAG GAG GTG GAG ACC TTT GCG TTT CAG GCA GAA ATT GCC GAG CTC ATG TCC CTC ATC ATC AAC ACT TTC TAT TCA  
N P E E V H N G E E E V E T F A F Q A E I A G L M S L I I N T F Y S 34

103  
AAC AAG GAG ATT TTC CTC CCG GAG TTG ATC TCT AAT GCT TCA GAT GCC CTG GAC AAG ATT CGA TAT GAG ACC CTG ACG GAC CCT TCT AAG TTG GAC AGC GCG  
N K E I F L R E L I S N A S D A L D K I R Y E S L T D P S K L D S C 68

205  
AAA GAG CTG AAA ATT GAC ATC CTC CCC AAC CCT CAG GAG CCC ACG CTG ACT TTG GTG GAC ACA GGC ATT GCC ATG ACC AAG GCT GAC CTC ATT AAT AAC CTG  
K E L K I D I I P N P Q E R T L T L V D T G I G M T K A D L I N N L 132

307  
GGA ACC ATT GCT AAG TCT GCG ACG AAG GCG TTC ATG GAG GCT CTC CAG GCT GGT GCA GAC ATC TCC ATG ATC GGG CAG TTT GGT GTC GGA TTC TAC TCG GCC  
G T I A K S G T K A F M E A L Q A G A D I S M I G Q F G V G F Y S A 136

409  
TAT CTA GTT GCA GAG AAA GTG GTT GTG ATC ACG AAG CAC AAT GAT GAT GAG CAG TAT GCC TGG GNG TCC TCT GCG GGT GGC TCC TTC ACC GTC CCG GNA GAC  
Y L V A E K V V V I T K H N D D E Q Y A W E S S A G G S F T V R X D 170

511  
CAT GGT GAG CCN ATT GGC CCG GGT ACC AAA GTG ATC CTT CAC CTC AAA GAA GAC CAG ACC GAG TAC TTG GAG GAG ACG AGG GTC AAG GAA GTG GTG AAG AAA  
H G E P I G R I G R K V I L H L K E D G T E Y L E E R R V K E V V K I 204

613  
CAT TCG CNG TTC ATA GCG TAT CCC ATC ACC CTC TAT TTG GAG AAG GNA CCG GAG AAG GAT AGT GAT GAT GAG GAA GAG AAA GGT GAG AAA GAG  
H S X F I G Y P I T L Y L E K X R E K E I S D D E A E E E K G E K I 245

715  
GAG GNA GAT AAG GAG GNT GAG GAG AAG CCT AAG ATT GAA GAT GTG GGA TCC GAT GAG GAA GAT GAC ACC GCC AAA GAC AAG AAA AAG AAA ACA AAG AAG ATC  
E X D K E X E E K P K I E D V G S D E E D D S G K D K K K K T K K I 272

817  
AAA GAG AAG TAC ATT GAC CAG GAG GAG CTG AAC AAG ACA AAG CCT ATC TGG ACC AGA AAC CCG GAT GAC ATC ACG CAG GAG GAG TAT GCC GAA TTC TAT AAG  
K E K Y I D Q E E L N K T K P I W T R N P D D I T Q E E Y G E F Y K I 306

919  
AGC CTC ACC AAT GAC TGG GAG GAC CAC TTG GCA GTC AAG CAC TTC TCT GTA GAA GGT CAG TTG GAA TTC ACG GCA TTC CTC TTC ATT CCC CCG CGA GCT CCC  
S L T N D M E D H L A V K H F S V E G Q L E F R A L L F I P R R A P 340

1021  
TTC GAC CTT TTT GAG AAC AAG AAG AAG AAC AAC ATC AAA TTG TAT GTC CCG CGT GTG TTC ATC ATG GAC ACC TGT GAC GAG CTG ATA CCT GAG TAC CTC  
F D L F E N K K K K N N I K L Y V R R V F I M D S C D E L I P E Y L I 374

1123  
AAC TTT ATC CCG GGT GTG GTT GAC TCC GAG GAC CTG CCC CTG AAC ATC TCC CCG GAG ATG CTG CAG CAG ACC AAG ATC CTG AAG GTC ATC CCG AAG AAC ATC  
N F I R G V V D S E D L P L N I S R E M L Q Q S K I L K V I R K N I 408

1225  
GTC AAG AAG TGC CTG GAG CTC TTC TCC GAG CTG GCT GAG GAC AAG GAG AAC TAC AAG AAG TTC TAT GAG ACC TTC TCC AAG AAT TTA AAG CTT GGA ATT CAT  
V K K C L E L F S E L A E D K E N Y K K F Y E A F S K N L K L G I H 442

1327  
GAA GAT TCC ACT AAC CCG CCG CCG CTC TCT GAG CTC CTT CCG TAT CAC ACC TCT CAG TCT GGA GAT GAG ATG ACC TCC TTG TCA GAG TAT GTG TCT CCG ATG  
E D S T N R R R L S E L L R Y H T S Q S G D E M T S L S E Y V S R H 476

1429  
AAG GAG ACC CAG AAG TCC ATC TAC TAT ATC ACT GGT GAG AGC AAA GAG CAA GTG CCC AAC TCT GCC TTT GTG GAG CGA GTG CCG AAG CCG GCC TTC GAG GTG  
K E T Q K S I Y Y I T G E S K E Q V A N S A P V E R V R K R G F E V 510

1531  
GTG TAT ATG ACT GAG CCT ATT GAC GAG TAC TGC GTG CAG CAG CTC AAG GAG TTT GAT GGG AAG AGC CTG GTC TCA GTG ACT AAG GAG GGC CTG GAG CTA CCA  
Y Y M T E P I D E Y C V Q Q L K E F D G K S L V S V T K E G L E L P 544

1633  
GAG CAG GAG GAA GAG AAG AAG AAA ATG GAG GAG AGC AAG GCA AAG TTT GAG AAT CTC TCC AAG CTC ATG AAG GAG ATC TTG GAC AAG AAG GTT GAA AAG GTG  
E D E E E K K K M E E S K A K F E N L C K L M K E I L D K K V E K V 578

1735  
ACA ATC TCC AAT AGG CTT CTG TCT TCA CCC TCC TCC ATT GTG ACA AOC ACC TAT GGC TGG ACA GCC AAC ATG GAA CCG ATC ATG AAG GCC CAG GCA CTG CGA  
T I S N R L V S S P C C I V T Y G M T A N M E R I M K A Q A L R 612

1837  
GAC AAC TCT ACA ATG GGC TAC ATC ATG GCC AAA AAA CAC CTG GAG ATC AAC CCT GAC CAC CCC ATC GTG GAG ACC CTG CCG CAG AAG GCT GAG GCA GAC AAA  
D M S T H G Y M M A K K H L E I N P D H P I V E T L R Q K A E A D K 646

1939  
AAC GAC AAA GCT GTC AAG GAC CTG GTG GTG CTG TTT GAA ACT GCT CTG CTG TCC TCT GTT TTC TCA CTT GAG GAT CCC CAA ACC CAG TCC AAC CCG ATC  
N D K A V K D L V V L L F E T A L L S S G F S L E D P Q T H S M R I 680

2041  
TAC CCG ATG ATT AAA CTA GGC CTG GGC ATC GAT GAA GAT GAG GTC ACT GCA GAG GAG CCC AGT OCT GCT GTT CCT GAT GAG ATC CCC CCT CTG GAA GGC GAT  
Y R M I K L G L G I D E D E V T A E E P S A A V P D E I P P L E G D 714

2143  
GAG GAT GCC TCG CCG ATG GAA GAG GTG GAT TAA AOCCTCCTGGAAGAACCCCTGCCCTGTATAGTATCCCGTGGCTCCCCAGCAGCCCTGACCCACCTGCTCTGCTCATGTACAA  
E D A S R M E E V D

2267  
GAATCTTCTATCCTGCTGCTGCTGCTTAAAGCAGGAAGATCCCTCCCAAGAAATAGCAAGGTTGGGTGTTATGTATTTGGTTTTTTTGTAGTTTTTTTCTAAAATAAAAGTATCCAAAATAAGAA  
E D A S R M E E V D

2402  
ATCCAGTTTTATACpoly(A)

Figure 12 : ADN complémentaire et séquence protéique déduite de l'HSP 84 KDa de souris (MOORE et al., 1987)

sur au moins 3 chromosomes. Récemment, la séquence de ce cDNA de l'HSP 90 KD de poulet a été établie. Pour ce faire, BINART *et al.* (1989) ont eu recours au plasmide recombinant qui comprend le cDNA $\alpha$  de l'HSP 90 KD humaine. Du fait que ce dernier reconnaît l'ARN messager correspondant à l'HSP 90 KD de poulet, il a été utilisé comme sonde pour le criblage de la librairie des cDNA.

Naturellement, les levures ne possèdent pas la réponse aux hormones stéroïdiennes. Pourtant le génome de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) contient un gène codant pour une protéine qui répond au label de cette famille de protéines de choc thermique. Ce gène séquencé (FARELLY *et* FINKELSTEIN, 1984) renferme dans la région en 5' non codante une similitude avec la séquence consensus nécessaire à l'induction des gènes de choc thermique (voir paragraphe 3.3.)

Nous ne pouvons clore ce chapitre sans citer le gène hsp 83 KD de drosophile, chez laquelle la réponse au choc thermique a été mise en évidence la première fois par RITOSSA *et al.* (1962). HACKETT *et* LIS (1983) ont déterminé la séquence nucléotidique codant pour cette protéine chez la drosophile mélanogaster.

### 3.2. Etude comparative des séquences en acides aminés des HSP 90 KD

La comparaison des séquences d'acides aminés des HSP 90 KD, déduites des séquences nucléotidiques déjà décrites ci-dessus est présentée sur la figure 13. Remarquons que plusieurs blocs de résidus d'acides aminés sont conservés chez toutes les espèces. De telles régions sont probablement importantes pour la(les) fonction(s) de ces protéines. Une des caractéristiques qui différencie les hsp 90 KD de



**Figure 13** - Aligement des séquences de résidus d'acides aminés des HSPs 90KD humaines (Rebbe *et al.*, 1987), de souris (Moore *et al.*, 1987), de drosophile (Hockett et Lis, 1983), de levure (Farrelly et Finkelstein, 1984) et de poulet (Binart *et al.*, 1989)  
 Les tirets sont introduits dans les séquences pour obtenir l'homologie maximale.

souris de l'homme par rapport à ses homologues chez le poulet, la drosophile et la levure, est la présence d'une petite séquence de 7 résidus d'acides aminés en position N-terminale. Cette insertion qui n'est apparemment pas le résultat du phénomène de maturation des ARN messagers, pourrait avoir un intérêt dans la production des anticorps spécifiques de ces espèces. Pour mieux apprécier les homologues existant entre des espèces aussi éloignées que l'homme et la drosophile, des chiffres en pourcentages sont notés dans le tableau suivant :

TABLEAU V

Souris	98			
Poulet	86	87		
Levure	61	63	64	
Drosophile	78	81	89	67
Espèces	Homme	Souris	Poulet	Levure

3.3. Localisation d'une séquence consensus "HSE" (élément de choc thermique)

L'activation de la transcription d'un gène par un Enhancer exige très probablement un contact direct entre les protéines fixées sur les Enhancers et celles (dont l'ARN polymérase II) participant à la construction du complexe d'initiation. Lorsque ces deux complexes nucléoprotéiques sont éloignés l'un de l'autre, il est probable que l'ADN peut faire une boucle permettant ainsi un rapprochement entre eux.

L'expression du gène de l'HSP est régulée suivant l'organisme et même le type cellulaire. Cependant, il semblerait que le mécanisme au niveau transcriptionnel soit commun à tous les gènes HSP eucaryotes. L'analyse de séquences dans la région 5' des gènes HSP de la drosophile a révélé la présence d'un site d'activation associé à une séquence consensus (Enhancer), retrouvée par la suite chez tous les autres gènes HSP. La séquence de cet élément consensus (HSE) (élément de choc thermique) est C -- GAA -- TTC -- G (où les tirets représentent n'importe quelle base nucléique) (voir paragraphe 1.4). Rappelons qu'un facteur HSTF qui se lie à l'HSE a été isolé et caractérisé, la plupart des gènes HSP renferme en fait plusieurs éléments consensus qui seraient mis en jeu de façon coopérative par liaison à ce facteur, et qu'une régulation négative de la transcription existe également par accumulation de l'HSP dans le noyau cellulaire.

### 3.4. Etude Biochimique

#### 3.4.1. *Purification*

L'histoire de la mise en évidence et de la caractérisation des protéines 90 KD de mammifères, ainsi que la volumineuse littérature qu'elles ont suscitée jusqu'à nos jours a commencé avec la notion de réponse au choc thermique.

C'est en 1982 que WELCH et FERAMISCO ont établi pour la première fois un protocole de purification des protéines 90 KD à partir des cellules HeLa humaines.

A partir de l'année 1985, les équipes traitant des récepteurs stéroïdiens s'intéressaient de plus près à l'HSP 90 associée au récepteur non transformé.

L'étape préliminaire commune à tous les protocoles consiste à homogénéiser le matériel biologique (tissu ou cellules isolées) dans un tampon approprié. Cet homogénat est soumis à une ultracentrifugation, la fraction limpide ou surnageant représente le cytosol de départ. Ensuite, la purification en elle-même fait appel à de nombreuses techniques telles que :

- techniques classiques (précipitation, chromatographie de gel-filtration, d'échange d'ions, et sur hydroxyapatite).
- chromatographie d'immunoaffinité

-Techniques classiques :

WELCH et FERAMISCO, 1982 proposent un protocole en 3 étapes à partir du cytosol de cellules HeLa (préalablement portées au choc thermique ou non). Ce protocole comprend un échange d'ions sur DE 52 cellulose, puis une chromatographie sur hydroxyapatite et enfin terminent par une gel filtration sur Sephacryl S300.

Le même protocole est adopté après par plusieurs auteurs; c'est le cas de HOWARD et DISTELHORST, 1988 pour purifier l'HSP 90 KD à partir des cellules IM-9.

En 1987, NEMOTO *et al.*, ont adopté une méthodologie associant cinq étapes de purification de l'HSP 88 KD de foie de rat. D'abord, le cytosol est précipité sélectivement par le sulfate de protamine pour obtenir des fractions plus enrichies en matériels 88 KD ; celles-ci, après dessalage sur le Séphacryl S200 sont ensuite déposées sur une

colonne de DEAE-Sephacel d'échange d'ions. Le pic d'éluion est mis sur une colonne de Séphacryl S300 de gel-filtration, et enfin sur une TSK DEAE 3SW (support d'échange d'ions à haute pression). Il s'agit là d'un protocole très long, qui pourrait expliquer les produits de dégradation obtenus à la fin de la purification.

Une année après, DENIS (1988), développe un protocole rapide en deux étapes, à partir du cytosol de foie de rat. Ce protocole est basé sur des techniques de chromatographie d'échange d'ions et de gel-filtration en mode haute performance.

#### - Chromatographie d'immunoaffinité

L'immobilisation des anticorps sur un support solide, constitue un moyen efficace et simple pour purifier spécifiquement des antigènes reconnus normalement par les anticorps fixés. Il s'agit d'une technique de plus en plus utilisée de nos jours, notamment quant on dispose d'anticorps monoclonaux.

A ce propos, très récemment RADANYI *et al.* (1989) possédant un anticorps monoclonal (BF4) anti-HSP 90 de poulet (RADANYI *et al.*, 1983) l'ont utilisé en guise d'immunoabsorbant afin de purifier cette protéine.

Pour établir que cette méthode de purification n'affecte ni les propriétés physicochimiques (rayon de Stokes, coefficient de sédimentation), ni les propriétés immunologiques de cette protéine, les mêmes auteurs étaient amenés à tester ces mêmes propriétés de l'HSP 90 KD à la fois à partir de l'extrait cytosolique et du récepteur de la progestérone stabilisé par le molybdate (RENOIR *et al.*, 1984).

#### 3.4.2. Propriétés biochimiques

Différentes méthodes ont été utilisées pour purifier les HSP 90 KD de plusieurs espèces.

L'ensemble des analyses biochimiques effectuées sur ces protéines nous donne des résultats à la fois concordants et intéressants que nous regroupons ci-dessous :

1) Qu'il s'agisse des HSP 90 KD libres ou liées aux différents récepteurs stéroïdiens non transformés, les valeurs des caractéristiques physicochimiques résumées dans le tableau VI sont très rapprochées.

Il s'agit à chaque fois d'un dimère de HSP 90 KD ayant une structure dissymétrique.

2) Nous avons déjà présenté les séquences en acides aminés complètes des 5 protéines HSP 90 KD déduites de leur cDNA (voir figure d'homologie de séquence n° 13). Nous nous limiterons ici à signaler que la composition en acides-aminés, ainsi que la détermination des séquences N-terminales des mêmes protéines par la dégradation automatique d'Edman, révèlent des résultats concordants (WELCH et FERAMISCO, 1982 ; RATAJCZAK *et al.*, 1987 ; NEMOTO *et al.*, 1987 ; DENIS, 1988 ; LESS-MILLER et ANDERSON, 1989).

Les protéines de choc thermique subissent des modifications post-traductionnelles telles que : la méthylation (WANG *et al.*, 1981), la glycosylation (KELLEY et SCHLESINGER, 1978), l'ADP-ribosylation (CARLSSON et LAZARIDES, 1983) ou encore la phosphorylation (KIM *et al.*, 1984 ; HOUSLEY *et al.*, 1985 ; MENDEL *et al.*, 1986). De telles modifications peuvent affecter la fonction et la stabilité métabolique de ces protéines (LANKS, 1983). C'est vraisemblablement la

**TABLEAU VI** - Caractéristiques hydrodynamiques des HSP 90 KDa (libre et liée au récepteur non transformé)

source	Masse Moléculaire apparente (KDa) en PAGE/SDS	Mr (KDa) Forme native (dimère)	S <sub>w,20</sub>	R <sub>s</sub> (nm)	Rapport axial (a/b)	Rapport de friction $\left(\frac{F}{F_0}\right)$	Références
Cellules HeLa Humaines	90 et 100	165 <sup>a</sup>	5,8 <sup>a</sup>	6,9 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	WELCH et FERAMISCO 1982
A Foie de rat	90		6,1 ± 0,2	6,9 ± 0,3	13	1,7	DENIS <u>et al.</u> , 1988b
Foie de rat	88	174	6,2(+ sel) 6,2(+ molybdate)	6,8			NEMOTO <u>et al.</u> , 1987
Cellules de souris (5178 Y)	90	170	6,2	6,5	n.d.	1,8	KOYASU <u>et al.</u> , 1986
Oviducte de Poulet	90	204(-sel) 187(+sel)	6,8(-sel) 6,5(+sel)	7,1(-sel) 6,8(+sel)	n.d.	n.d.	RADANYI <u>et al.</u> , 1989
B Oviducte de Poulet	90	174	5,8	7,1	n.d.	n.d.	RADANYI <u>et al.</u> , 1989
C Oviducte de Poulet	90	178	6,2	6,8	n.d.	n.d.	RADANYI <u>et al.</u> , 1989

A : HSP 90KD purifiée à partir de l'extrait cytosolique  
 B : HSP 90KD purifiée à partir du récepteur non transformé  
 C : HSP 90KD purifiée à l'aide du monoclonal (BF<sub>4</sub>)

<sup>a</sup> = mélange de 90 et 100 KDa  
 n.d. = non déterminé

phosphorylation de ces protéines *in vivo* qui semble intervenir dans la stabilité du complexe récepteur-HSP 90 KD. Fait intéressant : d'après BINART *et al.* (1989), les 2 sérines impliquées dans la phosphorylation sont positionnées dans la région N-terminale de l'HSP 90 KD supposée interagir avec le récepteur non transformé (voir figure 14A).

3) Notons enfin que l'HSP 90 KD est une protéine essentiellement cytoplasmique (KOYASU *et al.*, 1988) bien qu'elle soit détectée dans le noyau (GASC *et al.*, 1984). En effet, cette protéine est assez abondante dans la cellule. Elle représente jusqu'à 1 % des protéines cytosoliques (WELCH et FERAMISCO, 1982 ; KELLEY et SCHLESINGER, 1982 ; LAI *et al.*, 1984 ; SANCHEZ *et al.*, 1985) et se trouve en large excès molaire par rapport aux récepteurs stéroïdiens (100 à 1000 fois). Par ailleurs, son caractère acide (pHi 5,0-6,5) pourrait expliquer la différence de comportement en chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose des récepteurs non transformés par rapport aux récepteurs transformés (voir paragraphe 2.4.2) (BEN-OR et CHRAMBACH, 1983 ; DANZE *et al.*, 1987 ; SAKAUE et THOMPSON, 1977 ; SCHMIDT *et al.*, 1980).

### 3.5. Interaction de l'HSP 90 KD avec les différents domaines du récepteur.

#### \* Domaine E

Tout d'abord, PRATT *et al.*, 1988 ; GREEN *et al.*, 1986, GRONEMEYER *et al.*, 1987 réalisent des expériences de transfection de gènes codant pour les récepteurs GR et ER humains, PR de poulet dans des cellules réceptrices (singe, hamster et levure) qui en sont dépourvues. Ils remarquent alors que les récepteurs synthétisés se lient aux protéines HSPs endogènes, d'une façon hétérologue. Ainsi les résultats de ces

expériences suggèrent un mécanisme d'association de l'HSP 90 KD commun aux récepteurs stéroïdiens dans toutes les espèces.

Pour définir par la suite le ou les domaine(s) du récepteur impliqué(s) dans l'association avec l'HSP 90 KD, plusieurs auteurs spécialisés dans la génétique moléculaire font appel à des expériences de transfection, utilisant des plasmides qui ont intégré soit le gène du GR, soit le gène d'ER. Ces plasmides transformés, codent soit pour le type sauvage, soit pour des récepteurs mutés (HOLLENBERG *et al.*, 1987 ; KUMAR *et al.*, 1987).

De telles expériences montrent que le domaine de liaison au stéroïde (domaine E) est impliqué dans l'interaction avec l'HSP 90 KD. En effet, après transfection de cDNA de GR où manque le domaine E, il apparaît la forme 4S transformée et non la forme non transformée (PRATT *et al.*, 1988). Cette forme 4S, rappelons-le, est tout à fait fonctionnelle, même en absence de l'hormone, un tel mutant constitutif est obtenu également avec le récepteur des oestrogènes chez le rat (WATERMAN *et al.*, 1988).

D'autre part, DANIELSEN *et al.* (1986), PRATT *et al.* (1988), analysant différents mutants, localisent une région dans le domaine E en position (595-615) de la séquence du récepteur de rat qui serait responsable de la formation du complexe HSP 90 KD-récepteur.

Ces derniers résultats sont consolidés par d'autres résultats d'ordre biochimique et immunologique. En effet, l'analyse immunologique par DENIS *et al.* (1988) du méro-récepteur généré par protéolyse tryptique ménagée (WRANGE *et al.*, 1978), montre que celui-ci non dénaturé, gardant encore la capacité de lier le stéroïde est immunoprécipité par un anticorps monoclonal anti-HSP 90 de rat. Ce

résultat donne une évidence plus directe pour l'interaction de l'HSP 90 avec le domaine de liaison aux glucocorticoides (voir figure 16C). Des résultats similaires ont été récemment rapportés dans les cellules L (BRESNICK *et al.*, 1989). Ces résultats sont intéressants, malheureusement, ils ne nous renseignent pas sur le type de liaisons gouvernant cette association HSP 90KD -domaine E du récepteur. Il n'est pas exclu d'envisager d'autres liaisons qui viennent renforcer la cohésion et le maintien de cette forme hétéroooligomérique du récepteur non transformé.

#### \* Domaine C

Sachant d'une part que ce domaine de liaison à l'ADN du récepteur est riche en résidus d'acides aminés basiques (voir paragraphe 2.5.3), et d'autre part que le récepteur non transformé par opposition au récepteur transformé a peu d'affinité pour les supports anioniques (voir paragraphe 2.4.1), plusieurs auteurs pensent à une interaction (HSP-récepteur), possédant un caractère ionique. En ce sens, l'analyse de la séquence d'ADN complémentaire de l'HSP 90 KD de poulet (voir paragraphe 3.1) (BINART *et al.*, 1989) montre une région d'environ 70 acides aminés dont le taux d'hydrophilie est conservé à travers l'évolution. D'après les mêmes auteurs, cette région pouvant adopter une conformation en hélice  $\alpha$  serait impliquée dans l'interaction de l'HSP 90 KD avec le domaine C du récepteur. Avant de reprendre cela dans le chapitre suivant, signalons que d'autres arguments plus directs, et concordants dans la même trajectoire ont été apportés : ce sont les travaux de HOWARD et DISTELHORST (1988) qui montrent qu'après

purification, parallèlement, du récepteur activé et de l'HSP 90 KD à partir des cellules IM 9 humaines, l'addition en large excès de l'HSP 90 KD au récepteur transformé (16 molécules d'HSP 90 KD pour une molécule de récepteur transformé), inhibe la capacité de ce dernier à se lier à l'ADN.

### 3.6. Modalité d'interaction d'HSP 90 KD - Domaine C du récepteur.

La connaissance précise de la position spatiale des divers groupes d'une molécule protéique constitue une information importante pour la compréhension de ses propriétés fonctionnelles. Malheureusement, rares sont les protéines qui ont bénéficié de la cristallographie aux rayons X. Néanmoins, la structure secondaire d'une protéine fournit des renseignements non négligeables.

En ce sens, plusieurs auteurs se sont penchés sur l'étude de la structure secondaire des protéines 90 KD de choc thermique, afin de mieux comprendre leur modalité d'interaction avec d'autres protéines, et particulièrement avec les récepteurs des hormones stéroïdiennes. Les études faites dans ce domaine étaient basées sur des calculs de prédictions de structure secondaire ; plusieurs renseignements intéressants ont été obtenus :

L'analyse du rapport hydrophilie-hydrophobie des protéines, d'abord de l'HSP 90 KD de levure et de l'HSP 83 KD de drosophile (BLACKMAN et MESELSON, 1986) montre qu'il existe de larges régions d'acides aminés où la fréquence d'homologie est faible alors que la densité des charges globales est quasi-constante ; de telles régions sont ensuite identifiées (voir figure 11) chez l'HSP 90 KD de l'homme

(218-281), l'HSP 84 KD de souris (218-315), et récemment dans la région (221-290) nommée A. Chez le poulet, en plus de cette région A, il existe une deuxième région B (530-581) qui est pareillement très hydrophile comme la région (421-560) de l'HSP 84 de souris. Selon les prédictions de structure secondaire (voir figure 15), ces deux régions adoptent des conformations en hélice, vraisemblablement stabilisées par des interactions entre les acides aminés (aspartique, glutamique) et lysine, et seraient les premières candidates pour des interactions entre protéines.

A ce propos, BINART *et al.* (1989) ont identifié un petit domaine très riche en résidus d'acides aminés glutamyl et lysyl (233 ---> 247) dans la région A de l'HSP 90 KD de poulet qui adopterait une configuration spatiale identique à celle de la double hélice d'ADN. Selon les mêmes auteurs, ce domaine, où les conservations topologiques de charges parmi différentes espèces est remarquable, serait impliqué dans l'interaction avec le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs stéroïdiens (voir figures 14A, 14B).

### 3.7. Aspects fonctionnels de l'association HSP 90 KD-récepteurs stéroïdiens.

Si la possibilité physiologique d'une association HSP-récepteur devient de moins en moins contestée (PRATT *et al.*, 1988), la signification biologique ainsi que les modalités précises de celle-ci sont encore inconnues. Cependant, plusieurs hypothèses ont été proposées.

(A)

293	K	K	K	K	K
292	N	K	K	K	K
291	L	E	O	D	E
290	K	D	I	K	K
289	K	I	K	K	K
288	K	K	K	K	K
287	K	K	K	K	K
286	K	K	K	K	K
285	K	K	K	K	K
284	K	K	K	K	K
283	K	K	K	K	K
282	K	K	K	K	K
281	K	K	K	K	K
280	K	K	K	K	K
279	K	K	K	K	K
278	K	K	K	K	K
277	K	K	K	K	K
276	K	K	K	K	K
275	K	K	K	K	K
274	K	K	K	K	K
273	K	K	K	K	K
272	K	K	K	K	K
271	K	K	K	K	K
270	K	K	K	K	K
269	K	K	K	K	K
268	K	K	K	K	K
267	K	K	K	K	K
266	K	K	K	K	K
265	K	K	K	K	K
264	K	K	K	K	K
263	K	K	K	K	K
262	K	K	K	K	K
261	K	K	K	K	K
260	K	K	K	K	K
259	K	K	K	K	K
258	K	K	K	K	K
257	K	K	K	K	K
256	K	K	K	K	K
255	K	K	K	K	K
254	K	K	K	K	K
253	K	K	K	K	K
252	K	K	K	K	K
251	K	K	K	K	K
250	K	K	K	K	K
249	K	K	K	K	K
248	K	K	K	K	K
247	K	K	K	K	K
246	K	K	K	K	K
245	K	K	K	K	K
244	K	K	K	K	K
243	K	K	K	K	K
242	K	K	K	K	K
241	K	K	K	K	K
240	K	K	K	K	K
239	K	K	K	K	K
238	K	K	K	K	K
237	K	K	K	K	K
236	K	K	K	K	K
235	K	K	K	K	K
234	K	K	K	K	K
233	K	K	K	K	K
232	K	K	K	K	K
231	K	K	K	K	K
230	K	K	K	K	K
229	K	K	K	K	K
228	K	K	K	K	K
227	K	K	K	K	K
226	K	K	K	K	K
225	K	K	K	K	K
224	K	K	K	K	K
223	K	K	K	K	K
222	K	K	K	K	K
221	K	K	K	K	K
	C	M	H	D	Y
	H				
	I				
	C				
	K				

Figure 14A - Conservation des charges négatives dans la région A des 5 HSP 90 KD.

x : indique des résidus d'acides aminés

(B)

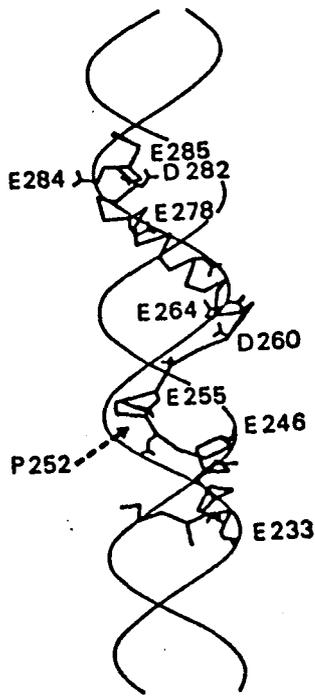
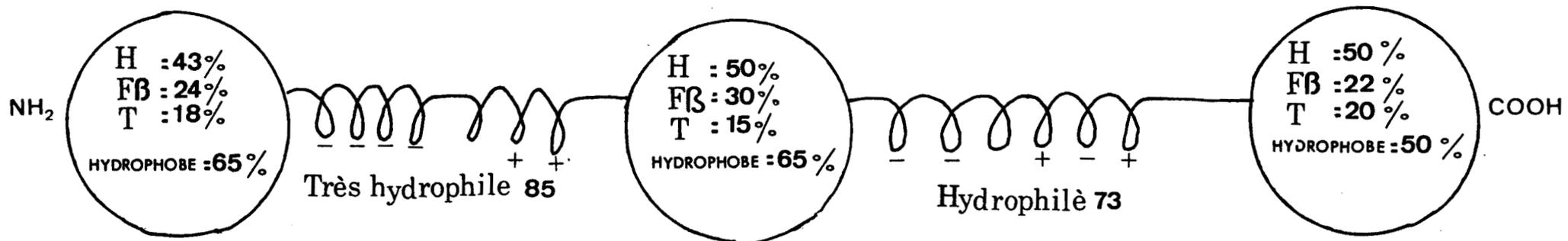


Figure 14B - Schéma découlant du segment (228-290) modélisé de la région A de l'HSP 90 KD de poulet.

Le segment 228-232 adopterait une conformation en pelote (coil)  
 Deux régions 233-247 et 261-287 adoptent une conformation en  
 hélice alpha, mimant la configuration spatiale de l'ADN.  
 (Selon BINART et al., 1989)



1 - 150

16 charges

[11<sup>-</sup>, 5<sup>+</sup>]

\* région 50-70  
chargée et  
exposée

150 - 320

27 charges <sup>+</sup>

51 charges <sup>-</sup>

H : 50 %  
 FB : 20 %  
 T : 15 %

hélice - 215-260

hélice + 261-275

320-420

13 charges

hélice  
 345-355  
 très chargée <sup>+</sup>

421 - 560

22 charges <sup>+</sup>

24 charges <sup>-</sup>

H : 60 %  
 FB : 25 %  
 T : 12 %

Zones exposées

420 - 432

540 - 560 (13 charges)

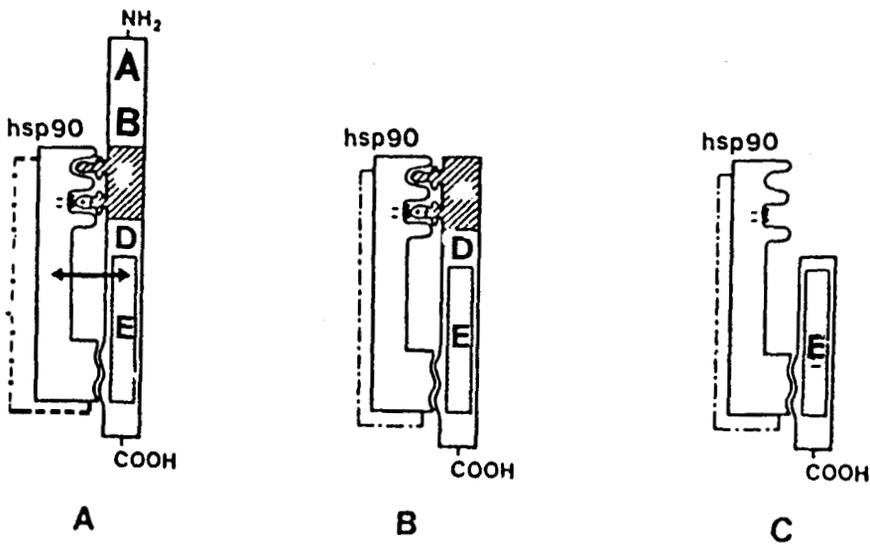
560 - 724

9 charges <sup>+</sup>

17 charges <sup>-</sup>

Figure 15 - Les données de prédiction de la structure secondaire de l'HSP 84 KDa chez la souris (MOORE et al., 1987)

-77-



**Figure 16** - Représentation schématique des récepteurs stéroïdiens.

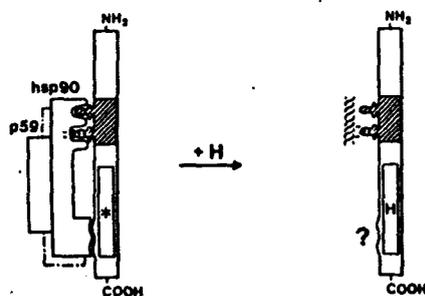
- A - Forme 7S du récepteur de la progestérone représentée avec une molécule d'HSP 90, obtenue par purification suivie par un traitement de cross-linking à l'aide du diméthylpimélimidate (ARANYI et al., 1988)
- B - Le mutant nt; du récepteur des glucocorticoïdes dépourvu de la région N-terminale (GEHRING et ARNDT, 1984)
- C - Forme 8S du récepteur des glucocorticoïdes soumise à une protéolyse trypsique ménagée.

Ainsi, deux fonctions simultanées peuvent être attribuées à l'HSP 90 KD concernant sa liaison aux récepteurs stéroïdiens.

i) l'HSP 90 KD pourrait contribuer à stabiliser la protéine réceptrice. En effet, certaines expériences indiquent que les récepteurs résistent mieux aux agents chimiques et à la température sous la forme 8 S par opposition à la forme 4 S.

LEACH *et al.* (1979) ; BUCHOU *et al.* (1983) ; ARANYI *et al.* (1988). Cet effet protecteur de l'HSP 90 KD pourrait d'ailleurs expliquer la longévité plus importante des récepteurs en absence plutôt qu'en présence d'hormone (MILGROM *et al.*, 1973 ; READ *et al.*, 1988) ceci va dans le même sens que les constatations de HOWARD et DISTELHORST (1988a) qui ont noté que la durée d'interaction de l'HSP 90 KDa avec le récepteur correspondait à sa demi-vie dans la cellule. Cela laisse supposer que l'HSP 90 KD jouerait un rôle dans la régulation de la dégradation intracellulaire du récepteur.

ii) En plus du rôle protecteur, la fonction essentielle de l'HSP 90 peut être schématisée comme suit :



BAULIEU & *al.*, 1989

\*: vide

l'HSP 90 KD masque le site de liaison du récepteur à l'ADN, ceci est encore mieux favorisé par l'interaction de l'HSP 90 KD avec un deuxième

site dans le domaine de liaison au stéroïde (PRATT *et al.*, 1988), DENIS et GUSTAFSSON., 1989) si bien qu'en absence d'hormone, le récepteur n'est pas capable de lier l'ADN (PRATT *et al.*, 1987). Une fois le stéroïde lié au récepteur, celui-ci répond au message hormonal en adoptant un changement conformationnel lui permettant de dévoiler un domaine de liaison à l'ADN, ce qui entraîne une déstabilisation du complexe HSP-récepteur, et le départ de l'HSP 90 KD (MENDEL *et al.*, 1986). Ainsi, pour remplir son rôle biologique, le récepteur bénéficie :

- d'un domaine capable de reconnaître le signal hormonal et de le traduire à l'ensemble de la protéine.
- d'un deuxième domaine fonctionnel et exécutif.
- et d'un répresseur extrinsèque qui serait l'HSP 90 KD, en absence de l'hormone.

### 3.8 - Conclusion

Durant les dix dernières années, les résultats concernant la structure et la fonction du récepteur des hormones glucocorticoïdes ont été abondants et très intéressants, cependant la stoechiométrie, ainsi que les modalités précises d'interaction de la protéine 90 KD avec le récepteur à l'état non transformé ne sont pas clairement établies. L'emploi des méthodes de purification du récepteur et de la protéine 90 KD, combinées à des méthodes de biologie moléculaire, d'immunologie, et de cristallographie conduiront à mieux comprendre l'étape mystérieuse de la transformation dans le mécanisme d'action des hormones glucocorticoïdes.

**RESULTATS PERSONNELS**

L'activité centrale de notre laboratoire consiste en l'étude du mécanisme d'action des hormones glucocorticoïdes du foie de rat par voie antérograde, d'où l'utilité de disposer du récepteur à l'état non transformé et transformé. La purification des deux formes du récepteur a déjà fait l'objet de deux thèses (IDZIOREK, 1985 & BELHASEN, 1987) respectivement.

A notre arrivée, le travail qui nous a été confié est :

- \* La mise au point d'un protocole de purification de la protéine 90 KD du rat
- \* La caractérisation biochimique, immunologique et structurale de cette protéine.

#### 1. CHOIX DU PROTOCOLE DE PURIFICATION

Nous avons rapporté dans le paragraphe 3.4.1 les protocoles employés pour purifier la protéine 90 KD de différentes espèces, libre ou associée aux récepteurs stéroïdiens.

Rappelons que la préparation du cytosol est l'étape préliminaire commune à tous ces protocoles. Celle-ci est suivie soit de techniques classiques de purification, soit d'une chromatographie d'immunoaffinité du récepteur non transformé avec séparation ultérieure de la protéine 90 KD.

Une alternative était posée : purifier la protéine 90 KD libre ou liée au récepteur?.

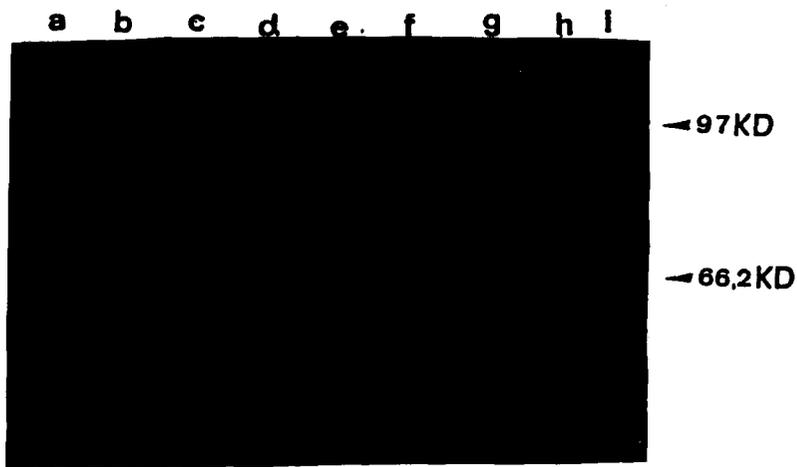
-D'une part, notre laboratoire maîtrise la technique de chromatographie qui permet la purification du récepteur non transformé :

la fraction cytosolique est d'abord soumise à une double précipitation par une solution de streptomycine puis une solution de protamine (voir matériels et méthodes). La fraction obtenue, nommée extrait Sulfate de Protamine (SP) est ensuite incubée avec un gel d'affinité (Sépharose 4B - diaminononane dexaméthasone), mis au point par LUSTENBERGER *et al.*, 1980 ; IDZIOREK *et al.*, 1985, visant une adsorption du récepteur sur le gel. L'éluat biospécifique du récepteur s'effectue en présence d'un excès de dexaméthasone ou encore d'acétonide de triamcinolone, permettant de récupérer le récepteur non transformé (associé à la protéine 90 KD) à 90 % d'homogénéité (fraction appelée éluat d'affinité). L'extrait sulfate de protamine non retenu sur le gel est repassé 1 à 2 fois sur ce dernier afin d'obtenir une fraction épuisée en récepteur (jusqu'à 98 %) que nous appelons SPE.

-D'autre part au cours de notre DEA (Diplôme d'Etudes Approfondies), nous avons montré que l'anticorps monoclonal anti 88 KD d'*Achlya ambisexualis* (RIEHL *et al.*, 1985) réagit de manière spécifique avec la protéine 90 KD du rat contenue dans les différentes fractions citées plus haut:

Le cytosol, SP, l'éluat d'affinité, SPE, mais, ainsi qu'en témoigne la figure 18, c'est la fraction SPE (très riche en 90 KD), qui réagit le plus fortement.

Par conséquent, il nous a semblé plus rapide et plus simple d'utiliser l'anticorps de TOFT en guise d'immunadsorbant pour purifier la protéine 90 KD libre à partir de la fraction SPE, plutôt que de recourir au protocole de purification du récepteur non transformé, existant à l'état de traces.

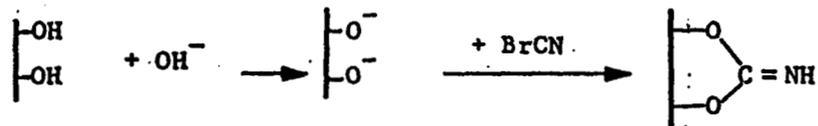


**Figure 18 - Immunorévélation des blots par l'anticorps monoclonal AC 88.**

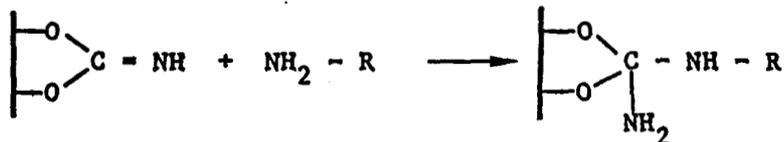
- a - Fraction de l'extrait sulfate de protamine épuisé en récepteur (SPE)
- b - Fraction de cytosol
- c - Fraction de l'extrait sulfate de protamine (SP)
- d, e, f, g et h - Fractions d'éluat d'affinité en quantité respectivement décroissante.
- i - Témoins de poids moléculaire standard.

### 1.1 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Nous avons utilisé le support Sépharose 4B activé au bromure de cyanogène (BrCN) en présence d'une base forte (phosphate de potassium 5 M, pH 11,9) ; son rôle est de faciliter l'attaque du BrCN sur les ions alkoxydes formés tel que



Les groupements imines ainsi formés réagiront avec les groupements amines ( $\text{NH}_2 - \text{R}$ ) des immunoglobulines G de l'anticorps monoclonal anti-88 KD.



Pratiquement, dans nos meilleurs essais, nous partons de 1,7 mg d'AC 88, dissous dans un tampon approprié pour 1 ml de gel activé. L'ensemble est incubé dans une petite colonne (voir matériels et méthodes). L'effluent non retenu sur le gel est à la fois dosé pour son contenu en immunoglobulines et testé sur les protéines 90 KD transférées sur nitrocellulose (Western-blot). Ce dernier contrôle nous indique si le greffage des anticorps a lieu. Quand l'effluent révèle encore la

protéine 90 KD, celui-ci est remis avec le gel, jusqu'à ce qu'il soit suffisamment épuisé de son activité d'anticorps.

Le dosage des immunoglobulines est utilisé dans le but d'apprécier le taux de greffage des immunoglobulines sur le support. Cette appréciation est obtenue par le calcul de la différence entre la quantité de protéines avant et après couplage au support.

Puisque la protéine 90 KD est dépourvue de toute activité biologique mesurable, le contrôle de l'efficacité de l'adsorption a été réalisé par comparaison de l'intensité des bandes 90 KD présentes dans le SPE avant et après adsorption.

L'adsorption est apparue faible (La bande 90 KD diminue peu dans le SPE après adsorption). Plus grave encore, aucune élution de la protéine 90 KD n'a pu être obtenue du support avec le tampon Glycine-HCL pH 2,8 couramment utilisé pour l'élution d'antigènes adsorbés, d'après la littérature. Devant le résultat négatif obtenu avec ce tampon, nous avons utilisé un deuxième tampon d'élution de pH basique, dans l'espoir de décrocher mieux la protéine du gel, mais sans grand résultat. Nous avons alors renoncé à poursuivre dans la voie de la mise au point

d'un immunadsorbant efficace et reproductible basé sur l'anticorps Ac 88 de TOFT. En effet cet anticorps, qui constitue l'élément clé du protocole de purification, ne nous est fourni qu'en quantités limitées, en tout cas insuffisantes pour un travail minutieux de mise au point. Nous avons donc préféré le garder comme outil de détection et de caractérisation de la protéine 90 KD dont la purification a été envisagée d'une autre manière.

#### 1.2. APPLICATION DU PROTOCOLE DE NEMOTO et al., 1987

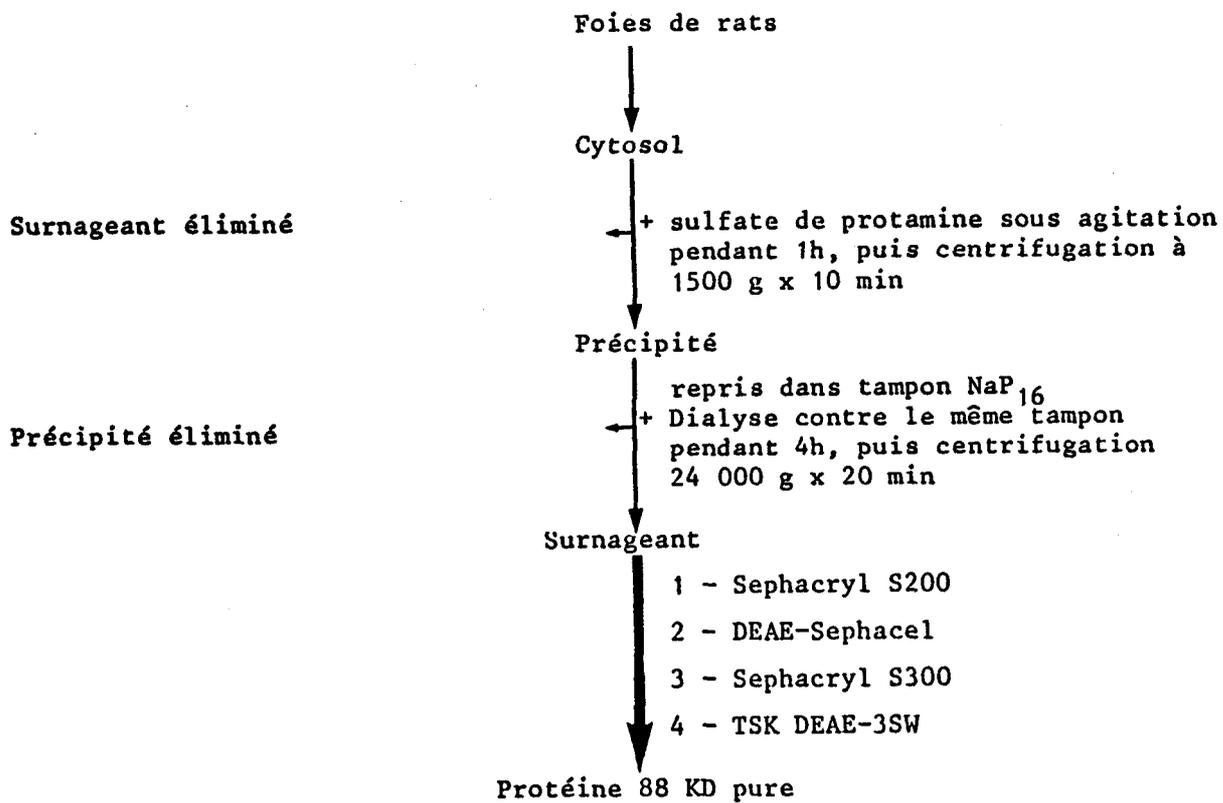
Au même moment NEMOTO et al., 1987 publiaient un protocole de purification de la protéine 88 KD du foie de rat. Le schéma de ce protocole est résumé sur la figure 19.

D'abord, pour séparer la protéine 88 KD cytosolique libre de celle liée au récepteur non transformé, 1 volume de cytosol est additionné avec 1/8 volume de phosphocellulose dans un tampon contenant du molybdate de sodium 10 mM. Le filtrat cytosolique est ensuite incubé avec une solution de protamine. Le précipité recueilli est repris dans un tampon phosphate 160 mM et dialysé contre celui-ci. Après centrifugation, le surnageant est recueilli et soumis à une succession de méthode classiques de chromatographie de gel filtration et d'échange d'ions, comme suit:

Sephacryl S200, DEAE Sephacel, Sephacryl S300, TSK DEAE-3 SW.

Nous avons testé ce protocole à de nombreuses reprises, mais nous n'avons jamais pu atteindre la dernière étape de purification pour les raisons suivantes:

\* Tout d'abord le protocole comporte de nombreuses étapes assez longues, qui peuvent compromettre la stabilité de la protéine 88 KD.



**Figure 19** - Purification de la composante non liante du RGNT du foie de rat (d'après T. NEMOTO, Y. OHARA-NEMOTO and M. OTA., 1987)

Ceci peut d'ailleurs expliquer les produits de dégradations copurifiés avec la protéine en question, dans la dernière étape.

\* A part la colonne TSK DEAE-3SW, les autres colonnes sont remplies de gels mous traditionnels. Les problèmes liés à l'utilisation de ces gels ne sont plus à démontrer, parmi ceux-ci :

- la granulométrie de ces gels est grossière (environ 100  $\mu\text{m}$  de diamètre), ce qui leur donne une résolution modérée.
- Leur résistance mécanique est assez faible ce qui implique un débit faible et des étapes chromatographiques longues. Ces gels ont tendance à se tasser facilement quand le débit et la pression qui lui sont appliqués s'élèvent.
- bien que tous les paramètres expérimentaux soient fixés, les chromatogrammes ne sont pas toujours reproductibles.

Une autre critique que l'on peut faire au protocole de NEMOTO, c'est qu'il comporte quatre étapes chromatographiques, alors qu'il n'utilise en fait que deux types de chromatographies .

### 1.3. MISE EN OEUVRE D'UN PROTOCOLE UTILISANT LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

Cette dernière réflexion, plus le fait que notre laboratoire d'accueil était équipé de matériel chromatographique à haute performance, nous ont encouragé à mettre au point un protocole en deux étapes de purification de la protéine 90 KD (voir figure 20).

Avant de rapporter nos résultats, nous avons jugé intéressant de donner quelques précisions sur la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) qui remplit un rôle déterminant dans la séparation des protéines.

#### 1.3.1 Apport de la chromatographie liquide haute performance.

L'un des plus grands progrès en chimie et biochimie fut l'introduction de la chromatographie. Dès la fin des années 40 on réalisait que la taille et la forme du matériel actif en chromatographie étaient de première importance pour la séparation de substances très voisines. Ce n'était pas uniquement les propriétés des matériels chromatographiques permettant de séparer les différentes substances qui étaient importantes, mais plutôt l'efficacité avec laquelle ces propriétés étaient utilisées. Le message était simple : faire que la surface active du matériel soit la plus large possible afin que les substances chimiques à séparer puissent interagir. Ceci se réalisait en diminuant la taille des particules du matériel chromatographique. Une chromatographie effectuée dans une colonne remplie de petites particules implique l'emploi de pompes haute pression, ainsi qu'une stabilité

mécanique accrue du matériel chromatographique. Le terme chromatographie liquide haute pression (HPLC) fut utilisé pour décrire tous les développements basés sur ces idées en chromatographie. Ces développements dus au progrès de la technique de préparation des supports, de fabrication des pompes et des détecteurs, sont apparus à la fin des années 60 et pendant les années 70. Plus tard, le sens du terme HPLC fut modifié et il signifie maintenant, Chromatographie Liquide Haute Performance. La silice est l'un des matériels chromatographiques utilisés en HPLC. Sa grande stabilité mécanique l'a rendue utilisable dans la mise en oeuvre des nouvelles idées. En Biochimie, l'HPLC a joué également un grand rôle. Aujourd'hui des particules en silice traitées par une couche compatible avec les protéines, sont disponibles. Ces particules ont approximativement un diamètre 10 fois plus petit que celui des gels mous traditionnels, ce qui leur donne une efficacité accrue en chromatographie.

Le but principal de la Biochimie est de comprendre et de décrire les structure de base responsables des fonctions biologiques des biomolécules. Une purification au préalable de ces biomolécules joue le plus souvent un rôle majeur. La diversité de la vie se reflète, d'une certaine façon, dans le vaste nombre des différentes protéines qui se trouvent dans les organismes vivants. La bactérie *E. coli*, par exemple, contient 3 000 protéines différentes, alors que les animaux supérieurs peuvent en contenir plus d'un million de différents types.

Il est alors simple de comprendre que l'isolement d'une seule protéine pure soit un travail difficile et pénible. L'analyse structurale de la protéine isolée n'en est pas moins délicate. Notre protocole de purification de la protéine 90 KD de rat est basé essentiellement sur cette Chromatographie Liquide Haute Performance, en échange d'ions, puis en exclusion de taille.

### 1.3.2. STRUCTURE DES SUPPORTS D'EXCLUSION DE TAILLE (HPSEC)

Jusqu'à la fin des années 60, l'HPLC, utilisant des supports apolaires de type hydrocarboné greffés sur la silice ( $\text{SiO}_2$ ) a été limitée aux petites molécules biologiques. Pour la séparation des macromolécules en mode d'exclusion de taille, il se posait le problème à la fois de l'inertie chimique du support et de sa porosité: En effet ce type de chromatographie nécessite que la taille des pores du support soit suffisante pour permettre la pénétration des macromolécules tout en minimisant les effets d'adsorption ionique non spécifiques dûs aux groupements silanols ( $\text{Si-OH}$ ) libres (WEHR et ABBOTT, 1979).

Depuis 1965, l'un des soucis des fabricants était d'obtenir des particules de silice de taille définie. Les premiers supports décrits étaient en verre (CPG) (HALLER, 1965), et en silice macroporeuse (KIRKLAND, 1976).

En 1980, UNGER développe des particules de silice ayant un diamètre de 10  $\mu\text{m}$ , et une taille des pores de 4000 Å. Ensuite, des efforts se sont multipliés pour réduire les phénomènes d'échange d'ions indésirables liés à ces supports.

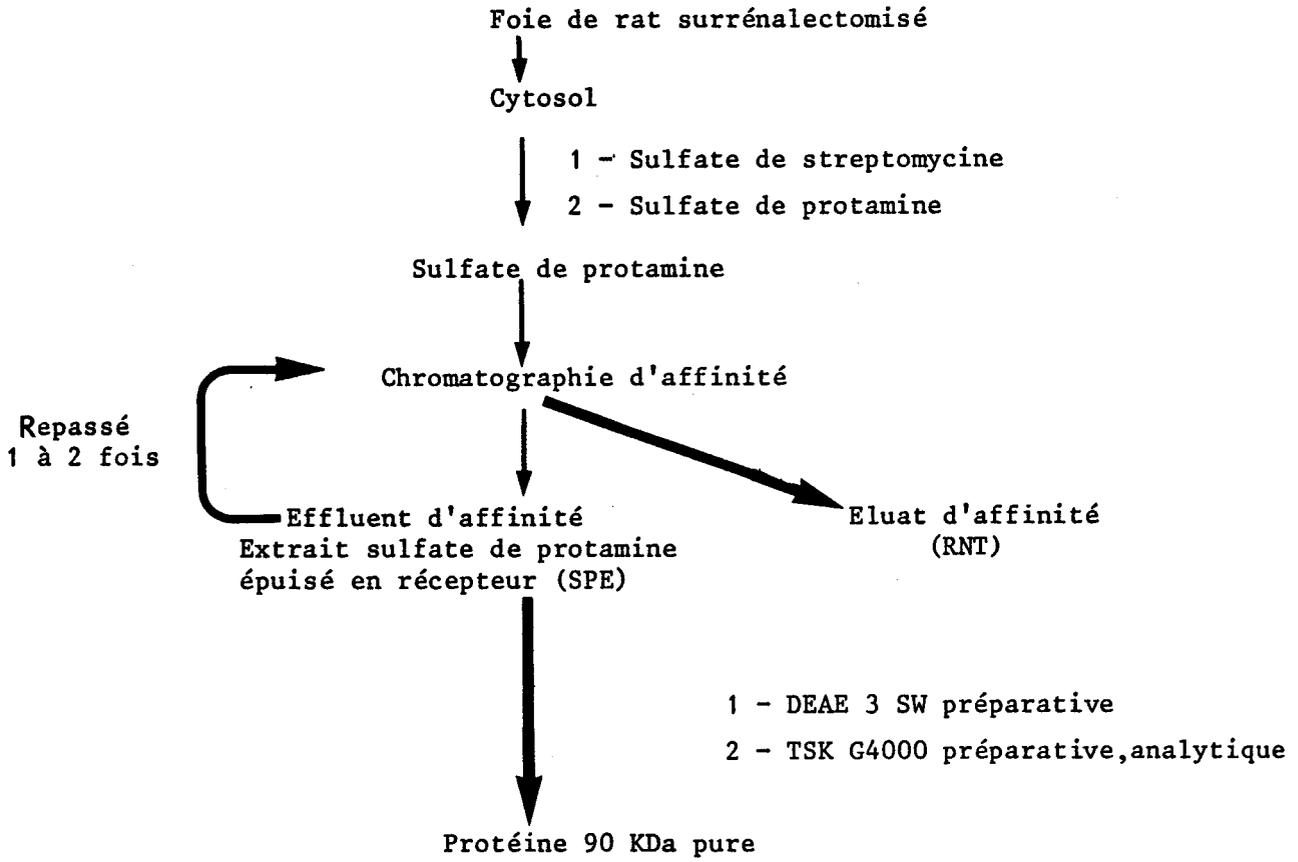


Figure 20 - Protocole de purification de la protéine du foie de rat.

La figure 21, résume un principe de greffage covalent d'une phase hydrophile inerte sur un support de type verre ou silice poreuse (REGNIER et NOEL, 1976), donnant ainsi un support rigide (de type diol) qui permet de réaliser un vrai tamisage moléculaire de protéines diverses.

Les gels TSK (ROKUSHIKA *et al.*, 1979) sont fabriqués de manière similaire au prototype donné sur la figure 21.

Actuellement, nous disposons sur le marché (TOYOSODA, Japon) de différents supports TSK SW d'exclusion de taille. Le diamètre des particules est compris entre 10 et 17  $\mu\text{m}$ , et la taille des pores varie de 12,5 à 50 nm. Les limites de séparation des différentes colonnes TSK, TSK G2000 SW ( $M_r < 100\ 000$ ), TSK G3000 SW ( $M_r < 350\ 000-500\ 000$ ), et la TSK G4000 SW ( $M_r < 1\ 000\ 000$ ) ont été précisées par ROKUSHIKA *et al.*, (1979).

### 1.3.3 STRUCTURE DES SUPPORTS D'ECHANGE D'IONS (HPIEC)

Le travail réalisé dans le cadre de la chromatographie d'exclusion de taille haute performance a beaucoup servi pour la fabrication des supports d'échange d'ions. En effet, il suffisait de réaliser une matrice échangeuse d'ions et de l'adsorber d'une manière irréversible sur les supports à base de silice de différentes porosités. C'est le cas du support préparé par CHANG *et al.*, 1976 où des groupements échangeurs d'ions (diméthylamine, diéthylamine, diéthylaminoéthyle, polyéthylèneimine) peuvent être fixés sur la fonction active époxy du



support de la silice greffée (figure 21 et 22). Le support d'échange d'ions qui nous a servi dans la purification de la protéine 90 KD de rat est la colonne TSK DEAE-3SW préparative (21,5 X 150 mm). C'est un support à base de particules de silice dont le diamètre des pores est de 250 Å, ce qui traduit une augmentation de la surface d'échange interne aux billes, et donc une meilleure résolution des grosses molécules. La taille des particules est de 10 µm ; ce paramètre se répercute sur le nombre de plateaux théoriques (N) qui mesure l'aptitude d'une colonne à limiter l'étalement des pics. N est une fonction du temps de rétention (tR) du pic sur la colonne et de la largeur à mi-hauteur (S) de ce dernier.

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

plus N est grand, et plus S est petit, donc meilleure est la résolution. Ceci est lié à la granulométrie des particules : plus le diamètre de celles-ci est petit, plus le nombre de plateaux théoriques (N) sera grand, et plus l'échange entre phase stationnaire et phase mobile augmente par diminution de la résistance au transfert. A côté de ce support, la firme Pharmacia propose le support Mono Q. C'est aussi une colonne échangeuse d'anions, mais à base de polymère organique, le groupement fonctionnel est une amine tertiaire. Ceci explique sa forte rétention et donc sa meilleure résolution pour les macromolécules biologiques. De plus, la zone de pH utilisable sur ce support est très large (pH 2 ---> 11), par rapport aux supports à base de silice, où la zone de pH recommandée ne doit pas dépasser 7-7,4, faute de quoi la silice est dissoute.

#### 1.4. APPLICATION DE LA HPIEC A LA PURIFICATION DE LA PROTEINE 90 KD.

##### 1.4.1 Choix de la colonne et des conditions expérimentales

Nous avons choisi la colonne TSK DEAE- 3SW préparative, car la protéine 90 KD possède un caractère acide (WELCH et FERAMISCO, 1982). A pH 7,4 (pH de la phase mobile aqueuse à utiliser), celle-ci sera chargée négativement, donc attirée par le groupement diéthylaminoéthyle du support. De plus cette colonne possède un volume total de 54,4 ml et une capacité d'échange d'ions importante de  $4,73 \pm 0,43$  mEq. La quantité de protéine à injecter peut aller jusqu'à 120 mg. Soit environ 20 ml de l'extrait sulfate de protamine épuisé en récepteur (SPE de 5 à 6 mg/ml). Par ailleurs, nous avons vu dans le paragraphe 2.5.1 que le récepteur non transformé (associé à la protéine 90 KD), analysé sur une DEAE-cellulose, est élué à une force ionique de 0,20 - 0,25 M KCl. Par conséquent, le phosphate qui sert à l'équilibration de la colonne (couramment utilisé pour les échangeurs d'anions), doit avoir une

molarité suffisamment inférieure à 0,2 M KCl, ceci pour permettre l'adsorption de la protéine 90 KD sur le gel. D'autre part, la force ionique étant l'un des facteurs d'élution en chromatographie d'échange d'ions, la teneur en sel de l'échantillon doit rester faible.

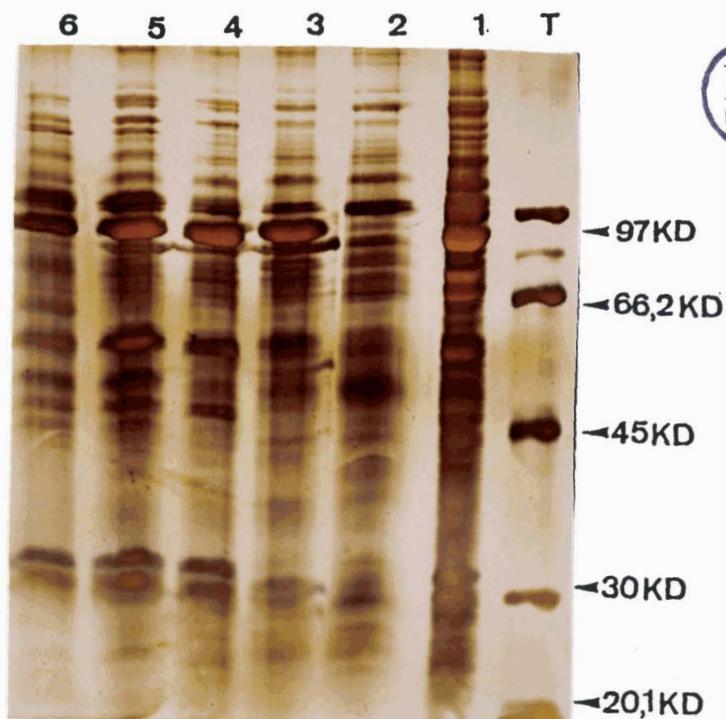
Pratiquement, 1 volume de SPE est ajusté à la même force ionique que le tampon d'équilibration (voir Matériels et Méthodes), qui ne contient pas de molybdate de sodium, additionné de  $\beta$ -mercaptoéthanol 20 mM, et ajusté à pH 7,4. Après injection de l'échantillon, une étape de lavage de 20 minutes est nécessaire pour éliminer du gel toutes les protéines adsorbées, soit faiblement, soit de manière non spécifique. Nous utilisons ensuite un gradient linéaire, de concentration en KCl (0 - 0,5 M).

#### 1.4.2 Résultats et discussion

Des aliquotes de toutes les fractions en sortie de l'HPIC sont d'abord analysées par la technique de DOT-BLOT, utilisant l'AC 88 de TOFT, et dosées pour leur contenu en sels. Les fractions contenant la protéine 90 KD sont ensuite soumises à un PAGE/SDS analytique.

La figure 23 montre un électrophorégramme, où le couloir 2 correspond à un aliquote de la fraction SPE de départ.

Les couloirs 3,4,5,6 et 7 correspondent au pic d'élution de la protéine 90 KD à partir de la concentration ionique de 0,3 M en potassium. Par rapport à la fraction SPE de départ, les fractions du pic d'élution de la protéine 90 KD sont relativement débarrassées de certaines protéines, alors que le gradient correspondant à ce profil chromatographique est de seulement 40 minutes. Sachant que la pente du gradient agit sur la sélectivité en sens inverse, à savoir que celle-ci augmente quand la

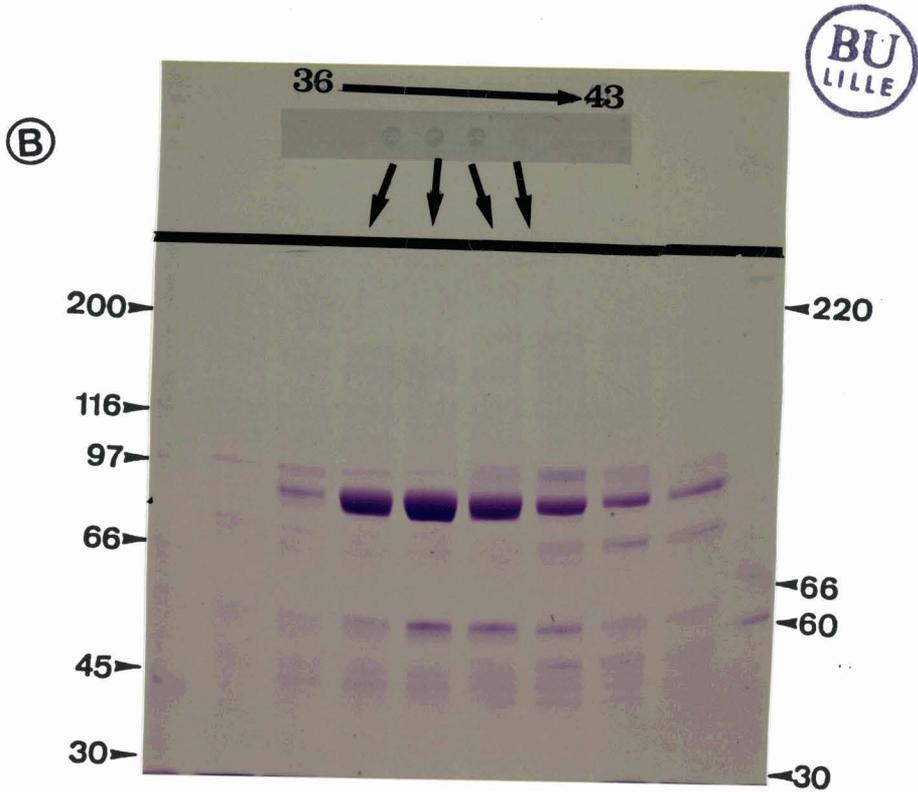
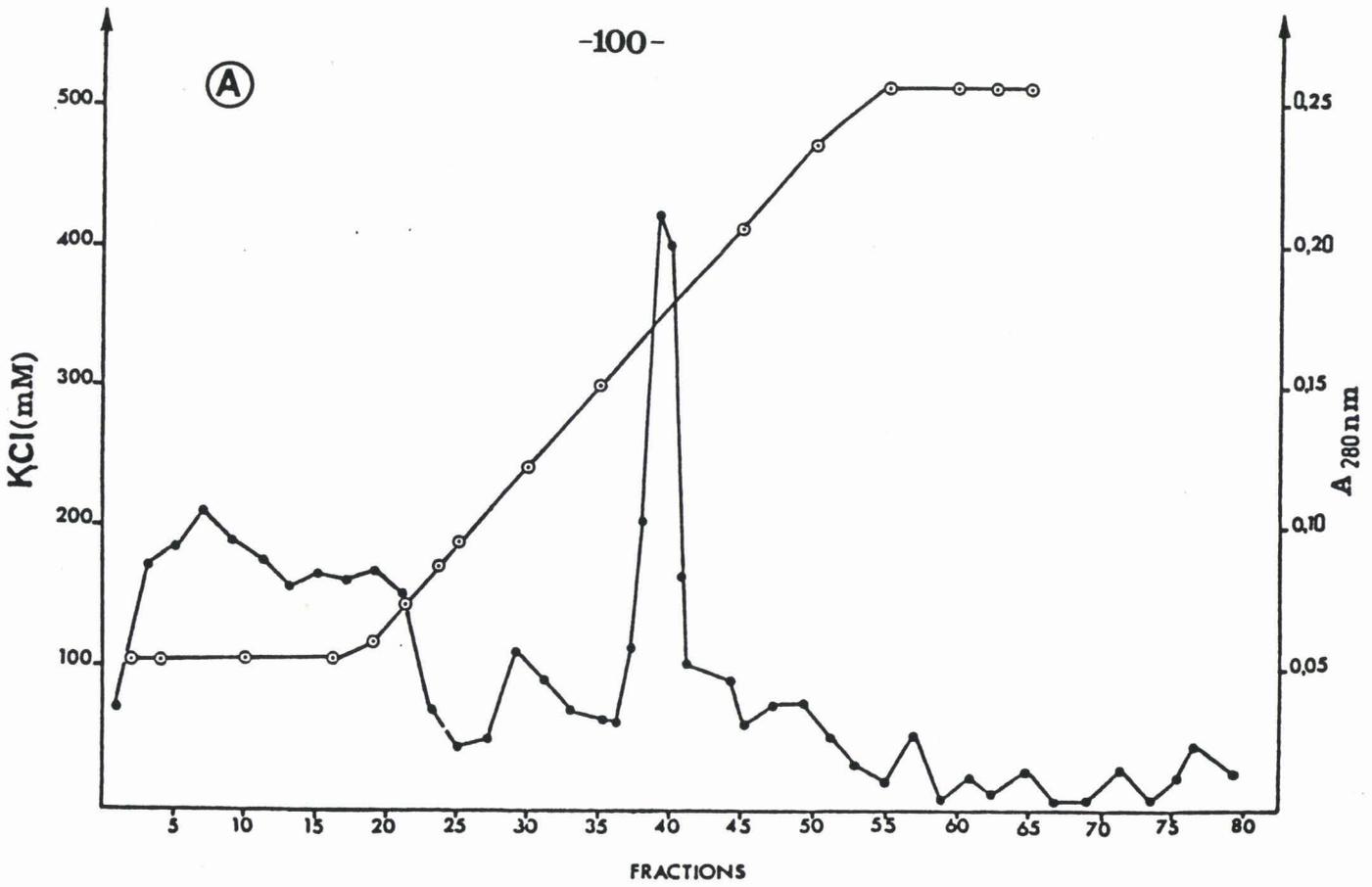


**Figure 23** - PAGE/SDS révéillé à la coloration d'argent, après chromatographie d'échange d'ions (HPIEC). Les couloirs 3,4,5 et 6 correspondent au pic d'élution de la protéine 90 KD, résultant d'un gradient linéaire en KCl de (0 à 0,5 M) de 40 minutes. Le couloir 1 représente une fraction de SPE de départ, et le couloir T montre les protéines témoins standards.

**Figure 24 - Purification de la protéine 90 KD du rat par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE préparative en HPLC.**

Une fraction (16 ml) de SPE est chargée sur la colonne TSK DEAE-3SW préparative (21,5 x 150 mm) équilibrée avec le tampon phosphate de potassium 0,05 M après un lavage de 20 minutes, l'élution est effectuée à l'aide d'un gradient linéaire de 0 à 0,5 M en KCl de 55 minutes à débit de 3,5 ml/min. Des fractions de 3,5 ml sont collectées. Des aliquotes de chaque fraction sont analysées pour leur concentration en potassium (—○—○—) et pour leur contenu protéique (A 280 nm) (—●—●—) Partie A.

Des aliquotes des mêmes fractions sont analysées par la technique d'immunorévélation en Dot-Blot (partie B). Des aliquotes des fractions contenant la protéine 90 KD, sont soumises à un PAGE/SDS analytique. Le pic d'élution de la protéine 90 se trouve dans les fractions 38, 39, 40 et 41 (partie C).



pente du gradient diminue, nous avons prolongé le temps du gradient en KCl jusqu'à 55 minutes. Nos résultats sont montrés figure 24, partie, A, B et C. Comme précédemment, des aliquotes de toutes les fractions du gradient (80 fractions) sont analysées pour la concentration saline et en protéines (A280 nm) (figure 24 partie A). La partie B de la même figure montre les fractions enrichies de la protéine 90 KD, analysées par la technique de DOT-BLOT.

Remarquons que le pic d'éluion de la protéine 90 KD est très fin ; celle-ci se trouve pratiquement concentrée sur 4 fractions (les fractions 38,39,40,41) (partie C). De plus, relativement au profil d'éluion précédent (figure 23), celui-ci nous permet, sérieusement une meilleure sélectivité de la protéine recherchée, par rapport aux autres protéines cytosoliques. Cependant, dans le pic d'éluion de l'HSP 90 KD, nous constatons la coéluion, bien que faible, d'une protéine de masse moléculaire d'environ 100 KD sous les conditions réduites (Figure 24, partie C). Celle-ci, vraisemblablement possède une charge nette similaire à celle de la protéine 90 KD.

Le succès obtenu par l'application de l'HPLC des protéines en mode d'échange d'ions pour la purification de la HSP 90 KD, nous a encouragé à utiliser l'HPLC en mode d'exclusion de taille pour mener à terme cette purification.

## 1.5. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION DE TAILLE (HPSEC)

### 1.5.1. Choix des conditions opératoires

Les colonnes utilisées sont la TSK G4000 SW préparative et analytique. Dans nos premiers essais, nous avons choisi la colonne préparative dont les volumes mort et total mesurés sont 83 ml et 218 ml respectivement. Cette colonne peut séparer jusqu'à 12 mg de protéines, le volume d'échantillons à injecter ne doit pas dépasser l'équivalent de 2 % du volume total de la colonne. Le tampon d'élution comprend du TES 20 mM, possédant un pouvoir tampon stable à pH 7 (pH préconisé pour les supports à base de silice). La force ionique ( $\mu$ ) du tampon est apportée par l'ajout de NaCl 200 mM ( $\mu = 0,2$ ). Ainsi, les phénomènes d'adsorption non spécifiques sur le support sont réduits.

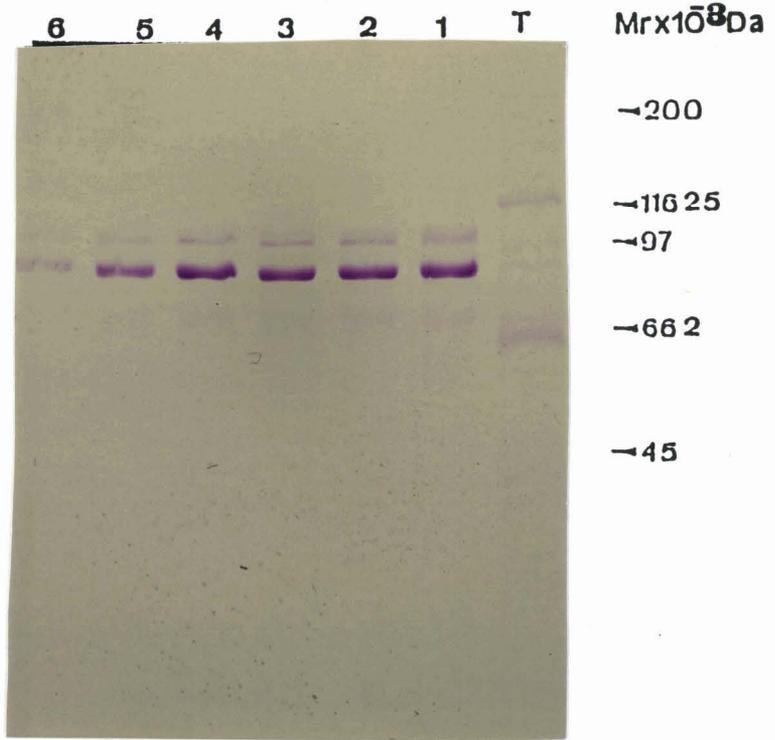
### 1.5.2 Résultats et discussion.

Après avoir recueilli les fractions du pic d'élution de la protéine 90 KD, en sortie de colonne d'échange d'ions (généralement 4 fractions de 3,5 ml chacune), celles-ci sont concentrées jusqu'à un volume de 2 ml, qui est immédiatement injecté sur la colonne TSK G4000 SW préparative, précalibrée avec un kit commercial de protéines standards (voir Matériels et Méthodes). Le débit optimum d'élution est de 3,5 ml/mn. Des fractions de 1,75 ml sont collectées, celles-ci sont d'abord analysées par la technique de Dot-blot, utilisant l'AC 88. Les fractions intéressantes sont ensuite soumises à un PAGE/SDS analytique. La figure 25, partie A, montre le pic d'élution de la protéine 90 KD à travers cette colonne préparative. Celui-ci est obtenu entre la 41e et 43e minute, ce qui correspond au volume d'élution de la  $\beta$ -galactosidase d'E.coli, et de la ferritine de rayon de Stokes

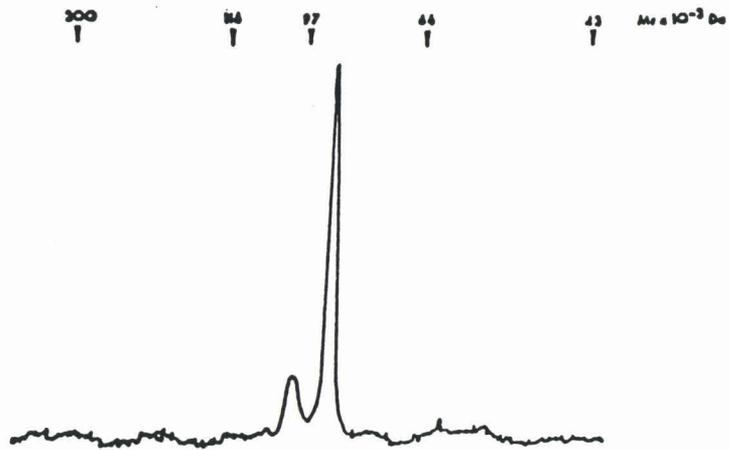
**Figure 25 -** A) PAGE/SDS coloré au bleu de Coomassie correspondant au pic d'élution de la protéine 90 KD, à travers la colonne TSK G4000 SW préparative, prééquilibré avec le tampon d'élution, et précalibré avec un kit commercial de protéines standards auxquelles nous avons rajouté la  $\beta$ -galactosidase d'E. coli de rayon de Stokes 6,9 nm. Le débit optimum d'élution est de 3,5 ml/min. Des fractions de 1,75 ml sont collectées, testées par la technique de Dot-Blot, utilisant AC 88. Les fractions contenant la protéine 90 KD se trouvent dans les couloirs 1,2,3,4,5 et 6. Le couloir T représente les protéines standards d'électrophorèse utilisées.

B) Courbe densitométrique de la protéine 90 KD, obtenue à partir du couloir 5-(partie A), les flèches indiquent les positions des protéines témoins d'électrophorèse utilisées dans le couloir T.

(A)



(B)



respectifs 6,9 nm et 6,1 nm. Pour estimer le pourcentage de purification de notre protéine, un des couloirs d'électrophorèse du pic d'élution de cette protéine est soumis à une lecture densitométrique. Le pic majeur représente 85 % du total. Les 15 % restant, correspondent à un contaminant dont nous avons déjà signalé la présence (même faiblement) après la chromatographie d'échange d'ions sur la TSK DEAE-3SW avec un gradient d'élution qui dure 55 minutes (figure 24 , partie C). Ce contaminant qui est déjà mentionné dans les travaux de WEICH et FERAMISCO, 1982 se rapportant à la purification de la protéine HSP 90 KD à partir des cellules humaines HeLa, ne possède aucune identité épitopique commune avec la protéine 90 KD, comme nous pouvons le constater à travers l'étude suivante.

#### 1.5.3 Caractéristiques immunochimiques de la protéine 90 KD purifiée

Après chaque étape de purification, l'identité immunochimique de la protéine 90 KD est vérifiée soit par la technique de DOT-BLOT, soit par la technique d'immunorévélation des protéines après électrotransfert d'un gel d'acrylamide sur une feuille de nitrocellulose (Western-blot). L'anticorps utilisé est le monoclonal anti 88 KD (AC 88) qui a été produit par le groupe de TOFT (RIEHL *et al.*, 1985). En effet, celui-ci est très utilisé comme sonde moléculaire pour détecter la présence de protéines analogues de 90 KD dans les tissus de mammifères. La figure 26, partie B, montre la révélation de cette protéine purifiée, à la fois

**Figure 26** - A) PAGE/SDS analytique coloré au bleu de Coomassie, à côté des protéines standards (couloir T), une fraction de SPE figure dans le couloir 1. Le couloir 2 représente la première étape de purification, les 3 et 4 montrent la protéine 90 KD purifiée et analysée dans les conditions d'électrophorèse en présence et en absence de réducteurs de thiols ( $\beta$ -mercaptoéthanol à 10 % final)

B) Immunorévélation du PAGE/SDS, partie A, après transfert sur une feuille de nitrocellulose, le couloir 4 est révélé par un anticorps polyclonal anti 90 KD de rat. Le couloir 5 par l'anticorps monoclonal AC 88.

$M_r \times 10^3 \text{ Da}$

T

1

2

3

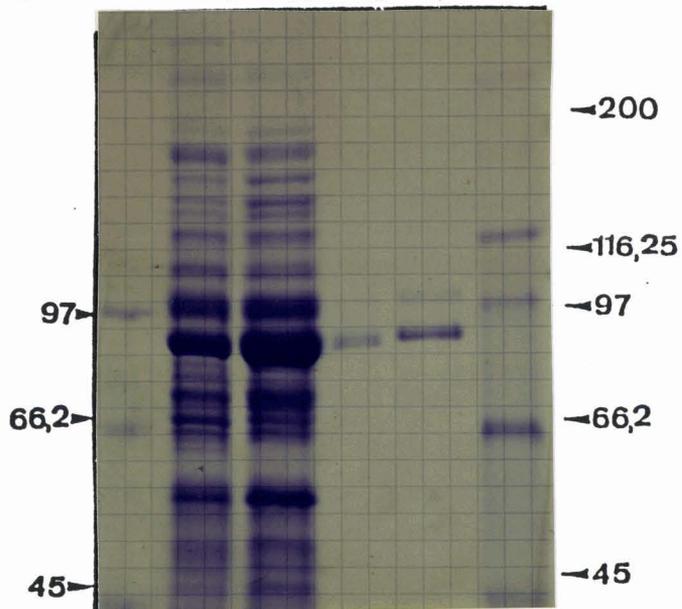
4

T

$M_r \times 10^3 \text{ Da}$

Ⓐ

-105-



T

5

4

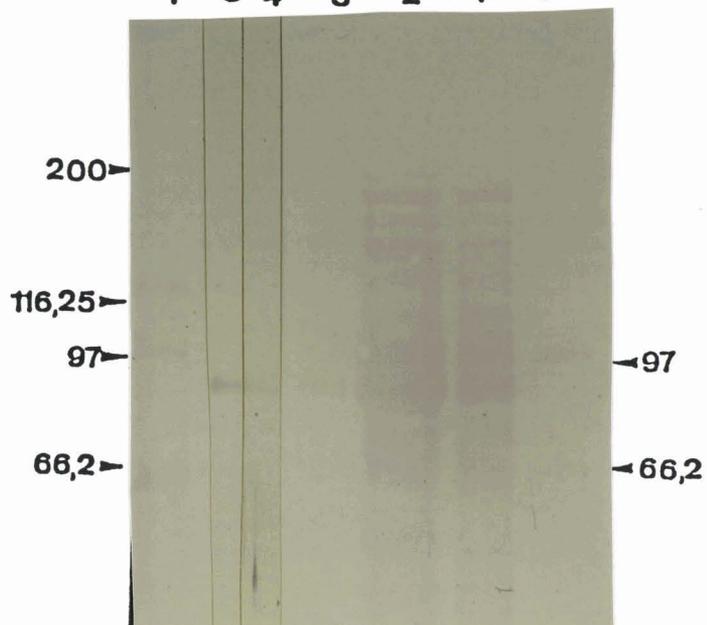
3

2

1

T

Ⓑ



par l'AC 88 et un anticorps polyclonal IS 25 que nous avons développé contre cette protéine (voir plus loin). Cependant, nous sommes étonnés que dans les protocoles de purification de la même protéine, développés par NEMOTO *et al.*, 1987 et par DENIS, 1988, l'utilisation de cet anticorps monoclonal ne soit pas mentionnée.

#### 1.5.4 Amélioration du degré de pureté de la protéine 90 KD

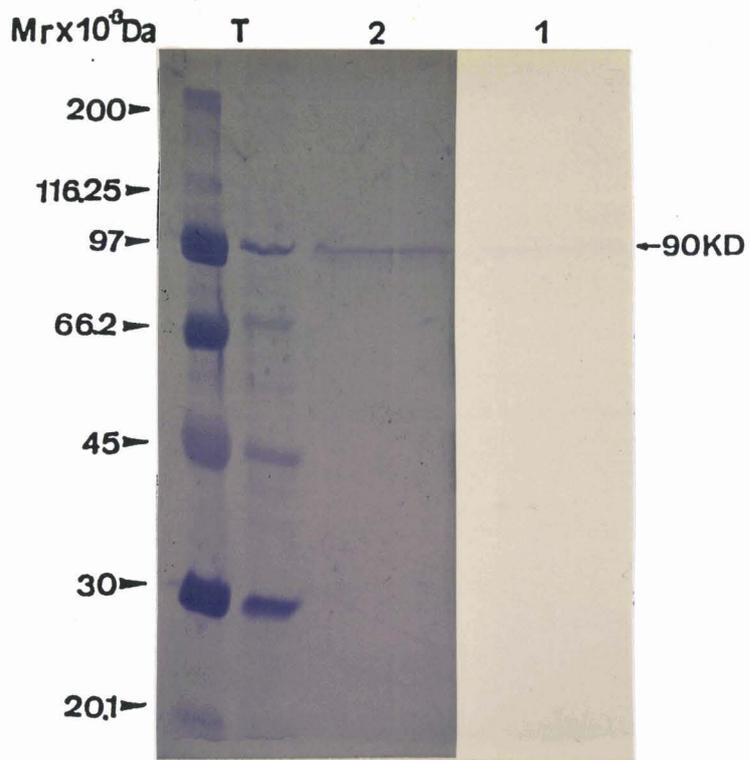
L'étude précise des caractéristiques physicochimiques de la protéine 90 KD nécessite l'obtention de celle-ci à l'état d'homogénéité. Pour ce faire de multiples précautions ont été adoptées :

Après de nouvelles calibrations de la colonne TSK G4000 SW avec les protéines standards, il s'avère que leurs pics d'élution présentent un épaulement anormal, avec un mauvais retour à la ligne de base. Ceci persiste même en lavant la colonne avec un tampon de forte force ionique (NaCl 0,5 M, acide acétique 0,01 N). Au vu de ces symptômes qui traduisent un vieillissement de la colonne préparative, nous avons utilisé la TSK G4000 SW analytique, et pour mettre toutes les chances de notre côté, nous n'injections sur cette colonne analytique que des fractions d'HPIC où le contaminant de WELCH et FERAMISCO existe en faible proportion par rapport à la protéine 90 KD (figure 24, partie C, fractions 39 et 40). Certes, en procédant ainsi, nous allons perdre sur le rendement de purification de la protéine 90 KD par rapport à l'utilisation de la colonne préparative, mais nous gagnons sur le degré de pureté de celle-ci, ainsi qu'il est mentionné dans la légende de la figure 27.

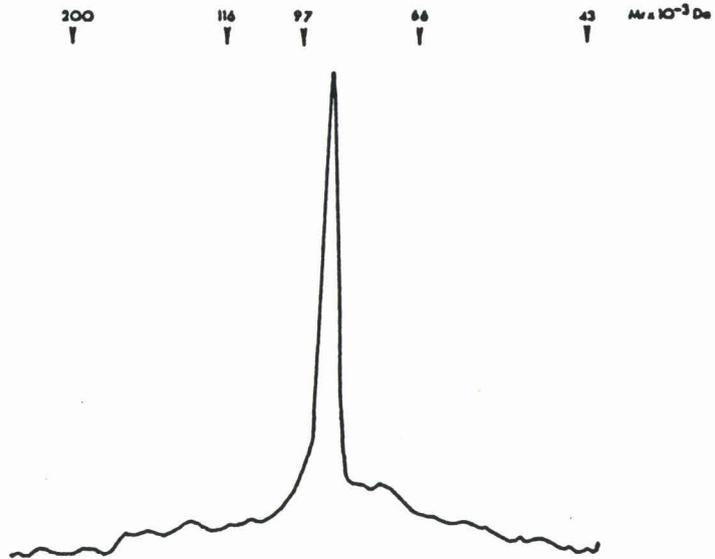
**Figure 27** - A) Des fractions du pic d'éluion de la protéine 90 KD après chromatographie d'échange d'ions (HPIEC) contenant peu ou pas le contaminant de 100 KD (contaminant de WELCH et FERAMISCO, 1988) sont collectées puis concentrées et injectées (en plusieurs fois) sur la TSK G4000 SW analytique, prééquilibrée dans le tampon TES 20 mM, NaCl 200 mM, -mercaptoéthanol, pH 7 à un débit de 0,5 ml/min. Des fractions de 0,250 ml correspondant au pic d'éluion de la protéine 90 KD (à partir de la 18e minute) sont recueillies. Des aliquotes de celles-ci sont soumises à un PAGE/SDS analytique (couloir 1), puis transférées sur un support P.V.D.F. (voir plus loin) pour un microséquençage de la partie N-terminale de cette protéine.

B) Courbe densitométrique (lecteur de gel : VERNON) du couloir 1, les flèches indiquent la position des protéines témoins standard utilisées dans les couloirs T.

Ⓐ



Ⓑ



1.6 LE RENDEMENT DE PURIFICATION DE LA PROTEINE 90 KD  
PAR LE PROTOCOLE ETABLI.

D'après les connaissances actuelles données dans la littérature concernant la protéine 90 KD, celle-ci ne présente aucune activité biologique mesurable, connue qui lui soit spécifique. Par conséquent, nous ne pouvons déterminer le taux de purification de cette protéine, après chaque étape chromatographique. Cependant, une fraction protéique du cytosol, soumise à un PAGE/SDS suivi d'une lecture densitométrique, indique que cette protéine représente 1 % des protéines totales cytosoliques (WELCH et FERAMISCO, 1982 ; SANCHEZ *et al.*, 1985). En se basant sur ce calcul approximatif, nous avons calculé le rendement de purification résultant de notre protocole de séparation de cette protéine, donné par la formule suivante.

$$\text{Rendement en pourcentage (R\%)} = \frac{\text{Quantité de la protéine (mg) après purification}}{\text{Quantité de la même protéine (mg) avant purification}} \times 100$$

Notre échantillon de départ est la fraction SPE, ayant un taux habituel de protéine de 6 mg/ml. Injectant 16 ml de SPE (96 mg de protéines totales) à la TSK DEAE -3SW, nous récupérons 0,3 mg de la protéine 90 KD pure en sortie de la TSK G4000 analytique. En appliquant la formule donnée ci-dessus, nous trouvons un rendement de 31 % . La valeur de ce

rendement est supérieure à celle donnée par le protocole de NEMOTO *et al.*, 1987, qui est de 27 % , et qui fait appel, rappelons-le, à plus de deux étapes. Par ailleurs, DENIS, 1988, adoptant un protocole identique au nôtre, donne un rendement de purification de 74 % pour la même protéine.

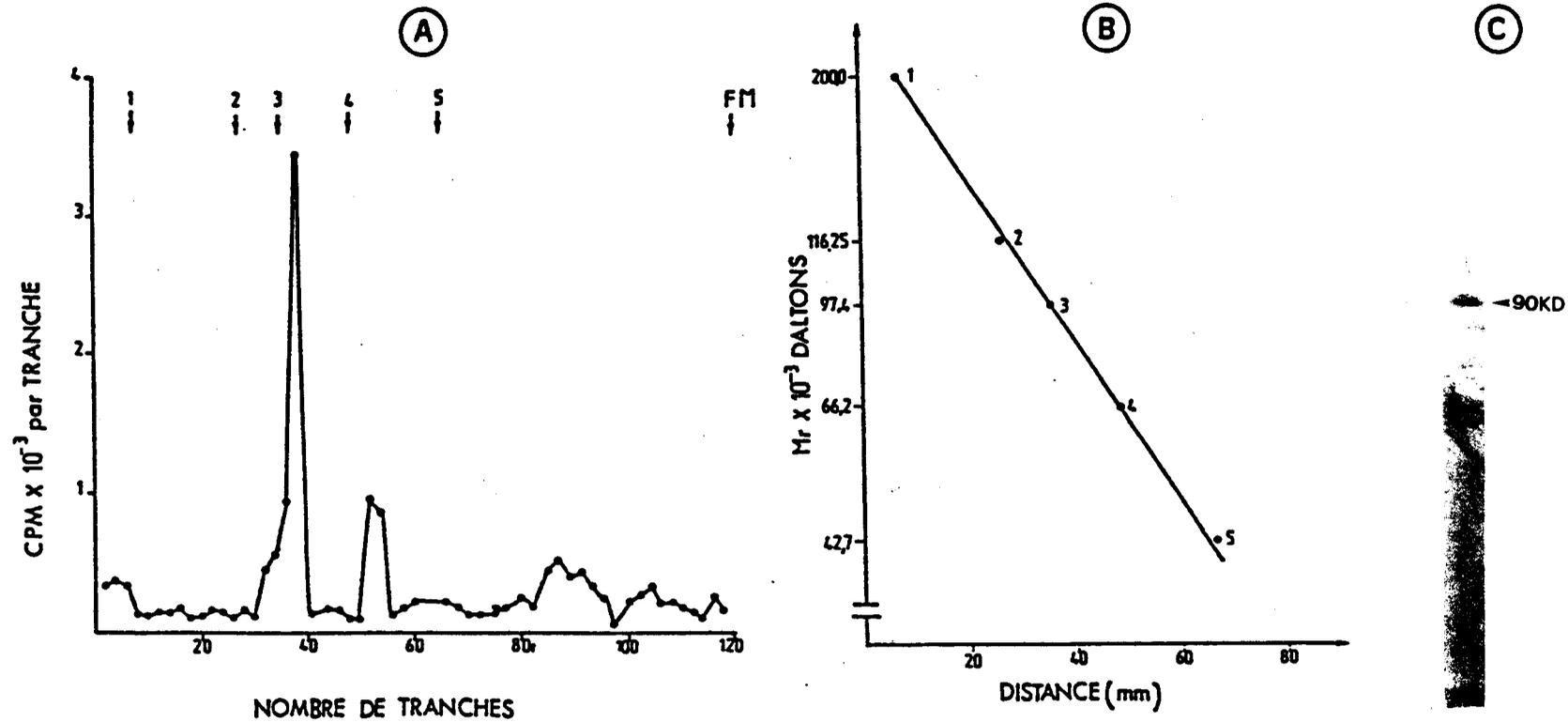
On peut se demander si ceci est dû au fait qu'il a utilisé une colonne Mono Q, qui normalement, est plus résolutive que la TSK DEAE-3 SW.

Quoi qu'il en soit, un dosage immunoenzymatique de la protéine 90 KD par la technique d'ELISA, utilisant l'AC 88 de TOFT pourrait permettre une quantification précise de cette protéine. Cette technique est très consommatrice d'anticorps, et nous préférons le garder pour d'autres utilisations plus essentielles.

## 2. CARACTERISATION DE LA PROTEINE 90 KD PURIFIEE.

### 2.1 Marquage au réactif de BOLTON et HUNTER, 1978.

La protéine 90 KD du foie de rat a été purifiée par un protocole simple, comportant deux étapes de chromatographie sur support à haute performance. L'état d'homogénéité électrophorétique de la protéine obtenue, caractérisé par une bande unique de masse moléculaire 90 KD en PAGE/SDS analytique (figure 27), ainsi que son identification immunochimique à la fois par l'AC 88 et l'immunsérum IS 25 nous ont permis d'étudier les caractéristiques physicochimiques de cette protéine. Pour ce faire, nous avons marqué une quantité de 25 µg de la protéine purifiée avec le réactif de BOLTON-HUNTER ; le N-succinimidyl (2,3-<sup>3</sup>-H) propionate qui est spécifique des fonctions amines libres présentes dans les protéines (voir Matériels et Méthodes). Après élimination de l'excès de réactif libre par filtration sur gel,

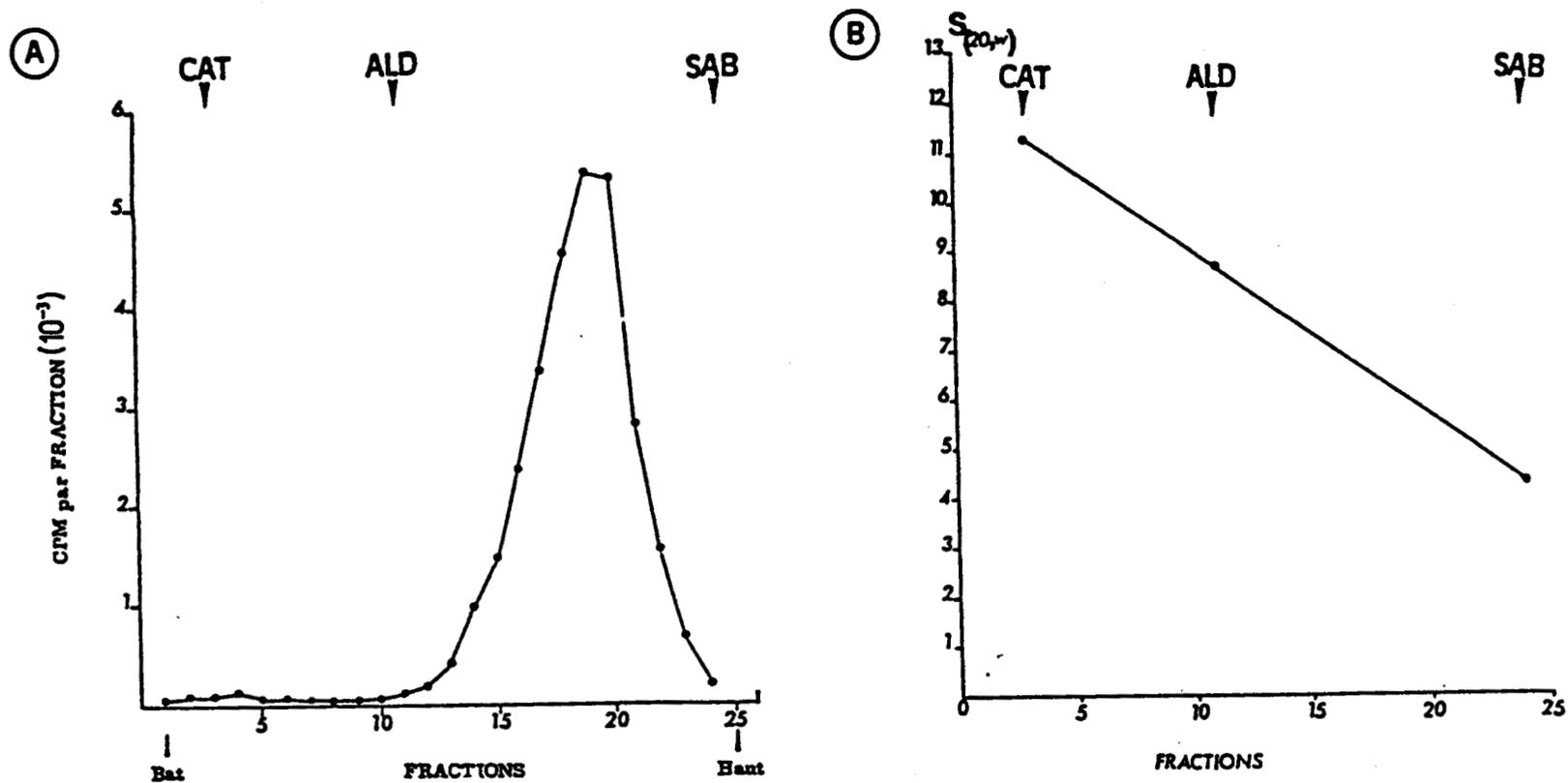


**Figure 28** - A) Electrophorèse en gel de polyacrylamide de la protéine 90 KD purifiée et marquée au réactif de BOLTON et HUNTER. Une fraction du pic d'éluion est soumise à un PAGE/SDS analytique. Le couloir de migration est alors découpé en tranches de 2 mm, dont la radioactivité est mesurée. Les flèches indiquent la position des témoins de masse moléculaire, dont la courbe de calibration est montrée sur la partie B. C) Autoradiographie d'un PAGE/SDS d'un aliquote de la même fraction marquée au réactif de BOLTON et HUNTER.

une fraction du pic lié est analysée en PAGE/SDS analytique, suivie d'un découpage du gel en tranches (slice number) dont la radioactivité est mesurée. Le résultat obtenu montre une bande majeure de 90 KD ainsi qu'en témoigne la figure 28 partie A, de plus compte tenu de l'activité spécifique du marquage obtenu qui est de  $0,35 \mu\text{ci}/\mu\text{g}$ , nous avons tenté de visualiser la protéine marquée en autoradiographie, celle-ci est présentée sur la figure 28 partie C, où une bande de 90 KD apparaît après deux semaines seulement d'exposition. L'ensemble de ces résultats, témoins de l'homogénéité de notre préparation de la protéine 90 KD purifiée, nous ont encouragé à déterminer ses paramètres physicochimiques.

## 2.2 Mesure du coefficient de sédimentation

Des aliquotes de la protéine 90 KD purifiée et marquée sont déposées sur des gradients linéaires en saccharose (5 à 20 %) préparées dans un tampon de force ionique élevée ( $\mu = 0,30$ ), contenant du phosphate de potassium 160 mM, et du mercaptoéthanol (20 mM). Les tubes sont soumis à une ultracentrifugation de 55 000 rpm pendant 16 heures à 0°C. La mesure du coefficient de sédimentation de la protéine 90 KD est réalisée par comparaison des standards centrifugés dans le même rotor et dont les coefficients de sédimentation ( $S_{20,w}$ ) sont connus : catalase (11,3 S), aldolase et (7,8 S), sérumalbumine (4,3 S). La protéine 90 KD purifiée sédimente à  $6,0 \pm 0,1$  ( $n = 3$ ), tel qu'en témoigne la figure 29. Cette valeur est tout à fait comparable avec celles rapportées dans la littérature. En effet, à partir de la même source biologique (foie de rat) DENIS *et al.*, 1988a, utilisant un tampon de gradient qui contient 160 mM de NaCl, trouvent une valeur de 6,1 S,



**Figure 29** - Mesure du coefficient de sédimentation de la protéine 90 KD purifiée.

A) des aliquotes de 200  $\mu$ l de la protéine purifiée sont déposés au sommet d'un gradient linéaire de sucrose (5-20 %). Après 16 heures d'ultracentrifugation à 55 000 rpm, des fractions de 170  $\mu$ l sont collectées par la base des tubes, puis comptées en radioactivité. Les flèches indiquent les protéines standard, dont la courbe de calibration est montrée par la partie B (Cat : catalase,  $S_{W,20} = 11,3$  ; ALD : aldolase,  $S_{20,w} = 7,8$  ; SAB : Séralbumine,  $S_{20,w} = 4,3$  )

qui est proche de celle donnée par NEMOTO *et al.*, 1987, soit 6,2 aussi bien en force ionique élevée (0,4 M de KCl) qu'en faible force ionique (10 mM de molybdate de sodium). De plus, ces valeurs sont similaires pour la même protéine chez d'autres espèces ; l'HSP 90 KD humaine possède un coefficient de sédimentation de 5,8 en absence de sels (WELCH et FERAMISCO, 1982), l'HSP 90 KD purifiée à partir de l'oviducte de poule sédimente à 6,2, que ce soit en présence ou en absence de 400 mM de KCl (RADANYI *et al.*, 1989). Les petites variations des valeurs des coefficients de sédimentation observées peuvent être dues à la nature du tampon utilisé en ultracentrifugation ; ce dernier, peut selon sa force ionique modifier le degré d'hydratation de la protéine 90 KD et par conséquent altérer sa densité.

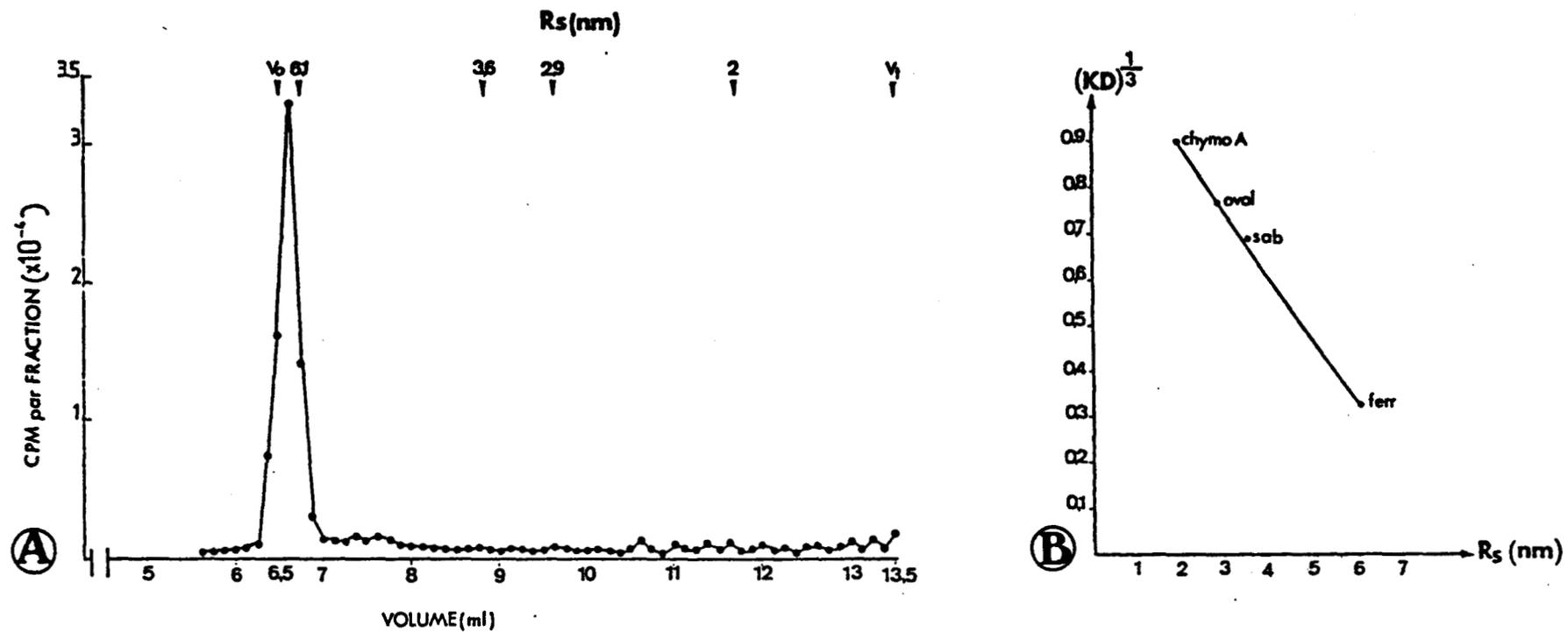
### 2.3 Mesure du rayon de Stokes

Le rayon de Stokes ( $R_s$ ) de la protéine 90 KD purifiée et marquée a été déterminé essentiellement par chromatographie d'exclusion de taille haute performance (HPSEC). Les colonnes utilisées sont la TSK G3000 SW et la TSK G4000 SW prééquilibrées dans un tampon de pH 7 composé de : TES 20 mM, NaCl 150 mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 10 mM (voir Matériels et Méthodes). Les calibrants employés sont des protéines standards fournies par des Kits commerciaux, dont les  $R_s$  sont connus et leur volume d'élution ( $V_e$ ) est détecté par absorbance UV à 280 nm. Le volume d'exclusion de la colonne ( $V_o$ ) est mesuré par l'élution du Bleu Dextran 2000 et le volume total ( $V_t$ ) est mesuré par l'élution du bichromate de potassium.

Pour chaque calibrant nous calculons le coefficient de distribution ( $K_D$ ) selon la formule :

$$K_D = \frac{V_e - V_0}{V_T - V_0}$$

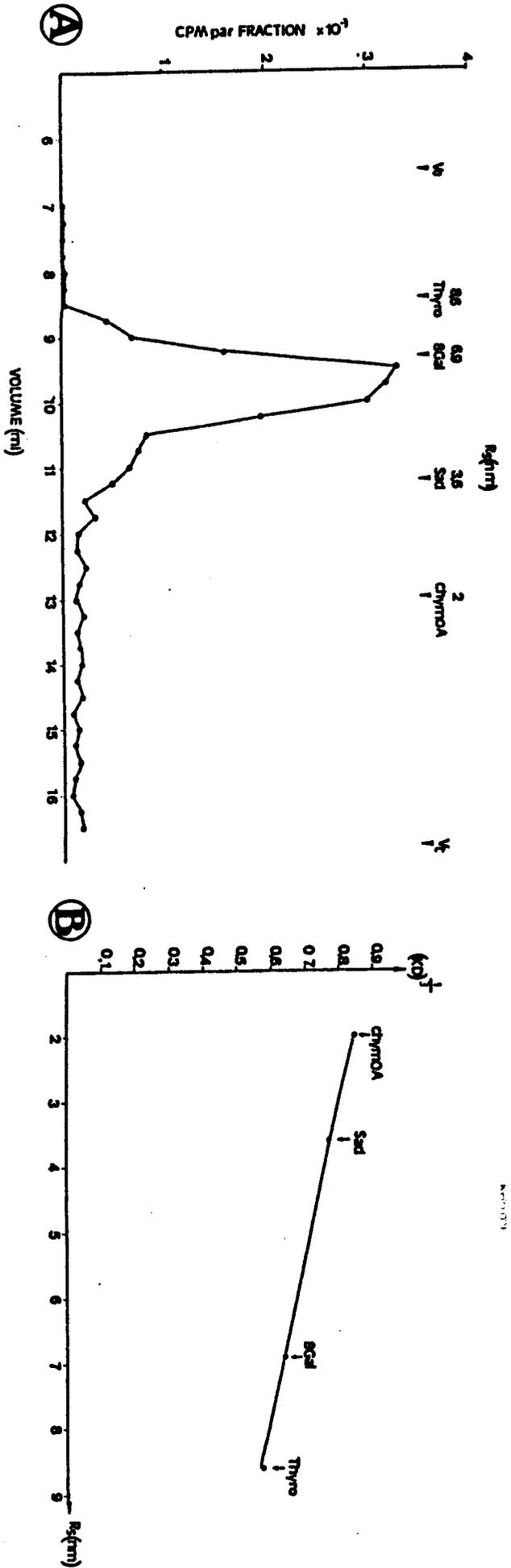
La courbe de calibration des valeurs de  $(K_D)^{1/3}$  en fonction des valeurs de  $R_s$  correspondantes, dérivant du modèle de PORATH (1963), et applicable pour les protéines globulaires (SIEGEL et MONTY, 1966), nous permet aisément la détermination du  $R_s$  de la molécule étudiée connaissant son  $K_D$ . Nous avons d'abord déterminé le  $R_s$  de la protéine 90 KD sur la colonne TSK G3000 SW, cependant le volume d'élution de cette protéine est très proche du volume mort ( $V_0$ ) de la colonne (figure 30), si bien que le rayon de Stokes est seulement de 6,5 nm. Devant l'imprécision de la courbe de calibration de la colonne TSK G3000 SW pour les protéines de taille supérieure à 6 nm, nous avons utilisé la colonne TSK G4000 de porosité supérieure. Parmi les calibrants nous avons ajouté la  $\beta$ -galactosidase d'*Escherichia coli* dont la valeur du rayon de Stokes ( $R_s = 6,9$  nm), permet une bonne évaluation de la calibration dans la zone de tailles moléculaires élevées. La valeur du  $R_s$  de la protéine 90 KD, obtenue sur ce support est de  $6,8 \pm 0,1$  (n=2) (figure 31). Notons que cette valeur est tout à fait en accord avec les résultats donnés dans la littérature. En effet, DENIS *et al.*, 1988a utilisant l'HPSEC, trouvent une valeur de 6,9 nm, la même valeur du rayon de Stokes est obtenue par WELCH et FERAMISCO, 1982 pour l'HSP 90 KD des cellules HeLa.



**Figure 30 - Mesure du rayon de Stokes de la protéine 90 KD purifiée et marquée sur la TSK G3000 SW(8X300mm)**

A) L'échantillon de la protéine 90 KD purifiée et marquée au réactif de BOLTON et HUNTER est injecté sur la TSK G3000 SW, prééquilibrée dans un tampon TES 20 mM, pH 7 à un débit de 5 ml/min. Des fractions de 0,125 ml sont collectées et mesurées en radioactivité.

B) Courbe de calibration obtenue à partir des protéines standards utilisées, dont les rayons de Stokes sont connus : Ferritine 6,1 nm ; Sérualbumine 3,6 nm ; ovalbumine 2,9 nm, chymotrypsinogène 2,0 nm).



**Figure 31** - Mesure du rayon de Stokes de la protéine 90 KD purifiée et marquée sur la TSK G4000 SW (7.5x300)

**A)** L'échantillon contenant la protéine 90 KD purifiée et marquée est injectée sur la TSK G 4000 SW analytique, équilibrée dans un tampon TRIS 20 mM, pH 7 à un débit de 0,5 ml/min. Des fractions de 0,250 ml sont collectées et dosées pour leur concentration radioactive.

**B)** La courbe de calibration obtenue à l'aide de protéines témoins de rayons de Stokes connus (Thyroglobuline 8,6 nm ;  $\beta$ -galactosidase d'E. coli 6,9 nm ; Sérumbalbumine 3,6 nm ; chymotrypsinogène 2)

2.4 Calcul des paramètres physicochimiques de la protéine 90 KD.

A partir des données de l'ultracentrifugation et de la chromatographie d'exclusion de taille, nous avons calculé les valeurs de la masse moléculaire et du rapport de friction de la protéine 90 KD purifiée. Avant de rapporter nos résultats, voici brièvement les équations bien établies qui permettent ces calculs.

Le rayon de Stokes d'une molécule dépend de sa taille moléculaire (ONCLEY, 1941) et correspond au rayon d'une sphère anhydre de même masse et de même volume spécifique partiel ( $\bar{V}$ )

$$R = \frac{3 M \bar{V}^{1/3}}{4 \pi N_A}$$

R = Rayon de la sphère anhydre

M = Masse moléculaire

V = volume spécifique partiel

N<sub>A</sub> = nombre d'AVOGADRO

La valeur du rayon de Stokes dépend aussi du degré de solvatation de la molécule selon l'équation

$$R_s = R \times \left( 1 + \frac{w}{\bar{V} l} \right)^{1/3} \times \frac{F}{F_0}$$

w = nombre de grammes de solvant par gramme de protéine

l = densité du solvant

Le terme  $F/F_0$  est le rapport de friction, en relation directe avec le degré d'asymétrie de la molécule étudiée et par conséquent de sa forme moléculaire ;  $F/F_0$  est d'autant plus grand que la molécule est dissymétrique (la valeur de  $F/F_0$  peut varier de 1 à 2) : sachant que la valeur du degré de solvatation des protéines est généralement égal à 0,2 gramme d' $H_2O$  par gramme de protéine (TANFORD, 1963), et que le volume spécifique partiel ( $v$ ) de la plupart des holoprotéines est de  $0,732 \text{ cm}^3/\text{g}$  (VEDECKIS, 1983), la valeur de  $F/F_0$  est donnée par l'équation suivante (SHERMAN, 1975).

$$\frac{F}{F_0} = 13,93 \times \frac{R_s(\text{nm})}{M^{1/3}}$$

La valeur de la masse moléculaire peut être évaluée par la relation de SIEGEL et MONTY, 1966

$$M = \frac{6 \pi N_A S_{20,w} R_s}{1 - \bar{v} \rho}$$

où en remplaçant les termes constants, on obtient la fameuse équation simplifiée qui relie la masse moléculaire, le coefficient de sédimentation et le rayon de Stokes d'une molécule, comme suit :

$$M = 4224 \times S_{20,w} \times R_s(\text{nm})$$

En remplaçant la valeur de  $S_{20,w}$  et le  $R_s$  de la protéine 90 Kd dans la dernière relation, celle-ci possède une masse moléculaire à l'état natif de 172,33 KD. Il s'agit très vraisemblablement d'une protéine dimérique. Par ailleurs, l'analyse de la protéine purifiée, par la technique de PAGE/SDS en présence et en absence d'agents réducteurs tels que le  $\beta$ -mercaptoéthanol à la concentration finale de 10 % (v/v) montre une bande de 90 KD (figure 26), prouvant ainsi que les liaisons des ponts

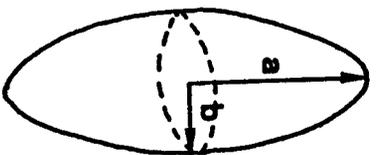
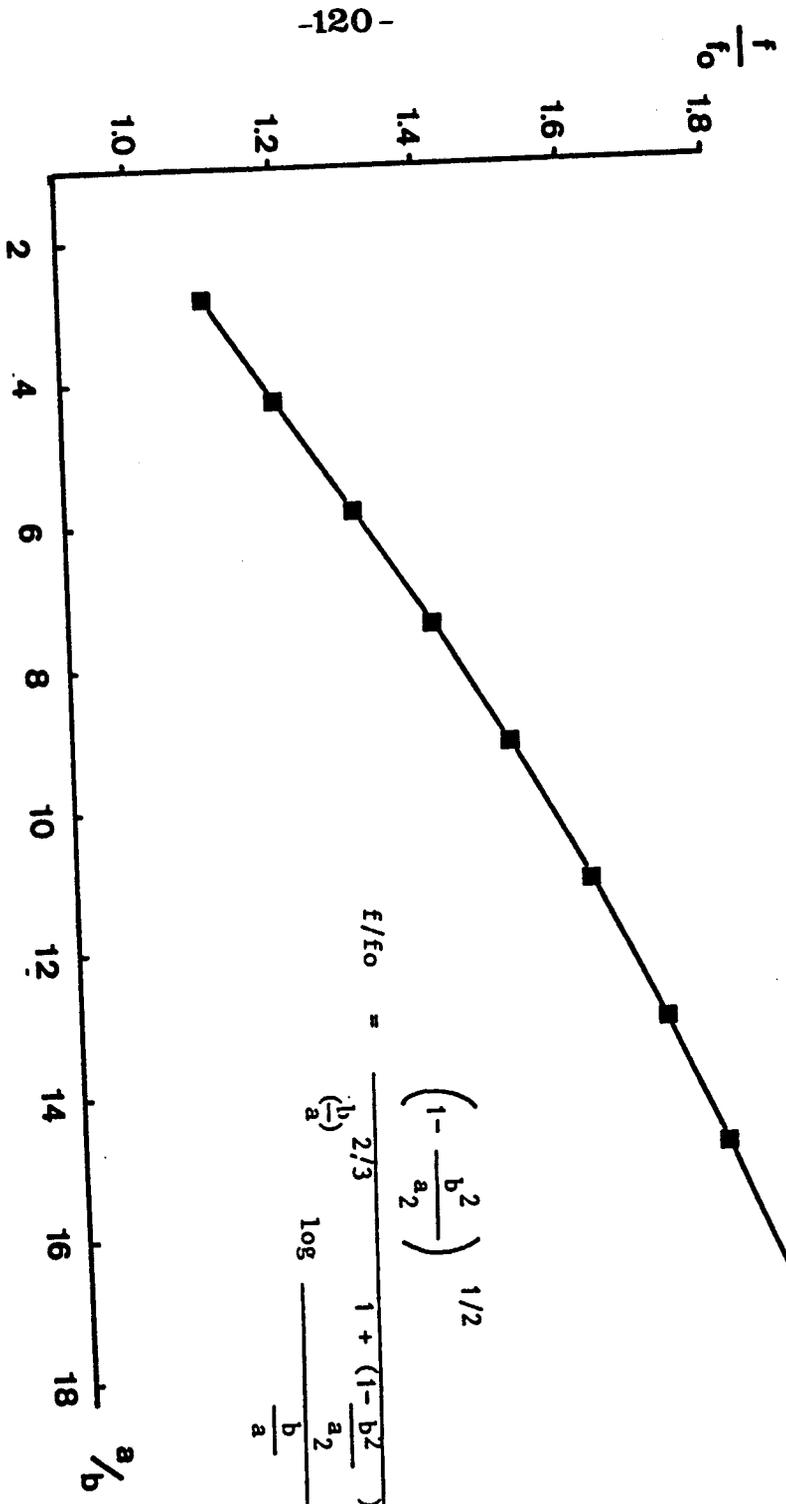
disulfure n'interviennent pas dans le phénomène de dimérisation de cette protéine. Ce résultat n'est pas contredit par les travaux récents portant sur l'HSP 90 KD de poule (RADANYI *et al.*, 1989) qui suggèrent plutôt la participation des liaisons hydrogène dans la formation du dimère.

Le calcul du rapport frictionnel  $F/F_0$  de la protéine 90 KD donne une valeur de 1,70 indiquant une forme très dissymétrique de cette protéine, à l'image soit d'une forme ellipsoïdale aplatie (de petit demi-axe de révolution "a" et de grand demi-axe équatorial "b") ou une forme ellipsoïdale allongée (de grand "a", et de petit "b" (voir figure 32).

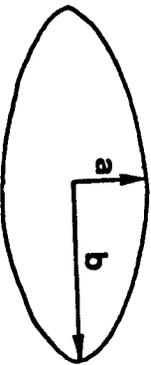
Nous avons cherché le rapport axial a/b de cette forme dissymétrique à l'aide de la courbe établie par BOYD, 1955 et SCHACHMAN, 1959 (figure 32) et appliquée au cas d'un ellipsoïde allongé. La valeur obtenue de ce rapport axial est de 13. Ainsi la protéine 90 KD purifiée aurait une forme dissymétrique très allongée.

### 2.5 Détermination du point isoélectrique (pHi)

Nous avons montré que la protéine 90 KD analysée en chromatographie d'échange d'ions sur le support TSK DEAE 3SW est éluée à partir d'une force ionique de 0,3 M en KCl. Par ailleurs SCHMIDT *et al.*, 1980 ; NORRIS et KOHLER, 1981 avaient déjà rapporté que le pic d'éluion du récepteur non transformé est de 0,20 à 0,25 KCl et que celui-ci possède un point isoélectrique compris entre 4 et 6 (MIDDLEBROOK et ARONOW, 1977; DANZE *et al.*, 1987). L'ensemble de ces observations porte à croire que l'HSP 90 KD, par sa forme dimérique allongée enveloppe le récepteur non transformé et lui confère un caractère acide. A partir de ces



ellipsoïde allongé



ellipsoïde applati

Figure 32- Expression graphique de l'équation de PERRIN, appliquée au cas d'un ellipsoïde allongé (BOYD, 1955 ; SCHACHMAN, 1959)  
 a = demi-axe de révolution ; b = demi-axe équatorial.

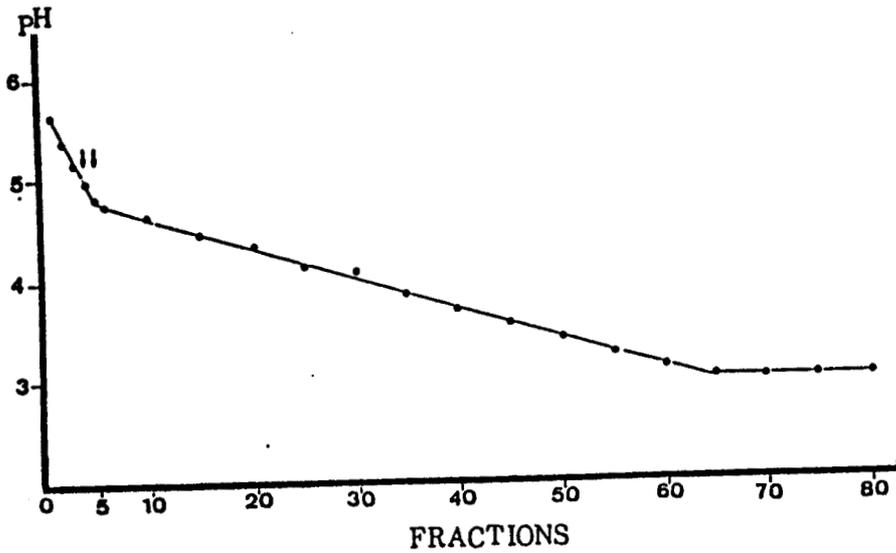
considérations, nous nous sommes intéressés à déterminer le  $pH_i$  de la protéine 90 KD par la méthode de chromatofocalisation (voir Matériels et Méthodes). Il s'agit d'une chromatographie réalisée sur une colonne échangeuse d'anions (DEAE-Trisacryl) équilibrée dans un tampon de pH 6 (à ce pH, la protéine 90 KD est adsorbée sur le gel). L'échantillon protéique (5 mg de SPE), préalablement dialysée contre le tampon d'équilibration est déposé sur la colonne. Ensuite, l'élution est faite par une solution d'ampholines (PBE 74 de  $pH_i$  compris entre 7 et 4) diluée et ajustée au pH 3 avant emploi. Au fur et à mesure de l'élution il y a création d'un gradient de pH à l'intérieur de la colonne (par action combinée du tampon de l'échangeur d'anions et du mélange d'ampholine). Les protéines sont alors désorbées du support lorsque le gradient est égal à leur  $pH_i$ . Des fractions de 2 ml, en sortie de la colonne sont analysées au pH mètre, et un aliquote de chaque fraction est analysé directement par la technique d'immunorévélation en DOT-BLOT (cette technique offre l'avantage d'analyser jusqu'à 96 fractions) par l'anticorps AC 88, qui, rappelons-le, reconnaît spécifiquement l'HSP 90 KD.

La figure 33 montre que l'HSP 90 KD possède un  $pH_i$  autour de 5. WELCH et FERAMISCO, 1982, utilisant une technique différente: l'isoélectrofocalisation, montrent que l'HSP 90 KD purifiée à partir des cellules HeLa possède un  $pH_i$  de 5,2. L'application de cette deuxième technique de détermination du point isoélectrique nous donne une valeur rapprochée de 4,85 (résultats non montrés).

(A)



(B)



**FIGURE 33** Mesure du pHi de la protéine 90KD BRUTE  
Une fraction de SPE (5mg ) est déposée sur colonne DEAE- Trisacryl, ensuite l'élution des protéine adsorbées sur la colonne est effectuée par une solution d'ampholines dont le pHi est compris entre 7&4, et ajustée au pH 3 avant l'emploi. Des fractions de 2ml en sortie de la colonne sont analysées par immunochimie (par la technique de DOT-BLOT, partie A), et au pH-mètre, partie B.

## 2.6 Détermination de la séquence N-terminale de la protéine 90 KD

Connaître la séquence N-terminale d'une protéine présente plusieurs intérêts pour un biochimiste : c'est à la fois disposer d'un autre moyen d'identifier cette protéine et de vérifier son homogénéité, voire même produire des anticorps à partir de cette séquence, qui peuvent constituer un outil de travail.

Etant donné que notre protéine purifiée, se prête mal à la lyophilisation, une fraction concentrée en protéine 90 KD, hautement purifiée est soumise à un PAGE/SDS analytique, puis transférée sur un support hydrophile de polyvinylidifluoride (PVDF) (voir figure 34, piste B) ; c'est l'un des supports qui résiste le mieux aux réactifs de la dégradation d'EDMAN, et donc très utilisé dans le microséquençage des protéines. Après visualisation des protéines sur le PVDF par la solution de coloration au Bleu de Coomassie, la bande 90 KD est découpée, puis insérée dans le séquenceur automatique en phase gazeuse (voir Matériels et Méthodes).

Grâce à cette méthodologie, nous avons pu déterminer une partie de la séquence N-terminale de la protéine 90 KD, de 9 résidus d'acides aminés que voici :

NH<sub>2</sub>-Pro - Glu - Glu -(Val) - Gln - Lys - Gly -(Glu) - Glu

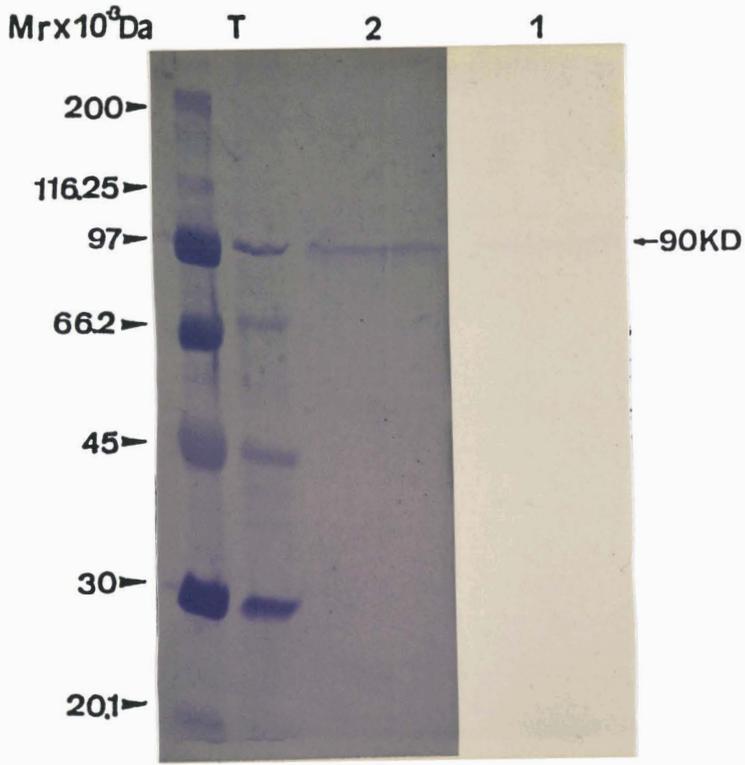
Notons que l'identification des résidus d'acides aminés en position 4 et 8 a été complétée par comparaison avec les travaux de DENIS, 1988, se rapportant à la purification de la même protéine chez le rat.

Nous avons déjà rapporté la comparaison des séquences d'acides aminés, déduites des séquences nucléotidiques complémentaire d'ADN (ADNc) des HSP 90 KD, chez les différentes espèces (figure 13).

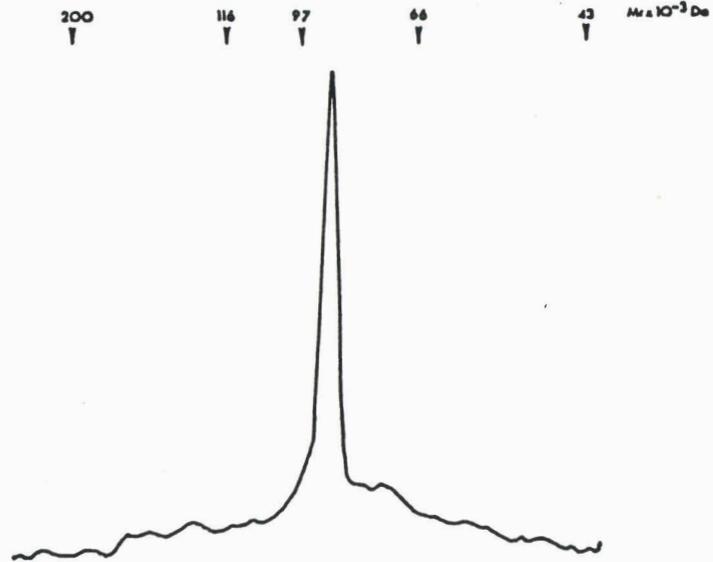
**FIGURE 34:** PAGE/SDS analytique suivi d'électrotransfert de la protéine 90KD purifiée, sur une membrane de nitrocellulose.

Les fractions enrichies de la protéine 90KD, obtenues après l'HPIEC sont concentrées et déposées sur la TSK G4000SW analytique à un débit de 0,5ml/min. Des fractions de 0,25ml sont collectées. La piste A indique le pic d'éluion de la protéine 90KD soumis à un PAGE/SDS analytique, un couloir de ce dernier est transféré sur le support PVDF (piste B), coloré au bleu de Commassie, pour la détermination de la séquence N-terminale de la protéine 90KD purifiée.

Ⓐ



Ⓑ



L'ADNc de l'HSP 90 KD du rat n'est pas connu jusqu'à présent. Néanmoins, la petite séquence N-terminale déterminée, révèle une homologie remarquable avec celles des autres espèces connues:

---

HSP 90 KD rat	Pro-Glu-Glu-Val-Gln-Lys-Gly-Glu-Glu
------------------	-------------------------------------

---

HSP 90 KD humain	Met-Pro-Glu-Glu-Val-His-His-Gly-Gly-Glu
---------------------	---

---

HSP 84 KD souris	Met-Pro-Glu-Glu-Val-His-His-Gly-Glu-Glu
---------------------	---

---

HSP 90 KD Poulet	Met-Pro-Glu-Ala-Val-Gln-Thr-Gln-Asp-Gln
---------------------	---

---

HSP 82 KD Dros-mélan	Met-Pro-Glu-Glu-Ala-Glu-Thr-Phe-Ala-Phe
-------------------------	---

---

HSP 90 KD levure	Met-Ala-Ser-Glu-Thr-Phe-Glu-Phe-Gln-Ala
---------------------	---

---

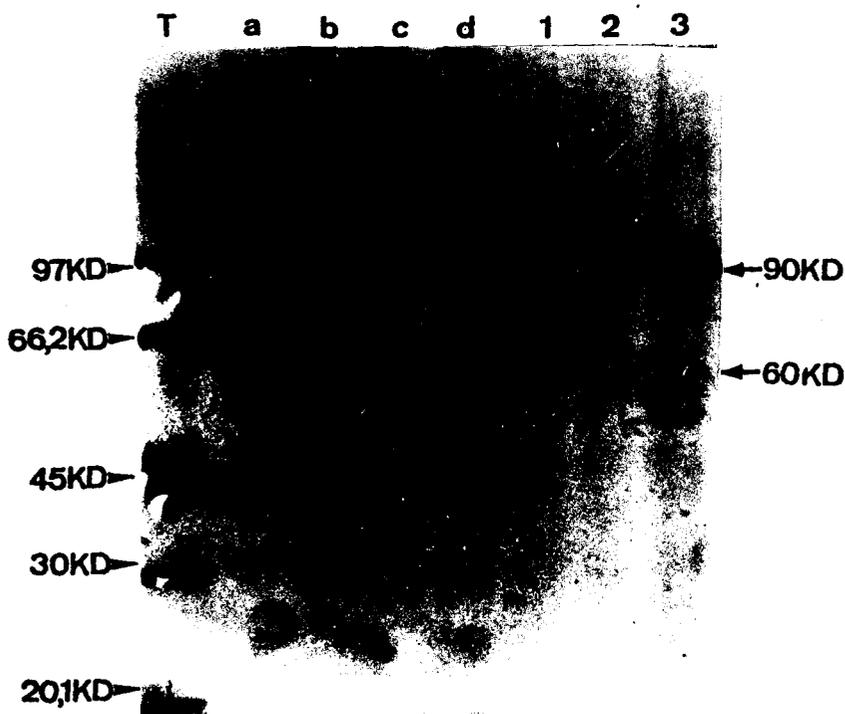
La méthionine n'est pas détectée dans l'HSP 90 du rat, cette différence peut être mise au compte des modifications co-translationnelles des protéines *in vivo*. En effet, chez les eucaryotes, quand la proline est placée en C-terminal de la méthionine (acide aminé d'initiation), il y a souvent perte de cette méthionine dans les protéines cytoplasmiques (FLINTA *et al.*, 1986).

3. PRODUCTION D'UN IMMUNSERUM ANTI-PROTEINE 90 KD : "IS 25".

La technique d'Electrophorèse préparative sur Gel de PolyAcrylamide en présence de Dodécyl Sulfate de Sodium (PAGE/SDS) permet la préparation de cet antigène recherché en grande quantité. Par conséquent, elle offre un moyen à la fois simple et rapide (MENDELHARTVIG, 1982), qui est de plus en plus utilisé de nos jours pour la production des anticorps.

Nous avons adopté cette méthodologie pour produire un immun sérum anti-protéine 90 KD chez les lapins. Pour ce faire, des fractions du pic d'élution de la protéine 90 KD, obtenues en sortie de l'HPIEC sont soumises à des PAGE/SDS préparatifs. Après coloration et décoloration du gel, la bande 90 KD est excisée, puis électroéluée (voir Matériels et Méthodes), ensuite dialysée abondamment contre une solution physiologique (NaCl 9 p. 1000), et enfin injectée par voies intradermiques multiples à des lapins Néo zélandais blancs, selon le protocole de VAITUKAITIS *et al.*, 1971.

Avant chaque immunisation, nous prenons soin de contrôler l'identité ainsi que l'homogénéité de l'antigène par des PAGE/SDS analytiques. L'appréciation de la quantité à injecter est déterminée à l'aide d'une protéine du commerce de masse moléculaire connue, déposée sur le même gel d'électrophorèse, et à doses croissantes (figure 35).



**FIGURE 35** Electrophoégramme coloré au bleu de coomassie.

La protéine 90 KD purifiée par la technique de PAGE / SDS préparative suivie d'électroélution, est redéposée sur un PAGE / SDS analytique, à coté des quantités croissantes d'une protéine du commerce ( glutamate deshydrogénase. Mr=54,4 KD, couloirs a,b,c,etd ).

Les couloirs 1et 2, correspondent à la protéine 90 KD obtenue dans les conditions habituelles de coloration,

Le couloir 3 est une fraction de la protéine 90 KD ,obtenue en utilisant des conditions de coloration douce.

T= témoins de protéines standards.

### 3.1 Etude de la spécificité de l'IS 25 produit

Lors de ces contrôles, nous remarquons chaque fois la présence de deux fragments peptidiques de taille d'environ 60 KD et 30 KD (ce dernier est non visible par la coloration au Bleu de Coomassie) provenant certainement d'une dégradation de l'HSP 90 KD électroéluée (figure 35). Ce point sera discuté ultérieurement plus en détail. A présent, nous nous limitons à signaler que l'antigène qui a servi à sensibiliser le lapin contient non seulement l'HSP 90 KD intacte, mais aussi ses produits de dégradation, qui peuvent être reconnus par l'immunsérum au même titre que la protéine non dégradée. Dix jours après le troisième rappel d'immunisation le lapin est saigné. L'IS 25 (appelé ainsi car développé chez un lapin portant arbitrairement le numéro 25), est recueilli et testé pour sa spécificité, à la fois sur l'antigène natif par la technique d'immunoprécipitation, et l'antigène dénaturé à l'aide de la technique d'immunorévélation des blots (voir Matériels et Méthodes). L'autoradiographie obtenue par immuno- précipitation de l'antigène total (fraction cytosolique marquée à l' $^{125}\text{I}$ ) est présentée sur la figure 36, partie A. Elle révèle que notre immunsérum 25 (couloir 2), reconnaît en plus de la protéine 90 KD.

\* Deux protéines de masse moléculaire autour de 60 KD et de 30 KD.

Vraisemblablement, ce sont les produits de dégradation de la protéine 90 KD, comme nous l'avons signalé ci-dessus.

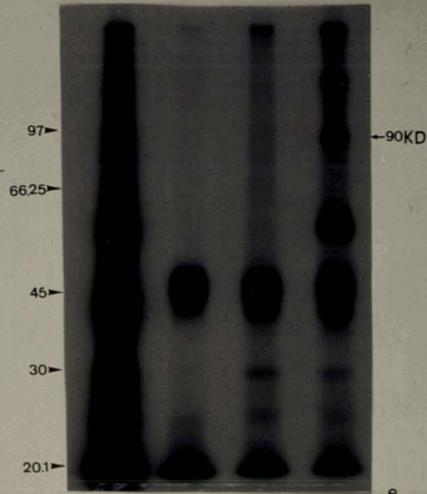
\* Deux bandes de poids moléculaires apparents 45 KD et 22 KD. Il s'agit là des protéines non spécifiques puisqu'elles sont reconnues également par les immunsérums témoins : le préimmun 25 ,couloir 3, et l'immunsérum non relevant, couloir 4).

**Figure 36 - Etude de la spécificité de l'immunsérum 25.**

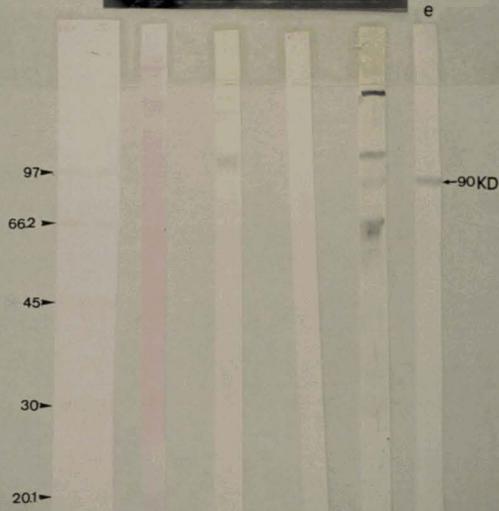
A) Autoradiographie résultant de la technique d'immuno-précipitation. Une fraction cytosolique est incubée avec de l'<sup>125</sup>Iode. Après marquage, des aliquotes de fraction d'antigène total (700 000 cpm) sont mises en contact avec l'IS 25 (couloir 2) avec le sérum non relevant (couloir 3), et avec le sérum préimmun 25 (couloir 4). Un aliquote de la fraction cytosolique marquée est présentée sur le couloir 5.

B) Immunorévélation d'une feuille de nitrocellulose, sur laquelle sont transférées des protéines cytosoliques, préalablement séparées par un PAGE/SDS analytique. Cette feuille est découpée en plusieurs couloirs incubés avec des anticorps. Le couloir A est incubé avec l'anticorps monoclonal AC 88, le couloir 2 est révélé par l'IS 25, les couloirs 3 et 4 sont des témoins incubés respectivement avec un sérum non relevant, et le sérum préimmun 25. Le couloir T contient des protéines standards colorées après transfert au rouge Ponceau.

(A)



(B)



T 5 4 3 2 1

\* Une protéine de haut poids moléculaire d'environ 120 KD, non révélée par les immunsérums témoins. Deux hypothèses peuvent être suggérées au sujet de cette bande :

- a) étant donné qu'en immunoprécipitation, la formation des immunocomplexes se fait avant l'électrophorèse dénaturante (voir Matériels et Méthodes), la bande 120 KD peut correspondre à une protéine associée à l'HSP 90 KD, et donc co-immunoprécipitée avec celle-ci par l'IS 25.
- b) soit, tout simplement cette protéine de 120 KD possède une communauté épitopique avec l'HSP 90 KD.

A côté de ces résultats découlant de la technique d'immunoprécipitation, voici ceux obtenus par la technique d'immunorévélation des protéines dénaturées et transférées sur feuille de nitrocellulose (figure 35, partie B).

Notons que la dilution adoptée pour les immunsérums utilisés (IS 25, préimmun 25, et immunsérum non relevant) est de 1/50e, alors qu'en immunoprécipitation, celle-ci est seulement de 1/20e. La dilution 1/50e a été choisie pour mieux apprécier la spécificité de notre IS 25. Sur la partie B, couloir 2, nous retrouvons un profil de reconnaissance immuno-chimique de l'IS 25 similaire à celui obtenu en immunoprécipitation. Par conséquent l'hypothèse a, faite au sujet de la bande 120 KD peut être éliminée. L'utilisation parallèle de l'anticorps AC 88 est présentée dans le couloir 1.

La même méthodologie de préparation de l'antigène a été adoptée par DENIS, 1988 pour produire un immunosérum conventionnel anti-protéine 90 KD de rat. Ce dernier est rendu monospécifique par la même équipe, par élution uniquement des anticorps interagissant avec les protéines 90 KD transférées sur feuille de nitrocellulose.

#### 4. LOCALISATION DE LA PROTEINE 90 KD DANS LES CELLULES HTC ET L 929

Nous avons remarqué que l'immunosérum 25 produit croise avec l'HSP 90 KD des cellules L929 des fibroblastes de souris, et par conséquent, constitue un outil supplémentaire pour l'étude des protéines HSP 90 KD. De plus, son utilisation a été appréciée dans les études immunohistochimiques, visant à localiser la protéine 90 KD dans les cellules d'hépatome de rat en culture (HTC) et les cellules L929, comme nous allons le voir dans le chapitre suivant.

##### 4.1 Etude immunohistochimique

Nous avons abordé la localisation intracellulaire de la protéine HSP 90 KD, à la fois dans les cellules d'hépatome de rat en culture (HTC) et les cellules L929 de souris, à l'aide de l'anticorps monoclonal AC 88 KD et polyclonal IS 25.

Les résultats concernant les cellules HTC sont résumés sur la planche A. Après avoir supprimé toute activité de type peroxydase à l'intérieur des cellules par de l'eau oxygénée (voir Matériels et Méthodes), l'emploi d'un sérum non immun de lapin qui constitue un contrôle négatif ne donne aucune réaction immunohistochimique (photo 1, planche A). Cependant, l'utilisation séparée des deux anticorps IS 25 et AC 88 KD permet d'observer respectivement sur les photos 3 et 4 (planche A) un marquage de même localisation cytoplasmique. Cette immunoréactivité, qui est

PLANCHE A

Test d'extinction

Les cellules HTC marquées en immunopéroxydase par les anticorps anti-HSP 90, dilués au 1/50<sup>ème</sup>.

- PHOTO 1.      Contrôle négatif de la solution tampon de coons  
PHOTO 2.      Contrôle négatif avec du sérum nonimmun de lapin  
PHOTO 3.      Anticorps polyclonal(AS25)  
PHOTO 4.      Anticorps monoclonal(AC88KD)

N= Noyau

C= Cytoplasme



BU  
LILLE



topographiquement identique avec les deux anticorps, apparaît plus intense avec l'anticorps IS 25. Ceci peut être expliqué par l'aptitude des anticorps polyclonaux à former des réseaux tridimensionnels avec les antigènes reconnus. Notons que les mêmes observations sont obtenues pour les cellules L929 (résultats non montrés), dans les mêmes conditions expérimentales.

#### 4.2 Etude de la spécificité du marquage immunochimique

Pour confirmer la spécificité de nos réactions immunohistochimiques avec les anticorps utilisés, nous avons procédé à des tests d'épuisement de ces derniers avec une solution d'antigènes (fraction SPE) contenant l'HSP 90 KD. Le principe de ces tests d'épuisement consiste à éteindre les réactions immunochimiques observées avec les anticorps en saturant ceux-ci au préalable avec l'antigène correspondant. Une extinction totale de l'immunoréactivité dans la cellule implique la spécificité du marquage. Des doses croissantes d'antigènes sont ajoutées aux anticorps AC 88 KD et IS 25, dont la concentration est constante (voir Tableau VII).

L'incubation des immunocomplexes se déroule pendant une demi-heure à 37°C, puis pendant une nuit à 4°C. L'ensemble est ensuite centrifugé 30 minutes à  $6 \times 10^3$  g, et le contrôle d'épuisement se fait à partir du surnageant sur les cellules HTC par la méthode immunohistochimique, comme ci-dessus. Les photos 1, 2 et 3 de la planche B montrent une diminution progressive de l'immunoréactivité avec l'IS 25 en fonction des doses croissantes d'antigènes. L'extinction totale est obtenue avec la quantité de 750,0 gamma d'antigène total.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
*Anticorps utilisés	AC88KD	AC88KD	AC88KD	AC88KD	AC88KD	AS25	AS25	AS25	AS25	AS25
Volumes en $\mu$ l des anticorps dilués au 1/50ème.	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Volumes en $\mu$ l d'une solution d'antigène total de 5mg/ml.	6,25	12,5	25	50	150	150	50	25	12,5	6,25
Tampon ( $\mu$ l)	43,75	37,5	25	-	-	-	-	25	37,5	43,75
Volume final en $\mu$ l	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

\* - Concentration initiale de l'AC 88KD pur est de 1,7mg/ml.

- AC 88KD=Anticorps monoclonal qui reconnaît spécifiquement l'HSP 90KD du foie de rat.

- AS 25 =Anti-sérum développé contre l'HSP 90KD chez un lapin(N°25).

TABLEAU N° VII :Test de saturation

PLANCHE B

Test d'extinction

Les cellules HTC marquées en immunopéroxydase par l'anticorps polyclonal(AS25), dilué au 1/50ème et présaturé avec des doses croissantes d'une solution de protéines(Fraction de SPE) contenant l'HSP 90KD.

Quantité d'antigène saturant

PHOTO 1.	62,5gamma
PHOTO 2.	250,0gamma
PHOTO 3.	750,0gamma

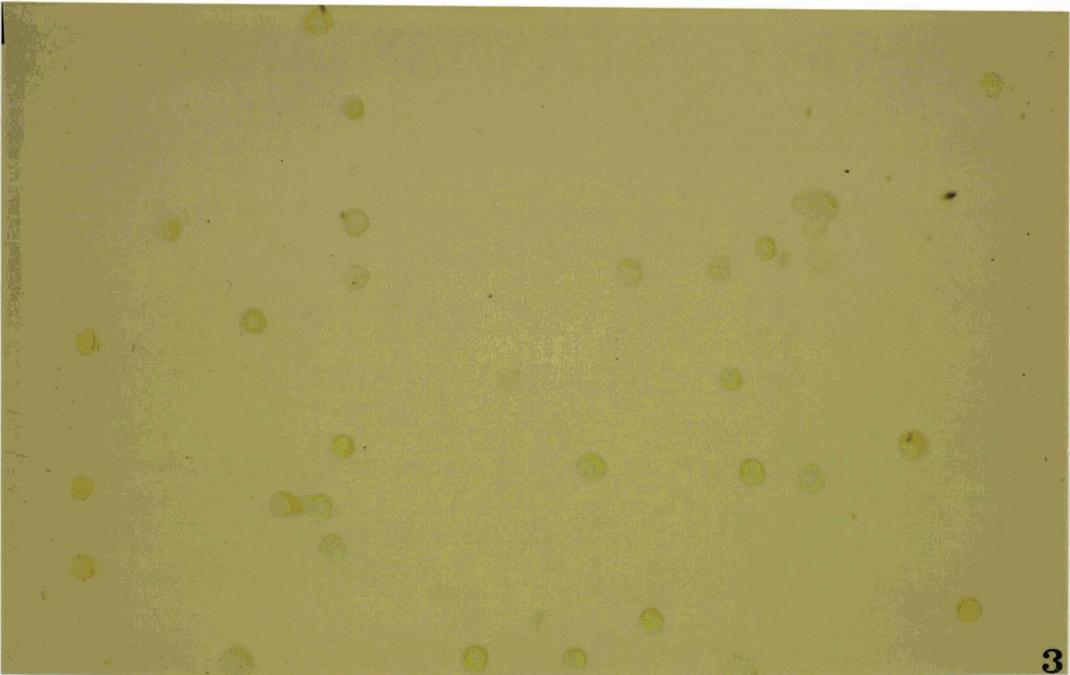
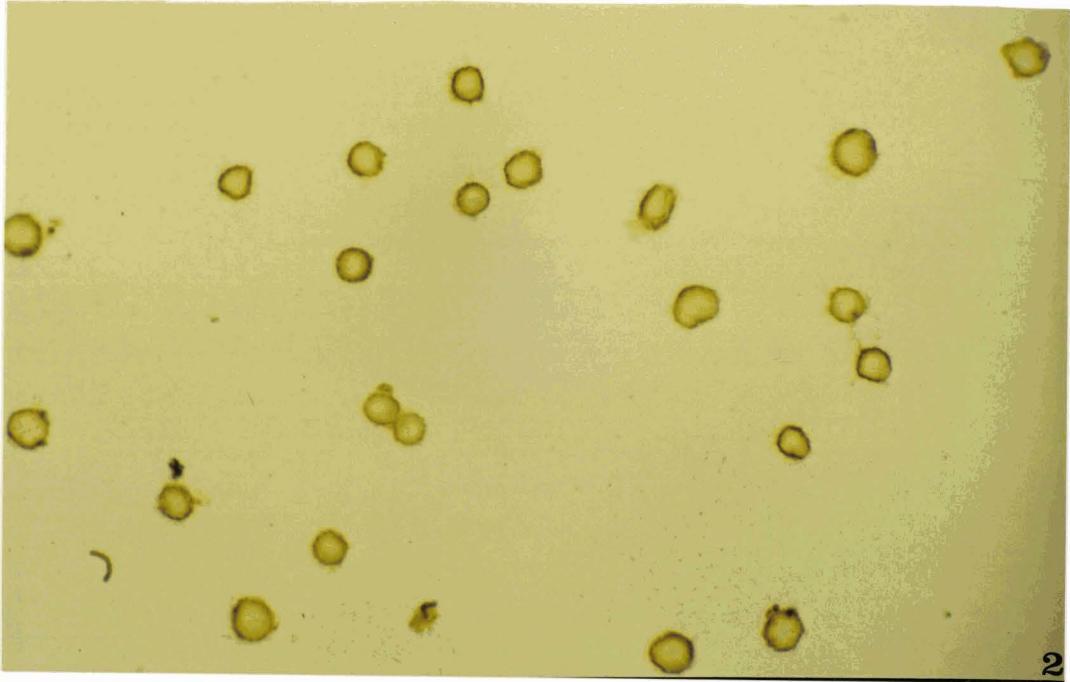
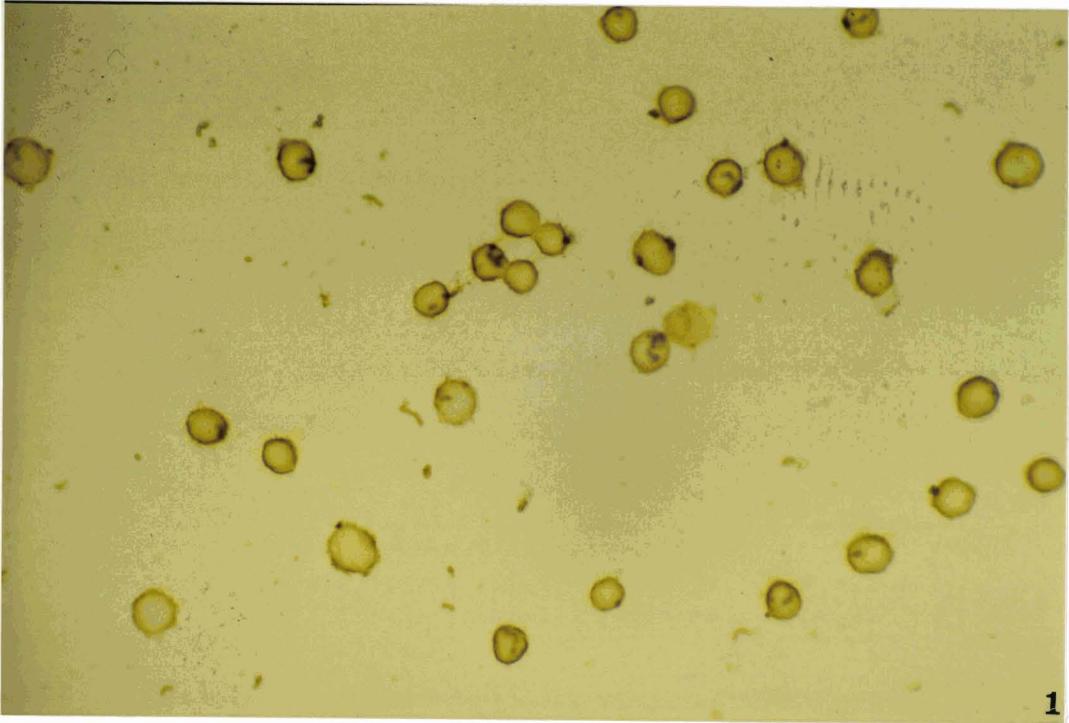


PLANCHE C

Test d'extinction

Les cellules HTC marquées en immunopéroxydase par l'anticorps monoclonal (AC88KD), dilué au 1/50ème et présaturé avec des doses croissantes d'une solution de protéines (Fraction de SPE) contenant l'HSP 90KD.

Quantité d'antigène saturant

PHOTO 1.	250,0gamma
PHOTO 2.	.750,0gamma



En ce qui concerne l'anticorps monoclonal AC 88 KD (planche C, photos 1 et 2), l'extinction est détectée seulement à partir de la quantité de 250,0 gamma (photo 2).

Ainsi, il résulte de cette étude immunohistochimique que la localisation intracellulaire de l'HSP 90 KD est essentiellement cytoplasmique. Des résultats identiques sont rapportés par plusieurs auteurs (LAI *et al.*, 1984, CARBAJAL *et al.*, 1986, KOYASU *et al.*, 1986) où l'HSP 90 KD est associée avec l'actine (NISHIDA *et al.*, 1986, KOYASU *et al.*, 1986), et bien d'autres protéines cytoplasmiques (voir paragraphe 1.5.2). Cependant, la présence de l'HSP 90 KD dans le noyau cellulaire (GASC *et al.*, 1984) est nécessaire pour les récepteurs stéroïdiens à localisation nucléaire (exemple des récepteurs de la progestérone et des oestrogènes). Il faut dire que l'HSP 90 KD est une protéine assez abondante dans la cellule où elle représente jusqu'à 1 % des protéines totales (LAI *et al.*, 1984, SANCHEZ *et al.*, 1985). Du fait de son large excès par rapport aux récepteurs stéroïdiens une petite quantité dans le noyau est suffisante pour assurer l'interaction avec ces derniers.

5. LE RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES NON TRANSFORME EST ASSOCIE

A L'HSP 90 KD.

L'anticorps AC 88 que nous avons utilisé au cours de notre travail, tant pour suivre la purification de l'HSP 90 KD que, pour sa caractérisation immunochimique; a été également utilisé en présence du récepteur cytosolique non transformé pour savoir si ce dernier est réellement associé à cette protéine.

En effet, LEFEBVRE et al., 1989, montrent que l'AC 88 incubé avec le récepteur, augmente son rayon de Stokes. De plus, l'analyse des paramètres physicochimiques par (les techniques de chromatographie d'exclusion de taille, et de centrifugation en gradient de sucrose) du récepteur des thymocytes de rat, non transformé stabilisé par le RU 486 à la fois en présence et absence de l'AC 88 montre que seule la forme HSP 90 KD libre fixe deux molécules d'anticorps AC 88, alors que le complexe glucocorticoïde-récepteur n'en fixe qu'une. Ceci indique que l'interaction du dimère d'HSP 90 KD, avec le récepteur est asymétrique.

6. VERS UNE APPROCHE DE LA LOCALISATION DE LA SEQUENCE EPITOPIQUE RECONNUE PAR L'ANTICORPS MONOCLONAL DE TOFT.

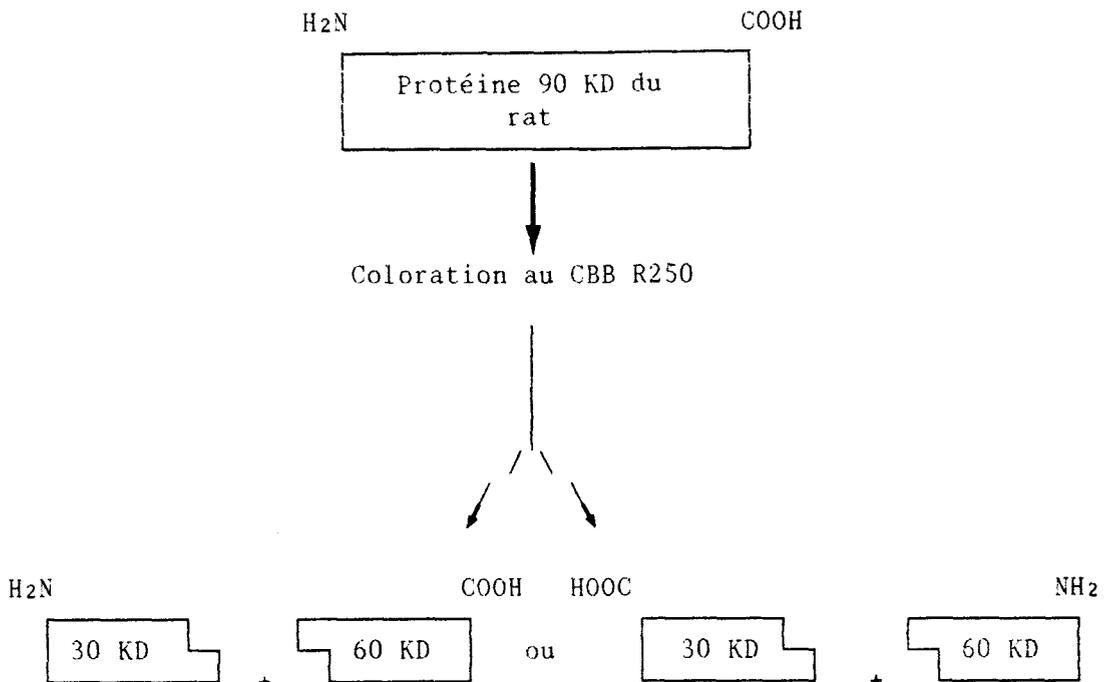
Lors de la préparation du matériel antigénique 90 KD pour la production d'un immunosérum par la méthode d'électrophorèse préparative en présence de SDS (PAGE/SDS), il s'est avéré que la protéine 90 KD, une fois électroéluee du gel, et soumise à un contrôle de nouveau sur PAGE/SDS analytique, apparaissait partiellement dégradée d'une manière curieusement reproductible, en deux fragments de taille d'environ 60 KD et 30 KD (figure 35, couloirs 1 et 2) résultant de deux manipulations différentes). A la recherche de l'étape qui cause la dégradation reproductible de notre protéine, nous nous sommes rendu compte que ce phénomène se produisait au moment de la coloration du gel préparatif. En effet, le changement des conditions de coloration au bleu brillant de Coomassie (CBB R250), tel que :

TABLEAU VIII

Coloration du gel	CBBR250	Ac.trichloracétique	Méthanol	Ac.acétique
Conditions habituelles de "dégradation"	0,1 %	12 %	25 %	10 %
Conditions douces	0,1 %	0 %	50 %	10 %

ne génère pas ces fragments, tel qu'en témoigne la figure 35, couloir 3). De plus, l'élément causal de cette dégradation est bien l'acide trichloracétique. Par ailleurs, et fait surprenant, aucun des deux fragments de dégradation n'est reconnu par l'AC 88 de TOFT alors que ce dernier reconnaît bien la protéine 90 KD donnant ces deux fragments.

Par contre, ces deux fragments sont révélés (résultats non montrés) par l'anticorps polyclonal (IS 25). Une explication vraisemblable de ce phénomène peut être schématisée, délibérément comme suit :



C'est comme si l'anticorps monoclonal de TOFT reconnaissait une petite séquence d'acides aminés située au même niveau que le site de coupure de la protéine 90 KD.

La détermination des séquences N-terminales des deux fragments de coupure, en comparaison avec la séquence d'acides aminés complète de la protéine 90 KD de rat, et de ses homologues pourrait contribuer à la localisation de la séquence épitopique reconnue par l'AC 88 de TOFT, d'autant plus que celle-ci, rappelons-le, constitue une carte d'identité commune à toutes les protéines HSP 90 KD (RIEHL *et al.*, 1985).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La protéine 90 KD du cytosol de foie de rat a été purifiée par un protocole rapide à caractère préparatif, comportant deux étapes de chromatographie liquide des protéines à haute performance (l'échange d'ions, suivi de l'exclusion de taille). La protéine obtenue possède une homogénéité électrophorétique, elle est reconnue par l'anticorps monoclonal spécifique d'un épitope commun à toutes les HSP 90 KD eucaryotiques. L'identification d'une partie de la séquence N-terminale a pu être déterminée par la méthode de dégradation d'EDMAN, utilisant un séquenceur automatique en phase gaz. Celle-ci comparée à d'autres séquences N-terminales des HSP 90 KD similaires, possède une homologie frappante. D'autre part, la protéine purifiée est marquée au réactif tritié de BOLTON et HUNTER et a été caractérisée du point de vue physicochimique. Il s'agit d'une protéine dimérique de masse moléculaire 180 KD, possédant un rapport axial important. Le phénomène de dimérisation de cette protéine est mal connu, néanmoins, celui-ci n'est certainement pas gouverné par des liaisons covalentes de type pont disulfure. La détermination du point isoélectrique indique que cette protéine possède bien un caractère acide, vraisemblablement responsable du comportement du récepteur non transformé vis-à-vis des supports basiques (DEAE-cellulose). De plus, nous avons développé un anticorps polyclonal contre cette protéine chez le lapin ; celui-ci a été utilisé parallèlement à l'anticorps monoclonal AC 88, pour la localisation immunohistochimique de cette protéine chez deux lignées cellulaires différentes, les cellules d'hépatome de rat en culture (HTC) et les fibroblastes de souris L929. Il en résulte que la protéine 90 KD est essentiellement cytoplasmique.

Si la participation de la protéine 90 KD non liante à la structure hétérooligomérique du récepteur non transformé est bien établie, les modalités précises ainsi que le pourquoi de cette interaction sont encore très mal compris. Il faudrait essayer de dégager la signification physiologique de cette association *in vivo*. Pour ce faire, un retour à la cellule entière apparaît indispensable, avec des expériences de Biologie Moléculaire. Une variante consiste à dépleter entièrement la cellule de cette protéine pour voir sa fonction biologique dans l'étape de transformation, par exemple, en réprimant le gène codant pour cette protéine (approche d'ARN anti-sens) . Très récemment, YUFU *et al.*, 1989 montrent que durant la différenciation des cellules leucémiques humaines HL 60 (où le récepteur des glucocorticoides existe chez cette lignée cellulaire), il y a modulation de la synthèse des protéines de choc thermique.

**MATERIEL & METHODES**

## 1. PREPARATION DU CYTOSOL DE FOIE

### Tampons

Le tampon d'homogénéisation : tampon TMG

Tris (Trizma <sup>R</sup> Base Sigma T-1503)	20 mM
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	3 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	10 mM
2-mercaptoéthanol	20 mM
Glycérol	10 %
Eau ultra pure	qsp 1000 ml

Le pH est ajusté à 7,40 avec HCl 1 M, et de nouveau vérifié juste avant l'emploi.

### Protocole

Des rats Wistar mâles (200 à 250 g) sont surrénalectomisés sous anesthésie et maintenus en régime normal avec de l'eau salée (NaCl 9 %). Trois jours après l'opération, les animaux sont sacrifiés. Le foie est prélevé rapidement et perfusé avec une solution aqueuse salée puis le tampon d'homogénéisation, refroidi à 4°C.

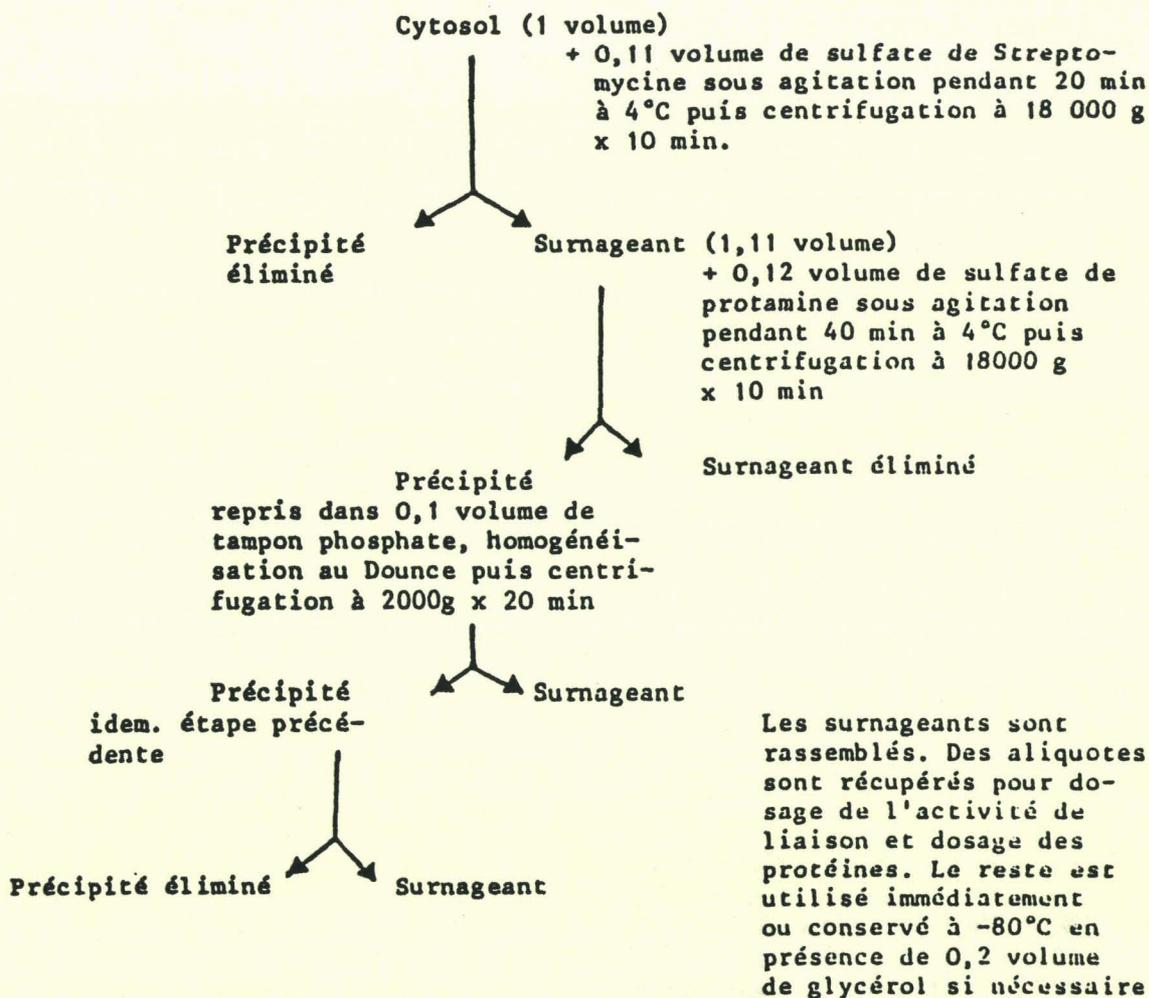
Toutes les manipulations ultérieures sont pratiquées à 4°C. Les foies sont épongés, pesés, coupés en petits morceaux et additionnés de tampon d'homogénéisation à raison de 1,5 ml par g de tissu.

L'homogénéisation est réalisée 10 secondes au mixer (Ultra-Turax) puis complétée à l'appareil de Potter par 5 allers-retours à 2000 rpm

Après ultracentrifugation de l'homogénat à 105 000 g pendant 2 h 30 min, le surnageant clair est récupéré après élimination de la couche lipidique, ajusté à pH 7,40 et constitue le cytosol.

2. PREPARATION DE L'EXTRAIT SULFATE DE PROTAMINE (SP)

La fraction cytosolique de foie de rats est soumise à une double précipitation par une solution de streptomycine, puis une solution de protamine selon le protocole suivant (GOVINDAN et SEKERIS, 1978) :



Le surnageant est utilisé immédiatement ou conservé à  $-70^{\circ}\text{C}$  en présence de 0,2 volume de glycérol. Des aliquotes sont récupérées pour le dosage de l'activité de liaison et le 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  $30 \text{ à } 50 \times 10^{-9}$  M de récepteur.

### 3. PREPARATION DE SPE ET DE L'ELUAT

Le SP recueilli est mis en contact avec un gel d'affinité (50 vol pour 1 vol de gel) (Sephacrose 4B-diaminononane dexaméthasone) (LUSTENBERGER *et al.*, 1980 ; IDZIOREK *et al.*, 1985), visant une adsorption du récepteur sur le gel. L'élution spécifique en présence d'un excès de dexaméthasone ou encore d'acétonide de triamcinolone  $4 \mu\text{M}$ , permet de récupérer le récepteur non transformé à 90 % d'homogénéité (fraction appelée éluat). L'extrait sulfate de protamine non retenu par le gel est repassé 1 à 2 fois sur ce dernier afin d'obtenir une fraction épuisée en récepteur (jusqu'à 98 %), que nous appelons SPE.

### 4. MESURE DE LA LIAISON HORMONE-RECEPTEUR (ROUSSEAU *et al.*, 1972)

0,5 ml de cytosol ou d'une dilution au 1/10e de l'extrait sulfate de protamine sont incubés en présence de  $30 \times 10^{-9}$  M d'acétonide de triamcinolone tritié (Amersham, 28 Ci/mmole). La liaison non spécifique est mesurée par incubation en parallèle des mêmes échantillons avec un excès de 500 fois d'acétonide de triamcinolone non radioactive.

Les incubations sont réalisées en double pendant 16h à  $0^{\circ}\text{C}$ . La radioactivité liée est mesurée par la technique au charbon dextran (ROUSSEAU *et al.*, 1972).

Après incubation, 0,2 ml d'incubat sont mélangés avec 0,1 ml de suspension de charbon (charbon activé Norit A 3 % et dextran T-70 0,3 % dans du tampon TMG, pH 7,40). Chaque incubat est traité en double. Après 10 secondes d'agitation au Vortex et 15 minutes de contact à 0°C, les tubes sont centrifugés pendant 5 minutes à 4 000 rpm, 0,15 ml de surnageant sont prélevés et mélangés à 4,5 ml de liquide scintillateur LKB "Optiphase". La radioactivité est mesurée par un compteur à scintillation liquide LKB 1214 ; le rendement de comptage pour le tritium est de 50 %.

La liaison spécifique est calculée par différence de la moyenne des 4 résultats obtenus pour l'incubation en présence d'hormone tritiée et la moyenne de ceux obtenus en présence de l'excès d'hormone froide et ramenée en  $\text{cpm.ml}^{-1}$ .

## 5. DOSAGE DES PROTEINES

a) *Méthode de BENSADOUN et WEINSTEIN (1976)*

### Réactifs

- Solution de désoxycholate de sodium à 2 %
  - Acide désoxycholique 50 mg
  - Soude N/19 2,5 ml
- Solution d'acide trichloracétique 25 %
  - Acide trichloracétique 25 g
  - H<sub>2</sub>O qsp 100 ml
- Tampon bicarbonate
  - Solution A NaHCO<sub>3</sub> 84 g
  - H<sub>2</sub>O qsp 500 ml
  - Solution B NaOH 45 g
  - H<sub>2</sub>O qsp 300 ml



- Réaction colorée

Ajouter à chaque tube en passant 10 secondes au Vortex à chaque fois :

- 1,5 ml de solution cupro-alcaline

Tampon bicarbonate 16 ml

H<sub>2</sub>O 16 ml

Solution cuprotartrique 6 ml

- 0,15 ml de solution de Folin-Ciocalteu

Laisser les tubes à l'obscurité pendant 45 minutes - lecture à 660 nm contre de l'eau distillée.

b) Méthode au Bleu Brillant de Coomassie (CBB G250)

Réactifs :

Bleu de Coomassie G250 (MERCK) 15 mg

Ethanol absolu 4,7 ml

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 % 10 ml

H<sub>2</sub>O qsp 100 ml

Filtration sur papier Whatman et conservation à l'abri de la lumière.

Réactif stable quelques jours.

Les dosages sont réalisés sur un analyseur centrifuge COBAS BIO selon le protocole suivant :

Température des cuves 30°C

Longueur d'onde 595 nm

Temps de 1ère lecture 2 minutes

- Pour une gamme étalon allant de 0 à 200 µg/ml de SAB

15 µl d'échantillon

60 µl de diluant (H<sub>2</sub>O)

225 µl de réactif

- Pour une gamme étalon allant de 0 à 50 µg/ml de SAB

60 µl d'échantillon

15 µl de diluant

225 µl de réactif

Programme :

Paramètres :	1 Unité	mg/ml
	2 facteurs de calcul	1
	3 standard 1 conc.	0
	4 standard 2 conc.	0
	5 standard 3 conc.	0
	6 limite	300
	7 Température (deg.c.)	30.0
	8 Type d'analyse	1
	9 Longueur d'onde (nm)	595
	10 Vol. échantillon (µl)	15
	11 Vol. diluant (µl)	60
	12 Vol. réactif (µl)	225
	13 Temps d'incubation (S)	0
	14 Vol. réactif démar. (µl)	0
	15 Temps 1ère lecture (S)	120.0
	16 Intervalle temps (S)	60
	17 Nombre de lectures	03

18 Blanc réactif	1
19 Mode de calcul	3

## 6. PREPARATION D'IMMUNO-ADSORBANT

### Réactifs

- Sepharose 4B (4 % d'agarose) (Pharmacia)
- Bromure de cyanogène

La totalité d'un flacon de 100 g est dissoute dans 103 ml d'acéto-  
nitrile ; l'ensemble est conservé à - 20°C.

- Tampon phosphate 5M, pH 11,9
- Tampon bicarbonate de sodium 0,25 M, pH 9
- Tampon\_ acétate de sodium 0,1 M, NaCl M, pH 4
- Tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,5 M, pH 7.
- Tampon bicarbonate de sodium 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3
- Ethanolamine M

Mode opératoire (modifié d'après PORATH *et al.*, 1973)

Le Sépharose 4 B est lavé abondamment à l'eau distillée sur verre  
fritté et essoré. 10 g de Sépharose 4B sont mis en suspension dans 10 ml  
de tampon phosphate 5 M, pH 11,9 et l'ensemble est dilué à 20 ml avec de  
l'eau distillée refroidie à 4°C.

On ajoute, sous agitation douce 0,412 ml de solution de bromure de  
cyanogène (sous la hotte) par petites portions pendant 2 minutes. Au  
bout de 10 minutes le gel activé est lavé très rapidement (moins de 2  
minutes) sur verre fritté par 250 ml d'eau distillée refroidie à 4°C,  
puis par 200 ml de bicarbonate de\_sodium 0,25 M, pH 9. On transfère le  
gel activé et lavé dans un tube contenant la solution d'anticorps

(environ 1,7 mg) dans 5 ml de tampon bicarbonate de sodium 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3. On laisse sous agitation lente (agitateur rotatif) pendant 1 heure à température ambiante puis une nuit à 4°C. Le gel est essoré (on garde une aliquote pour le dosage des protéines après couplage) puis suspendu dans 150 ml de solution d'éthanolamine M pendant 2 heures pour saturer les fonctions qui n'ont pas réagi. Le gel est ensuite lavé par les deux tampons suivants :

Acétate de sodium 0,1 M, NaCl M, pH 4 (150 ml)

Phosphate de sodium (0,01 M, NaCl 0,5 M, pH 7 (150 ml)

Le lavage est répété 3 fois, pour éliminer les adsorptions non spécifiques. Un volume du gel (4 ml) est ensuite transféré dans une colonne chromatographique (IBF 25) et lavé abondamment par 10 volumes de tampon PBS 7,4.

#### Immunoadsorption

1 ml est introduit dans la petite colonne (IBF 25) en contact une heure avec le gel sous agitation rotative. Ensuite, on effectue un lavage par PBS 7,5, NaCl 500 mM pour éliminer les adsorptions non spécifiques.

Les antigènes retenus sur la colonne sont élués par le tampon glycolle-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 2,8 (28 ml par 4 ml de gel) et récupérés dans un certain volume du tampon phosphate 1M de pH 8,3 afin de se trouver dans un tampon voisin de la neutralité.

La solution d'antigène est concentrée 2 fois dans une cellule diaflo équipée d'une membrane YM 30.

La régénération de l'immunoabsorbant se fait par une solution de carbonate de sodium 0,1 M puis rééquilibrée par une solution de NaCl 0,15 M, azide de sodium 0,2 %

7. CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS A HAUTE PERFORMANCE (HPIEC)

Appareillage

Les colonnes utilisées sont : Ultropac TSK DEAE 3SW préparative et TSK 545 DEAE analytique de LKB.

La HPIEC est effectuée sur un appareil Waters 204 4/6/6-GN, muni d'un injecteur U6K équipé d'une boucle de 2 ml, de deux pompes 6000 A pilotées par un programmeur de gradient M660 et d'un détecteur WATERS 480, (WATERS, Mildred, USA).

La récupération des fractions est assurée par un collecteur programmable, modèle 201 (GILSON, FRANCE). La mesure en continu de la force ionique est assurée par un appareil détecteur de concentration saline (IBF), branché à la sortie de la colonne chromatographique, et associé à un enregistreur (LKB).

Des aliquotes sont dosées en potassium par photométrie de flamme (Flamme Photometer, model 143, Instrumentation Laboratory, Inc.) pour la détermination de la concentration en KCl

Tampons

Tampon A :  $KxHyPO_4$  50 mM pH 7,40  
(Basse force ionique)  $\beta$ -mercaptoéthanol 10 mM

Tampon B = Tp A + 0,5 M KCl  
(Haute force ionique)

Tampon C :  $KxHyPO_4$  5 mM pH 7,40  
 $\beta$ -mercaptoéthanol 10 mM

Tampon de lavage D : Acide acétique 0,01 N  
NaCl 500 mM pH > 3

Tous les tampons sont filtrés sur membrane Millipore HATF (0,45  $\mu$ ) et dégazés avant emploi.

Préparation de la colonne

L'équilibration de la colonne réfrigérée à 0°C par un bain de glace pilée s'effectue en tampon A (3 volumes de tampon pour 1 volume de colonne suffisent).

La régénération de la colonne est réalisée systématiquement à la fin des manipulations par

- lavage avec le tampon D (3 volumes)
- suivi d'un lavage dans de l'eau azidée (3 volumes pour 1 volume de colonne).

Préparation du matériel à purifier

L'extrait sulfate de protamine épuisé en récepteur est dilué avec le tampon C de manière à ajuster la force ionique finale à 50 mM en potassium.

L'échantillon est alors concentré 3 à 4 fois sur membrane DIAFLO YM 30, avant d'être clarifié par ultracentrifugation 20 minutes à 30 000 rpm puis injecté sur la colonne (la quantité de protéines injectées sur la colonne ne doit pas dépasser 180 mg sur la DEAE préparative).

Après injection, un délai de 20 minutes est respecté avant de démarrer le gradient d'élution avec le tampon B pendant 55 minutes à un débit de 3,5 ml/mn (préparatif) ou 0,5 ml/mn (analytique).

Des fractions de 3,5 ml sont collectées et des aliquotes sont analysées en PAGE/SDS, Western-blot ou Dot-blot.

8. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION DE TAILLE A HAUTE PERFORMANCE (HPSEC)

Matériel

Colonne TSK G4000 SW analytique LKB (7,5 x 300 mm)

préparative LKB (21,5 x 600 mm)

Précolonne TSK GSWP (7,5 x 75 mm)

Injecteur muni d'une boucle de 0,2 ml

Pompe LKB 2150

Collecteur programmable, modèle 201 (GILSON, FRANCE)

Enregistreur LKB

### Tampons

Tampon E. TES 20 mM pH 7,0

NaCl 150 mM

$\beta$ -mercaptoéthanol 10 mM

Le tampon est filtré sur membrane Millipore HATF (0,45  $\mu$ m) et dégazé avant l'emploi.

### Elution

Volume d'échantillon injecté 2 % du volume total de la colonne filtré dès l'entrée de la précolonne par la mise en place d'un fritté métallique (pores de 1  $\mu$ m).

L'élution est réalisée avec le tampon E à un débit de 0,5 ml/minute (colonne analytique) ou 3,5 ml/mn (colonne préparative). Pendant toute la durée de l'analyse, la colonne et le réservoir de tampon sont placés dans un bain de glace. Des fractions de 0,25 ml (analytique) ou 1,75 ml (préparatif) sont collectées et des aliquotes analysées comme précédemment.

### Calibration

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 la  $\beta$ -galactosidase d'E.coli ( $R_s = 6,9$  nm).

Ces protéines standards sont utilisées à une concentration de 1 à 3 mg/ml et 0,1 ml sont injectés 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 ( $M_r = 2 \times 10^7$ ). Le volume total de la colonne est mesuré par l'élution du bichromate de potassium. La calibration est obtenue selon le modèle de Porath (1963).

#### Maintenance de la colonne

Après une série d'injections, la colonne est lavée par un tampon NaCl 0,5 M - Acide acétique 0,01 N (3 volumes pour 1 volume de colonne). Elle est ensuite rincée à l'eau Millipore et conservée dans de l'eau azidée (azide Na 0,2 p. 1000).

9. ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU DENATURANT  
(PAGE/SDS) (LAEMMLI, 1970)

Cuve à électrophorèse verticale : Protean Double Slab Electrophoresis  
Cell Bio Rad (ref. 716 514 20).

Solutions

*Solution A à 7,5 % d'acrylamide*

Acrylamide		75,00 g
Bis acrylamide		2,00 g
Tris		45,30 g
SDS		1,00 g
TEMED		0,3 ml
HCl 5,6 N	qsp pH	8,8
H <sub>2</sub> O	qsp	1 l

*Solution C de concentration*

Acrylamide		30,00 g
Bis acrylamide		0,80 g
Tris		15,10 g
SDS		1,00 g
TEMED		0,5 ml
HCl 5,6 N	qsp pH	6,8
H <sub>2</sub> O	qsp	1 l

*Solution aqueuse de persulfate d'ammonium à 10 % (v/v)*  
(à préparer extemporanément)

*Tampon d'électrophorèse (4 fois concentré)*

Tris	12,00 g
Glycine	57,20 g
SDS	4,00 g
HCl 5,6 N	qsp pH 8,3
H <sub>2</sub> O	qsp 1 l (à diluer au 1/4 avant utilisation)

Sample buffer (tampon de dénaturation pour échantillons protéiques)

Tris-HCl	0,08 M pH 6,8
SDS	3 % (p/v)
β-mercaptoéthanol	5 %
Glycérol (v/v)	20 % (v/v)
Bleu de bromophénol	0,001 %

Marqueurs de masse moléculaire

(Kit Bio Rad, Haut et bas poids moléculaire)

* 6T (LMW) Composition	KD
Phosphorylase b du muscle de lapin	97,400
Sérumalbumine bovine	66,200
Ovalbumine du blanc d'oeuf de poule	42,699
Anhydrase carbonique bovine	31,000
Inhibiteur tryptique du soja	21,500
Lysozyme du blanc d'oeuf de poule	14,400

* 5T (HMW) Composition	KD
Myosine	200,000
$\beta$ -galactosidase d'E.coli	116,250
Phosphorylase du muscle de lapin	97,400
Sérumalbumine bovine	66,200
Ovalbumine du blanc d'oeuf de poule	42,699

Solution de coloration des gels

Bleu brillant R250 de Coomassie (Merck 12553)	1,0 g
Acide trichloracétique 50 % (p/v)	250 ml
Méthanol	250 ml
Eau ultra pure	qsp 1 l

Solution de décoloration

Méthanol	500 ml
Acide acétique	160 ml
Eau ultra pure	1300 ml

Protocoles

a) Electrophorèse analytique

Un bouchon d'acrylamide (solution à 10 %) (5 ml + 50  $\mu$ l de persulfate d'ammonium) est coulé pour maintenir l'étanchéité du système (2 plaques de verre 160 x 180 mm ; 1,5 mm d'épaisseur) 30 ml de solution à 7,5 % d'acrylamide sont ensuite coulés (30 ml de solution A + 100  $\mu$ l de persulfate) et polymérisent 15 mn à 50°C.

Puis le gel de concentration est coulé (7,5 ml de solution C + 150 µl de persulfate d'ammonium) et le peigne rajouté immédiatement.

Après une pré-électrophorèse, les échantillons protéiques sont déposés dans les puits en présence de bleu de bromophénol 0,001 % et de glycérol après avoir été traités 3 mn au bain-marie bouillant en présence de 3 % de SDS.

L'électrophorèse est réalisée à 35 mA (par gel) pendant 4 h. Les gels sont démoulés puis fixés et colorés dans la solution de coloration pendant 2 h. L'excès de colorant est éliminé par lavage du gel dans la solution de décoloration.

b) Electrophorèse préparative

Le protocole utilisé reste identique, excepté l'épaisseur des gels qui double (3 mn).

La coloration (et fixation) dans le CBB R250 est limitée à 30 min et la décoloration ne dépasse pas une heure pour éviter toute dégradation du matériel protéique.

10. ELECTROELUTION (ANDERSON *et al.*, 1973)

Après coloration et décoloration des gels (PAGE/SDS) préparatifs, la bande protéique recherchée est isolée, celle-ci, d'abord équilibrée en tampon d'électrophorèse est ensuite découpée en de fins morceaux que l'on met dans un boudin de dialyse contenant un peu de tampon d'électrophorèse. L'ensemble est soumis à une électroélution.

11. CONCENTRATION DES ECHANTILLONS PROTEIQUES

Elle se fait à l'aide de l'appareil Diaflo équipé d'une membrane Amicon YM 30 (Pharmacia), et alimenté en azote.

12 . PRODUCTION d'IMMUNSERUM ANTI 90 KD (IS 25) (MENDEL-HARTVIG, 1982)

Après chromatographie d'échange d'ions préparative de SPE, le pic d'éluion de la protéine 90 KD est collecté, puis concentré, ensuite soumis à des PAGE/SDS préparatifs. A la fin de la migration électrophorétique, le gel est coloré au CBBR 250, puis décoloré. La bande 90 KD est découpée, électroéluée, ensuite dialysée contre une solution physiologique (9 p. 1000 de NaCl), enfin concentrée. Une aliquote d'électroéluat de la protéine 90 KD est déposée sur un gel PAGE/SDS analytique, à côté des quantités croissantes d'une protéine du commerce (Glutamate déshydrogénase, Mr 54,4 KD), en vue d'apprécier la quantité de protéine 90 KD dans l'électroéluat. 1 volume (0,5 mg) de l'électroéluat est complété par 1 volume d'adjuvant de Freund, et sert à l'immunisation sous-cutanée d'un lapin New Zealand (appelé arbitrairement lapin 25). Cette immunisation est suivie de rappels à 3 semaines d'intervalle. Dix jours après le troisième rappel d'immunisation, le lapin est saigné à l'oreille et l'antisérum produit (nommé par conséquent IS 25) est testé en Western-blot, et en immunoprécipitation.

13. MARQUAGE à l'IODE<sup>125</sup> (BOLTON, 1977).

Une fraction de cytosol (35 µg) est incubée avec 0,35 mCi d'iodure de sodium et 100 µl de chloramine T (solution à 1 mg/ml) pendant 1 minute à 4°C, en agitant fréquemment et doucement au Vortex. La réaction est stoppée par addition de 100 µl de métabisulfite de sodium (solution à 2 mg/ml).

L'incubat est débarrassé d'iode libre par filtration sur une P.D. 10 (colonne G25, PHARMACIA). Le pic lié est collecté et utilisé en immunoprécipitation.

#### 14. TECHNIQUE D'IMMUNOPRECIPITATION

##### Tampon d'adsorption

Tris-HCl	12 mM, pH 7,40
NaCl	0,15 M
SDS	0,3 %
Triton X-100	1,7 %
EDTA	2 mM

##### Protocole

Des fractions d'antigène total (700 000 cpm) sont incubées séparément avec l'IS 25, le sérum préimmun 25, et un immunsérum non relevant (25 µl par anticorps). L'incubat est complété à 500 µl avec du tampon d'adsorption et mis sous agitation rotative pendant une nuit à 4°C.

- Prégonflement d'une heure à 4°C, de la protéine A-Sépharose 4B, dans le tampon d'adsorption à raison de 10 mg/ml et par piste.
- Après deux lavages de la protéine A-Sépharose avec le tampon d'adsorption, le culot est mis en incubation avec l'immuncomplexe formé pendant 2 à 3 heures à température ambiante et sous agitation.
- Après une dizaine de lavages, suivis de comptages de la radioactivité en I<sup>125</sup>, visant à éliminer l'antigène marqué, non reconnu, 45 µl du tampon de dénaturation sont rajoutés au culot.

- L'ensemble est dénaturé 2 min à 100°C, l'électroéluat qui contient l'antigène marqué reconnu par l'immunsérum utilisé est soumis à un PAGE/SDS analytique.

- Après migration électrophorétique, le gel est séché, celui-ci est mis en contact avec un film KODAK X-OMAT pendant 14 jours à - 70°C.

15. TRANSFERT DES PROTEINES DU GEL ANALYTIQUE DE POLYACRYLAMIDE VERS LA FEUILLE DE NITROCELLULOSE (Western-blot) : TOWBIN *et al.*, 1979)

Matériel

Appareil LKB 2005 Transphor Electroblothing Unit (BROMA, Sweden)

Nitrocellulose Schleicher & Schull BA 85 (0,45  $\mu$ m)

Tampon de transfert

Tris-HCl 25 mM pH 8,3

Glycine 150 mM

Méthanol 20 %

Le gel de polyacrylamide est placé en contact avec la feuille de nitrocellulose préalablement équilibrée dans le tampon. Le transfert s'effectue pendant 5h à 60V (0,3A) ou 16h à 20V, en évitant l'échauffement de la cuve à l'aide d'une circulation d'eau courante. Après électrotransfert, les protéines sont colorées 5 mn par une solution aqueuse de Rouge Ponceau à 0,2 % contenant 3 % d'acide trichloracétique. L'excès de colorant est éliminé par plusieurs lavages de la feuille de nitrocellulose à l'eau distillée. La feuille est soit séchée et stockée, soit utilisée immédiatement pour l'immunorévélation.

Conditions particulières pour la détermination de la séquence N-terminale de la protéine 90 KD

Le transfert de la protéine 90 KD purifiée s'effectue sur une membrane de polyvinylidifluoride (P.V.D.F., Millipore), selon GULTEKIN et HEERMANN (1988). Ce support se prête bien aux réactifs de la dégradation d'EDMAN (1950), en séquenceur phase gaz (Sequencer Applied Biosystems 470A) couplé à un analyseur (120 A de la même marque) de dérivés phényl

hydantoine d'acides aminés (PTH). (Il est recommandé de ne pas mettre de glycine dans le tampon de transfert). Le microséquencage de la partie N-terminale de la protéine 90 KD a été réalisé par Mme Belaiche, dans le laboratoire dirigé par le Dr. P. Sautière, que nous remercions.

#### 16. TECHNIQUES IMMUNOCHIMIQUES.

##### . Réactifs et tampons

- TBS
  - Tris-HCl 10 mM
  - NaCl 150 mM
  - pH 7,4
- TNT (à préparer extemporanément)
  - TBS 1 litre
  - Tween 20 (0,1 %, p/v) 1 gramme
- Révélateur (à préparer extemporanément)
  - 4-chloro-1-naphtol (SIGMA C8890) 50 mg
  - à dissoudre dans 17 ml de méthanol
  - TBS qsp 100 ml
  - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 % 60 µl

##### Mode opératoire

- Saturation de la feuille de nitrocellulose dans la solution de TBS contenant 5 % (p/v) de lait écrémé en poudre 1h à 37°C.
- Lavage 2 fois 15 minutes dans TBS à température ambiante  
1 fois 15 minutes dans le TNT
- Incubation avec l'anticorps en solution dans TNT, lait écrémé en poudre 1 % (p/v) 1h à 2h à température ambiante.
- Lavage 3 fois 15 minutes dans le TNT

- Incubation avec l'anticorps marqué à la peroxydase (système lapin ou système souris) à une solution 1/1000e ou 1/500e respectivement dans TNT, lait écrémé 1 % (p/v) 1 heure sous agitation à température ambiante.

- Lavage 2 fois 15 minutes dans le TNT

- Lavage 1 fois dans le TBS

- Révélation par la solution de 4-chloronaphtol et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> immuncomplexes révélés sous forme de bandes colorées en violet. Ce protocole d'immunorévélation des blots est valable pour la technique de "Dot-blot".

#### 17. TECHNIQUE DU DOT-BLOT

Les échantillons protéiques de 0,1 ml sont immobilisés sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de microfiltration BIO-DOT (96 puits, BIO RAD, USA) relié à une trompe à vide. Le nombre élevé de puits permet de tester un fractionnement chromatographique complet. La feuille de nitrocellulose est ensuite soumise à la révélation immunologique.

#### 18. MARQUAGE COVALENT DES PROTEINES A L'AIDE D'UN TRACEUR RADIOACTIF.

Marquage au réactif de BOLTON et HUNTER (1973)

##### . Tampons

Tampon d'incubation : Borate de sodium/acide borique 0,1 M, pH 8,5.

Tampon d'équilibration de la précolonne d'HPLC

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM, NaCl 0,2 M, pH 7.

Le réactif (2,3 <sup>3</sup>H) N-succinimidyl-propionate (100 Ci/mmole) est utilisé en formant une liaison covalente avec les  $\Sigma$ -NH<sub>2</sub> des résidus de lysine. La protéine 90 KD purifiée (0,36 nmole) est reprise dans 3 ml de tampon d'incubation. L'ensemble est concentré. L'équivalent de 0,36 nmole de protéine soit 50  $\mu$ l sont ajoutés et incubés avec 100  $\mu$ l du réactif (1 nmole) dans un tube micro-vial (PIERCE) pendant 1 heure à 0°C. Après arrêt de la réaction avec 50  $\mu$ l de la solution Tris 50 mM, la protéine 90 KD est débarrassée de l'excès de réactif libre par dessalage, sur une précolonne de haute performance TSK GW 4000 (7,5 x 75 mm), prééquilibrée. Les fractions récupérées à l'exclusion contenant l'HSP 90 KD radioactive sont aliquotées et analysées immédiatement en électrophorèse de deux façons :

- soit les couloirs de migration sont découpés en tranches de 2 mm, qui sont digérées dans 0,2 ml d'eau oxygénée (30 %) à 55°C pendant 1 nuit, ensuite on rajoute le liquide à scintillation et on laisse reposer à l'abri de la lumière pendant une nuit avant de passer au comptage.
- soit après migration électrophorétique le gel est séché (Sehe gels, réf. 2003, LKB) et mis en contact avec un film (Hyper film<sup>TM</sup>-MP Amersham) pendant 3 semaines à - 70°C.

#### 19. MESURE DE LA CONSTANTE DE SEDIMENTATION

Des solutions de saccharose à 5 % et à 20 % sont préparées dans le tampon phosphate 160 mM ; pH 7,4 à 4°C ; glycérol 10 % ; mercaptoéthanol 20 mM. Le gradient de saccharose 5-20 % est réalisé à l'aide d'un appareil à deux chambres cylindriques et coulé dans des tubes en polyallomère de 4,5 ml. 200  $\mu$ l de la protéine 90 KD purifiée et marquée sont déposés sur les tubes, ceux-ci sont soumis à une

ultracentrifugation de 16 heures à 4°C à 55 000 rpm dans un rotor SW 60 (Beckman) à godets horizontaux. La mesure du coefficient de sédimentation de la protéine 90 KD est déterminée par comparaison à des standards centrifugés en parallèle, et dont les coefficients de sédimentation ( $S_{20,w}$ ) sont connus : catalase (11,3 S), aldolase (7,8 S), sérumalbumine (4,3 S). A l'arrêt de la centrifugation, les tubes sont ponctionnés par le fond, et des fractions de 6 gouttes sont recueillies et soumises à une mesure de radioactivité. Quant aux témoins standards, ceux-ci sont détectés par un dosage de protéines des fractions recueillies.

#### 20. MESURE DU RAYON DE STOKES

Elle est effectuée par chromatographie d'exclusion de taille à haute performance (HPSEC). La protéine 90 KD purifiée et marquée au réactif de BOLTON et HUNTER est injectée sur la colonne TSK G4000 SW analytique.

#### 21. DETERMINATION DU $\rho_{Hi}$ DE LA PROTEINE 90 KD.

##### matériels

Support : gel conventionnel de DEAE-Trisacryl

Dimension de la colonne : 15 x 100 mm

Tampon d'équilibration (A) : TES 20 mM, NaCl 100 mM, pH 6,0.

Eluant : PBE 74 (Poly Buffer Eluant de pH entre 7 et 4) de chez Pharmacia.

protocole.

Equilibrer la colonne avec le tampon A (au moins 2 volumes pour 1 volume total théorique de la colonne).

Dépôt de l'échantillon biologique à analyser dialysé auparavant contre le tampon A

Désorption des protéines avec le tampon PBE74 (dilué au 1/15e et ajusté à pH 3,5 avant emploi).

Le débit du travail est de 0,3 ml par min, assuré par une pompe (GILSON) à basse pression.

22. ETUDE IMMUNOHISTOLOGIQUE.

L'activité immunologique des anticorps (monoclonaux, polyclonaux) a aussi été appréciée en immunohistochimie sur des cellules d'hépatome de rats en culture HTC et des fibroblastes L929 de souris dans le laboratoire d'Histologie (Pr. J. LEONARDELLI, Mme SAINT-PAUL, Elisabeth Faculté de Médecine de Lille)\_que nous remercions.

Culture cellulaire

Les cellules à lignées continues HTC et L929 (cellules d'hépatome de rat en culture, et les cellules de fibroblastes de souris) sont stockées dans l'azote liquide en présence de 10 % de diméthylsulfoxyde, et de 30 % de sérum de veau foetal. Au besoin de ces cellules, celles-ci sont décongelées par immersion immédiate dans un bain-marie à 37°C. Les cellules sont ensuite mises en culture dans un milieu nutritif approprié :

- les cellules HTC dans le milieu :

SWIM'S S77 (GIBCO UK, Grande-Bretagne), additionné de L-glutamine 4 mM, pénicilline-streptomycine 100 unités ou microgrammes par ml, tricine 20 mM, pH 7,8 et de sérum de veau foetal 10 %.

- les cellules L929 dans le milieu :

DMEM (milieu minimum essentiel modifié par DULBECCO) à 3,7 grammes par litre de bicarbonate de sodium, additionné de L-glutamine 4 mM, pénicilline-streptomycine 100 unités ou microgrammes par ml et de sérum de veau foetal.

Ces cellules en monocouche, en phase logarithmique sont décolorées par trypsinisation courte. La suspension cellulaire est alors diluée de façon à obtenir une bonne répartition des cellules sur la lame.

tampons.

Tampon COONS : véronal sodique 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2

Tampon Tris : Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6

Tampon révélateur :

Diaminobenzidine (DAB)	80 mg
Méthanol	320 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 37 %	320 µl
Tris	160 µl

Protocole expérimental

Les cellules sont déposées sur lame en gouttes épaisses, puis fixées par un spray cytologique (à base d'alcool), et sont conservées à température ambiante jusqu'à utilisation. Pour la réaction immuno-chimique, les lames sont rincées à l'alcool (95°) pour éliminer le film laissé par le fixateur, puis réhydratées par passage sous eau courante

(1 à 3 min), ensuite stabilisées par immersion dans du tampon de COONS durant 5 min. Pour inhiber toute activité peroxydasique endogène, les cellules sont incubées pendant 6 min avec une solution tamponnée contenant 3 % d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Après lavage des cellules avec le tampon de COONS, celles-ci sont incubées avec les anticorps spécifiques choisis à une dilution optimale (1/50e) durant 2 heures à 37°C, ensuite lavées abondamment dans le tampon de COONS, avant d'être incubées avec les deuxièmes anticorps (immunoglobulines de mouton anti-lapin marquées à la peroxydase) à 37°C. Au bout de 30 min d'incubation les cellules sont révélées avec le tampon de révélation. Là où il y a réaction immunohistologique, une coloration marron apparaît entre 3 et 5 min. La réaction immunologique peut être arrêtée par immersion des lames dans l'eau ; celles-ci sont ensuite déshydratées par passages successifs dans l'alcool 95° et 100°, puis toluène et enfin les lames sont montées dans une résine synthétique (Eukitt) pour l'étude en microscopie optique.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- ADKINS B., HUNTER T. & SEFTON B.M. (1982)  
The transforming proteins of PRCII virus and Rous sarcoma virus form a complex with the same two cellular phospho-proteins.  
J. Virol. 43 : 448-455
- ALEXIS M.N., DJORDEVIC-MARKOVIC R. & SEKERIS C.E. (1983)  
Activation and changes in the sedimentation properties of rat liver glucocorticoid receptor.  
J. Steroid Biochem. 18 : 655-663
- ALLERA A., RAO G.S. & BREUER H. (1980)  
Specific interaction of corticosteroids with components of the cell membrane which are involved in the translocation of the hormone into the intravesicular space of purified rat liver plasma membrane vesicles.  
J. Steroid Biochem. 12 : 259-266
- ANDERSON C.W., BAUM P.R. & GRESTELAND R.F. (1973)  
Processing of adenovirus 2-induced proteins.  
J. Virol. 12 : 241-252
- ANDERSON N.L., GIOMETTI C.S., GEMMEL M.A., NANCE S.L. & ANDERSON N.G. (1982)  
A two-dimensional electrophoretic analysis of heat-shock-induced proteins of human cells.  
Clin. Chem. 28 : 1084-1092
- 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. & BAULIEU E.E. (1988)  
Covalent stabilization of the non transformed chick oviduct cytosol progesterone receptor by chemical cross-linking.  
Biochemistry 27 : 1330-1336
- ASHBURNER M. (1970)  
Patterns of puffing activity in salivary gland chromosomes of Drosophila. Responses to environmental treatments.  
Chromosoma 31 : 356-376
- ASHBURNER M. & BONNER J.J. (1979)  
The induction of gene activity in Drosophila by heat shock.  
Cell 17 : 241-254
- AYME A. & TISSIERES A. (1985)  
Locus 67B of Drosophila melanogaster contains seven, not four, closely related heat shock genes.  
EMBO J. 4 : 2949-2954

- BAILLY A., SAVOURET J.F., SALLAS N. & MILGROM E. (1978)  
Factors modifying the equilibrium between activated and non-activated forms of steroid-receptors complexes.  
Eur. J. Biochem. 88 : 623-632
- BALOUL J.M., PIERCE R.J., CRZYCH J.M. & CARRON A. (1985)  
In vitro synthesis of a 28 kilodalton antigen present on the surface of the Schistosomulum of Schistosoma mansoni.  
Mol. Biochem. Parasitol. 17 : 105-114
- BAULIEU E.E., BINART N., CADEPOND F., CATELLI M.G., CHAMBRAUD B., GARNIER J., GASC J.M., GROYER-SCHWEIZER G., OBLIN M.E., RADANYI C., REDEVILH G., RENOIR J.M. & SABBABH M. (1989)  
Do receptor-associated nuclear proteins explain earliest steps of steroid hormone function?  
in : "THE STEROID/THYROID HORMONE RECEPTOR FAMILY AND GENE REGULATION" edited by CARLSTEDT-DUKE J., ERICKSON H., GUSTAFSSON J.A., 1989 Birhauser Verlag Basel, 301-318
- BELAHSEN Y. (1987)  
Purification et caractérisation du récepteur des glucocorticoïdes sous forme transformée.  
Thèse pour le Doctorat en Biochimie, Nouveau Régime, Lille I
- BEN-OR S. & CHRAMBACH A. (1983)  
Heterogeneity of the glucocorticoid receptors : molecular transformation during activation detected by electrofocusing.  
Arch. Biochem. Biophys. 221 : 343-353
- BENSADOUN A. & WEINSTEIN D. (1976)  
Assay of proteins in the presence of interfering materials.  
Anal. Biochem 70 : 241-250
- BERENDES H.D. (1968)  
Structural and functional properties of polytene nuclei isolated from salivary glands of Drosophila hydei.  
Chromosoma 24 : 418-437
- BIENZ M. (1984)  
Xenopus hsp 70 genes are constitutively expressed in injected oocytes.  
EMBO J. 3 : 2477-2483
- BINART N., CHAMBRAUD B., DUMAS B., ROWLANDS D.A., BIGOGNE C., LEVIN J.M., GARNIER J., BAULIEU E.E. & CATELLI M.G. (1989)  
The cDNA-derived amino acid sequence of chick heat shock protein Mr 90,000 (HSP90) reveals a "DNA Like" structure : potential site of interaction with steroid receptors.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 159 : 140-147

- BLACKMAN R. K. & MESELSON M. (1986)  
Interspecific nucleotide sequence comparisons used to identify regulatory and structural features of the Drosophila hsp 82 gene.  
J. Mol. Biol. 188 : 499-515
- BLICQ S., DANZE P. M., DUMUR V., FORMSTECHEP P. & DAUTREVAUX M. (1988)  
Inhibition of glucocorticoid receptor transformation, subunit dissociation and temperature-dependent inactivation by various N-substitued maleimides.  
Biochemistry 27 : 8436-8442
- BLOOM E., METULICH D. T., LAN N. C., HIGGINS S. J., SIMONS S. S. & BAXTER J. D. (1980)  
Nuclear binding of glucocorticoid receptors : correlation between cytosol binding, activation and the biological response.  
J. Steroid Biochem. 12 : 175-184
- 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 : 4337-4342
- BODWELL J. E., HOLBROOK N. J. & MUNCK A. (1985)  
Stabilization of thymic glucocorticoid-receptor complexes by the calcium-activated protease inhibitor, calpastatin.  
J. Biol. Chem. 260 : 2601-2604
- BOLTON A. E. & HUNTER W. M. (1973)  
The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugaison to a <sup>125</sup>I-containing acylating agent.  
Biochem. J. 133 : 529-539
- BOND U. & SCHLESINGER M. J. (1985)  
Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts.  
Mol. Cell. Biol. 5 : 949-956
- BOND U. & SCHLESINGER M. J. (1986)  
The chicken ubiquitin gene contains a heat shock promoter and expresses an unstable mRNA in heat-shocked cells.  
Mol. Cell. Biol. 6 : 4602-4610
- BONNER J. J. & PARDUE M. L. (1976)  
The effect of heat shock on RNA synthesis in Drosophila tissues.  
Cell 8 : 43-50

- BRUGGE J., ERICKSON E. & ERICKSON R. L. (1981)  
The specific interaction of the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60src, with two cellular proteins.  
Cell 25 : 363-372
- BOYD W. C. (1955)  
Table of axial ratios calculated from the Perrin equation.  
J. Phys. Chem. 59 : 1119-1120
- BRUGGE J., YONEMOTO W. & DARROW D. (1983)  
Rous sarcoma virus transforming protein and two cellular phosphoproteins : analysis of the turnover and distribution of this complex.  
Mol. Cell. Biol. 3 : 9-19
- BUCHOU T., MESTER J., RENOIR J. M. & BAULIEU E. E. (1983)  
Effects of urea and molybdate on the chick oviduct progesterone receptor.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 114 : 479-487
- BURDON R. H. & CUTMORE C. M. (1982)  
Human heat shock gene expression and the modulation of the plasma membrane sodium-potassium ATPase activity.  
FEBS Lett. 140 : 45-48
- BURDON R. H. (1986)  
Heat shock and the heat shock proteins.  
Biochem. J. 240 : 313-324
- CAKE M. H., DI SORBO D. M. & LITWACK G. (1978)  
Effect of pyridoxal phosphate on the DNA-binding site of activated hepatic glucocorticoid receptor.  
J. Biol. Chem. 253 : 4886-4891
- CARLSSON L. & LAZARIDES E. (1983)  
ADP-ribosylation of the Mr 83,000 stress inducible and glucose-regulated protein in avian and mammalian cells : modulation by heat shock and glucose starvation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 4664-4668
- CARLSTEDT-DUKE J., GUSTAFSSON J. A. & WRANGE 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., WRANGE 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

- CHANDLER V. L. , MALER B. A. & YAMAMOTO K. R. (1983)  
DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor  
in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo.  
Cell 33 : 489-498
- CHANG S. H. , GOODING K. M. & REGNIER F. E. (1976a)  
Uses of oxiranes in the preparation of bonded phase supports.  
J. Chromato. 120 : 321-333
- CHANG S. H. , GOODING K. M. & REGNIER F. E. (1976b)  
High-performance liquid chromatography of proteins.  
J. Chromato. 125 : 103-114
- CHIROCO W. J. , WATERS M. G. & BLOBEL G. (1988)  
70K heat shock related proteins stimulate protein  
translocation into microsomes.  
Nature 332 : 805-810
- CIECHANOVER A. , FINLEY D. & VARSHAVSKY A. (1984)  
Ubiquitin dependence of selective protein degradation  
demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85.  
Cell 37 : 57-66
- 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. & WILSON E. M. (1981)  
Identification of an 8 S androgen receptor-promoting factor  
that converts the 4, 5 S form of the androgen receptor to 8 S.  
Endocrinology 109 : 496-505
- CORCES V. , PELLICER A. , AXEL R. & MESELSON M. (1981)  
Integration, transcription and control of a Drosophila heat  
shock protein gene in mouse cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 7038-7042
- COURTNEIGE S. A. & BISHOP J. M. (1982)  
Transit of pp60v-src to the plasma membrane.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 7117-7121
- 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
- DANIELSEN M. , NORTHROP J. P. & RINGOLD G. M. (1986)  
The mouse glucocorticoid receptor : mapping of functional  
domains by cloning, sequencing and expression of wild type  
and mutant receptor proteins.  
EMBO J. 5 : 2513-2522

DANZE P. M., FORMSTECHEP 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

DAUSSE J. P., DUVAL D., MEYER P., GAIGNAULT J. C., MARCHANDEAU  
C. & RAYNAUD J. P. (1977)  
The relationship between glucocorticoid structure and effects  
upon thymocytes.  
Mol. Pharmacol. 13 : 948-955

DE BANZIE J. S., SINCLAIR L. & LIS J. T. (1986)  
Expression of the major heat shock gene of Drosophila  
melanogaster in Saccharomyces cerevisiae.  
Nuclear Acid Res. 14 : 3587-3601

DELLWEG H. G., HOLTZ A., MUGELE K. & GEHRING U. (1982)  
Active domains in wild-type and mutant glucocorticoid  
receptors.  
EMBO J. 1 : 285-289

DENIS M. (1988a)  
Two-step purification and N-terminal amino acid sequence  
analysis of the rat Mr 90,000 heat shock protein.  
Anal. Biochem. 173 : 405-411

DENIS M., WIKSTROM A. C. & GUSTAFSSON J. A. (1988b)  
Subunit composition of the molybdate stabilized non-activated  
glucocorticoid receptor from rat liver.  
J. Steroid Biochem. 30 : 273-276

DENIS M. & GUSTAFSSON J. A. (1989)  
Translation of glucocorticoid receptor mRNA in vitro yields a  
nonactivated protein.  
J. Biol. Chem. 264 : 6005-6008

DESHAIES R., KOCH B., WERNER-WASHBURNE M., CRAIG E. &  
SCHECKMAN R. (1988)  
70KD stress protein homologues facilitate translocation of  
secretory and mitochondrial precursor polypeptides.  
Nature 332 : 800-805

DI DOMENICO B. J., BUGAISKY G. E. & LINDQUIST S. (1982a)  
Heat shock and recovery are mediated by different  
translational mechanisms.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 6181-6185

DI DOMENICO B. J., BUGAISKY G. E. & LINDQUIST S. (1982b)  
The heat shock response is self-regulated at both the  
transcriptional and posttranscriptional levels.  
Cell. 31 : 593-603

EDMAN P. (1950)

Method for determination of the amino acid sequence in peptides.

Acta Chem. Scand. 4 : 283-293

EILERS M. & SCHATZ G. (1988)

Protein unfolding and the energetics of protein translocation across biological membranes.

Cell 52 : 481-483

EISEN L. P., REICHMAN M. E., THOMPSON B. E. GAMETCHU B., HARRISON R. V. & EISEN H. J. (1985)

Monoclonal antibody to the rat glucocorticoid receptor. Relationship between the immunoreactive and DNA-binding domain.

J. Biol. Chem. 260 : 11805-11810

FAIRALL L., RHODES D. & KLUG A. (1986)

Mapping of the sites of protection on a 5 S RNA gene by the Xenopus transcription factor IIIA-A model for the interaction.

J. Mol. Biol. 192 : 577-591

FINDLEY R. C. & PEDERSON T. (1981)

Regulated transcription of the genes for actin and heat-shock proteins in Drosophila cells.

J. Cell. Biol. 88 : 323-328

FINLEY D., CIECHANOVER A. & VARSHAVSKY A. (1984)

Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85.

Cell 37 : 43-55

FINLEY D., OZKAYNAK E. & VARSHAVSKY A. 1987)

The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation and other stresses.

Cell 48 : 1035-1046

GAMETCHU B. & HARRISON R. W. (1984)

Characterization of a monoclonal antibody to the rat liver glucocorticoid receptor.

Endocrinology 114 : 274-279

GASC J. M., RENOIR J. M., RADANYI C., JOAB I., TUOHIMAA P. & BAULIEU E. E. (1984)

Progesterone receptors in the chick oviduct : an immunohistochemical study with antibodies to distinct receptor components.

J. Cell Biol. 99 : 1193-1201

- GASC J.M., DELAHAYE F. & BAULIEU E. E. (1989)  
Compared intracellular localization of the glucocorticosteroid and progesterone receptors : an immunocytochemical study.  
Exp. Cell. Res. 181 : 492-504
- GEHRING U. (1980)  
in : "BIOCHEMICAL ACTION OF HORMONES".  
LITWACK G., ed., Vol. VII, pp 205-232.  
Academic Press, NEW YORK.
- GEHRING U. & HOLTZ A. (1983)  
Photoaffinity labelling and partial proteolysis of wild-type and variant glucocorticoid receptors.  
Biochemistry 22 : 4013-4018
- GEHRING U. & ARNDT H. (1985)  
Heteromeric nature of glucocorticoid receptors.  
FEBS Lett. 179 : 138-142
- GERWICK L. E. (1985)  
Hyperthermia in cancer therapy : the biological basis and unresolved questions.  
Cancer Res. 45 : 3408-3414
- GIGUERE V., HOLLENBERG S. M., ROSENFELD M. G. & EVANS R. M. (1986)  
Functional domains of the human glucocorticoid receptor.  
Cell 46 : 645-652
- GIGUERE V., ONG E. S., SEGUI P. & EVANS R. M. (1987)  
Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid.  
Nature 330 : 624-629
- GOVINDAN M. V. & SEKERIS C. E. (1978)  
Purification of two dexamethasone-binding proteins from rat liver cytosol.  
Eur. J. Biochem. 89 : 95-104
- GOVINDAN M. V. & MANZ B. (1980)  
Three-step purification of glucocorticoid receptors from rat liver.  
Eur. J. Biochem. 108 : 47-53
- GRANDICS P., GASSER D. L. & LITWACK G. (1982)  
Monoclonal antibodies to the glucocorticoid receptor.  
Endocrinology 111 : 1731-1733
- GRANDICS P., MILLER A., SCHMIDT T. J., MITTMAN D. & LITWACK G. (1984)  
Purification of the unactivated glucocorticoid receptor and its subsequent in vitro activation.  
J. Biol. Chem. 259 : 3173-3180

GREEN S., WALTER P., KUMAR V., KRUST A., BORNERT J.M., ARGOS P. & CHAMBON P. (1986)

Human oestrogen receptor cDNA : sequence, expression and homology to v-erb-A.

Nature 320 : 134-139

GREEN S. & CHAMBON P. (1988)

Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation.

Trends Genet. 4 : 309-314

GREEN S., KUMAR V., THEULAZ I., WAHLI W. & CHAMBON P. (1988)

The N-terminal DNA-binding "zinc finger" of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity.

EMBO J. 7 : 3037-3044

GRONEMEYER H., TURCOTTE B., QUIRIN-STRICKER C., BOCQUEL M.T., MEYER M.E., KROZOWSKI Z., JELTSH J.M., LEROUGE T., GARNIER J.M. & CHAMBON P. (1987)

The chicken progesterone receptor : sequence, expression and functional analysis.

EMBO J. 6 : 3985-3994

GRONER B., PONTA H., BEATO M. & HYNES N.E. (1983)

The proviral DNA of the mouse mammary tumor virus : its use in the study of molecular details of steroid hormone action.

Mol. Cell. Endocrin. 32 : 101-116

GULTEKIN H. & HEERMAN K.H. (1988)

The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix.

Anal. Biochem. 172 : 320-329

GUSTAFSSON J.A., CARLSTEDT-DUKE J., WRANGE O., OKRET S. & WIKSTROM A.C. (1986)

Functional analysis of the purified glucocorticoid receptor.

J. Steroid Biochem. 24 : 63-68

HACKETT R.W. & LIS J.T. (1983)

Localization of the hsp 83 transcript within a 3292 nucleotide sequence from the 63B heat shock locus.

Nuclear Acid Res. 11 : 7011-7020

HAHN G.M. (1982)

Heat treatment of cancer.

"PRINCIPLES AND PRACTICES OF ONCOLOGY".

Eds. DE VITA V.T., HELLMAN S. & ROSENBERG S.A.

LIPPINCOTT J. Co., PHILADELPHIA, pp1811-1821.

HALLER W. (1965)

Chromatography on glass of controlled pore size.

Nature 206 : 693-696

- HARMON J. M., EISEN H. J., BROWER S. T., SIMONS S. S., LANGLEY C. L. & THOMPSON E. B. (1984)  
Identification of human leukemic glucocorticoid receptors using affinity labelling and anti-human glucocorticoid receptor antibodies.  
Cancer Res. 44 : 4540-4547
- HENLE J. K. & DETHLEFSEN L. A. (1978)  
Heat fractionation and thermotolerance : a review.  
Cancer Res. 38 : 1843-1851
- HERSHKO A. & CIECHANOVER A. (1982)  
Mechanisms of intracellular protein breakdown.  
Annu. Rev. Biochem. 51 : 335-364
- HICKEY E., BRANDON S. E., SADIS S., SMALE G. & WEBER L. A. (1986)  
Molecular cloning of sequences encoding the human heat-shock proteins and their expression during hyperthermia.  
Gene 43 : 147-157
- HICKEY E., BRANDON S. E., SMALE G., LLOYD D. & WEBER L. A. (1989)  
Sequence and regulation of a gene encoding a human 89-kilodalton heat shock protein.  
Mol. Cell. Biol. 9 : 2615-2626
- HOLBROOK N. J., BODWELL J. E., JEFFRIES M. & MUNCK A. (1983)  
Characterization of non-activated glucocorticoid receptor complexes from intact rat thymus cells.  
J. Biol. Chem. 258 : 6477-6485
- HOLBROOK N. J., BODWELL J. E. & MUNCK A. (1984)  
Nonactivated and activated glucocorticoid-receptor complexes in WEHI-7 and rat thymus cells.  
J. Steroid Biochem; 20 : 19-22
- HOLLENBERG S. M., WEINBERGER C., ONG E. S., CERULLI G., ORO A., LEBO R., THOMPSON E. B. & EVANS R. M. (1985)  
Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor.  
Nature 318 : 635-641
- HOLLENBERG S. M., GIGUERE V., SEGUI P. & EVANS R. M. (1987)  
Colocalization of DNA binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor.  
Cell 49 : 39-46
- HOUSLEY P. R. & 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. & DISTELHORST C. W. (1988a)

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

HOWARD K. J. & DISTELHORST C. W. (1988b)

Effect of the 90 KDa heat shock protein, HSP90, on glucocorticoid receptor binding to DNA-cellulose.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 151 : 1226-1232

HYNES N. E. , VAN OUYEN A. J. J. , KENNEDY N. , HEERLICH P. , PONTA H. & GRONER B. (1983)

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

IDZIOREK T. , FORMSTECHEP P. , DANZE P. M. , SABLONNIERE B. , LUSTENBERGER P. , RICHARD C. , DUMUR V. & 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

JAMRICH M. , GREENLEAF A. L. & BAUTZ E. K. F. (1977)

Localization of RNA polymerase in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 : 2079-2083

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

KALIMI M. , COLMAN P. & FEIGELSON P. (1975)

The "activated" hepatic glucocorticoid-receptor complex.  
J. Biol. Chem. 250 : 1080-1086

KALIMI M. , HUBBARD J. & RAY A. (1983)

The effect of calcium on the hepatic glucocorticoid receptor.  
J. Steroid Biochem. 18 : 665-671

KASAMBALIDES E. J. & LANKS K. W. (1983)

Dexamethasone can modulate glucose-regulated and heat-shock protein synthesis.  
J. Cell. Physiol. 114 : 93-98

- 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
- KELLEY P.M. & SCHLESINGER M.J. (1982)  
Antibodies to two major chicken heat shock proteins cross-react with similar proteins in widely divergent species.  
Mol. Cell. Biol. 2 : 267-274
- KEY J.L., LIN C.Y., CEGLARZ E. & SCHOFFEL F. (1982)  
in "HEAT SHOCK-FROM BACTERIA TO MAN"  
SCHLESINGER M.J., ASHBURNER M. & TISSIERES A., Eds.,  
pp329-336. COLD SPRING HARBOR Laboratory.
- KIM C.S., LANDER J.M., JOH T.H. & PRATT R.M. (1984)  
Immunocytochemical localization of glucocorticoid receptors in midgestation murine embryos and human embryonic cultured cells.  
J. Histochem. Cytochem. 32 : 1234-1237
- KING W.J. & GREENE G.L. (1984)  
Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells.  
Nature 307 : 745-747
- KIRKLAND J.J. (1976)  
Porous silica microspheres for high-performance size-exclusion chromatography.  
J. Chromato. 125 : 231 -250
- KLOETZEL P. & BAUTZ E.K.F. (1983)  
Heat-shock proteins are associated with hnRNP in Drosophila tissue culture cells.  
EMBO J. 2 : 705-710
- KOVACIC-MILOVOJEVIC 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
- KOYASU S., NISHIDA E., KADOWAKI T., MATSUZAKI F. & IIDA K. (1986)  
Two mammalian heat shock proteins, HSP 90 and HSP 100, are actin-binding proteins.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 8054-8058
- KUMAR V., GREEN S., TACK G., BERRY M., JIN J.R. & CHAMBON P. (1987)  
Functional domains of the human estrogen receptor.  
Cell 51 : 941-951

LAEMMLI U. K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227 : 680-687

LAI B. T., CHEN N. W., STANEK A. E., KEH W. & LANKS K. W. (1984)

Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies.

Mol. Cell. Biol. 4 : 2802-2810

LANDRY J., BERNIER D., CHRETIEN P., NICOLE L. M., TANGUAY R. M. & MARCEAU N. (1982)

Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance.

Cancer Res. 42 : 2457-2461

LANDRY J. & CHRETIEN P. (1983)

Relationship between hyperthermia induced heat shock proteins and thermotolerance in Morris hepatoma cells.

Can. J. Biochem. Cell. Biol. 61 : 428-437

LANKS K. W. (1983)

Metabolite regulation of heat shock protein levels.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 5325-5329

LEACH K. L., DAHMER M. K., HAMMOND N. D., SANDO J. J. & PRATT W. B. (1979)

Molybdate inhibition of glucocorticoid receptor inactivation and transformation.

J. Biol. Chem. 254 : 11884-11890

LEENDERS H. J. & BERENDES H. D. (1972)

Effect of changes in the respiratory metabolism upon genome activity in Drosophila. Induction of gene activity.

Chromosoma 37 : 434-444

LEES-MILLER P. S. & ANDERSON C. W. (1989)

Two human 90-KDa heat shock proteins are phosphorylated in vivo at conserved serines that are phosphorylated in vitro by casein kinase II.

J. Biol. Chem. 264 : 2431-2437

LEFEBVRE P., FORMSTECHEP P., RICHARD C. & DAUTREVAUX M. (1988a)

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 : 1221-1229

- LEFEBVRE P., DANZE P.M., SABLONNIERE B., RICHARD C.,  
FORMSTECHEP P. & 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 27 : 9186-9194
- LEFEBVRE P., SABLONNIERE B., TBARKA N. & DAUTREVAUX M. (1989)  
Study of the heteromeric structure of the untransformed  
glucocorticoid receptor using chemical cross-linking and  
monoclonal antibodies against the 90K heat shock protein.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 159 : 677-686
- LEVINSON W., OPPERMAN H. & JACKSON J. (1980)  
Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the  
synthesis of four proteins in eukariotic cells.  
Biochim. Biophys. Acta 606 : 170-180
- LEWIS M. J. & PELHAM H. R. B. (1985)  
Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of  
the 70 KD heat shock protein.  
EMBO J. 4 : 3137-3143
- LI G. C. (1983)  
Induction of thermotolerance and enhanced heat shock protein  
synthesis in Chinese hamster fibroblasts by sodium arsenite  
and by ethanol.  
J. Cell. Physiol. 115 : 116-122
- LI G. C. & SCHRIEVE D. C. (1982)  
Exp. Cell Res. 142 : 464-468
- LINDQUIST S. (1980)  
Varying patterns of protein synthesis during heat shock :  
implications for regulation.  
Dev. Biol. 77 : 463-479
- LINDQUIST S. (1981)  
Regulation of protein synthesis during heat shock.  
Nature 293 : 311-314
- LINDQUIST S. (1986)  
The heat shock response.  
Ann. Rev. Biochem. 55 : 1151-1191
- LINDQUIST S. & CRAIG E. A. (1988)  
The heat shock proteins.  
Ann. Rev. Genet. 22 : 631-677

- LIPSICH L. A., CUTT J. R. & BRUGGE J. S. (1982)  
Association of the transforming proteins of Rous, Fujinami and Y73 avian sarcoma viruses with the same two cellular proteins.  
Mol. Cell. Biol. 2 : 875-880
- LUSTENBERGER P., BLANCHARDIE D., FORMSTECHEP P., ORSONNEAU J. L. & BERNARD S. (1985)  
Non-transformed rabbit liver glucocorticoid receptor : purification, characterization and transformation.  
Biochimie 67 : 1267-1278
- MADER S., KUMAR V., DE VERNEUIL H. & CHAMBON P. (1989)  
Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from glucocorticoid-responsive element.  
Nature 338 : 271-274
- MARKOVIC R. D., EISEN H. J., PARCHMAN L. G., BARNETT C. A. & LITWACK G. (1980)  
Evidence for a physiological role of corticosteroid binder IB  
Biochemistry 19 : 4556-4564
- MARKOVIC R. D. & LITWACK G. (1980)  
Activation of liver and kidney glucocorticoid receptor complexes occurs in vivo.  
Arch. Biochem. Biophys. 202 : 374-379
- MARSHALL T. (1984)  
Detection of protein in polyacrylamide gels using an improved silver stain.  
Anal. Biochem. 136 : 340-346
- Mc MAHON A. P., NOVAK T. J., BRITTEN R. J. & DAVIDSON E. H. (1984)  
Inducible expression of a cloned heat shock fusion gene in sea urchin embryos.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 7490-7494
- 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
- MENDEL D. B., BODWELL J. E. & MUNCK A. (1987)  
Activation of cytosolic glucocorticoid-receptor complexes in intact WEHI-7 cells does not dephosphorylate the steroid-binding protein.  
J. Biol. Chem. 262 : 5644-5648

MENDEL D.B. & ORTI E. (1988)

Isoform composition and stoichiometry of the 90 KDa heat shock protein associated with glucocorticoid receptors.  
J. Biol. Chem. 263 : 6695-6702

MENDEL-HARTVIG I. (1982)

A simple and rapid method for the isolation of peptides from sodium dodecyl sulfate-containing polyacrylamide gels.  
Anal. Biochem. 121 : 215-217

MERIL C.R., GOLDMAN D., SEDMAN S.A. & EBERT M.H. (1981)

Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins.  
Science 211 : 1437-1438

MIDDLEBROOK J.L. & ARONOW L. (1977)

Physicochemical properties of glucocorticoid receptors from mouse fibroblasts.  
Endocrinology 100 : 271-282

MIESFELD R., RUSCONI S., GODOWSKI P.J., MALER B.A., 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 : 389-399

MIESFELD R., GODOWSKI P.J., MALER B.A. & YAMAMOTO K.R. (1987)

Glucocorticoid receptor mutants that define a small region sufficient for enhancer activation.  
Science 236 : 423-427

MILGROM E., ATGER M. & BAULIEU E.E. (1973)

Acidophilic activation of steroid hormone receptors.  
Biochemistry 12 : 5198-5205

MILLER J.M., Mc LACHLAN A.D. & KLUG A. (1985)

Repetitive zinc binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes.  
EMBO J. 4 : 1605-1612

MITCHELL H.K., PETERSEN N.S. & BUZIN C.H. (1985)

Self-degradation of heat shock proteins.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 4969-4973

MOORE S.K., KOSAK C., ROBINSON E.A., ULLRICH S.J. & 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. & FOLEY R. (1979)

Activation of steroid hormone receptor complexes in intact target cells in physiological conditions.  
Nature 278 : 752-754

- 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
- NEIDHART F. C. , VAN BOGELEN R. A. & VAUGHN V. (1984)  
Annu. Rev. Genet. 18 : 295-329
- NEMOTO T. , OHARA-NEMOTO Y. & OTA M. (1987)  
Purification and characterization of a non binding component  
of the non transformed receptor from rat liver.  
J. Biochem. 102 : 513-523
- NISHIDA E. , KOYASU S. , SAKAI H. & YAHARA I. (1986)  
Calmodulin-regulated binding of the 90-KDa heat shock protein  
to actin filaments.  
J. Biol. Chem. 261 : 16033-16036
- NIU E. M. , NEAL R. M. , PIERCE V. K. & 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. & KOHLER P. O. (1981)  
Separation of glucocorticoid receptors by phosphocellulose  
chromatography at pH 6,8.  
J. Steroid Biochem. 15 : 337-341
- OKRET S. , CARLSTEDT-DUKE J. , WRANGE O. , CARLSTROM K. &  
GUSTAFSSON J. A. (1981)  
Characterization of an antiserum against the glucocorticoid  
receptor.  
Biochim. Biophys. Acta 677 : 209-219
- OKRET S. , WIKSTROM A. C. & GUSTAFSSON J. A. (1985)  
Molybdate stabilized glucocorticoid receptor : evidence for a  
receptor heteromer.  
Biochemistry 24 : 6581-6586
- ONCLEY J. L. (1941)  
Evidence from physical chemistry regarding the size and shape  
of protein molecules from ultracentrifugation, viscosity,  
dielectric dispersion and double refraction of flow.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 41 : 121-150
- OPPERMAN H. , LEVINSON W. & BISHOP J. M. (1981)  
A cellular protein that associates with the transforming  
protein of Rous sarcoma virus is also a heat-shock protein.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 1067-1071

- PAPAMICHAIL M., TSOKOS G., TSAWDAROGLOV N. & SEKERIS C. E.  
(1980)  
Immunocytochemical demonstration of glucocorticoid receptor  
from different cell type and their translocation to the  
nuclei.  
Exp. Cell Res. 125 : 490-494
- PARKER C. S. & TOPOL J. (1984)  
A Drosophila RNA polymerase II transcription factor binds to  
the regulatory site of an hsp 70 gene.  
Cell 37 : 273-283
- 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., WRANGE O.,  
OKRET S., GUSTAFSSON J. A. & YAMAMOTO K. R. (1983)  
Sequence specific binding of glucocorticoid receptor to MMTV  
DNA at sites within and upstream of the transcribed region.  
Cell 35 : 381-392
- PELHAM H. R. B. (1982)  
A regulatory upstream promoter element in the Drosophila  
hsp70 heat-shock gene.  
Cell 30 : 517-528
- PELHAM H. R. B. (1985)  
Trends Genet. 1 : 31-35
- PELHAM H. R. B. (1986)  
Speculations on the functions of the major heat shock and  
glucose-regulated proteins.  
Cell 46 : 959-961
- PONTA H., KENNEDY N., SKROCH P., HYNES N. E. & GRONER B.  
(1985)  
Hormonal response region in the mouse mammary tumor virus  
long terminal repeat can be dissociated from the proviral  
promoter and has enhancer properties.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 1020-1024
- 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., PRATT D. V., HOLLENBERG S. M., GIGUERE V., CADEPOND F. M., SCHEIZER-GROYER G., CATELLI M. G., EVANS R. M. & BAULIEU E. E. (1988)

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

PRATT W. B., REDMOND T., SANCHEZ E. R., BRESNICK E. H., MESHINCHI S. & WELSH M. J. (1989)

Speculations on the role of the 90 KDa heat shock protein in glucocorticoid receptor transport and function. in : "THE STEROID/THYROID HORMONE RECEPTOR FAMILY AND GENE REGULATION" edited by CARLSTEDT-DUKE J., ERICKSON H., GUSTAFSSON J. A., 1989 Birhauser Verlag Basel, 109-126

RAAKA B. M. & SAMUELS H. H. (1983)

The glucocorticoid receptor in GH1 cells. Evidence for dense amino acid labelling 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

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

RADANYI C., RENOIR J. M., SABBABH M. & BAULIEU E. E. (1989)

Chick heat-shock protein of Mr:90,000, free or released from progesterone receptor, is in a dimeric form. J. Biol. Chem. 264 : 2568-2573

RATAJCZAK T., COMBER M., MOIR R. & HAHNEL R. (1987)

The amino-terminal sequence of the 85-90K nonhormone binding component of the molybdate-stabilized estradiol receptor from calf uterus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 143 : 218-224

READ S. M. & NORTHCOTE D. H. (1981)

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

READ L. D., SNIDER C. E., MILLER J. S., GREENE J. L. & KATZENELLENBOGEN B. S. (1988)

Mol. Cell. Endocr. 2 : 263-271

REBBE N. F., WARE J., BERTINA R. M., MODRICH P. & STAFFORD D. W. (1987)

Nucleotide sequence of a cDNA for a member of the human 90-KDa heat-shock protein family. Gene 53 : 235-245

REDEVILH 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

REGNIER F. E. & NOEL R. (1976)  
Glycerolpropylsilane bonded phases in the steric exclusion  
chromatography of biological macromolecules.  
J. Chromato. 14 : 316-320

REICHMAN M. E., FOSTER C. M., EISEN L. P., EISEN H. J., TORAIN  
B. F. & SIMONS S. S. (1984)  
Limited proteolysis of covalently labelled glucocorticoid  
receptors as a probe of receptor structure.  
Biochemistry 23 : 5376-5384

REITER T. & PENMAN S. (1983)  
"Prompt" heat shock proteins : translationally regulated  
synthesis of new proteins associated with nuclear matrix-  
intermediate filaments as an early response to heat shock.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 4737-4741

RENOIR J. M., BUCHOU T., MESTER J., RADANYI C. & BAULIEU E. E.  
(1984)  
Oligomeric structure of molybdate stabilized, non-transformed  
8 S progesterone receptor from chicken oviduct cytosol.  
Biochemistry 23 : 6016-6023

REXIN M., BUSCH W. & GEHRING U. (1986)  
Chemical cross-linking of heteromeric glucocorticoid  
receptors.  
Biochemistry 27 : 5593-5601

RIEHL R. M., SULLIVAN W. P., VROMAN B. T., BAUER V. J., PEARSON  
G. P. & TOFT D. O. (1985)  
Immunological evidence that the non hormone binding component  
of avian steroid receptors exist in a wide range of tissues  
and species.  
Biochemistry 24 : 6584-6591

RINGOLD G. M. (1984)  
Steroid hormone regulation of gene expression.  
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25 : 529-566

RINGOLD G. M., YAMAMOTO K. R., BISHOP J. M. & VARMUS H. E. (1977)  
Glucocorticoids stimulated accumulation of MMTV RNA :  
increased rate of synthesis of viral RNA.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 : 2879-2883

RITOSSA F. M (1962)  
A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in  
Drosophila.  
Experientia 18 : 571-573

- RITOSSA F. M. (1964)  
Activation of specific loci in polytene chromosomes of Drosophila.  
Exp. Cell. Res. 35 : 601-607.
- RODENHISER D., JUNG J. H. & ATKINSON B. G. (1985)  
Mammalian lymphocytes : stress-induced synthesis of heat-shock proteins in vitro and in vivo.  
Can. J. Biochem. Cell. Biol. 63 : 711-722
- ROKUSHIKA S., OHKAWA T. & HATANO H. (1979)  
High-speed aqueous gel permeation chromatography of proteins.  
J. Chromato. 176 : 456-461
- ROSE D. W., WETTENHALL R. E. H., KUDLICKI W., KRAMER G. & HARDESTY B. (1987)  
The 90-kilodalton peptide of the heme-regulated eIF-2 $\alpha$  kinase has sequence similarity with the 90-kilodalton heat shock protein.  
Biochemistry 26 : 6583-6587
- ROSE D. W., WELCH W. J., KRAMER G. & HARDESTY B. (1989)  
Possible involvement of the 90-KDa heat shock protein in the regulation of protein synthesis.  
J. Biol. Chem. 264 : 6239-6244
- ROUSSEAU G. G., BAXTER J. D. & TOMKINS G. M. (1972)  
Glucocorticoid receptors : relation between steroid and biological effects.  
J. Mol. Biol. 79 : 539-554
- ROUSSEAU G. G., CAMBRON P., BRASSEUR N., MARCOTTE L., MATTON P. & SCHMIDT J. P. (1983)  
Glucocorticoid agonist and antagonist activity of 17-21 acetonide steroids.  
J. Steroid Biochem. 18 : 237-244
- 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., DANZE P. M., FORMSTECHEP P., LEFEBVRE P. & DAUTREVAUX M. (1986)  
Physical characterization of the activated and non-activated forms of the glucocorticoid-receptor complex bound to the steroid antagonist 3H RU 486.  
J. Steroid Biochem. 25 : 604-614
- SABLONNIERE B. (1987)  
Etude des caractéristiques hydrodynamiques du récepteur des glucocorticoides. Apport de la chromatographie liquide à haute performance.  
Mémoire de DERBH , Biochimie, LILLE II

SABLONNIERE B., LEFEBVRE P., FORMSTEHER P. & 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. Chromato. 403 : 183-196

SABLONNIERE B. (1988)

Organisation hétéro-oligomérique du récepteur des glucocorticoides.

Thèse pour le Doctorat en Biochimie, Nouveau Régime, LILLE I.

SABLONNIERE B., ECONOMIDIS I.V., LEFEBVRE P., PLACE M., RICHARD C., FORMSTECHER P. & 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. 177 : 371-382

SAKAUE Y. & THOMPSON E. B. (1977)

Characterization of two forms of glucocorticoid-receptor complexes separated by DEAE-cellulose column chromatography. Biochem. Biophys. Res. commun. 77 : 533-541

SANCHEZ E. R., TOFT D. O., SCHLESINGER M. J. & PRATT W. B. (1985)  
Evidence that the 90 KDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a heat shock protein.

J. Biol. Chem. 260 : 12398-12401

SANCHEZ E. R. & PRATT W. B. (1986)

Phosphorylation of L-cell glucocorticoid receptors in hormones complexes. Evidence that receptor is not a protein kinase.

Biochemistry 25 : 1378-1382

SANCHEZ E. R., REDMOND T., SCHERRER L. C., BRESNICK E. H., WELSCH M. J. & PRATT W. B. (1988)

Evidence that the 90-kilodalton heat-shock protein is associated with tubulin containing complexes in L-cell cytosol and in intact PtK cells.

Mol. Endocrinol. 2 : 756-760

SATO B., NOMA K., NISHIZAWA Y., NAKATAO K., MATSUMOTO K. & YAMAMURA Y. (1980)

Mechanism of activation of steroid receptors involvement of low Mw inhibitor in activation of androgen, glucocorticoid and estrogen receptors systems.

Endocrinology 106 : 1142-1148

SCHACHMAN H. K. (1959)

Interpretation of sedimentation data.  
in : "ULTRACENTRIFUGATION IN BIOCHEMISTRY"  
Acad. Press, NEW YORK, 215-247

SCHLESINGER M. J. , ALIPERTI G. & KELLEY P. M. (1982)

The response of cells to heat shock.  
Trends Biochem. Sci. 7 : 222-225

SCHMIDT T. J. , HARMON J. M. & THOMPSON E. B. (1980)

Activation-labile glucocorticoid-receptor complexes of a  
steroid-resistant variant of CEM-C7 human lymphoid cells.  
Nature 286 : 507-510

SCHOFFL F. & BAUMANN G. (1985)

Thermo-induced transcripts of a soybean heat shock gene after  
transfer into sunflower using a T1 plasmid vector.  
EMBO J. 4 : 1119-1124

SCIANDRA J. J. & SUBJECK J. R (1983)

The effects of glucose on protein synthesis and thermosen-  
sitivity in Chinese hamster ovary cells.  
J. Biol. Chem. 258 : 12091-12093

SCIANDRA J. J. , SUBJECK J. R. & HUGHES C. S. (1984)

Induction of glucose-regulated proteins during anaerobic  
exposure and of heat-shock proteins after reoxygenation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 4843-4847

SHAW G. & KAMEN R. (1986)

A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of  
GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation.  
Cell 46 : 654-667

SHERIDAN P. J. , BUCHANAN J. M. , ANSELMO V. C. & MARTIN P. M.  
(1979)

Equilibrium : the intracellular distribution of steroid  
receptors.  
Nature 282 : 579-582

SHERMAN M. R. (1975)

Physical-chemical analysis of steroid hormone receptors.  
in : "METHODS IN ENZYMOLOGY. HORMONE ACTION", Eds O 'MALLEY  
B. W. & HARDMAN J. G. , vol 36 Academic Press, NEW YORK, 211-234

SHERMAN M. R. , PICKERING L. A. , ROLLWAGEN F. M. & MILLER L. K.  
(1978)

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

SHERMAN M. R. , MORAN M. C. , 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. & 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.

Biochim. Biophys. Acta 112 : 346-362

SIMONS S. S. , THOMPSON E. B. & JOHNSON D. F. (1979)

Anti inflammatory pyrazolo-steroid : potent glucocorticoids containing bulky A ring substituents and no C3 carbonyl.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 86 : 793-799

SIMONS S. S. (1987)

Selective covalent labelling of cysteine in bovine serum albumine and in hepatoma tissue culture cell glucocorticoid receptors by dexamethasone-21-mesylate.

J. Biol. Chem. 262 : 9669-9675

SIMONS S. S. , PUMPHREY J. G. , RUDIKOFF S. & EISEN H. J. (1987)

Identification of cysteine 656 as the amino acid of hepatoma tissue culture cell glucocorticoid receptors that is covalently labelled by dexamethasone-21-mesylate.

J. Biol. Chem. 262 : 9676-9680

SPENA A. , HAIN R. , ZIERVOGEL U. , SAEDLER H. & SCHELL J. (1985)

Construction of a heat-inducible gene for plants.

Demonstration of heat inducible activity of the Drosophila hsp 70 promoter in plants.

EMBO J. 4 : 2739-2744

SPRADLING A. , PENMAN S. & PARDUE M. L. (1975)

Analysis of Drosophila mRNA by in situ hybridization : sequences transcribed in normal and heat shocked cultured cells.

Cell 4 : 395-404

SULLIVAN W. P. , VROMAN B. T. , BAUER V. J. , RURI R. K. , RIEHL R. M. , PEARSON G. R. & TOFT D. O. (1985)

Isolation of steroid receptor binding protein from chicken oviduct and production of monoclonal antibodies.

Biochemistry 24 : 4214-4222



TAI P. K., MAEDA Y., NAKAO K., WAKEN N. G., DUHRING J. L. & FABER L. E. (1986)

A 58 KDa protein associated with progesterone, androgen, estrogen and glucocorticoid receptors.  
Biochemistry 25 : 5269-5272

TANFORD C. (1963)

in : "PHYSICAL CHEMISTRY OF MACROMOLECULES"  
WILEY, NEW-YORK.

THOMAS G. P. & MATHEWS M. B. (1984)

Mol. Cell. Biol. 4 : 1063-1072

TISSIERES A., MITCHELL H. K. & TRACY U. M. (1974)

Protein synthesis in salivary glands of D. melanogaster.  
Relation to chromosome puffs.  
J. Mol. Biol. 84 : 389-398

TOWBIN T., STAEBELIN T. & GORDON J. (1979)

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets : procedure and applications.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 4250-4354

TUOHIMAA P., RENOIR J. M., RADANYI C., MESTER J., JOAB I., BUCHOU T. & BAULIEU E. E. (1984)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 119 : 433-439

ULLRICH S. J., ROBINSON E. A., LAW L. W., WILLINGHAM M. & APPELA E. (1986)

A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock related protein.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 3121-3125

UNGER K. (1980)

in : Porous silica, Journal of Chromatography Library, vol. 16

UNGER K. (1984)

High-performance size-exclusion chromatography.  
in : "METHODS IN ENZYMOLOGY", 104 (7) 154-170

VAITUKATIS J., ROBBINS J. B., NIESCHLAG E. & ROSS G. T. (1971)

A method for producing specific antisera with small doses of immunogen.  
J. Clin. Endocr. 33 : 988-991

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., KOVACIC-MILOJEVIC B., LA POINTE M.C. & REKER C.E. (1985)

in "MOLECULAR MECHANISM OF STEROID HORMONE ACTION".

Eds MOUDGIL V.K., DE GRUYTER W., BERLIN, pp 85-110

VOELLMY R. & RUNGGER D. (1982)

Transcription of a Drosophila heat shock gene is heat-induced in Xenopus oocytes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 1776-1780

WANG C., GOMER K.H. & LAZARIDES E. (1981)

Heat shock proteins are methylated in avian and mammalian cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 3531-3535

WATERMAN M.L., ADLER S., NELSON C., GREENE G.L., EVANS R.M. & ROSENFELD M.G. (1988)

A single domain of the estrogen receptor confers DNA binding and transcriptional activation of the rat prolactin gene.

Mol. Endocrinol. 2 : 14-20

WATSON K. & CAVICCHIOLI R. (1983)

Acquisition of ethanol tolerance in yeast-cells by heat shock

Biotechn. Lett. 5 : 683-688

WEINBERGER C., HOLLENBERG S.M., ROSENFELD M.G. & EVANS R.M. (1985)

Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the v-erb-A oncogene product.

Nature 318 : 670-672

WELCH W.J. & FERAMISCO J.R. (1982)

Purification of the mammalian heat shock proteins.

J. Biol. Chem. 257 : 14949-14959

WELCH W.J. & FERAMISCO J.R. (1984)

Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells.

J. Biol. Chem. 259 : 4501-4513

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 : 1467-1472

- WRANGE O. & GUSTAFSSON J. A. (1978)  
Separation of the hormone- and DNA-binding sites of the hepatic glucocorticoid receptor by means of proteolysis.  
J. Biol. Chem. 253 : 856-865
- 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., RADOJCIC 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. (1986)  
Stoichiometric analysis of the specific interaction of the glucocorticoid receptor with DNA.  
J. Biol. Chem. 261 : 11770-11778
- WRANGE O., ERICKSSON P. & PERLMAN T. (1989)  
The purified activated glucocorticoid receptor is a homodimer.  
J. Biol. Chem. 264 : 5253-5259
- WU C. (1984)  
Two protein binding sites in chromatin implicated in the activation of heat shock genes.  
Nature 309 : 229-234
- YAMAMOTO K. R., GEHRING M. R., STAMPFER C. & SIBLEY H. (1976)  
Genetic approaches to steroid hormone action.  
Recent Prog. Horm. Res. 32 : 3-32
- YANG C. R., MESTER J., WOLFSON A., RENOIR J. M. & BAULIEU E. E. (1982)  
Activation of the chick oviduct progesterone receptor by heparin in the presence or absence of hormone.  
Biochem. J. 208 : 399-406
- YUFU Y., NISHIMURA J., TAKAHIRA H., IDEGUCHI H. & NAWATA H. (1989)  
Down-regulation of a Mr 90,000 heat shock cognate protein during granulocytic differentiation in HL-60 human leukemia cells.  
Cancer Res. 49 : 2405-2408
- ZEUTHEN E. (1971)  
Synchrony in Tetrahymena by heat shocks spaced a normal cell generation appart.  
Exp. Cell. Res. 68 : 49-60

ZIEMIECKI A., CATELLI M. G., JOAB I. & MONTCHARMONT B. (1986)  
Association of the heat shock protein hsp 90 with steroid  
hormone receptors and tyrosine kinase oncogene products.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 238 : 1298-1307

ZIMMERMAN R. & MEYER D. I. (1986)  
A year of new insights into how proteins cross membranes.  
Trends Biochem. Sci 11 : 512-515

TABLE DES MATIERES

<u>CHAPITRE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	7
INTRODUCTION	8
1. CHOC THERMIQUE ET PROTEINES ASSOCIEES	10
1.1. Généralités	10
1.2. Caractérisation de la réponse au choc thermique	10
1.3. Protéines de choc thermique	13
1.4. Régulation de la réponse au choc thermique	16
1.5. Fonctions des protéines de choc thermique	20
1.5.1. Interaction HSP 70 KD - protéines	20
1.5.2. Interaction HSP 90 KD - protéines	24
* Interaction HSP 90 KD - Kinases	24
- tyrosine kinases	
- kinase eIF-2 $\alpha$	
- caséine kinase II	
* Association HSP 90 KD - Actine F	27
* Interaction HSP 90 KD - récepteurs des hormones stéroïdes	29
1.6. Applications biotechnologiques et cliniques du choc thermique	29
2. LE RECEPTEUR DES HORMONES GLUCOCORTICOIDES	30
2.1. Mécanisme d'action	30
2.2. Localisation cellulaire des récepteurs stéroïdiens	31
2.3. Transformation	33
2.3.1. transformation <u>in vitro</u>	33
2.3.2. transformation <u>in vivo</u>	35
2.4. Interaction du récepteur avec les constituants cellulaires	36
2.5. Etude structurale du récepteur	37
2.5.1. Récepteur non transformé	38
- propriétés biochimiques	38
- caractéristiques physicochimiques	38
2.5.2. Récepteur transformé	41
- propriétés biochimiques	41
- caractéristiques physicochimiques	41
2.6. Structure fonctionnelle du polypeptide liant l'hormone	41
2.6.1. Etude biochimique	42
2.6.2. Etude immunologique	43
2.6.3. Etude génétique	44
-1-Domains N-terminaux (A et B)	46
-2-Domaine C	48
-3-Domaine D	50
-4-Domaine E	51

2.7.	Structure quaternaire du récepteur transformé	52
2.7.1.	Preuves de l'existence de l'HSP 90 KD dans la forme 8-10 S des récepteurs stéroïdiens	54
	* Arguments d'ordre immunologique	54
	* Arguments d'ordre biochimique	55
	* Arguments d'ordre génétique	55
2.7.2.	Stoechiométrie de l'association HSP 90 KD - récepteur	56
3.	L'HSP 90 KD : ETUDE DETAILLEE	59
3.1.	Etude génétique de la classe des HSP 90 KD	59
3.2.	Etude comparative des séquences en acides aminés des HSP 90 KD	63
3.3.	Localisation d'une séquence consensus "HSE" (Elément de choc thermique)	65
3.4.	Etude biochimique	66
	3.4.1. Purification	66
	3.4.2. Propriétés biochimiques	69
3.5.	Interaction de l'HSP 90 KD avec les différents domaines du récepteur	71
	- Domaine E	71
	- Domaine C	73
3.6.	Modalités d'interaction HSP 90 KD - Domaine C du récepteur	74
3.7.	Aspects fonctionnels de l'association HSP 90 KD - récepteur stéroïdiens	75
3.8.	Conclusion	80
 <b><u>CHAPITRE II : RESULTATS PERSONNELS</u></b>		81
1.	CHOIX DU PROTOCOLE DE PURIFICATION	82
1.1.	Chromatographie d'affinité	85
1.2.	Application du protocole de NEMOTO <u>et al.</u> , 1987	87
1.3.	Mise en oeuvre d'un protocole utilisant la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)	90
	1.3.1. Apport de l'HPLC	90
	1.3.2. Structure des supports HPLC d'exclusion de taille	92
	1.3.3. Structure des supports HPLC d'échange d'ions (HPIEC)	94
1.4.	Application de la HPIEC à la purification de la protéine 90 KD	97
	1.4.1. Choix de la colonne et des conditions expérimentales	97
	1.4.2. Résultats et discussion	98

1. 5.	Chromatographie d'exclusion de taille (HPSEC)	102
1. 5. 1.	Choix des conditions opératoires	102
1. 5. 2.	Résultats et discussion	102
1. 5. 3.	Caractéristiques immunochimiques de la protéine 90 KD purifiée	104
1. 5. 4.	Amélioration du degré de pureté de la protéine 90 KD	106
1. 6.	Rendement de purification de la protéine 90 KD par le protocole établi	108
2.	CARACTERISATION DE LA PROTEINE 90 KD PURIFIEE	109
2. 1.	Marquage au réactif de BOLTON et HUNTER, 1978	109
2. 2.	Mesure du coefficient de sédimentation	111
2. 3.	Mesure du rayon de Stokes	113
2. 4.	Calcul des paramètres physicochimiques	117
2. 5.	Détermination du point isoélectrique pHi	119
2. 6.	Détermination de la séquence N-terminale de la protéine 90 KD	123
3.	PRODUCTION D'UN IMMUNSERUM ANTI-PROTEINE 90 KD "IS25"	127
	Etude de la spécificité de l'immunsérum produit	128
4.	LOCALISATION DE LA PROTEINE 90 KD DANS LES CELLULES HTC ET L929	132
4. 1.	Etude immunohistochimique	132
4. 2.	Etude de la spécificité du marquage immunochimique	134
5.	LE RECEPTEUR NON TRANSFORME EST ASSOCIE A L'HSP 90 KD	139
6.	VERS UNE APPROCHE DE LA LOCALISATION DE LA SEQUENCE EPITOPIQUE RECONNUE PAR L'ANTICORPS AC 88	140
7.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	143
	<b>CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES</b>	144
1.	Préparation du cytosol de foie	145
2.	Préparation de l'extrait Sulfate de Protamine (SP)	146
3.	Préparation de SPE et de l'éluat	147
4.	Mesure de la liaison hormone-récepteur	147
5.	Dosage des protéines	148
6.	Préparation d'immunadsorbant	152
7.	Chromatographie d'Echange d'Ions à Haute Performance (HPIEC)	154
8.	Chromatographie d'Exclusion de taille à Haute Performance (HPSEC)	156
9.	Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en milieu dénaturant (PAGE/SDS)	159

10. Electroélu­tion	162
11. Concentration des échantillons protéiques	162
12. Production d'immunsérum anti 90 KD (IS 25)	163
13. Marquage à l'iode 125	163
14. Technique d'immunoprécipitation	164
15. Transfert des protéines du gel de polyacrylamide analytique vers une feuille de nitrocellulose (Western Blot)	166
16. Techniques immuno­chimiques	167
17. Technique du Dot-Blot	168
18. Marquage covalent des protéines à l'aide d'un traceur radioactif	168
19. Mesure de la constante de sédimentation (S <sub>20,W</sub> )	169
20. Mesure du rayon de Stokes (R <sub>s</sub> nm)	170
21. Détermination du point isoélectrique	170
22. Etude immunohisto­chimique	171

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

174



## RESUME

Il semble admis maintenant que la transformation ( ou activation ) du complexe hormone glucocorticoïde - récepteur est concomitante d'une conversion de ce dernier d'une forme non transformée, ayant un haut poids moléculaire, à la forme transformée de petit poids moléculaire.

Plusieurs arguments indépendants plaident en faveur d'une structure hétérooligomérique pour le complexe non transformé qui comprend en plus de la sous unité protéique liant l'hormone glucocorticoïde;

- Deux sous-unités protéiques non liantes possédant chacune une masse moléculaire de 90 KD.

- Une molécule d'ARN d'environ 36 KD

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressé à l'étude de la protéine 90 KD non liante libre. Pour ce faire, nous avons mis au point un protocole de purification de cette protéine, rapide et simple. Celui-ci est basé sur l'usage consécutif des Chromatographies Liquides, d'échange d'ion et d'exclusion de taille, sur supports à Haute Performance (HPLC) ; la protéine ainsi purifiée nous a permis :

. La détermination de ses paramètres physicochimiques.

. L'identification d'une partie de sa séquence N-terminale.

. Le développement d'un anticorps polyclonal, que nous avons utilisé en parallèle avec l'anticorps monoclonal(AC 88), fourni par TOFT pour :

. La localisation immunohistochimique intracellulaire de la protéine 90 KD, dans deux lignées cellulaires différentes.

---