

50376  
1989  
259

50376  
1989  
259

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE FLANDRES - ARTOIS

UFR DE BIOLOGIE

Année 1989

Thèse n° 450

THESE

PRESENTEE A L'UNIVERSITE DE LILLE I  
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE  
DOCTEUR EN BIOCHIMIE

PAR

Pierre-Marie DANZE

## LE RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES :

Un facteur de transcription dont l'activité de liaison  
spécifique à l'ADN est régulée par le ligand stéroïdien.



Présentée le 23 Novembre 1989 devant la Commission

JURY : Président : Professeur S. BALL  
Rapporteurs : Professeur J. ANDRE  
: Professeur M. PORCHET  
Examineurs : Professeur M. DAUTREVAUX  
: Docteur P. FORMSTECHE

030 024131 2

Je tiens à présenter mes plus vifs remerciements aux membres du Jury qui ont bien voulu accepter de juger ce travail.

Monsieur le Pr S. Ball. Bien que ce sujet soit fort éloigné de vos centres d'intérêts scientifiques, vous avez accepté de présider ce Jury. Je vous en remercie vivement.

Monsieur le Pr M. Dautrevaux. Vous m'avez accueilli dans le Laboratoire depuis bientôt dix ans. J'espère vous avoir satisfait dans l'accomplissement des tâches hospitalières et universitaires que vous m'avez confié.

Monsieur le Pr J. André. Je vous remercie d'avoir spontanément accepté de participer à ce jury de Thèse.

Monsieur le Pr M. Porchet. Vous avez accepté de juger ce travail, soyez-en remercié.

Pierre Formstecher. Tu as dirigé ce travail et m'as surtout montré un esprit d'analyse qui retire parfois à la recherche son aspect aléatoire.

Je tiens également à présenter mes remerciements aux différents membres du laboratoire qui ont pu contribuer à l'ensemble de ces résultats et particulièrement à Mme Morandi pour la frappe de ce manuscrit.

## RESUME

Les récepteurs stéroïdiens, et plus particulièrement ceux des glucocorticoïdes, se comportent comme des facteurs transcriptionnels en induisant l'expression d'un gène après interaction avec des sites spécifiques d'ADN situés en amont de la zone transcrite.

Pour acquérir une affinité envers l'ADN, les récepteurs subissent une modification conformationnelle appelée transformation. Le rôle de l'hormone, tant au niveau de cette étape qu'au niveau de la liaison à l'ADN et de l'activation de la réponse, reste encore mal compris.

Nous avons cherché à répondre en partie à ces questions par différents moyens d'abord. Ainsi, nous avons mis au point une technique d'échange de stéroïde grâce à l'utilisation de 8 % d'acétonitrile. Ceci nous a permis de montrer qu'une fois transformé, le récepteur présentait une affinité très faible pour l'acétonide de triamcinolone. Des travaux identiques réalisés avec une antihormone, le RU 486, montrent que la transformation du complexe récepteur-RU 486 est normale, puisque celui-ci une fois transformé ne peut plus échanger son stéroïde. Nous voyons donc que d'un point de vue biochimique, le rôle du stéroïde semble limité à l'étape de transformation.

Ces résultats ne sont pas en accord avec les études réalisées *in vivo* qui montrent que la présence du stéroïde est nécessaire, après transformation, à l'expression d'un gène. La Biologie Moléculaire confirme cette hypothèse puisque le complexe RU 486-récepteur peut inhiber de façon compétitive la réponse cellulaire induite par un récepteur à activité constitutive, c'est-à-dire ne dépendant pas du stéroïde.

Nous avons étudié le rôle du stéroïde dans la liaison ADN-récepteur. Pour cela nous avons sélectionné la séquence consensus de reconnaissance du récepteur des glucocorticoïdes (GGTACAATCTGTTCT), puis réalisé des études de l'interaction entre cet oligonucléotide et des cytosols de foie de rat ou de lymphocytes humains par retard sur gel. Nous avons obtenu une bande retardée parfois dédoublée. Nous avons identifié le récepteur des glucocorticoïdes au niveau de cette bande sur plusieurs critères. D'une part l'intensité de la bande retardée varie avec le taux de récepteur transformé présent dans le cytosol puisque la bande retardée (1) est très faible lorsque les préparations cytosoliques sont faites à 4°C (2) augmente fortement lorsque le cytosol est chauffé (25°C, 30 min) avant incubation avec l'ADN (3) est bloquée par la présence dans le milieu de molybdate de sodium (agent inhibant la transformation) ou par le RU 486, antiglucocorticoïde majeur. D'autre part, des cytosols déplétés en récepteur des glucocorticoïdes par chromatographie d'affinité ne donnent pas de bande retardée. Il apparaît donc que le récepteur des glucocorticoïdes se comporte comme un facteur dont l'activité de liaison à l'ADN est régulée par le ligand.

Après corrélation avec une technique de dosage des récepteurs, il semble que la méthode de retard sur gel puisse être utilisée non seulement pour l'étude du site de liaison du récepteur à l'ADN mais aussi comme méthode de dosage fonctionnel du récepteur.

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Biochimie Structurale de Monsieur le Professeur M. DAUTREVAUX, sous la direction du Docteur P. FORMSTECHEP. Il a fait l'objet ou a participé à l'élaboration des publications, communications et posters suivants :

- Sablonniere, B., Danze, P.M., Formstecher, P., Lefebvre, P. and Dautrevaux, M. (1986) Physical characterization of the activated and non activated forms of the glucocorticoid receptor bound to the antagonist RU 486. *J. Steroid Biochem.* 25(5) : 605-614.
- Lefebvre, P., Danze, P.M., Sablonniere, B., Richard, C., Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1988) The association of the glucocorticoid receptor binding subunit with the 90K non steroid binding component is stabilized by both steroidal and non steroidal antiglucocorticoids in intact cells. *Biochemistry*, 27 : 9186-9194.
- Blicq, S., Danze, P.M., Dumur, V., Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1988) Inhibition of glucocorticoid receptor transformation, subunit dissociation and temperature dependent inactivation by various N-substituted alkylmaleimides. *Biochemistry*, 27 : 8436-8442.
- Danze, P.M., Richard, C., Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1989) Steroid exchange assay in the presence of acetonitrile. Application to the study of glucocorticoid and antiglucocorticoid receptor complexes. *Steroids* (in press).
- Danze, P.M., Storme, L., Dumur, V., Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1989) Steroid and temperature dependant band shift of a <sup>32</sup>P-labelled synthetic GRE consensus oligonucleotide in the presence of human leukocyte cytosol. Application to glucocorticoid receptor assay, 9th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry, Las Palmas, Canary Islands, Spain.
- Danze, P.M., Storme, L., Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1989) Détection des récepteurs des stéroïdes par retard sur gel. Application au dosage du récepteur des glucocorticoides.

7èmes Journées lilloises de Biologie Clinique, Le Touquet.

## A - INTRODUCTION

Un des problèmes les plus intéressants de la biologie actuelle est la compréhension de la régulation de l'expression des gènes par les facteurs nucléaires. Les récepteurs hormonaux représentent un modèle particulièrement important et ceci à double titre. D'une part, ces facteurs nucléaires (récepteurs stéroïdiens par exemple) intervenant dans la régulation des gènes, sont maintenant bien connus du point de vue de leur fonctionnement et de leur structure ; l'étude de leur interaction avec le génome peut donc être très complète. D'autre part, l'expression de ces facteurs est elle-même dépendante de la présence du stéroïde.

A partir d'un tel modèle, il est donc possible de comprendre le mécanisme de transmission du message hormonal allant de l'arrivée de l'hormone à la réponse cellulaire.

La transcription d'un gène nécessite l'intervention d'un enzyme, la RNA-polymérase (RNA polymérase II chez les eucaryotes) qui se fixe sur une séquence d'ADN située en amont du gène, appelée site promoteur (figure 1). Ce site est généralement composé de séquences particulières appelées "TATA box" et "CAAT box" situées respectivement à -30 et -40/-110 paires de bases (bp) du site d'initiation de la transcription appelée "CAP-site" et considéré comme le point de référence du gène (valeur 0).

Cependant, la réponse à une stimulation hormonale peut varier d'un tissu à un autre. Ainsi le gène de la vitellogénine est exprimé au niveau du foie de poulet mais pas au niveau de l'oviducte qui

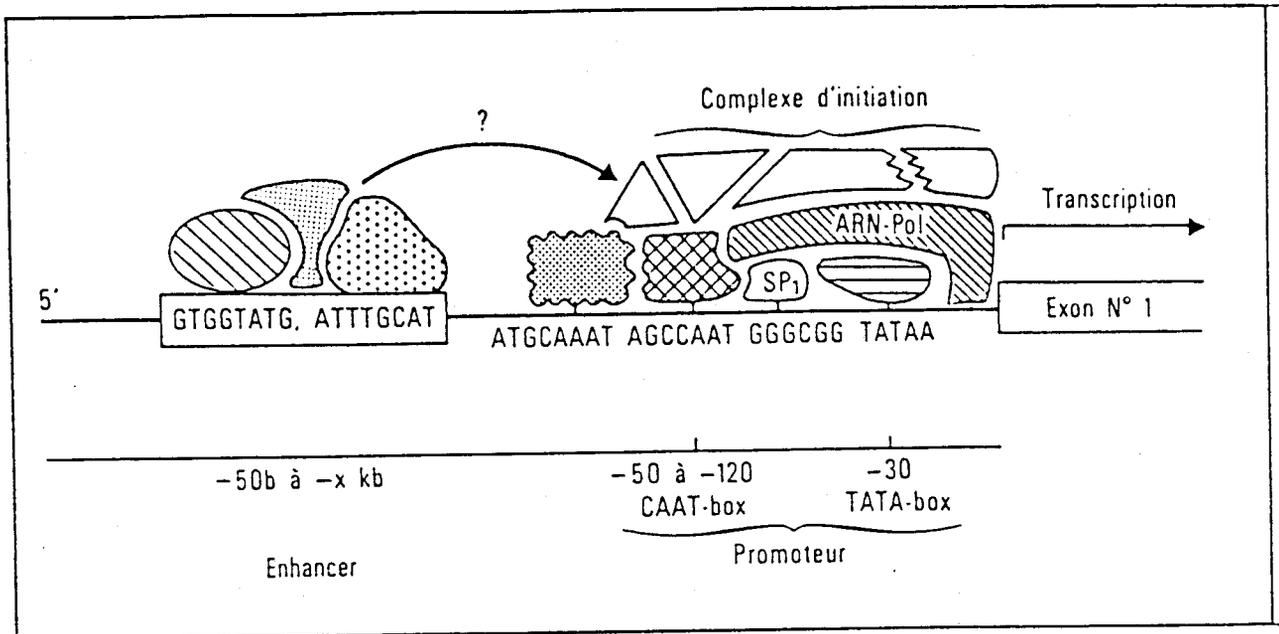


Figure 1 - Complexe d'initiation de la transcription et complexe enhancer.

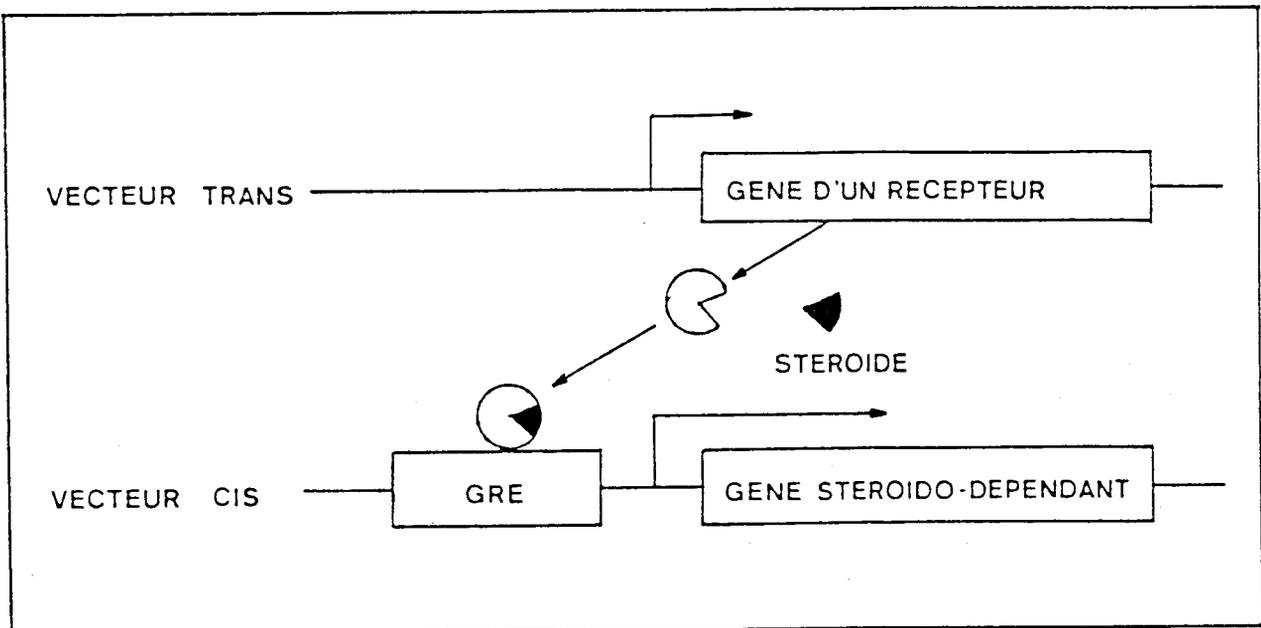


Figure 2 - Elements de régulation en cis et en trans

contient pourtant le même matériel génétique (Burd et Weinstraub, 1983). De même, l'expression d'un gène peut varier avec le développement de l'organisme (Ben-Or, 1983). Cette modulation de l'expression des gènes semble être le fait de la structure du noyau et particulièrement de la présence de séquences d'ADN situées en amont du gène appelées "cis-acting elements". Ces séquences correspondent en fait à des zones de fixation de protéines nucléaires synthétisées par d'autres gènes appelés gènes régulateurs (figure 2). Ces protéines se fixent au niveau de séquences précises d'ADN et activent ou inhibent l'expression du gène. Cette transrégulation est le fait de nombreuses protéines nucléaires, parmi lesquelles se trouvent les récepteurs stéroïdiens. Leur mécanisme d'action n'est pas actuellement bien défini et a fait l'objet de plusieurs revues récentes (Ptashne, 1986 ; Dynan, 1989 ; Mitchell et Tjian, 1989).

L'évolution très rapide des connaissances sur le rôle des récepteurs dans la régulation de l'expression des gènes tient essentiellement au fait que ces récepteurs ont été étudiés depuis longtemps en tant que site de fixation pour les stéroïdes. Ils présentent un mode d'action commun, connu depuis longtemps, et qui comporte les étapes suivantes (figure 3a) :

- (1) fixation du stéroïde au récepteur,
- (2) modification conformationnelle du complexe hormone-récepteur (étape appelée transformation),
- (3) liaison du complexe transformé au(x) site(s) régulateur(s) et

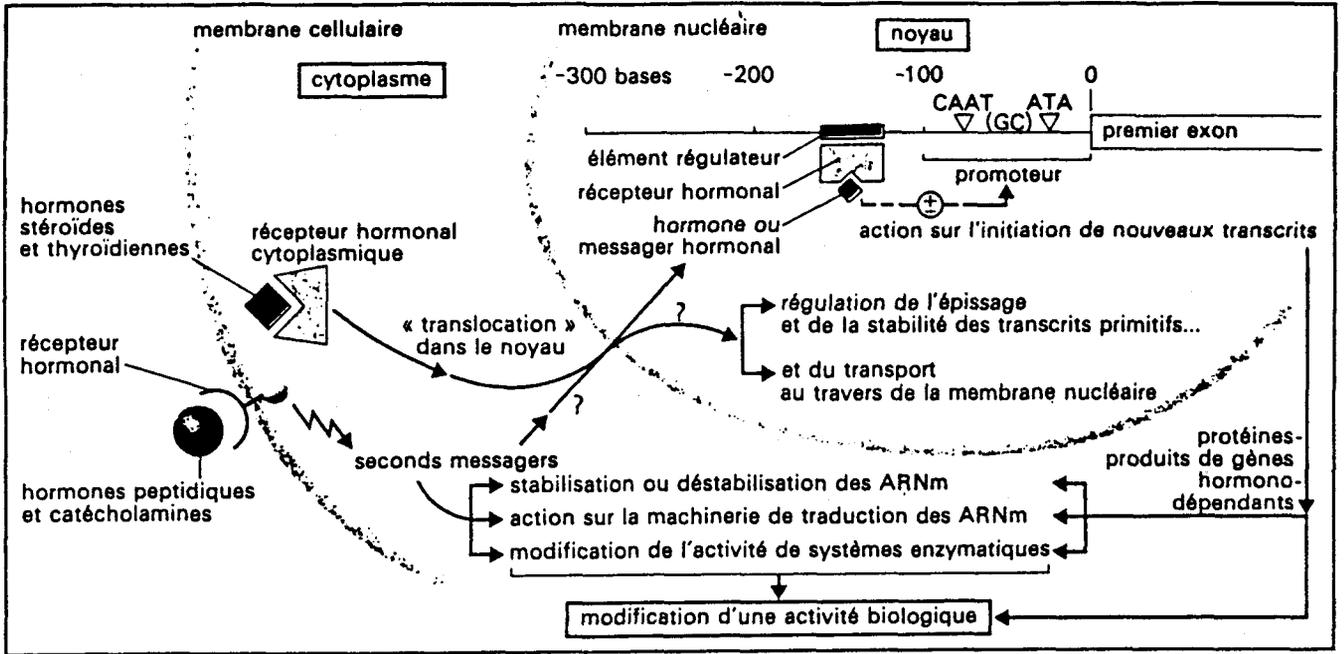


Figure 3a - Mécanisme d'action des hormones stéroïdes

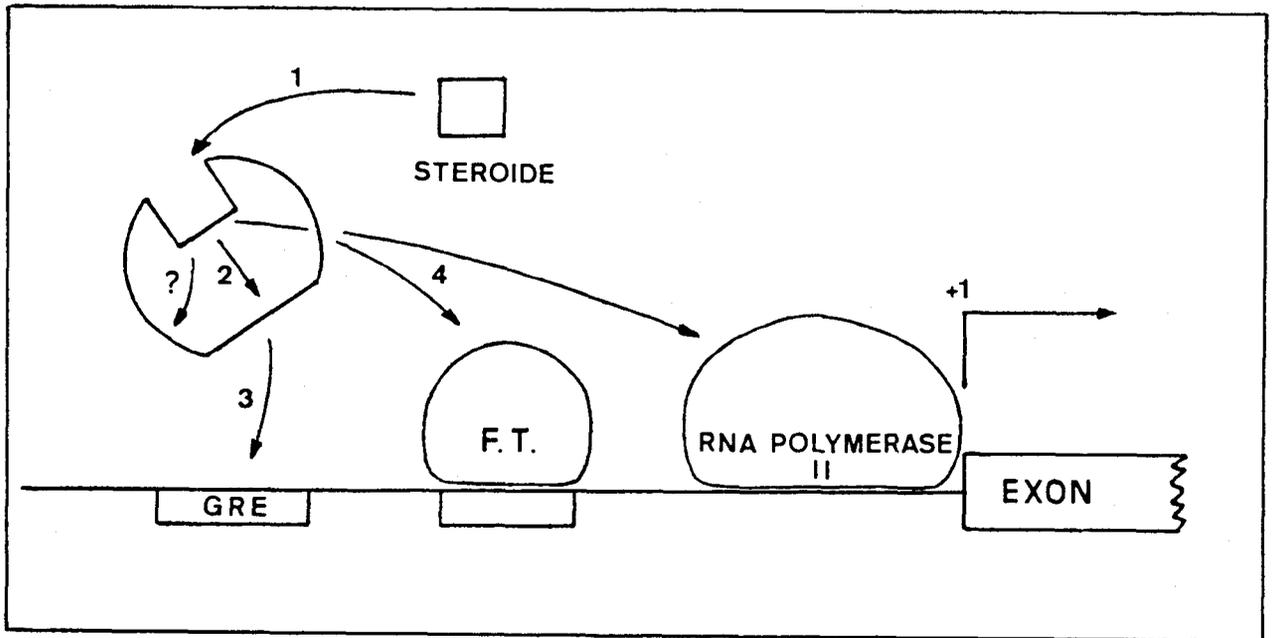


Figure 3b : Niveau d'action du stéroïde sur le récepteur

(4) action sur l'initiation de nouveaux transcrits.

Par ce mécanisme, les glucocorticoides interviennent dans l'homéostasie des organismes eucaryotes en contrôlant :

- les métabolismes de la plupart des tissus (Thompson et Lippman, 1974 ; Munck et Leung, 1976). Cette action plutôt anabolique au niveau du foie, est essentiellement catabolique pour les autres organes.

- les processus inflammatoires. On constate un effet antipyrétique direct au niveau de l'hypothalamus, une inhibition de la synthèse des prostaglandines et leucotriène (Davidson *et al.*, 1987) et une transcription du gène de l'interleukine 1 (Lee *et al.*, 1988).

- les processus immunitaires. Il existe des effets doubles faisant intervenir un mécanisme immunodépresseur peut être par l'intermédiaire du système endocrinien (Munck *et al.*, 1984) et un mécanisme cytosolique lié à l'activation d'endonucléases préformées (Alnemri et Litwack, 1989) plutôt qu'à l'induction de nouvelles nucléases comme cela a été proposé par Compton et Cidlowski (1986 ; 1987).

Comme nous le voyons, les effets sont multiples, relativement complexes et imbriqués les uns dans les autres. Les mécanismes de maturation cellulaire pourraient aussi être liés aux glucocorticoides. Ainsi, dans la maladie des membranes hyalines observée chez les nouveaux-nés immatures, le nombre de sites liant les

glucocorticoides est plus faible que chez le sujet normal (Kerepesi et Aranyi, 1985). De même, des modifications de taux et de structure du récepteur pourraient accompagner le développement de la rétine neurale embryonnaire de poulet (Ben-Or, 1983). Cependant, les arguments permettant de bien déterminer le rôle des glucocorticoides et de leur récepteur dans ces mécanismes de différenciation restent très fragmentaires.

Un aspect particulièrement intéressant de ce sujet est la compréhension du rôle du stéroïde dans cette modulation de l'expression des gènes par les récepteurs (figure 3b). *In vivo*, on constate que la présence de l'hormone est nécessaire à l'expression d'un gène (Becker et al., 1986), alors qu'*in vitro*, il semble possible d'obtenir une réponse même en absence d'hormone (Willman et Beato, 1986). Ainsi, la formation du complexe hormone-stéroïde (figure 3b, étape 1) peut être le facteur déclenchant et nécessaire

- soit au bon déroulement de toutes les étapes (étapes 2, 3, et 4).
- soit seulement à la transformation et à la transcription du gène (étapes 3, 4).
- soit exclusivement nécessaire à la dernière étape.

L'étude structurale du récepteur et celle du rôle du stéroïde sur le devenir de la protéine peut nous renseigner sur ces questions. Nous aborderons ce sujet dans la première partie de notre revue bibliographique. Dans une deuxième partie, nous chercherons à montrer comment l'interaction entre le récepteur et son site ADN spécifique peut aboutir à l'expression d'un gène.



B - LE RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES,  
LA PROTEINE ET SA TRANSFORMATION.

1 - LOCALISATION DES RECEPTEURS

Les récepteurs stéroïdiens, et particulièrement le récepteur des glucocorticoides présentent au cours de leur action différents stades fonctionnels. Ceci correspond à trois états conformationnels du récepteur

- (1) le récepteur ne pouvant lier l'hormone (non activé ),
- (2) le récepteur liant l'hormone mais sans affinité majeure pour l'ADN encore appelé récepteur activé,
- (3) le récepteur transformé, liant l'ADN (Grody *et al.*, 1982 ; Wayne *et al.*, 1982).

Il est resté admis pendant longtemps que ces étapes étaient concomitantes de modification de la localisation cellulaire du récepteur, les formes non transformées étant cytoplasmiques, la forme transformée étant nucléaire (Middlebrook *et al.*, 1975).

Ce modèle est actuellement rejeté pour les récepteurs des oestrogènes et de la progestérone dont la localisation semble être nucléaire, même avant la liaison à l'hormone (Perrot-Appianat *et al.*, 1986 ; Gasc *et al.*, 1984). Le doute subsiste pour le récepteur des glucocorticoides car les résultats semblent discordants suivant l'origine des cellules testées (Welshons *et al.*, 1984 ; Lukola *et al.*, 1985). Cependant, les techniques de dosage du récepteur pour le stéroïde (Rousseau *et al.*, 1973) comme les méthodes d'immunofluorescence (Antakly

et Eisen, 1984 ; Fuxe *et al.*, 1985) restent en faveur d'un récepteur libre cytoplasmique.

Picard et Yamamoto (1987) développent d'autres arguments en faveur d'une translocation nucléaire hormonodépendante. En effet, le récepteur possède deux séquences NL1 et NL2 intervenant dans la localisation nucléaire de la molécule. La séquence NL1 présente un enchaînement de résidus basiques dont la structure secondaire correspond probablement à une hélice  $\alpha$ .

Ce type de séquence a été décrit pour d'autres séquences de translocation nucléaire, comme celle de l'antigène SV40 (Kalderon *et al.*, 1984a, b). La séquence NL2, non séparable de la région du récepteur liant le stéroïde semble cependant présenter le rôle prépondérant dans cette action. Picard et Yamamoto proposent l'hypothèse d'un dévoilement de ces séquences lors de la liaison hormone-récepteur, permettant ainsi le transfert nucléaire.

L'abondance des résultats contradictoires ne permet pas de trancher la question. Cependant, il semble bien que la répartition cellulaire des récepteurs des glucocorticoides soit différente de celle des autres récepteurs de la même famille (progestérone, oestrogène, androgène, hormone thyroïdienne et acide rétinoïque).

## 2 - ABORD BIOCHIMIQUE DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES

### a - Le récepteur, complexe transformable

Le récepteur des glucocorticoides non transformé est un complexe hétéropolymérique (Holbrook *et al.*, 1983 ; Raaka *et al.*, 1983, 1985 ; La Pointe *et al.*, 1986 ; Lefebvre *et al.*, 1988a), présentant un haut poids moléculaire d'environ 300 Kda (Vedeckis, 1983).

Plusieurs types de molécules interviennent dans ce complexe :

- la protéine HSP 90

Son association avec le récepteur est certaine *in vitro* (Lefebvre *et al.*, 1988a) et probable *in vivo* (Pratt *et al.*, 1988 ; Howard et Distelhorst, 1988 ; Denis et Gustafsson, 1989), deux molécules HSP 90 liant une molécule de récepteur (Denis *et al.*, 1987 ; Mendel et Okret, 1988).

Plusieurs hypothèses ont été émises quant au rôle de cette molécule associée. Pour certains, elle stabiliserait le récepteur (Howard et Distelhorst, 1988), pour d'autres, elle jouerait un rôle de transport intracellulaire (Koyasu *et al.*, 1986) et pour d'autres enfin la liaison HSP 90-récepteur masquerait le site de liaison à l'ADN (Danielson *et al.*, 1986 ; Pratt, 1987 ; Pratt *et al.*, 1988).

- des acides ribonucléiques

Leur association avec le récepteur des glucocorticoides a été retrouvée *in vitro* (Sablonnière *et al.*, 1988) et *in vivo* (Economidis et Rousseau, 1985) mais leur rôle dans la formation du complexe hétéropolymérique non transformé reste flou.

- autres facteurs

Le récepteur non transformé est une phosphoprotéine (Mendel *et al.*, 1987 ; Tienrungroj *et al.*, 1987) et la phosphorylation n'intéresse que des résidus de sérine (Dalman *et al.*, 1988).

La phosphorylation est un mécanisme important pour les molécules interagissant avec l'ADN. Une déphosphorylation peut augmenter l'affinité entre les deux molécules. Une phosphorylation peut inhiber la liaison mais peut aussi favoriser la formation de dimères, ce qui est

fréquemment observé pour les facteurs nucléaires (Yamamoto *et al.*, 1988).

Pour Mendel *et al.* (1987) ainsi que pour Tienrungrroj *et al.* (1987), la transformation ne s'accompagne pas de changements de la phosphorylation du récepteur. Par contre, Orti *et al.* (1989) montrent que les récepteurs des cellules WEHI-7 présentent une augmentation du nombre de résidus de phosphate lors de la transformation et que celle-ci n'existe pas si l'hormone est le RU 486, un antigluco corticoïde puissant.

Une activité kinasique est démontrée pour le récepteur de l'oestradiol dans les cellules MCF-7 (Baldi *et al.*, 1986). De plus, les récepteurs de la progestérone et de l'oestradiol présentent des séquences consensus caractéristiques de sites de liaison de l'ATP (Baker *et al.*, 1986 ; Birnbaumer *et al.*, 1987) . Le récepteur lié au site ADN spécifique pourrait ainsi favoriser le départ des histones en les phosphorylant. Cette activité également supposée pour le récepteur des glucocorticoides (Kurl *et al.*, 1984 ; Singh *et al.*, 1984 ; Miller-Diener *et al.* , 1985) serait en fait liée à une kinase copurifiée avec le récepteur (Sanchez *et al.*, 1986).

Il est possible qu'une phosphorylation affecte la capacité du récepteur transformé de se lier à des sites ADN spécifiques. Aucun enzyme nucléaire n'a pu être identifié mais Wei *et al.* (1987) observent une polyphosphorylation du récepteur de la progestérone quand il est lié aux structures nucléaires. Une telle hypothèse pourrait être envisagée pour le récepteur des glucocorticoides, l'hyperphosphorylation

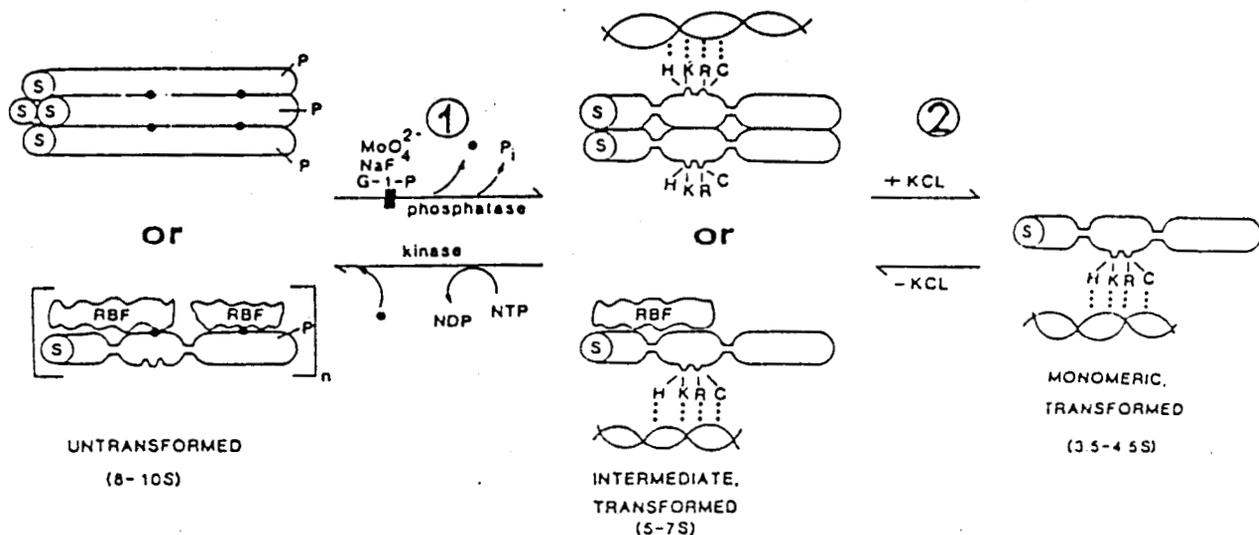


Figure 4 - Schéma hypothétique du mécanisme de la transformation suivant Vedeckis *et al.* (1985)

- . Deux arrangements du complexe hormone-récepteur non transformé sont présentés (homomérique et hétéromérique)
- . L'étape 1 réversible aboutit à un récepteur transformé intermédiaire ne liant pas le DNA.
- . L'étape 2 favorisée par la force ionique, aboutit à un monomère présentant une affinité pour le DNA.

Abréviations : H : Histidine ; R : Arginine ;  
 C : Cystéine ; S : Stéroïde ; NTP-NDP : nucléoside tri- ou diphosphate ; RBF: facteur de petit poids moléculaire.

déstabilisant le complexe ADN-récepteur et étant ainsi impliquée dans le recyclage du récepteur dans la cellule (Dalman *et al.*, 1988).

b - Le récepteur transformé

La transformation est la modification conformationnelle du récepteur qui lui confère une affinité envers l'ADN. Le sujet a été abondamment traité et a fait l'objet de nombreuses revues bibliographiques (Milgrom, 1981 ; Grody *et al.*, 1982 ; Schmidt et Litwack, 1982 ; Danzé, 1983, 1987).

Cette étape s'accompagne d'un changement de taille de la molécule qui, en chromatographie de gel-filtration, montre un rayon de Stokes de 4 nm et en ultracentrifugation en gradient de sucrose, un coefficient de sédimentation de 4S (Vedeckis, 1983 ; Luttge *et al.*, 1984). Une augmentation du point isoélectrique est aussi observée (Ben-Or et Chambrach, 1983 ; Danzé *et al.*, 1987). Cette variation pourrait être le fait de la dissociation récepteur-HSP 90 et/ou être liée à une modification conformationnelle réelle du récepteur.

Le mécanisme de la transformation est probablement une dissociation du complexe hétéropolymérique en un monomère. Plusieurs modèles illustrent cette hypothèse (pour revue voir Formstecher, 1986). Le modèle de Vedeckis (figure 4) est particulièrement intéressant car il décrit une forme intermédiaire pouvant correspondre à un dimère de récepteur liant l'ADN. Cette notion est à rapprocher des résultats de Biologie Moléculaire qui décrivent une telle interaction (voir paragraphe c3.e). De tels dimères de récepteurs ont été décrits en l'absence de liaison à l'ADN pour le récepteur des oestrogènes (Sabbah *et al.*, 1989).

Une fois transformé, il ne semble pas que le récepteur puisse directement revenir à son état non transformé (Chou et Luttge, 1988 ; Danzé *et al.*, 1989).

### 3 - LE RECEPTEUR ET SON STEROIDE

Il semble de première importance de connaître le rôle du stéroïde dans la transformation du récepteur et donc dans la liaison du récepteur à l'ADN. *In vivo*, le stéroïde intervient comme un ligand nécessaire au fonctionnement du récepteur (Becker *et al.*, 1986). *In vitro*, il semble qu'on puisse obtenir une liaison à l'ADN même en l'absence d'hormone (Willmann et Beato, 1986).

#### a - Le rôle du stéroïde dans la transformation

##### - Transformation des récepteurs non incubés

Classiquement, le stéroïde joue un rôle fondamental dans la transformation, puisqu'en l'absence d'hormone, on n'observe pas de liaison des récepteurs au noyau. Pour le récepteur de la progestérone, plusieurs auteurs ont rapporté l'existence d'une transformation en l'absence de stéroïde (Yang *et al.*, 1982 ; Moudgil *et al.*, 1981 ; Jensen et Desombre, 1973). En fait, aucune étude précise ne permet de trancher définitivement cette question.

L'hypothèse d'une transformation sans hormone n'est toutefois pas improbable puisque des récepteurs délétés dans le domaine liant le stéroïde possèdent une activité transcriptionnelle constitutive. L'ensemble des travaux du groupe de Pratt s'oriente vers cette hypothèse où le stéroïde semble intervenir uniquement comme un élément dissociant un récepteur non transformé hétéropolymérique. Cependant, ces résultats sont obtenus sur des expériences réalisées en milieu acellulaire.

- Transformation du complexe antihormone-récepteur

L'étude de la transformation des récepteurs a fortement bénéficié de la mise au point de stéroïdes ayant une affinité pour le récepteur, mais ne provoquant pas de réponse cellulaire : les antihormones. Il semble exister une relation entre la structure chimique du stéroïde et son activité antigluco-corticoïde (pour revue, voir Formstecher, 1986). L'absence de groupement hydroxyl en 11 $\beta$  ou son remplacement par un dérivé de taille volumineuse (cas du RU486) ou la modification de la chaîne latérale en 17 $\beta$  de la dexaméthasone ou du cortisol (cas du mésylate de dexaméthasone confère au stéroïde une action antihormonale.

Contrairement à ce qui a été proposé initialement (Bell et Jones, 1982 ; Raynaud *et al.*, 1975, 1980), l'instabilité des complexes non transformés n'est pas un critère pour une activité antihormonale. En effet, le RU 486 forme avec le récepteur un complexe stable qui possède un  $K_D$  de l'ordre de celui de la dexaméthasone (Golaz et Beck, 1984 ; Gagne *et al.*, 1985). D'autres observations comme l'instabilité des complexes à l'élévation de la température (Toth et Aranyi, 1983 ; Eliard et Rousseau, 1984 ; Bell et Weatherhill, 1986) caractérisent l'action antihormonale, mais ne peuvent expliquer totalement l'inhibition de la réponse.

La caractérisation principale de l'interaction antihormone-récepteur semble être pour les antigluco-corticoïdes, un ralentissement important de la transformation des complexes préformés (Moguilewsky et Philibert, 1984 ; Bourgeois *et al.*, 1984 ; Sablonnière *et al.* 1986 ; Rajpert *et al.*, 1987).

Tous les travaux réalisés dans notre laboratoire sur l'action du RU 486 mais aussi d'autres antihormones ont démontré cette action tant *in vitro* que dans des conditions sub-physiologiques (Lefebvre *et al.*, 1988b ; Sablonnière *et al.*, 1987).

*In vitro*, le complexe RU 486-récepteur transformé semble présenter des caractéristiques physico-chimiques analogues aux complexes agoniste-récepteur (Sablonnière *et al.*, 1986 ; Danzé, 1987). Quelques anomalies qualitatives de la transformation ont été observées sur des cultures cellulaires (Jung-Testas et Baulieu, 1983) ou par compétition entre un ADN spécifique et de la DNA-cellulose (Bourgeois *et al.*, 1984 ; Simons et Miller, 1984). Il est difficile d'affirmer l'importance de ces observations puisque le complexe transformé antagoniste-récepteur présente envers de l'ADN spécifique (LTR de MMTV), la même affinité que les complexes agoniste-récepteur (Miller *et al.*, 1984).

Récemment, Webster *et al.* (1988) abordent le problème sous un autre angle. Profitant de l'organisation structurale des récepteurs stéroïdiens en domaine (voir paragraphe 4), ils créent un récepteur mutant en gardant le domaine de liaison au stéroïde, et en remplaçant le domaine de liaison à l'ADN par celui d'un facteur de transcription GAL4. Ils obtiennent ainsi une transcription stéroïdo-dépendante du gène modulé par GAL4. Dans ce modèle, seul l'agoniste induit la réponse. Ces résultats laissent supposer que le récepteur transformé lié à un agoniste est différent de celui lié à un antagoniste.

Ainsi, à côté du faible taux de transformation du récepteur, pourraient venir se greffer des différences plus subtiles inhibant la transcription après la fixation du récepteur à l'ADN comme celle émise

par Guiochon-Mantel *et al.* (1988). Ces auteurs insèrent dans des cellules COS-7 le récepteur de la progestérone de lapin et le même récepteur mutant délété de son site de liaison au stéroïde. Ce récepteur stimule la transcription de gènes stéroïdo-dépendants même en absence d'hormone. En présence de RU 486, ces cellules n'expriment plus le gène progestérone-dépendant. Le récepteur sauvage lié au RU 486 peut donc lier l'ADN et entre en compétition avec le récepteur mutant. Ainsi, l'activité antihormonale pourrait se dérouler après la liaison récepteur-ADN.

Il est aussi possible que d'autres mécanismes puissent intervenir dans l'action antihormonale. Cela est démontré pour d'autres récepteurs comme celui des oestrogènes. Le Tamoxifène lié au récepteur des oestrogènes présente une action antioestrogénique par trois mécanismes. Il induit des changements de conformation du récepteur au niveau du site de liaison à l'hormone (Rochefort *et al.*, 1983), la liaison récepteur-ADN est modifiée et enfin la structure même du récepteur change (Borgna *et al.*, 1984).

L'action antihormonale ne repose donc pas sur un mécanisme unique, mais dans le cas des glucocorticoides, elle semble essentiellement être liée à un ralentissement de la transformation.

#### b - Liaison du stéroïde au récepteur transformé

Le récepteur transformé présente des caractéristiques de liaison au stéroïde différentes de celles observées chez le récepteur non transformé. Le récepteur non transformé peut échanger son stéroïde. Cette constatation a été mise à profit pour réaliser des dosages des récepteurs par échange du stéroïde endogène avec un stéroïde de synthèse

marqué (Rosner et Polimeni, 1978 ; Barneji et Kalimi, 1981 ; Kalimi et al., 1983; Hubbard et al., 1984) et pour la purification du récepteur par chromatographie d'affinité (Idziorek et al., 1985).

Peu d'études ont été réalisées sur le récepteur transformé car la caractérisation de la liaison récepteur transformé-stéroïde ne peut être obtenue qu'après purification. Pour Chou et Luttgé (1988), le récepteur transformé ne lie plus le stéroïde.

#### 4 - STRUCTURE DU RECEPTEUR SOUS FORME MONOMERIQUE

La caractéristique la plus marquante des récepteurs stéroïdiens est leur organisation en domaines distincts. Les techniques de protéolyse limitée, réalisées sur des récepteurs mutants de cellules lymphomateuses ont mis en évidence l'existence des trois domaines suivants dans le récepteur des glucocorticoides (Carlstedt-Duke et al., 1982 ; Reichman et al., 1984 ; Gehring, 1984) (Figure 5)

- domaine immunogène N-terminal de 50 KDa
- domaine liant l'ADN de 15 KDa
- domaine liant le stéroïde C-terminal de 25 KDa.

Le clonage des gènes codant pour les différents récepteurs stéroïdiens des mammifères a été le point de départ d'une étude très précise de la fonction de chacun de ces domaines. Tous ces récepteurs ont une organisation analogue et forment avec le récepteur thyroïdien (Weinberger et al., 1986) et celui de l'acide rétinolique (Giguère et al., 1987), une famille homogène de protéines régulatrices (Figure 5). Une certaine individualité fonctionnelle existe au sein de chacun des domaines. Ainsi, il est possible de stimuler un gène corticodépendant

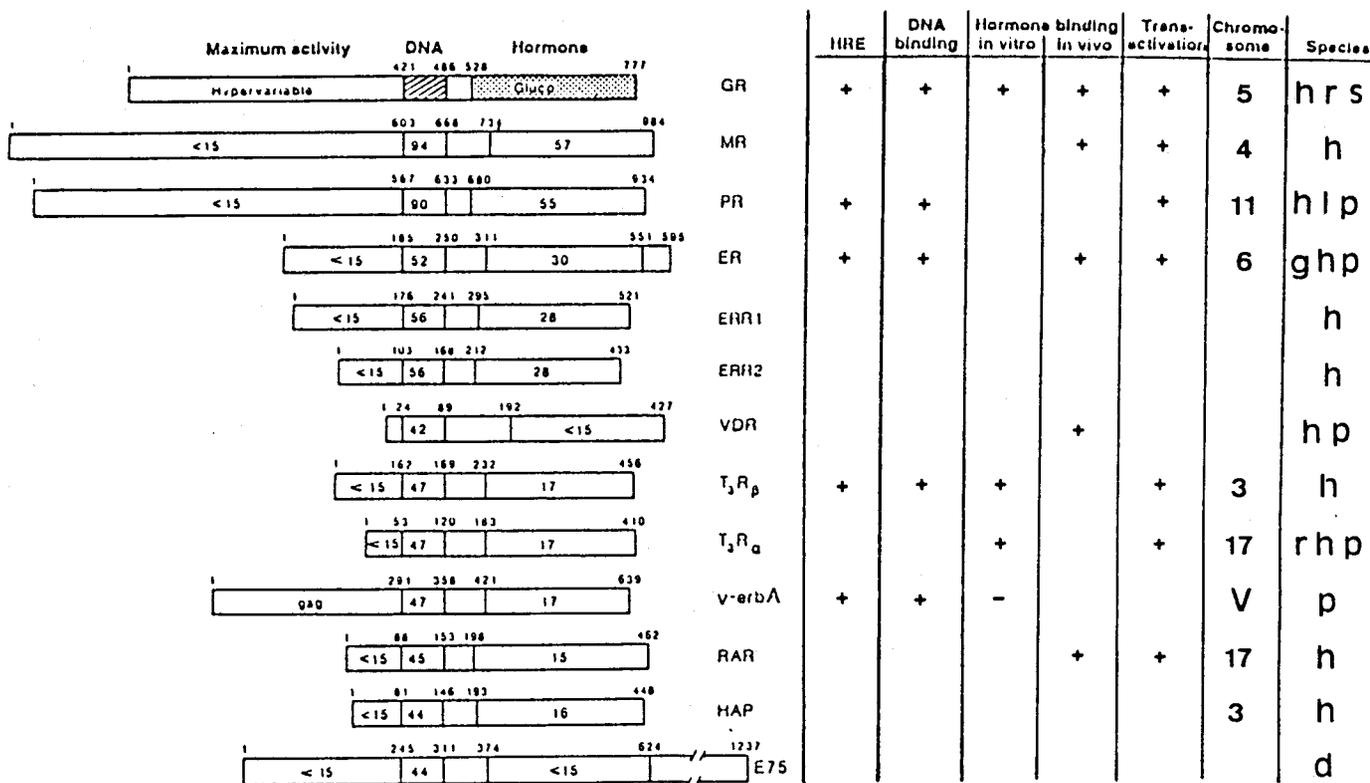


Figure 5 - Homologies de séquence et d'organisation entre les récepteurs des stéroïdes et apparentés.

Les différentes abréviations correspondent aux récepteurs suivants :  
 GR : glucocorticoïdes ; MR : minéralocorticoïdes ; PR : progestérone ;  
 ER, ERR<sub>1</sub> et ERR<sub>2</sub> : oestrogène et apparenté des oestrogènes ; VDR : Vitamine D<sub>3</sub>  
 T<sub>3</sub>R ET T<sub>3</sub>R : thyroïdien ; RAR : rétinoïque

Différentes caractéristiques ont été mises en évidence pour chacun d'entre eux. Celles-ci sont récapitulées dans le tableau correspondant à la mise en évidence :

- d'un site ADN de fixation (HRE)
- du site de liaison sur l'ADN pour la protéine (DNA-binding)
- du site de liaison à l'hormone (hormone-binding)
- du domaine de transactivation (transactivation)
- de la localisation du chromosome (chromosome)

Ces récepteurs ont été décrits chez l'homme (h), le rat (r), le poulet (p), la grenouille (g), la souris (s) ou la drosophile.

par les oestrogènes en remplaçant le domaine de liaison au récepteur des glucocorticoides par celui des oestrogènes (Green et Chambon, 1987).

Schématiquement, on peut opposer les domaines caractérisant la protéine elle-même (domaine A/B immunogène et domaine D, région charnière) et ceux liés à l'activité de la protéine (domaine C liant l'ADN, domaine E liant le stéroïde). Concernant les premiers domaines, les homologies de séquence entre les différents récepteurs sont faibles. De plus, leur rôle est peu connu. L'absence du domaine immunogène semble diminuer l'activité transcriptionnelle induite par le récepteur des glucocorticoides (Miesfield *et al.*, 1986 ; Giguère *et al.*, 1986). Elle tend aussi à augmenter l'activité inhibitrice de la protéine (Oro *et al.*, 1988a).

Le domaine A/B pourrait donc être impliqué dans la modulation de la réponse transcriptionnelle. Cette hypothèse est d'autant plus probable que la régulation négative décrite par Oro s'exerce par l'intermédiaire d'une séquence GRE (voir plus loin) analogue à celle impliquée dans les mécanismes de transactivation (Akerblom *et al.*, 1988). Dans le cas des récepteurs des oestrogènes, ce domaine A/B pourrait intervenir dans la force de liaison du récepteur à l'ADN en interagissant avec d'autres protéines nucléaires (Kumar et Chambon, 1988).

La fonction de la région D reste encore plus obscure. Elle possède une situation charnière entre les deux domaines de liaison. Sa délétion semble abolir toute action stimulatrice ou inhibitrice du récepteur (Hollenberg *et al.*, 1987 ; Oro *et al.*, 1988a). Etant donné

cette situation, ce domaine pourrait être impliqué dans le mécanisme de transformation.

a - Le domaine de liaison au stéroïde

Plusieurs homologies de séquences ont été constatées entre les récepteurs stéroïdiens puisqu'il existe de 30 à 92 % de conservation de ce domaine suivant le stéroïde intéressé (Figure 5). Il existe aussi une parenté non négligeable avec les domaines liant l'hormone des récepteurs des hormones thyroïdiennes et celui de l'acide rétinolique.

L'étude de ce domaine a fortement bénéficié de la création de récepteurs mutants, mais aussi des techniques de marquage par le stéroïde (photoaffinité ou marquage au mésylate de dexaméthasone). Un récepteur délété de son domaine E possède une activité transcriptionnelle indépendante de toute stimulation hormonale (Miesfeld *et al.*, 1987 ; Hollenberg *et al.*, 1987 pour les glucocorticoides, Waterman *et al.*, 1988 pour les oestrogènes). D'autres mutations ont permis l'identification d'une séquence de 20 aminoacides fortement conservée pour tous les récepteurs stéroïdiens (homologie supérieure à 50 %). Cette séquence pourrait être impliquée dans l'interaction avec d'autres composants du récepteur quand celui-ci est à l'état non transformé (Danielsen *et al.*, 1986 ; Pratt *et al.*, 1988). Ce composant pourrait être la protéine de choc thermique HSP 90 KDa dont la liaison au récepteur pourrait être nécessaire à l'activité de la liaison du stéroïde par le récepteur. Une fois dissocié, le monomère perdrait son activité liante (Bresnick *et al.*, 1989).

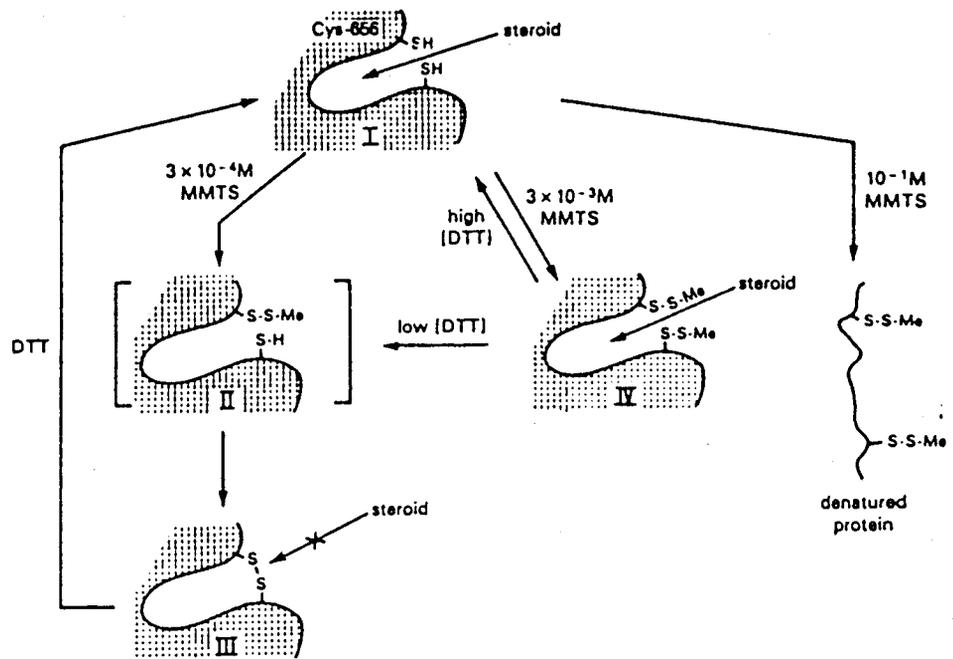


Figure 6 - Action hypothétique du MMTS et du DTT sur les groupements SH du site de liaison au stéroïde du récepteur des glucocorticoïdes suivant Miller et Simons (1988)

Certains acides aminés, comme l'acide glutamique 546 sont indispensables à la liaison du stéroïde. L'importance des réducteurs dans les tampons de préparation des cytosols a montré depuis longtemps l'existence de cystéines impliquées dans la liaison au stéroïde. Simons *et al.*, (1987) puis Carlstedt-Duke *et al.*, (1988) localisent ces cystéines au niveau du domaine E (position 656 et 754). Pour Miller et Simons (1988), deux cystéines pourraient se trouver à l'entrée de la cavité, le stéroïde ne pouvant entrer dans le site que si les cystéines sont à l'état réduit (Figure 6). D'autres acides aminés comme la méthionine 622 (Carlstedt-Duke *et al.*, 1988) semblent aussi avoir des rôles déterminants dans cette interaction.

La région E pourrait être également impliquée dans les mécanismes de transduction au noyau (Picard et Yamamoto, 1987), dans des fonctions de répression de la liaison avec l'ADN spécifique et dans l'activité de régulation transcriptionnelle (Picard *et al.*, 1988).

#### b - Le domaine de liaison à l'ADN (domaine C)

Le domaine C du récepteur est une région particulièrement intéressante car elle correspond à la région liant l'ADN, élément clef de la régulation. Tout comme son site de liaison au niveau de l'ADN, (voir Chapitre C) cette région est fortement conservée dans la plupart des espèces pour les différents récepteurs. Sur les 65 résidus, 20 sont invariants et plus de la moitié se retrouve une fois sur deux. Les résidus les mieux conservés sont les cystéines puisqu'elles représentent 9 des 20 résidus invariants. Le positionnement de ces résidus de

cystéine est caractéristique de structures retrouvées pour d'autres molécules interagissant avec l'ADN et initialement décrites pour le facteur de transcription TF IIIA (Miller *et al.*, 1985).

En fait, cette structure dite en doigt représente un des deux modèles connus pour les protéines interagissant avec l'ADN. L'autre modèle, connu depuis longtemps et mieux documenté est la structure hélice  $\alpha$ -coude  $\beta$ -hélice  $\alpha$ . (pour revue, voir Brennan et Matthews, 1989 a et b)

L'interaction entre ces protéines et la double hélice d'ADN se fait au niveau du grand sillon pour une des deux hélices  $\alpha$ , l'autre se disposant en travers du grand sillon (Figure 7).

La structure cristalline de ces complexes a été réalisée (Brennan et Matthews, 1989 ; Anderson *et al.*, 1987). L'ADN reste sous forme B mais présente quelques déformations (courbure de l'ADN, ouverture du grand sillon au niveau de l'hélice  $\alpha$  et compression du petit sillon). Les liaisons spécifiques protéine-ADN se font entre les chaînes latérales des acides aminés situés sur l'hélice  $\alpha$  insérée dans le grand sillon et les bases d'ADN (liaisons hydrogène ou de Van der Waals).

Dans le cas du répresseur du tryptophane, la liaison avec l'opérateur se ferait de manière indirecte, grâce à des molécules d'eau servant d'intermédiaire entre la protéine et l'acide nucléique (Otwinowski *et al.*, 1988). La spécificité d'une telle liaison reste cependant à démontrer.

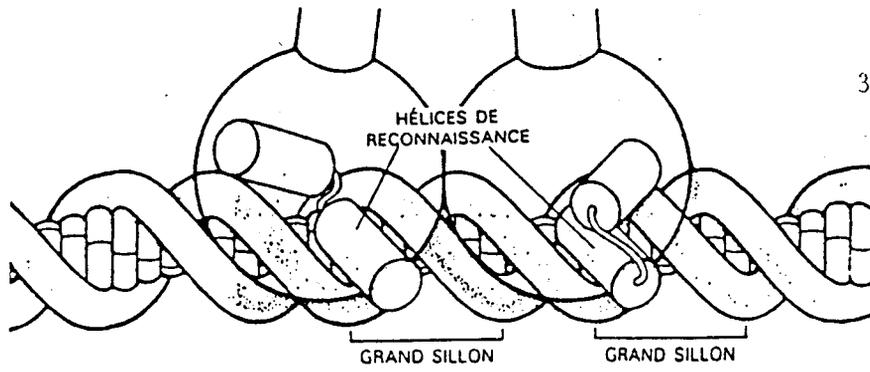


Figure 7 - Modèle Hélice-Coude-Hélice :  
Structure et interaction avec l'ADN  
(Ptashne, 1989)

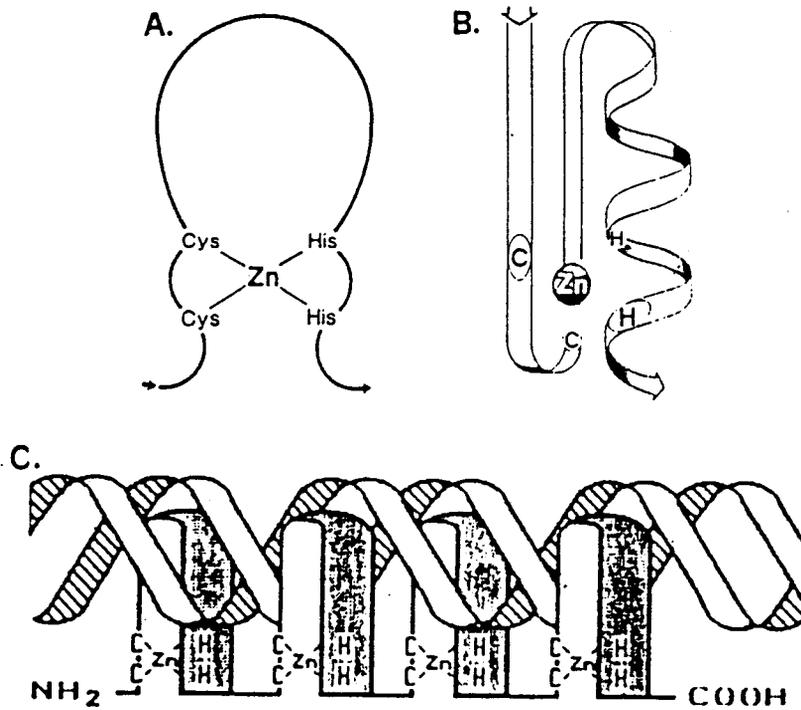


Figure 8 - Modèle des doigts à zinc :  
A - B : Structure (Evans et Hollenberg, 1988)  
C : Interaction avec l'ADN (Payre et Vincent, 1988)

Les protéines de structure analogue à TF IIIA forment une famille caractérisée par l'existence de boucles maintenues en place par l'établissement de liaison de coordinance intéressant soit 4 cystéines (type C4) soit 2 cystéines et 2 histidines (type C2H2) et un atome de Zinc (Figure 8). D'autres types intermédiaires sont décrits et complexent eux aussi des atomes de Zinc (Tableau I). La structure tertiaire de la boucle ainsi formée n'est pas fermement établie mais semble correspondre au modèle feuillet  $\beta$ -hélice  $\alpha$  (Figure 8b). Parmi l'ensemble de ces protéines dactyles, seul le groupe C2H2 présente un nombre de doigts très variable puisqu'il va de 2 pour le facteur ADR1 à 37 pour le facteur XFin. Cette multiplicité pourrait intervenir pour augmenter la spécificité de l'interaction ou l'affinité entre la protéine et l'ADN.

Les récepteurs stéroïdiens appartiennent au groupe C4 des protéines dactyles. Ce groupe possède deux doigts codés par des exons différents (Arriza *et al.*, 1987). Comme cela a été initialement proposé par Evans (1988), les deux doigts ont un rôle distinct. En effet, l'échange du premier doigt du récepteur des oestrogènes par celui des glucocorticoides aboutit à un récepteur mutant modulant l'activité transcriptionnelle des gènes glucocorticodépendants (Green et Chambon, 1988). La même équipe vient de démontrer que la mutation ponctuelle de 3 aminoacides situés vers l'extrémité C-terminale du premier doigt du récepteur des oestrogènes peut modifier la spécificité du récepteur de la même façon (Mader *et al.*, 1989). Tous ces résultats semblent converger vers une organisation coopérative des deux doigts, le premier doigt, porteur de la spécificité par ses aminoacides variables se

CLASSIFICATION DES DOIGTS A ZINC			
Origine	Nom de la séquence ou de la protéine	Nombre de doigts	Rôle de la protéine
<b>Séquence type Cys X<sub>2-4</sub> Cys X<sub>3</sub> Phe X<sub>5</sub> Leu X<sub>2</sub> His X<sub>2-4</sub> His</b>			
Xénope	TFIIIA	9	Facteur de transcription
Drosophile	Serendipity β, δ	5(β) ; 6 + 1 (δ)	Gène de transcription chez l'embryon
	Kruppel	4	Gène de segmentation
	Hunchback	4 + 2	Gène de segmentation
Souris	mkr <sub>1</sub> , mkr <sub>2</sub>	7(1) ; 9(2)	Contrôle de l'expression génétique pendant le développement
	Krox 20	3	Contrôle de la transcription
Levure	ADR1	2	Active la transcription du gène ADH2
Mammifères	Sp 1	3	Facteur de transcription
	NGF-IA	3	Stimule la différenciation neuronale
	Egr-1	3	Contrôle la transcription
	TDF	13	Détermination du sexe
<b>Séquence type Cys X<sub>2</sub> Cys X<sub>6</sub> Cys X<sub>6</sub> Cys X<sub>2</sub> Cys</b>			
Eucaryotes unicellulaires	GAL-4	1	Métabolisme du galactose
	PPR-1	1	Régulation de la biosynthèse de la pyrimidine
	ARGR-2	1	Métabolisme de l'arginine
	LAC-9	1	Métabolisme du galactose
	qa-1f	1	Active la transcription de gènes impliqués dans l'utilisation de l'acide quinique
<b>Séquence type Cys X<sub>2</sub> Cys X<sub>13</sub> Cys X<sub>2</sub> Cys</b>			
Adénovirus	E1A	1	Stimulation de la transcription
Mammifères	Récepteurs stéroïdiens	1	Médiateurs de l'action des hormones stéroïdiennes, contrôle de la transcription
<b>Séquence type Cys X<sub>2</sub> Cys X<sub>4</sub> His X<sub>4</sub> Cys</b>			
Rétrovirus	gène gag	1	Formation du <i>core</i> protéique des virions
<b>Séquence type Cys X<sub>3</sub> His X<sub>5</sub> Cys X<sub>2</sub> Cys</b>			
Bactériophage	gène 32	1	Déstabilise l'hélice
<b>Séquence type Cys X<sub>2</sub> Cys X<sub>9</sub> Cys X<sub>2</sub> Cys ou Cys X<sub>2</sub> Cys X<sub>6</sub> His X<sub>2</sub> His</b>			
Bactéries	ARNt synthétases	1	Métabolisme des acides nucléiques

TABLEAU I : Classification des doigts à zinc selon Helbecque et al. (1988)

fixerait dans le grand sillon de l'ADN, puis l'ensemble serait stabilisé par le deuxième doigt (voir Figure 10).

A côté de la structure C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub>, la deuxième caractéristique des protéines dactyles est la liaison avec un atome de zinc bien que cette association n'ait pas été retrouvée pour la protéine dactyle de nucléocapside du virus de myéloblastose aviaire (Jentoft *et al.*, 1988)

La présence de cet atome a été mise en évidence pour le facteur TF IIIA (Klug et Rhodes, 1987), SpI (Kadonaga *et al.*, 1987) ou Gal4. Par des méthodes physicochimiques, Freedman *et al.* (1988) montrent que la présence de zinc est nécessaire à l'établissement de la conformation d'une protéine de 19 KDa correspondant au domaine C du récepteur des glucocorticoides, et qu'il permet d'obtenir une affinité de cette protéine pour des sites d'ADN spécifiques.

Le rôle de l'atome de zinc dans l'établissement des boucles varie suivant les modèles étudiés. Ainsi, l'élimination du zinc par le dithiothreitol diminue ou abolit la liaison des facteurs de transcription à leur site spécifique (Kadonaga *et al.*, 1987 ; Klug et Rhodes, 1987). Le remplacement par d'autres atomes comme le cadmium ou le cobalt ne restaure pas l'affinité de liaison du facteur Sp1 pour son site (Kadonaga *et al.*, 1987).

La nature du métal semble moins importante pour le récepteur des glucocorticoides puisqu'en présence de cadmium, celui-ci fixe des séquences spécifiques (Freedman *et al.*, 1988). Une présence trop importante de zinc ou de cadmium abolit ici la liaison du récepteur à son site spécifique (Freedman *et al.*, 1988 ; Helbecque *et al.*, 1989). En

fait, ceci pourrait être lié à une action directe non spécifique du zinc avec l'ADN (observation personnelle, voir résultats).

Enfin, la nature des aminoacides impliqués dans la liaison avec le zinc est importante puisque la mutation d'une cystéine avec une histidine réduit fortement la capacité de liaison de la protéine Lac 9 à son site spécifique de liaison (Witte et Dickson, 1988).

L'ensemble de ces résultats concernant les protéines dactyles amène deux remarques. D'une part, bien qu'ils appartiennent à une même famille d'un point de vue structural, il faut bien différencier les doigts à zinc des facteurs de transcription de ceux retrouvés chez les récepteurs. En effet, TF IIIA lie la double hélice d'ADN au niveau d'un des deux brins alors que les récepteurs établissent des liaisons avec les deux brins. Ceci peut être interprété par une différence fonctionnelle de ces deux facteurs puisque l'un (TF IIIA) fait partie du complexe transcriptionnel et devra laisser passer l'ARN-polymérase alors que le récepteur stéroïdien ne fait que réguler la transcription.

D'autre part, même si le rôle des doigts à zinc est fondamental dans l'interaction protéine-ADN, il ne faut pas négliger d'autres zones de la molécule comme la séquence séparant les doigts, la région C-terminale à côté du deuxième doigt des récepteurs (Evans, 1988) ou certaines régions intervenant dans la spécificité de reconnaissance (comme le domaine E) ou au contraire dans le cadre d'une action inhibitrice (cas possible du domaine A/B).

## C - LE RECEPTEUR TRANSFORME VU PAR L'ADN

Il est maintenant bien établi que le complexe hormone-récepteur une fois transformé, se fixe au noyau et module la transcription de gènes spécifiques eux-mêmes ultérieurement traduits pour induire la réponse cellulaire. La notion de l'interaction entre ces complexes et l'ADN est restée imprécise jusque dans les années 1980 où le noyau se comportait comme une "boite noire" permettant la transmission du message. La conjonction de l'isolement des gènes spécifiques régulés par les stéroïdes, de la purification des différents récepteurs et de l'amélioration des techniques concernant l'interaction protéine-ADN a permis de faire progresser de façon très importante les connaissances sur le mode d'interaction du récepteur au niveau de son site ADN.

### 1 - NOTION DE SITES ACCEPTEURS

Le premier abord de l'interaction entre les récepteurs stéroïdiens et les noyaux a considéré le noyau dans son ensemble. Se fondant sur des variations d'affinité des récepteurs pour les noyaux, Higgins *et al.* (1973) ont décrit l'existence de sites accepteurs spécifiques de tissu, bien qu'il existe une certaine affinité du récepteur des glucocorticoides pour les cellules non sensibles à l'action des stéroïdes (O'Malley *et al.*, 1972). Ces sites sont saturables (15 à 16000 par noyau selon Higgins *et al.*, 1973 a; b). D'après Levy et Baxter (1976), seuls les sites de haute affinité pourraient correspondre à ceux impliqués dans la transcription du message hormonal (pour revue voir Danzé 1983 ; Formstecher 1986).

Vu à ce niveau, le mécanisme de la transmission du message hormonal semble clair. Cependant, le noyau est un milieu très hétérogène et le récepteur pourrait se fixer ailleurs que sur l'ADN. Néanmoins, les récepteurs stéroïdiens se comportent comme des transrégulateurs agissant essentiellement au niveau génomique. La notion de sites accepteurs a permis d'établir la notion d'une interaction entre les récepteurs et des zones spécifiques du noyau. Ces notions ont fortement évolué et sont devenues plus précises, grâce au développement des techniques permettant l'étude de l'interaction entre des facteurs nucléaires et des séquences spécifiques d'ADN (voir Annexe).

## 2 - REGULATION DE LA TRANSCRIPTION PAR LES RECEPTEURS STEROIDIENS.

Les récepteurs stéroïdiens représentent un bon modèle pour l'étude de la régulation des gènes par les facteurs nucléaires. En effet, les récepteurs sont des protéines

(1) *purifiées*

(2) *identifiables* : développement d'anticorps monoclonaux (Gametchu *et al.*, 1984 ; Okret *et al.*, 1984 ; Westphal *et al.*, 1982) et emploi du stéroïde radioactif

(3) *modulables* par le stéroïde

Il est donc facile d'étudier la liaison récepteur-ADN mais aussi de déterminer le rôle fonctionnel de certaines séquences.

a - Détermination de la séquence consensus GRE.

L'étude des récepteurs stéroïdiens a profité d'un modèle expérimental très important qui représente à lui seul plus de la moitié des publications sur ce sujet. Il s'agit de l'induction de la

transcription de l'ADN proviral du virus de la leucémie mammaire de souris (MMTV). Une fois intégré au niveau du génome de la cellule hôte, la transcription de cet ADN devient sous la dépendance des récepteurs des glucocorticoides et de la progestérone. Comme tous les rétrovirus, le MMTV possède deux sites non codant appelés LTR (Long Terminal Repeat) situés de part et d'autre de la région codante (Groner *et al.*, 1983).

Par des études de transfection, Hynes *et al.*(1983) ont montré que la séquence LTR contient une séquence indispensable à l'induction par les glucocorticoides. Grâce à l'analyse de délétions successives de ces séquences transfectées, il a été possible de déterminer une séquence conférant l'inductibilité hormonale à des promoteurs normalement non dépendants des stéroïdes. L'étude d'autres gènes a montré qu'une séquence identique appelée Hormone Response Element régulait la stéroïdo-dépendance (voir Tableau VI)

Pour le récepteur des glucocorticoides, une séquence consensus minimum 5'TGTTCT 3' est actuellement bien établie. Les différents auteurs s'accordent pour élargir cette séquence à un oligomère plus important 5' GGTACANNNTGTTCT 3' (n : bases non déterminées) (Tableau II).

#### b - Localisation et orientation du GRE

Les caractéristiques de la séquence GRE minima sont celles retrouvées pour les séquences dites "enhancers", c'est-à-dire les séquences où interagissent les facteurs nucléaires de régulation. Ainsi, la localisation du GRE se trouve dans la plupart des cas à quelques centaines de bases en amont du site promoteur. Cependant, elle a été retrouvée au niveau du premier intron du gène de la GH (Moore *et al.*,

	SEQUENCE	HOMOLOGIES %
1. GRE (+)	<pre>           11 13 15 1 2 3 4 5 6   10 12 14 GGTACAnnnTGTTCT </pre>	100
2. PRE	"	"
3. ARE	"	"
4. MRE	"	"
5. ERE	AGGTCAnnnTGACCT	58
6. EcRE	AGGGTTnnnTGCACT	42
6. TRE	TCAGGTCA---TGACCTGA	58
7. RRE	"	
8. GRE (-)	<pre>           11 13 15 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 12 14 ATYACNnnnTGATCW </pre>	33

TABLEAU II : Les différentes séquences consensus des récepteurs hormonaux

- GRE : Élément de réponse aux glucocorticoïdes  
 (+) séquence activatrice  
 (-) séquence inhibitrice
- PRE : Élément de réponse aux progestagènes
- ARE : Élément de réponse aux androgènes
- MRE : Élément de réponse aux minéralocorticoïdes
- ERE : Élément de réponse aux oestrogènes
- EcRE : Élément de réponse aux ecdystéroïdes
- TRE : Élément de réponse aux hormones thyroïdiennes
- RRE : Élément de réponse à l'acide rétinoïque

1985 ; Eliard *et al.*, 1985 ; Birnbaum et Baxter, 1986), mais aussi au niveau d'une zone située entre -450 et -2500 paires de bases du site promoteur dans le cas de la tryptophane-oxygénase (T.O.)(Jantzen *et al.*, 1987 ; Danesh *et al.*, 1987) ou de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (Petersen *et al.*, 1988).

Comme les sites enhancers, cette séquence garde son rôle régulateur après inversion (Strähle *et al.*, 1987 ; Miksicek *et al.*, 1988, Schule *et al.*, 1988). Cette notion se retrouve spontanément au niveau des différents génomes puisqu'il existe une séquence consensus GRE orientée vers le CAP dans le cas de la séquence LTR de MMTV (Scheidereit *et al.*, 1984) et du gène de la GH (Slater *et al.*, 1985), en sens inverse pour le gène de la vitellogénine II de poulet (Scheidereit *et al.*, 1986) ou du virus de sarcome de souris (Miksicek *et al.*, 1986). Pour le gène de la TAT (Jantzen *et al.*, 1987), ou du lysozyme (Renkawitz *et al.*, 1984), on retrouve deux séquences consensus, l'une orientée vers le CAP, l'autre en sens inverse.

Enfin, il faut noter que ces séquences sont souvent multiples et on en retrouve jusqu'à 5 dans la séquence LTR de MMTV.

La séquence consensus GRE minima présente un taux de conservation de 90 % des bases pour l'ensemble des gènes régulés par les glucocorticoides. Si on étend la séquence à 5'GGTACANNNTGTTCT 3', la première partie (GGTACA) n'est conservée que dans 60 % des sites. Il faut surtout noter une variabilité plus importante pour les bases situées en position 1 et 3 (retrouvée seulement dans 30 à 35 % des sites). En substituant ces deux bases par des adénosines, cette séquence

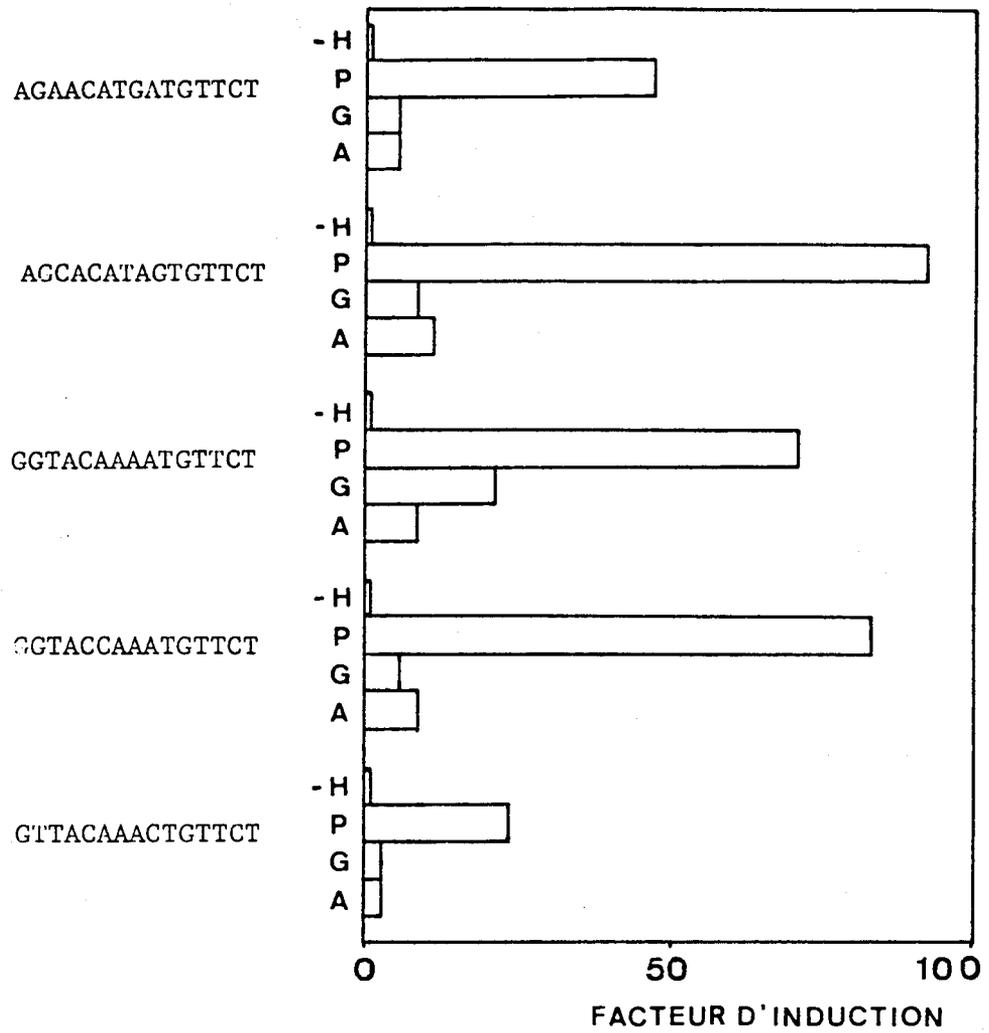


Figure 9 - Effets de mutations ponctuelles sur l'activité de l'élément de réponse au stéroïde suivant Ham et al. (1988)

- H : absence d'hormone
- P : progestagène (R 5020)
- G : glucocorticoïde (Dexaméthasone)
- A : androgène (testostérone)

est transformée en un palindrome parfait ayant pour axe le triplet nucléotidique NNN.

c - Interaction entre le GRE et son récepteur

Le fait que la séquence consensus élargie se présente comme un palindrome presque parfait, est en faveur d'une interaction ADN-récepteur sous forme dimérique. Cependant, parmi toutes les séquences décrites jusqu'ici aucune ne possède une structure palindromique parfaite. Ham *et al.* (1988) ont étudié l'effet de mutations ponctuelles au niveau de la séquence consensus élargie sur l'activité du gène CAT cotransféré dans des cellules ZR-75-1. Dans ce modèle, la séquence GGTACAAAGTGTCT donne une activité CAT trois fois plus importante que celle obtenue avec le palindrome parfait (Figure 9). La mutation de la guanine en position 2 (voir Tableau II) ou le changement d'une des bases du triplet ACA, aboutit à une forte baisse de l'activité CAT. Bien que d'autres travaux confirment la moins bonne induction obtenue par le palindrome parfait (Strähle *et al.* 1987), ceci ne remet pas en cause l'existence du deuxième site de liaison au niveau du GRE, et pourrait très bien être le reflet d'une fixation légèrement différente pour chaque monomère du récepteur.

La comparaison des résultats obtenus par les expériences de footprint et de protection de méthylation (voir Annexe), a permis de préciser le mode d'interaction entre le récepteur des glucocorticoides et la séquence consensus. La fixation du récepteur à l'ADN bloque la méthylation des guanines 11 (brin supérieur) et 14 (brin inférieur) comme l'ont montré Karin *et al.* (1984) et Beato *et al.* (1988). Les techniques de footprint (Scheidereit *et al.*, 1984 ; Beato *et al.*, 1988)

ainsi que les techniques de microscopie électronique (Schmid, 1982) montrent des zones d'interaction plus étendues que celles décrites par les techniques de protection.

Il est particulièrement intéressant de rapprocher ces résultats de ceux obtenus par Green *et al.* (1988) grâce à la réalisation de récepteurs chimériques des oestrogènes. Comme nous l'avons vu précédemment, le site de liaison du récepteur à l'ADN se présente sous la forme de deux doigts à zinc. Grâce à la réalisation de chimères de récepteurs possédant seulement le premier ou le deuxième doigt à zinc, Green *et al.* (1988) ont pu montrer que le premier doigt joue un rôle majeur dans la spécificité de l'interaction, sans doute par l'établissement de contacts spécifiques avec une partie ou toutes les bases de la séquence consensus, le deuxième doigt jouant le rôle de stabilisateur. Cette hétérogénéité dans le mode de reconnaissance ADN-récepteur pourrait expliquer la discordance entre les résultats de footprint et de protection de méthylation.

Dans leur étude très précise sur l'interaction entre la séquence GRE située entre -200 et -160 du LTR de MMTV et le récepteur, Chalepakis *et al.* (1988a) aboutissent à des résultats similaires (Figure 10). Au niveau de ce site, il existe quatre zones de contact séparées par environ 10 paires de bases et qui pourraient fixer deux molécules de récepteur. Les deux régions centrales incluent les résidus de guanine protégées par le récepteur lors des expériences de méthylation (guanine 11, brin du haut, 14 brin du bas) et pourrait correspondre à des zones de fixation plus importantes. Les deux régions latérales, non protégées contre la méthylation sont moins conservées, riches en adénine et en

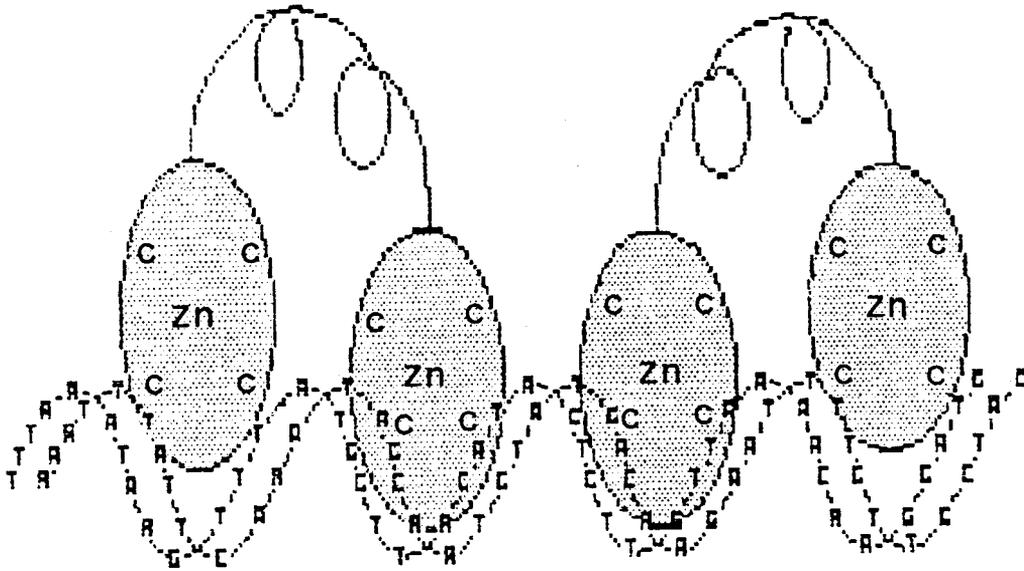


Figure 10 - Modèle d'interaction entre les domaines liant l'ADN du récepteur des glucocorticoïdes et leur GRE (Chalepakis et al., 1988 a)

thymine et pourraient être impliquées dans une interaction non spécifique de type ionique par exemple.

Les mêmes études de protection semblent indiquer que l'interaction du récepteur avec des séquences spécifiques se situe au niveau du grand sillon et que l'interaction est probablement située du même côté de la double hélice car les sites d'interaction récepteur-ADN sont séparés d'environ 10 paires de bases, ce qui représente donc environ un tour de spire (Chalepakis *et al.*, 1988).

#### d - Comparaison avec d'autres SRE

Les séquences consensus pour les récepteurs semblent pouvoir être regroupées en trois groupes présentant de hauts degrés de conservation entre eux (voir Tableau II). Le premier groupe comprend les récepteurs des glucocorticoides, de la progestérone, des androgènes et de minéralocorticoides. La parenté est telle que dans le cas du gène du lysozyme et du LTR de MMTV régulés tous deux par les glucocorticoides et la progestérone, il a été difficile d'identifier des sites préférentiels pour l'un ou l'autre des récepteurs. Les techniques de footprint après action de l'exonucléase III a permis à Van der Ahe *et al.* (1985) de montrer que les sites de liaisons étaient les mêmes. Cependant, les séquences situées à -160 paires de bases dans le cas du LTR de MMTV et à -200 pour le gène du lysozyme présentent une affinité plus importante pour le récepteur de la progestérone et les empreintes laissées par chacun des récepteurs ne sont pas toujours identiques.

La similitude des séquences consensus à l'intérieur d'un même groupe permet facilement d'expliquer qu'une mutation d'une ou plusieurs bases au niveau d'une séquence palindromique puisse diminuer, voire

abolir la régulation exercée par le récepteur des glucocorticoides ou celui de la progestérone (Strähle *et al.*, 1987).

Comme nous pouvons le voir sur le tableau II, les séquences consensus correspondant au récepteur des oestrogènes, des ecdysones, des hormones thyroïdiennes ou de l'acide rétinoïque sont très voisines. En fait, les différences essentielles seraient fonctionnelles et suivant les cas, la liaison provoquerait une activité transcriptionnelle ou non. Une telle hypothèse a été illustrée par Glass *et al.* (1988) (figure 11). Par compétition avec la séquence TRE normale, ces auteurs montrent que le récepteur à T<sub>3</sub> présente une affinité diminuée d'un facteur de 5 si on ajoute 1 ou 6 bases au niveau de la zone de jonction des deux hémipalindromes. Il n'y a plus d'affinité si on retire les deux bases centrales ou si on ajoute 9 bases au centre du palindrome. S'il y a trois bases entre les deux hémipalindromes, l'affinité pour le récepteur à T<sub>3</sub> reste bonne et la séquence présente à ce moment une affinité nettement supérieure pour le récepteur des oestrogènes. Pour Glass *et al.* (1988), la présence ou l'absence de ces trois bases dans la séquence de reconnaissance pour le récepteur à T<sub>3</sub> pourrait intervenir dans le contrôle transcriptionnel positif ou négatif par la T<sub>3</sub>.

Il est intéressant de constater que les deux groupes de récepteurs définis à partir des homologies de séquences en acides aminés au niveau de leur région C (groupe du récepteur des glucocorticoides et celui des oestrogènes) sont superposables aux deux groupes de SRE (GRE et ERE respectivement).

Les deux groupes de SRE possèdent entre eux une certaine communauté de structure qui explique parfaitement les résultats obtenus

Mutant	Sequence	Affinité (x10 <sup>10</sup> M)
rGH TRE WT	CAGGGACG TGACCGCA	12
rGH TRE -2		>1000
rGH TRE +1	G	36
rGH TRE +2	GC	22
rGH TRE +3a	TAG	49
rGH TRE +3b	CTG	30
rGH TRE +6	CTATAG	61
rGH TRE +9	ATAACTATA	>1000
Vit ERE	TCAGGTCA CTG TGACCTGA	7

Figure 11 - Affinité TRE-récepteur T<sub>3</sub> et modification de la distance séparant deux hémipalindromes (Glass et al., 1988)

La première séquence correspond au palindrome naturel. Dans les autres séquences seules les bases ajoutées ont été inscrites.

par Martinez *et al.* (1987) et par Klock *et al.* (1987). Ces derniers auteurs transfectent dans des cellules MCF-7 (cellules contenant le récepteur des glucocorticoides et celui des oestrogènes), des plasmides contenant différentes séquences de SRE et le site promoteur de la thymidine-kinase qui induit l'expression du gène de la CAT. Lorsque le SRE de ce montage est la séquence ERE, la cellule exprime la CAT sous la dépendance du récepteur des oestrogènes. La simple mutation de 4 bases (figure 12) à l'intérieur du site enhancer (modification du SRE) aboutit à un gène régulé par les glucocorticoides. Ces résultats permettent certainement de montrer le rôle fondamental de la structure des SRE. Cependant, *in vivo*, la régulation de l'expression des gènes par les récepteurs fait intervenir d'autres éléments non nucléaires (concentration en hormone intracellulaire ...) ou nucléaire (possibilité de dimérisation du récepteur, formation de complexes protéiques, régulation par d'autres facteurs).

#### e - Dimérisation des récepteurs stéroïdiens

La structure psdeudopalindromique du GRE mais aussi de la plupart des "response elements" a fait poser très tôt l'hypothèse de la fixation de deux molécules de récepteur au niveau de sites spécifiques de l'ADN (Scheidereit et Beato, 1984 ; Scheidereit *et al.*, 1986).

Par électrophorèse, ultracentrifugation en gradient et footprint, Wrange *et al.* (1986 ; 1989) montrent que l'interaction protéine-GRE intéresse deux protéines. La première de 90 KD correspond au récepteur. Bien qu'initialement considérée comme une sous-unité fonctionnelle du récepteur ou un contaminant intervenant dans la spécificité d'interaction avec l'ADN (Gustafsson *et al.*, 1986), la

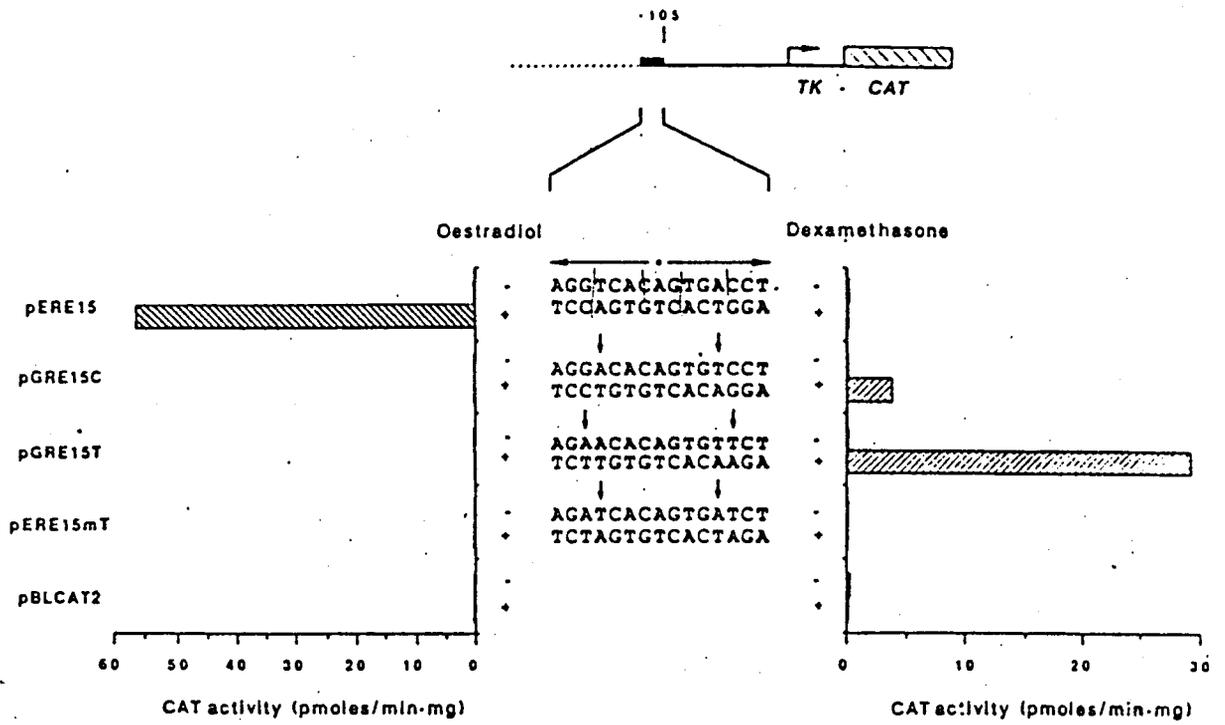


Figure 12 - Substitution de bases et passage d'un ERE à un GRE (Klock et al., 1987)

deuxième protéine semble aussi correspondre au récepteur car, une fois lié à l'ADN, le pic de radioactivité dû au stéroïde tritié présente une augmentation de la constante de sédimentation qui passe de 4S à 6S (Wrange *et al.* (1989). Par étude de pontage à la glutaraldéhyde, il semblerait que la dimérisation puisse même exister avant la fixation sur l'ADN.

Les travaux de Kumar et Chambon (1988) sur le récepteur des oestrogènes et ceux de Tsai *et al.* (1988) sur le récepteur des glucocorticoides semblent confirmer cette hypothèse. Pour mettre en évidence la dimérisation, ces auteurs ont étudié l'interaction entre des récepteurs tronqués, possédant le domaine C de liaison à l'ADN, et leur "hormone response element". Au vu des résultats obtenus par retard sur gel, les récepteurs modifiés semblent posséder une affinité moins importante envers leur site spécifique. La mise en présence du récepteur normal, du récepteur muté et de l'ADN donne à faible concentration une bande unique retardée et à concentration plus élevée la présence de deux bandes. Il semble ainsi que la fixation du récepteur en tant que dimère existe pour les deux récepteurs et de plus, la deuxième unité se fixant de façon coopérative (Tsai *et al.*, 1988).

Par l'utilisation d'agents chaotropiques et de digestion tryptique, Sabbah *et al.* (1989) montrent que la forme transformée 5S du récepteur des oestrogènes correspond en fait à un homodimère de deux récepteurs de 66 KD. Cette dimérisation impliquerait une interaction hydrophobe concernant la région liant le stéroïde.

La dimérisation des protéines liant l'ADN est un mécanisme retrouvé pour plusieurs facteurs de transcription tant chez les

procaryotes que chez les eucaryotes (Hendrickson *et al.*, 1985 ; Hope et Struhl, 1987 ; Anderson *et al.*, 1987 ; Sauer *et al.*, 1988 ; Halazonetis *et al.*, 1988). Le facteur protéique de levure MAT $\alpha$ 2 régule le type cellulaire par liaison à un opérateur et possède deux domaines, l'un pour la liaison à l'ADN, l'autre impliquée dans la dimérisation. Ce facteur possède peu d'affinité pour son site ADN en tant que monomère et la dimérisation augmente considérablement cette affinité (Sauer *et al.*, 1988). Cette notion de sites fonctionnels au sein de la protéine et de coopérativité entre deux monomères est également le fait des récepteurs stéroïdiens.

Les protéines qui agissent à l'état de dimère sur des sites ADN possèdent parfois une structure particulière servant d'interface entre les deux protéines et appelée "Leucine Zipper". Cette structure correspond à une hélice  $\alpha$  comportant 4 résidus de leucine, chacun étant séparé des autres par 6 acides aminés. Les résidus de leucine sont donc situés sur le même côté de l'hélice, tous les deux tours, et les chaînes latérales des résidus de leucine d'un monomère s'intercalent avec celles d'un autre monomère favorisant ainsi la dimérisation (Landschutz *et al.*, 1988). Une telle structure a été retrouvée pour le facteur nucléaire CBP (Landschutz *et al.*, 1988), le facteur GCN4 (Hope et Struhl, 1987) ou dans la formation de complexes hétéromériques comme cela a été montré pour la liaison du facteur Jun/AP-1 à la protéine FOS (Schuermann *et al.*, 1989).

Aucune structure de type Leucine Zipper n'existe dans les récepteurs stéroïdiens dont les bases moléculaires de la dimérisation restent encore à élucider. S'il semble que les récepteurs stéroïdiens

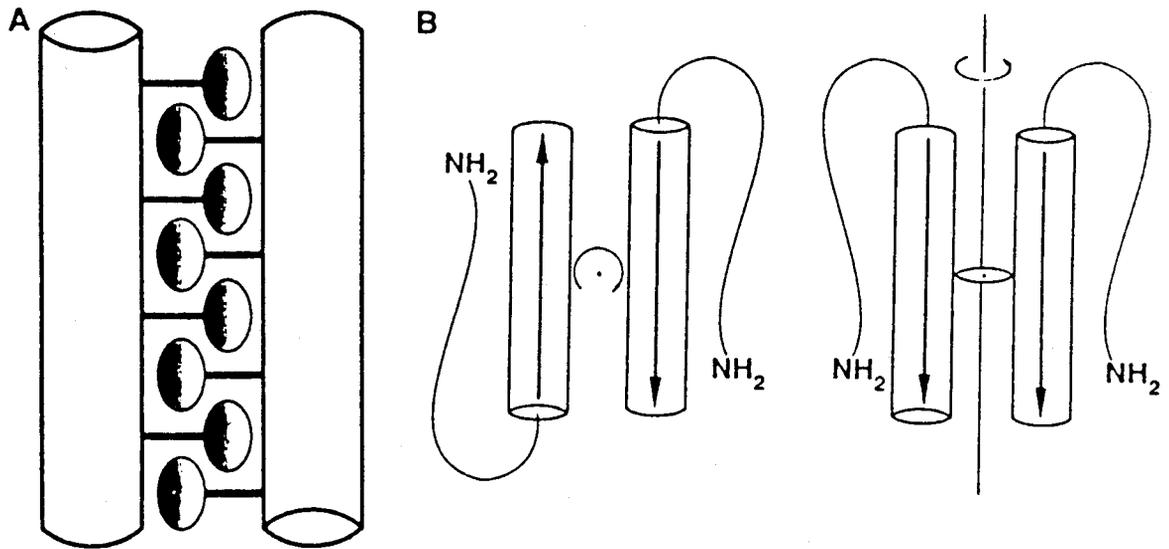


Figure 13 - Structure des Leucine-Zippers (Landschulz et al., 1988)

A : Les deux tubes parallèles représentent les dimensions approximatives d'une Hélice.  
Les interdigitations symbolisent les chaînes latérales des leucines

B : Les protéines se disposent de manière anti-parallèle ou parallèle pour établir le Leucine-Zipper

soient liés à l'ADN sous forme d'un dimère, il est actuellement difficile d'affirmer si la dimérisation est antérieure à la liaison au site GRE.

#### f - Récepteur et inhibition de la transcription

La difficulté d'étudier une réponse inhibitrice fait que le mécanisme de répression de l'activité des gènes par les récepteurs stéroïdiens est actuellement mal compris. Cette inhibition peut se faire à plusieurs niveaux

(1) celui de la séquence spécifique de reconnaissance.

Ainsi, Beato (1989) propose l'existence d'une séquence consensus inhibitrice. Celle-ci présente de nombreuses bases non déterminées (voir Tableau II) et possède une relative similitude avec la séquence stimulatrice (30 % d'homologie de séquence). La présence d'une adénine en position 12 semble particulièrement importante, car elle n'est jamais retrouvée dans les séquences activatrices. Il n'existe cependant pas de véritable accord sur l'existence de cette séquence qui a été établie à partir de trois sites inhibiteurs seulement.

(2) celui de la séquence du site promoteur. La plupart des gènes ont une régulation multiple et l'inhibition de la transcription peut être liée à une compétition entre facteurs nucléaires qui ne peuvent se fixer en même temps sur leurs sites respectifs comme cela a été évoqué par Akerbloom *et al.* (1988) pour le gène de la sous-unité  $\alpha$  de l'hormone glycoprotéique humaine.

(3) celui d'une interaction protéine-protéine.

L'association du récepteur à d'autres facteurs nucléaires peut expliquer

l'inhibition du gène de la prolactine par les glucocorticoides (Adler *et al.*, 1988). Le récepteur ne se lierait alors pas sur son site ADN.

(4) celui du récepteur lui-même. Ainsi, Oro *et al.* (1988) montrent que certaines mutations d'acides aminés peuvent entraîner une inhibition de réponse et non une stimulation. Ce problème semble très complexe et les mécanismes probablement intriqués car d'autres facteurs nucléaires peuvent jouer un rôle dans l'inhibition de gènes glucocorticodépendants (Langer et Ostrowski, 1988).

### 3 - ACTION DES STEROIDES SUR LA CHROMATINE

#### a - Existence de sites d'hypersensibles à la DNase I

Une deuxième manière d'aborder la régulation de la transcription par les stéroïdes correspond à l'étude des modifications de la chromatine, induites par la stimulation hormonale. La plupart des résultats expérimentaux sont issus des techniques initialement décrites par Weintraub et Groudine (1976). Cette technique consiste à réaliser, en absence ou en présence de stimulation hormonale, une digestion partielle des noyaux par la DNase I, puis à comparer la structure des sites transcriptionnels obtenus. Ces deux auteurs ont ainsi pu décrire l'existence de sites hypersensibles ou de sites résistants à la DNase I au sein des unités transcriptionnelles. Il apparaît que certains de ces sites sont liés à l'activité transcriptionnelle du gène et à sa régulation (Wu et Gilbert, 1981).

Burch et Weintraub (1983) ont étudié l'existence de tels sites au niveau du gène de la vitellogénine de foie de poulet, gène régulé par les oestrogènes. A côté de sites non spécifiques, ils décrivent l'existence de trois sites spécifiques apparaissant après la stimulation

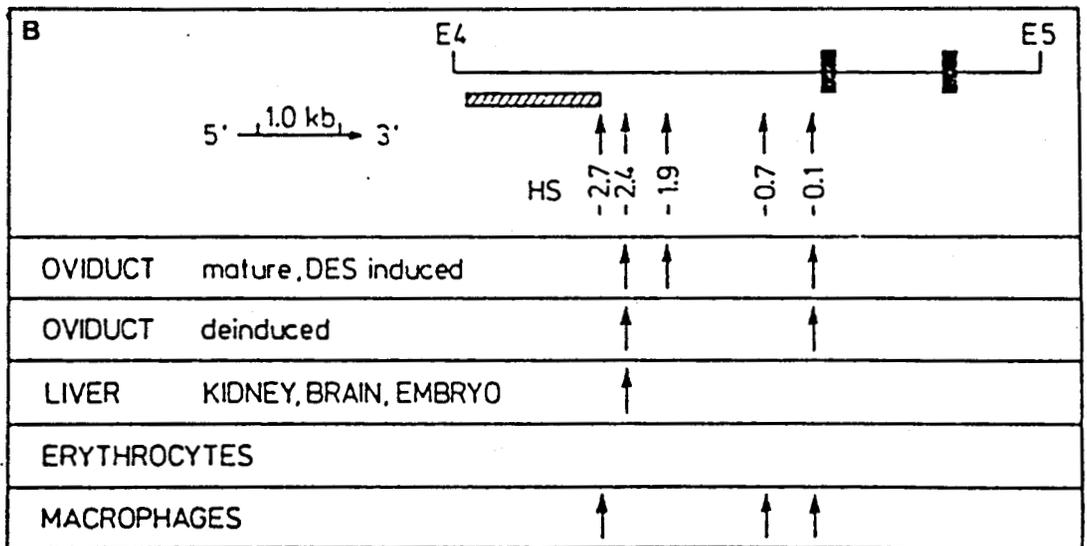
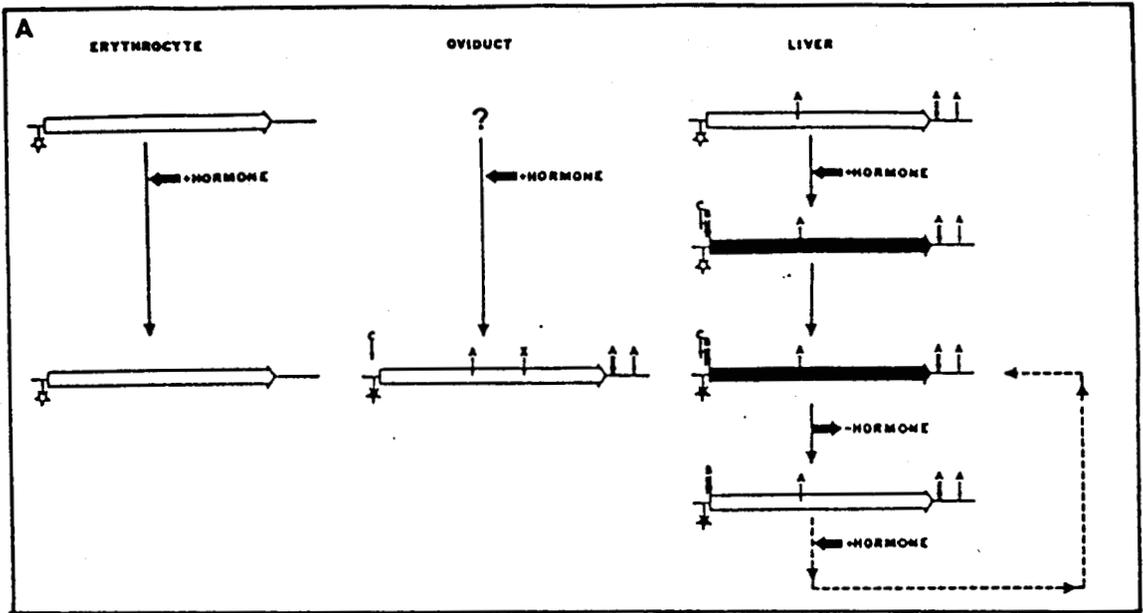


Figure 14 - Sites d'hypersensibilité à la DNase I

Changement de structure des sites après induction par l'hormone dépendance du tissu et de la maturation des cellules

A : gène de la vittellogénine (Burch et Weintraub, 1983)  
 B : gène du lysozyme (Fritton et al., 1984)

hormonale. Deux de ces sites sont stables. Ils persistent après stimulation hormonale et peuvent transmettre la caractéristique à la cellule fille, même après élimination du stéroïde. Le troisième site, situé plus en amont du gène, disparaît rapidement après l'arrêt de la stimulation hormonale. Ce site pourrait être lié à l'intervention du complexe oestrogène-récepteur lui-même, mais en fait, seule la mise en évidence d'une séquence de type Estrogen Response Element et la présence du récepteur à ce niveau pourrait permettre d'affirmer le rôle du récepteur dans ces modifications structurales induites par l'hormone.

La nature de ces sites semble non seulement être stéroïdo-dépendante, mais elle varie aussi suivant le taux d'expression du gène ainsi que du type de tissu intéressé. Ainsi, les sites spécifiques liés à une hypersensibilité à la DNase I subsistent dans l'oviducte, organe sensible aux oestrogènes, mais qui n'exprime pas le gène de la vitellogénine. Par contre, on ne les retrouve pas dans les érythrocytes, cellules non sensibles aux oestrogènes et n'exprimant pas le gène de la vitellogénine (Figure 14a). Des résultats semblables ont été obtenus par Fritton *et al.* (1984) pour le gène du lysozyme (Figure 14b).

Les mêmes notions sont retrouvées dans le cas du récepteur des glucocorticoides. Après fusion du GRE de MMTV avec le gène de la thymidine kinase, Zaret et Yamamoto (1984) observent aussi l'existence de sites de deux natures : ceux peu stables correspondant à une interaction récepteur-ADN, et d'autres plus stables qui persistent même après élimination de l'hormone. Dans le cas du gène de l'utéroglobine, tous les sites décrits sont tissu-spécifiques et instables (Jantzen *et al.*, 1987).

Tous les résultats rapportés ici sont moins précis que ceux concernant l'interaction protéine-ADN mais ils apportent des notions très importantes sur la différenciation cellulaire. Ainsi, l'organisation chromatinienne autoriserait ou non l'interaction du facteur nucléaire avec l'ADN. L'existence d'autres sites, induits par l'hormone mais stables après élimination du stéroïde, semble de plus prouver que la liaison ADN-récepteur est un mécanisme nécessaire mais non suffisant à l'expression des gènes stéroïdo-dépendants (Becker *et al.*, 1987).

#### b - Stéroïdes et altérations chromosomiques

La comparaison des caractéristiques de liaison des récepteurs avec les noyaux ou avec l'ADN a très vite montré indirectement le rôle des protéines chromosomiques (Milgrom *et al.*, 1976 ; Simons, 1977).

Plusieurs composants semblent être impliqués :

(1) les protéines non histones HMG14 et 17 semblent jouer un rôle au niveau de la chromatine active (Weisbrod et Weintraub, 1979). Après traitement des cellules MMTV par les glucocorticoides, ces molécules présentent une diminution importante du taux d'ADP-ribose, et ceci de façon parallèle à l'initiation de la transcription induite par l'hormone (Taniama et Johnson, 1983). Il est possible que ces variations de phosphorylation soient en relation avec une activité du récepteur bien que celui-ci ne semble pas posséder d'action kinasique (Sanchez *et al.*, 1988).

(2) L'organisation structurale du fragment LTR de MMTV a pu être étudiée par leur insertion sur des minichromosomes (virus papillome bovin). Dans ce contexte, ces fragments sont associés aux

histones et forment des nucléosomes régulièrement espacés (Hager, 1988). Il apparaît une zone d'hypersensibilité à la DNase I après stimulation par les glucocorticoides et ceci au niveau d'un nucléosome portant une séquence GRE. Par la même technique, associée au footprint et aux techniques de protection, Perlmann et Wrangé (1988) montrent que le récepteur des glucocorticoides lie spécifiquement l'ADN au niveau du nucléosome même. Ainsi, la présence du récepteur pourrait altérer la structure du nucléosome, créant un site d'attaque pour un agent de clivage. D'un point de vue plus fonctionnel, cette altération pourrait faciliter la fixation d'un autre facteur de transcription. Rappelons en effet qu'à proximité des GRE, on retrouve souvent des séquences correspondant aux sites de fixation de facteurs de transcription (Novack *et al.*, 1985 ; Miksicek *et al.*, 1987 ; Schüle *et al.*, 1988 ; Becker *et al.*, 1986) et que ceux-ci peuvent agir avec le récepteur de façon coopérative (voir paragraphe 5). Ceci pourrait aussi expliquer l'action coopérative de deux GRE au niveau d'un gène (Jantzen *et al.*, 1987).

Après administration d'oestrogènes chez un animal vivant, le taux d'acétylation des histones et plus particulièrement celui de l'histone H<sub>4</sub> est augmenté (Libby, 1972). Ces phénomènes sont fréquemment observés lors de l'initiation de la transcription et l'expression d'un gène s'accompagne de modifications rapides de l'acétylation des histones. Par contre, un gène non exprimé présentera un taux d'acétylation stable. Un tel turn-over semble exister lors de l'induction de la TAT par les glucocorticoides (Plesko *et al.*, 1983). Inversement, il semble que l'histone H<sub>1</sub> inhibe spécifiquement la liaison du récepteur à l'ADN (Ichikawa *et al.*, 1987). Cette observation est

probablement secondaire au rôle de cette histone dans la formation de la chromatine inactive.

#### c - Stéroïdes et modifications de l'ADN

La méthylation des cytosines semble être un mécanisme intervenant dans la régulation de l'expression des gènes. Cependant, il ne semble pas y avoir un mécanisme unique de régulation et il est difficile de dire si cette méthylation est la cause ou la conséquence de l'activité transcriptionnelle (Yamamoto, 1985 ; Dynan, 1989). Pour Cedar (1988), la plupart des gènes méthylés sont inactifs par formation de structure chromatinienne locale les rendant inaccessibles. La déméthylation activerait alors le gène. Une telle observation a été réalisée par Burch et Weintraub (1983) lors de l'induction de la transcription du gène de la vitellogénine par les glucocorticoides. Cette déméthylation est lente et postérieure à l'apparition du site d'hypersensibilité à la DNase I.

Les stéroïdes semblent aussi provoquer des modifications de la structure de l'ADN. Pour Yamamoto (1985), l'association des récepteurs stéroïdiens avec la topoisomérase II pourrait former une DNAGyrase interagissant directement au niveau du site "steroid response element". Cette action permettrait la fixation du récepteur sur son site et la stimulation de la transcription.

Cette hypothèse repose sur plusieurs constatations. D'une part, les variations d'enroulement de l'ADN influent sur l'activité des promoteurs et enhancers. La liaison du récepteur des glucocorticoides aux sites GRE est plus faible lorsque ces sites sont situés au sein d'un ADN superenroulé (voir Yamamoto, 1985), propriété rencontrée chez les

DNAgyrases bactériennes (Cozzarelli, 1980). D'autre part, l'ADN peut être coupé par un agent intercalant, le mAMSA(4'(9-acridinyl-amino)methanesulfone-m-anisidine). Cette molécule agit en bloquant l'action de la topoisomérase II au stade du clivage intermédiaire enzyme-ADN. Le fait que les oestrogènes stimulent l'action du mAMSA (Zwelling *et al.*, 1983) est en faveur de l'hypothèse émise par Yamamoto.

#### 4 - REGULATION MULTIPLE DE L'EXPRESSION DES GENES

D'après le modèle classiquement admis, l'interaction entre le récepteur transformé et les sites spécifiques de l'ADN provoque une stimulation ou une inhibition de l'expression du gène stéroïdo-dépendant. Cependant, ce modèle simplifié élimine de nombreuses questions sur la régulation de l'expression d'un gène par plusieurs récepteurs stéroïdiens ou sur l'action du récepteur une fois fixé à sa séquence spécifique d'ADN.

La plupart du temps, les gènes étudiés sont induits par plusieurs facteurs transcriptionnels. Ainsi, la séquence LTR de MMTV cotransfectée avec un gène, rend celui-ci dépendant des androgènes, des glucocorticoides et des progestagènes (Ham *et al.*, 1988). De même, le gène du lysozyme est sous la dépendance des stéroïdes quand il est exprimé dans les cellules de glandes tissulaires (Schutz *et al.*, 1978). Ce même gène est exprimé spontanément dans les macrophages sans intervention de l'hormone (Cross *et al.*, 1988). Ceci pourrait être lié à l'existence d'un autre facteur nucléaire activateur liant une séquence d'ADN recoupant la séquence GRE. La présence des récepteurs stéroïdiens deviendrait donc inutile (Altschmied *et al.*, 1989).

Comme la structure des SRE est analogue pour les glucocorticoides ou la progestérone, une régulation multihormonale semble normale. Cependant, les réponses obtenues ne sont pas de même intensité suivant le stéroïde stimulant (Ham *et al.*, 1988). De plus, certains gènes ne sont stimulés que par un récepteur stéroïdien unique. Il existe donc certaines conditions complémentaires à l'existence d'un SRE qui rendent le gène sensible à tel ou tel stéroïde.

Plusieurs explications peuvent intervenir. D'une part, suivant le tissu, la concentration varie d'un stéroïde à un autre et donc l'abondance relative en stéroïde peut expliquer la stimulation spécifique. Une deuxième possibilité est l'existence de différences minimes, mais de grande importance dans la structure ou dans l'environnement de chaque SRE. Une dernière possibilité est l'intervention d'autres facteurs nécessaires à la spécificité de chaque récepteur. Plusieurs modèles expérimentaux ont permis de déterminer l'importance des deux dernières explications.

a - Régulation multiple des gènes par les récepteurs stéroïdiens.

La région 5' flanquante du gène de la phosphoénolpyruvate kinase (PEPCK) (Petersen *et al.*, 1988) possède deux GRE situés respectivement en -1264 et -468 paires de bases du site d'initiation de la transcription. Il semble que chacun des GRE bien qu'éloigné d'environ 700-800 paires de bases l'un de l'autre, intervienne pour moitié dans la stimulation du gène. On trouve une coopérativité identique entre deux GRE éloignés pour gène de la tryptophane oxygénase (Danesh *et al.*, 1987).

L'induction du gène de la tyrosine aminotransférase (TAT) fait intervenir des GRE situés à environ 2000-2500 paires de bases du site d'initiation, et ceux-ci semblent agir de façon synergique. Alors que la stimulation du site distal aboutit à une induction de réponse faible (30 % de l'activité maximale), la liaison du récepteur des glucocorticoides au site proximal ne donne aucun effet d'induction. La réponse maximale est obtenue par la liaison aux deux sites.

Le gène CAT transfecté dans des cellules MCF-7 est sensible à la dexaméthasone si celui-ci possède la séquence consensus GRE immédiatement avant la TATA box (Strähle *et al.*, 1988). Il semble donc que le récepteur des glucocorticoides comme celui des oestrogènes n'a pas besoin d'autres facteurs pour stimuler un gène. Cette caractéristique est d'ailleurs commune à d'autres séquences de régulation (pour revue, voir Strähle *et al.*, 1988). Si la séquence GRE est éloignée de la TATA box, le gène n'est plus sensible aux glucocorticoides. L'addition d'une deuxième séquence GRE restaurera la stéroïdo-dépendance. La stimulation à distance d'un gène par les stéroïdes nécessitera donc la coopérativité de deux récepteurs.

Par contre, il semble que les sites du LTR de MMTV interviennent de façon indépendante (Buetti et Kühnel, 1986). Par ailleurs le gène du lysozyme est stimulé par la progestérone et les glucocorticoides, mais il ne semble pas y avoir d'effet additif dans l'action de ces deux hormones (Renkawitz *et al.*, 1984). Il semble donc exister plusieurs mécanismes d'action, il faut cependant différencier ce dernier cas des deux premiers. En effet, les GRE situés dans la séquence LTR correspondent à des séquences répétitives. Chez les virus, ce type

de séquence est caractéristique des sites liant les molécules à activité "enhancer". Dans le cas des sites promoteurs des gènes de la PEPCK de la TO ou de la TAT, il n'existe que deux ou trois GRE. Leur organisation différente pourrait être liée à d'autres facteurs rendant ces séquences spécifiques du gène ou du tissu. Ainsi, la présence d'une séquence TGGTCT (ce qui peut arriver statistiquement toutes les 4096 paires de bases) ne suffit pas pour obtenir un site enhancer, d'autres conditions sont nécessaires et celles-ci semblent varier d'un gène à un autre.

b - Association récepteurs stéroïdiens-facteurs de transcription.

De nombreux arguments, le plus souvent indirects démontrent que *in vivo*, la liaison du récepteur stéroïdien à l'ADN est souvent associée à l'intervention de facteurs nucléaires pour induire l'initiation de la transcription.

Après traitement stéroïdien, le taux de mRNA du lysozyme est augmenté d'un facteur 1000 dans l'oviducte de poulette. Par contre, le même gène transfecté avec son site promoteur dans des cellules T47D présente une induction nettement plus faible (Hecht *et al.*, 1988). La même observation a été réalisée pour le gène de l'ovalbumine (Tora *et al.*, 1988). En effet, après stimulation par les oestrogènes, le gène est exprimé dans les fibroblastes d'embryon de poulet, mais pas dans les cellules HeLa humaines.

Le traitement par les glucocorticoides de cellules thymiques aboutit à leur lyse alors que la même stimulation provoque, au niveau des cellules hépatiques, une augmentation des enzymes de la gluconéogenèse. La synthèse d'ARN au niveau des noyaux isolés de foie de

rat est augmentée par l'addition de cytosol provenant du même tissu et préalablement incubé avec un stéroïde agoniste. Par contre, si le cytosol incubé provient de thymus, on constate une inhibition de synthèse quelle que soit l'origine du tissu (foie ou thymus) (Tsawdaroglov *et al.*, 1984 ; Tzavaras *et al.*, 1989).

Cette inhibition est levée si on ajoute ultérieurement du cytosol de foie. Il existe donc probablement des facteurs transcriptionnels cytosoliques dont la présence inhiberait l'expression de gènes stéroïdo-dépendant.

D'après Strähle *et al.* (1988), le gène CAT transfecté dans des cellules MCF-7 reste sensible à l'action des glucocorticoides si on remplace un des deux sites GRE situés en amont du site promoteur par des séquences d'ADN spécifiques pour d'autres facteurs de transcription comme NF-1 ou SP-1. Miksicek *et al.* (1987) ont identifié l'existence d'un facteur protéique liant la séquence TGGCA (séquence correspondant au site de liaison du facteur NF-1) au niveau de la séquence LTR de MMTV. Des mutations de cette séquence inhibent *in vitro* la liaison du facteur de transcription à son site NF-1 et abolissent *in vivo* la stimulation par les glucocorticoides du gène de la CAT transfecté.

Dans la séquence 5' flanquante du gène de la T0, Schüle *et al.* (1988) retrouvent une séquence de type CACCC. Cette séquence, située dans le site promoteur du gène de la globine (Dierks *et al.*, 1983) lie un facteur protéique et semble aussi impliquée dans la régulation de l'expression du gène de la T0 par les glucocorticoides. Cette séquence associée à un GRE de MMTV semble stimuler de manière coopérative l'expression de l'activité CAT une fois transfecté dans ces fibroblastes

de souris LtK-. Cette action coopérative est indépendante de l'ordre et de l'orientation de chacun des éléments. Cependant, un stéréo-alignement est nécessaire pour obtenir une induction maximale.

Ces résultats montrent donc que la régulation des gènes par les récepteurs stéroïdiens est modulée par d'autres facteurs tissu spécifiques. D'après Schüle *et al.* (1988) cette action coopérative ferait intervenir des interactions protéine-protéine. La plupart des facteurs de transcription sont organisés en domaines comme nous l'avons vu précédemment. Outre le domaine liant l'ADN et éventuellement, pour les récepteurs stéroïdiens, le domaine liant l'hormone, on a pu identifier un ou plusieurs domaines nécessaires au fonctionnement du facteur nucléaire (pour revue : Beato, 1989 ; Mitchell et Tjian, 1989).

Ce site encore appelé domaine transcriptionnel d'activation) pourrait être impliqué dans les liaisons protéine-protéine. De tels domaines ont été décrits pour le récepteur des glucocorticoides (Hollenberg et Evans, 1988), celui des oestrogènes (Lees, J.A. *et al.*, 1989) et celui de la progestérone (Dobson *et al.*, 1989). Il semble que ce domaine facilite l'initiation de la transcription de façon peu spécifique (Ptashne, 1988 ; Mitchell et Tjian, 1989).

Tout ceci laisse donc supposer l'existence de facteurs tissu- ou cellule-spécifiques associés au récepteur stéroïdien et modulant la stimulation hormonale. Si cette hypothèse permet d'expliquer les différences de réponse entre deux types cellulaires à une même stimulation hormonale, peu d'arguments permettent d'expliquer comment une cellule répond sélectivement aux glucocorticoides ou à la progestérone alors que les récepteurs de ces deux stéroïdes présentent

des SRE très proches, voire identiques. Le gène CAT transfecté dans des cellules Fto2B-3 (cellules d'hépatome n'exprimant que le gène du récepteur des glucocorticoides) rend le gène glucocortico-dépendant s'il possède en amont de son site promoteur la séquence GRE (Strähle *et al.*, 1989). La transfection dans cette cellule du gène du récepteur de la progestérone rend le gène CAT dépendant de ce stéroïde. Il semble donc que ce soit seulement l'absence de récepteur de la progestérone qui empêche cette hormone de stimuler le gène. Il ne s'agit probablement que d'un mécanisme particulier puisque certaines cellules expriment les deux récepteurs, mais ne sont sensibles qu'à une des deux hormones (Ballard *et al.*, 1974 ; Beato, 1987).

En conclusion, la régulation des gènes par les stéroïdes est un mécanisme complexe faisant intervenir

- d'une part un phénomène de reconnaissance spécifique d'un récepteur sur une séquence d'ADN (SRE) pouvant fixer différents récepteurs (GR ou PR),
- et d'autre part, un certain nombre de facteurs de transcription qui peuvent stimuler indépendamment ou ensemble un même gène (De Franco *et al.*, 1986 ; Speck et Baltimore, 1987).

## 5 - LES MODELES DE LA REGULATION DES GENES PAR LES STEROIDES

L'interaction entre le récepteur et son SRE représente la première étape d'une chaîne d'événements aboutissant à l'expression d'un gène. Il semble que le récepteur des oestrogènes ou celui des glucocorticoides puisse former directement en association avec les

protéines liant la boîte TATA, un complexe transcriptionnel (Strahle *et al.*, 1988).

Cependant, la plupart du temps ces SRE sont éloignés du site de fixation de la RNA polymérase II et doivent probablement agir à distance. De plus, chez les eucaryotes, l'expression du gène ne pourra être réalisée que dans la chromatine active. Un des premiers rôles du récepteur est sans doute la participation avec d'autres facteurs nucléaires à la modification de la structure quaternaire de la chromatine, comme cela a été montré par l'apparition de sites d'hypersensibilité à la DNase I induits par les stéroïdes (Scheidereit *et al.*, 1983 ; Fritton *et al.*, 1984).

Dans un deuxième temps, le complexe DNA-récepteur induit est impliqué dans la régulation proprement dite. Plusieurs mécanismes ont été proposés et tous aboutissent à une modification de la structure de l'ADN. Pour Karin *et al.* (1984), l'interaction protéine-ADN aboutirait à une modification de la structure de la double hélice transmettant ainsi le signal à distance. Le rôle du récepteur stéroïdien se limiterait à créer un environnement favorable pour la fixation de la RNA polymérase II (Payvar *et al.*, 1983 ; Kirsch *et al.*, 1986).

Les travaux actuels semblent de plus en plus impliquer une régulation multifactorielle dans laquelle le récepteur stéroïdien n'est qu'un élément de la chaîne de régulation (Beato, 1988 ; 1989 ; Theveny *et al.*, 1987 ; Petersen *et al.*, 1988 ; Ham *et al.*, 1988). Dans ces modèles, les séquences d'ADN serviraient en tant que support à des protéines nucléaires présentant des interactions entre elles. Dans cette

hypothèse, les modifications de structure de l'ADN seraient induites par l'établissement de liaison protéine-protéine. Ainsi un récepteur ayant lié un HRE pourrait se dimériser avec un autre récepteur fixé à un HRE situé plus en amont ou en aval du site enhancer. L'ADN compris entre ces deux HRE présenterait alors un repliement (Theveny *et al.*, 1987). Cette boucle observée en microscopie électronique peut aboutir à un complexe favorisant la fixation d'un facteur de transcription sur son site ADN (Figure 15a) ou pourrait intervenir directement dans la formation d'un complexe transcriptionnel (Figure 15b). Ce modèle obtenu à partir des séquences régulatrices pour le gène de l'utéroglobine et du MMTV n'est probablement pas unique puisque la plupart des gènes possèdent plusieurs GRE (voir tableau VI).

L'existence d'une boucle d'ADN créée par une interaction protéique a aussi été proposée par Cordingley (1987). Elle fait ici intervenir une interaction entre le récepteur des glucocorticoides et le facteur NF1.

L'existence d'interaction protéine-protéine semble jouer un rôle majeur dans l'induction de la transcription. Ce mécanisme, et particulièrement la création de boucles d'ADN est retrouvé pour de nombreux gènes. Pour Ptashne (1986), l'induction de boucles est probablement commune à toutes les protéines régulatrices.

En fait, les modèles proposés ne donnent qu'une vue très manichéenne de l'expression des gènes, ceux-ci s'exprimant ou ne s'exprimant pas. Peu de résultats précis peuvent expliquer les variations d'intensité de réponse consécutives à une stimulation hormonale. Cette régulation pourrait avoir lieu à plusieurs niveaux et

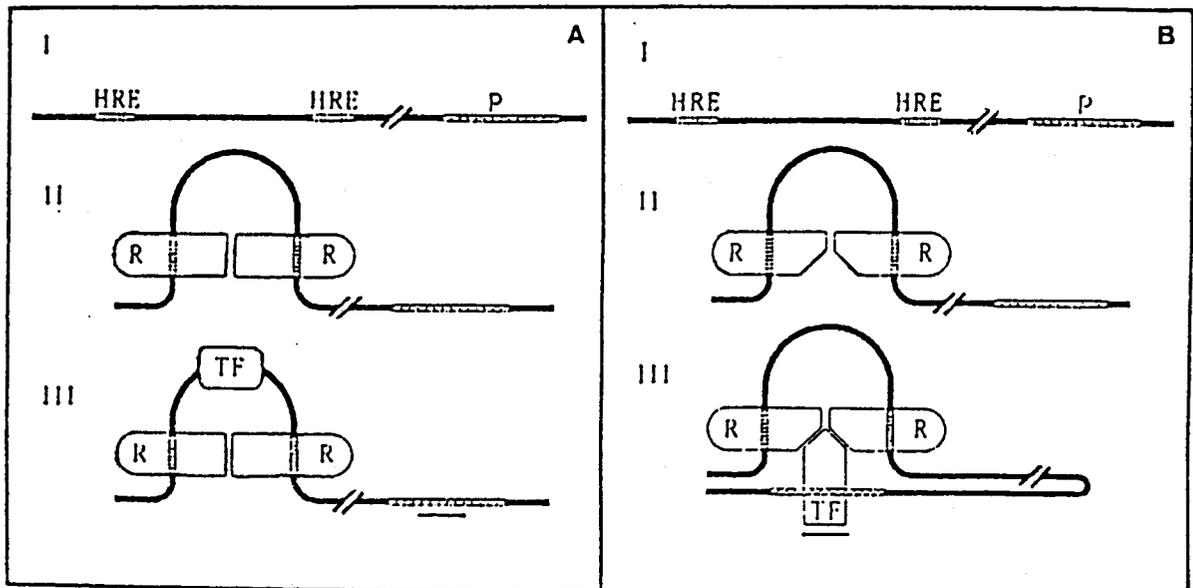


Figure 15 - Modèle d'interaction entre HRE , le récepteur et d'autres facteurs de transcription (Theveny et al., 1987)

A : hypothèse de repliement favorisant la fixation d'un facteur de transcription

B : hypothèse d'une interaction directe

si on observe exclusivement au niveau du site ADN trois niveaux pourraient intervenir

(1) la structure du SRE pourrait être impliquée.

Ainsi, plus la séquence GRE est éloignée de la séquence consensus GGTACANNNTGTTCT, plus la liaison récepteur-ADN est faible et moins l'induction du gène sera marquée. Une telle hypothèse a été proposée par Petersen *et al.* (1988) pour expliquer la faible induction obtenue à partir des séquences GRE du site promoteur de la PEPCK.

(2) la structure des régions flanquant les GRE pourrait aussi intervenir dans la stabilisation du complexe et augmenter l'induction du gène (Chalepakis *et al.*, 1988).

(3) la multiplicité des séquences GRE au niveau du gène pourrait diminuer le taux d'occupation du GRE "fonctionnel" et ainsi diminuer l'induction de la réponse.

Toutes ces données montrent la complexité de la régulation des gènes par les glucocorticoides au niveau de la transcription. Cette modulation est en fait associée à d'autres régulations situées en amont (expression ou non expression du récepteur) ou en aval de la transcription. Ainsi, les glucocorticoides pourront aussi affecter les phénomènes d'épissages (Cote et Gagel, 1986), le transfert de l'ARN au cytoplasme (Nevins *et al.*, 1983) ou la stabilité de l'ARN messager (Guertin *et al.*, 1983 ; Fulton *et al.*, 1983). Nous voyons donc que l'action des glucocorticoides au niveau cellulaire s'élucide de plus en plus pour chaque étape, mais qu'il est encore impossible de faire une synthèse cohérente de tous les faits observés de la liaison de l'hormone au récepteur jusqu'à l'expression finale du message hormonal.

## D - CONCLUSION

Par cette revue générale nous avons cherché à montrer la complexité des mécanismes de régulation de l'expression des gènes par les stéroïdes ainsi que l'importance des connaissances acquises depuis peu de temps. A côté de l'étude précise concernant chaque étape, l'intérêt de ce sujet peut se porter vers deux autres axes :

- D'une part, la détection de nouveaux récepteurs identifiés par leur cDNA. Ceci a déjà abouti à l'isolement du récepteur de l'acide rétinoïque (Giguère *et al.*, 1987). L'intérêt de ce récepteur est particulièrement important car l'acide rétinoïque est impliqué dans les mécanismes de différenciation et dans le développement des cellules.
- D'autre part, la compréhension des mécanismes physiopathologiques dans lesquels sont impliqués les récepteurs. Des modèles expérimentaux ont pu être réalisés grâce à la sélection de cellules de lymphomes de souris S49 ou de cellules HTC résistantes aux glucocorticoides (Sibley *et Tomkins*, 1974). Trois clones cellulaires ont été identifiés (Northrop *et al.*, 1985, 1986).

- les cellules r<sup>-</sup> qui ne possèdent pas ou très peu de récepteur
- les cellules nt<sup>-</sup> dont le taux de récepteur est normal, mais le transfert du récepteur dans le noyau est fortement diminué
- les cellules nt<sup>i</sup> qui présentent un récepteur tronqué probablement par mutation antisens

(Northrop *et al.*, 1985). Ce récepteur semble présenter une affinité augmentée pour l'ADN.

D'un point de vue pathologie, différentes anomalies ont pu expliquer les résistances aux glucocorticoides. En fait, une mutation peut altérer le fonctionnement du récepteur et il est possible d'entrevoir différents niveaux de mutations pouvant expliquer des pathologies congénitales.

- soit le récepteur ne lie pas ou moins bien l'hormone.

Vingerhoeds *et al.* (1976) et Chrousos *et al.* (1982) rapportent ainsi l'existence d'une résistance primaire au cortisol. Celle-ci semble liée à un récepteur anormal ayant peu d'affinité pour son stéroïde. De même la substitution d'une valine située dans le site de liaison à l'hormone du récepteur des oestrogènes aboutit à une baisse d'affinité du récepteur pour son stéroïde (Tora *et al.*, 1989).

- soit le récepteur lie l'hormone, mais ne peut reconnaître son site ADN. Une telle observation a été faite par Nawata *et al.* (1987). Le patient présente une résistance aux glucocorticoides, avec hypercortisolisme mais sans syndrome de Cushing clinique. Le taux de transformation du récepteur semble effondré et la translocation nucléaire abaissée alors que le taux de récepteur est normal. Des cas de rachitisme vitamino-résistant à la 1,25 diOH vitamine D<sub>3</sub> ont aussi été attribués à une baisse d'affinité du récepteur de la vitamine D<sub>3</sub> pour son site ADN. Une anomalie a pu être identifiée et a objectivé des

mutations touchant les acides aminés d'un des deux doigts à zinc du récepteur (Hughes *et al.*, 1988).

- soit enfin, le récepteur ne lie ni l'hormone, ni l'ADN. Ce mécanisme a été proposé dans le cas du pseudohermaphrodisme masculin chez des sujets ne possédant pas de liaison hormone-récepteur et une délétion du domaine de liaison à l'ADN du gène codant pour le récepteur de la testostérone (Brown *et al.*, 1988). Cette équipe a identifié l'anomalie par Southern-blots. Cependant, les moyens d'étude dans ce cas sont limités, car le récepteur est fortement modifié. Il est ainsi difficile de différencier une absence complète d'une anomalie du récepteur. L'apport du PCR (Polymérase Chain Reaction) (pour revue, voir Kahn, 1988) et des anticorps antirécepteur peut aider à cette différenciation.

Comme nous le voyons, la pathologie du récepteur peut expliquer dans certains cas les pathologies hormono-résistantes congénitales. Une telle étude pourrait en outre permettre de comprendre le mécanisme des résistances acquises aux stéroïdes existant dans certaines pathologies. Déjà, Hill *et al.* (1989) ont pu montrer que l'absence de récepteur des oestrogènes dans le cancer du sein était lié à un polymorphisme du gène au niveau du site de liaison à l'ADN ou au stéroïde.

Pour pouvoir aborder tous les aspects de ce sujet très vaste, il est nécessaire de maîtriser plusieurs outils en même temps et qui sont : (1) la technique de dosage hormone-récepteur,  
(2) celle du dosage de la liaison récepteur-ADN,

(3) les moyens d'identifier le récepteur par des anticorps ou par des techniques plus sensibles comme le PCR. Une telle étude a pu être menée dans le cas du récepteur de l'insuline (Kobayashi *et al.*, 1988) et celui de la vitamine D (Hughes *et al.*, 1988) et a permis de mettre en évidence l'existence d'anomalie des récepteurs.

**RESULTATS**

## INTRODUCTION

Depuis notre arrivée au laboratoire, nous nous sommes intéressé à la caractérisation du récepteur transformé. En fait, le sujet présente plusieurs facettes :

- (1) le récepteur transformé et sa caractérisation
- (2) le récepteur transformé, sa liaison au stéroïde et
- (3) le récepteur transformé et sa liaison à l'ADN

Le premier sujet a été abondamment abordé par de nombreux auteurs. Notre contribution a été d'identifier les variations de point isoélectrique du récepteur des glucocorticoides de foie de rat au cours de leur transformation (Danzé *et al.*, 1987) et de caractériser le complexe transformé lié à un agoniste ou à un antagoniste comme le RU 486 (Sablonnière *et al.*, 1986).

Le deuxième aspect du problème a été nettement moins bien étudié, les résultats concernant ce sujet étant la plupart du temps discordants. Nous avons abordé cet aspect du problème grâce à la mise au point d'une technique permettant l'échange du stéroïde.

Le troisième sujet fait actuellement l'objet de nombreuses recherches et correspond en grande partie à notre revue bibliographique. Notre contribution à ce sujet s'est orientée différemment des autres auteurs. Nous avons en effet utilisé une sonde synthétique correspondant au GRE pour doser le récepteur des glucocorticoides transformé. De plus, nous avons cherché à étudier l'interaction entre le peptide correspondant au doigt à zinc et cette séquence d'ADN.

Dans cette revue de nos résultats, nous parlerons des deuxième et troisième sujets puisque le premier a fait l'objet en 1986 de notre DERBH.

## PARTIE I

### LE RECEPTEUR TRANSFORME : CARACTERISATION PAR LE STEROIDE

De nombreuses études ont cherché à montrer quel était le mécanisme de la transformation au niveau de la protéine. Ceci a permis d'établir un certain nombre de modèles hypothétiques, qui tous font intervenir une dissociation d'un hétéropolymère en monomère. Cependant, deux modèles s'opposent. Si le modèle de Vedeckis se confirme, le récepteur transformé lié au stéroïde doit être en équilibre avec le même récepteur libre. Dans les autres modèles, le récepteur doit subir un cycle avant de pouvoir de nouveau être dans son état natif.

Peu de travaux se sont intéressés aux conséquences de la transformation au niveau du couple stéroïde-récepteur. Trois cas de figure peuvent se présenter à nous :

(1) le stéroïde garde la même affinité pour son récepteur après transformation,

(2) celle-ci augmente ou

(3) diminue.

Pour Moguilewski et Philibert (1984) et pour Schmidt *et al.* (1985), les complexes transformés seraient plus stables que les complexes non transformés. Les mêmes études réalisées sur des complexes antagoniste-récepteur donnent des résultats très contradictoires (Bourgeois *et al.*, 1984 ; Schmidt, 1986).

La disparition de toute affinité du récepteur envers le stéroïde éliminerait le modèle à l'équilibre de Vedeckis. Il semble donc intéressant de savoir si le récepteur transformé est capable de lier le stéroïde. La première condition nécessaire à cette étude est la purification du récepteur sous forme transformée. Cette purification doit nous permettre d'obtenir un récepteur transformé à homogénéité dans un milieu dont la composition doit être proche de la composition initiale du cytosol. La transformation nécessitant la présence de l'hormone, étudier l'affinité du récepteur transformé pour son stéroïde nécessitera la mise au point de techniques d'échange n'interférant pas avec le but de nos expériences.

#### A - PREPARATION DU RECEPTEUR TRANSFORME

De nombreuses équipes ont cherché à purifier le récepteur sous sa forme transformée et ont essentiellement utilisé des techniques comme la chromatographie sur DNA-cellulose (Eisen et Glinsmann, 1976, 1978), phosphocellulose (Colman et Feigelson, 1976) ou d'autres supports comme l'héparine (Hackey et Pratt, 1971). Le principe de la purification la plus performante semble être la succession de chromatographies d'échanges d'ions, le récepteur étant soit exclu, soit retenu et élué de la colonne (protocole type Westphal et Beato, 1980).

Dans notre cas, le taux de purification du récepteur par rapport aux autres protéines ne nous importait que peu. C'est pourquoi nous avons utilisé une technique de chromatographie sur résine polycationique retenant la forme non transformée et excluant la forme transformée. Comme nous le voyons figure 16, le récepteur transformé est élué de la DEAE Trisacryl à une force ionique de 60 à 80 mM de NaCl.

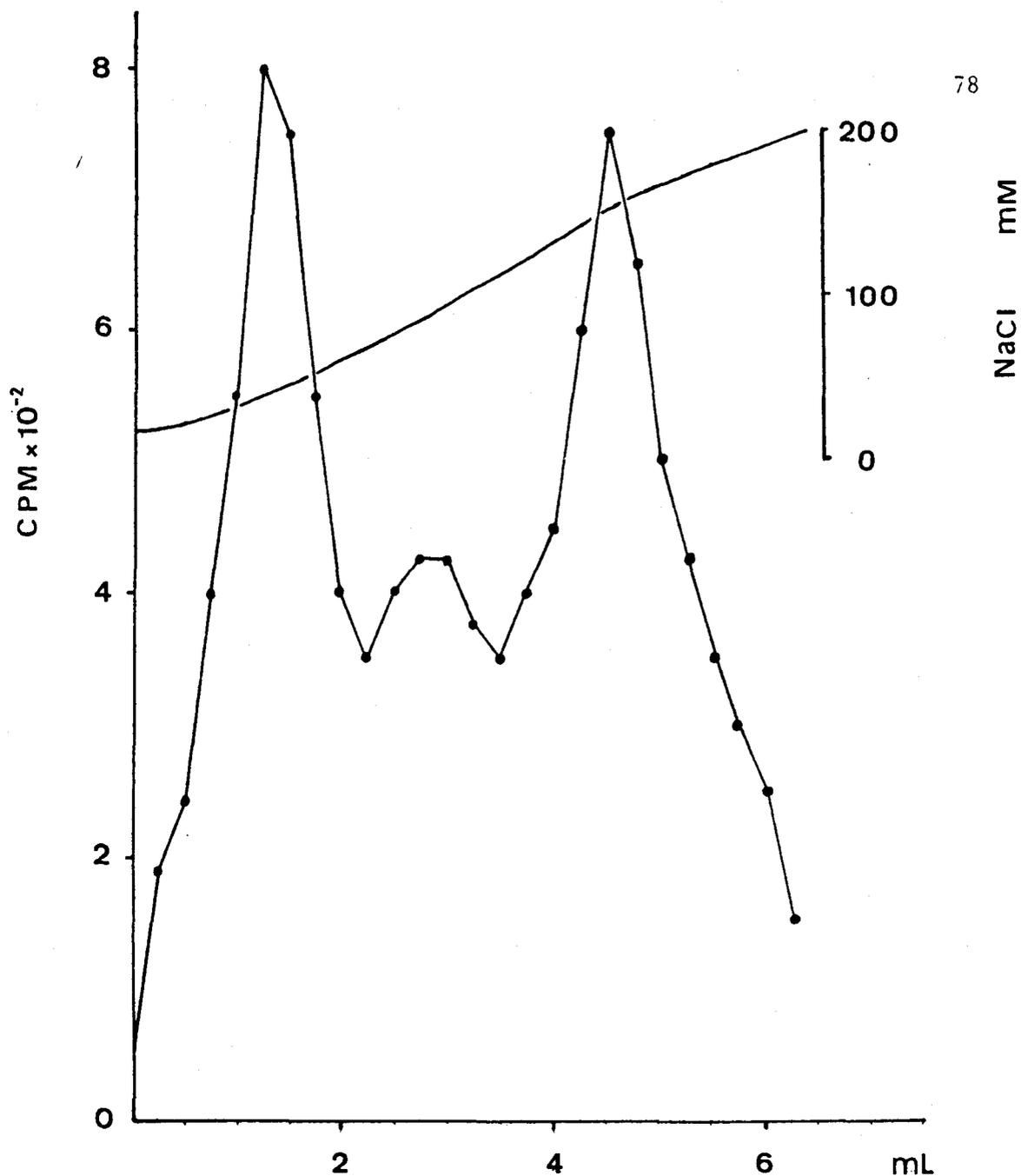


Figure 16 - Chromatographie sur DEAE-Trisacryl du récepteur cytosolique des glucocorticoïdes.

Après incubation une nuit avec 30 nM de dexaméthasone tritiée, le cytosol de foie de rat est chauffé à 25°C pendant 30 minutes. Le cytosol est ensuite déposé sur la colonne (1 cm x 3) de DEAE-Trisacryl préalablement équilibrée dans un tampon Tris 20 mM, EDTA 1 mM, mercaptoéthanol 10 mM, NaCl 20 mM pH 7,4 à un débit de 0,5 ml/min. La colonne est ensuite éluée par un gradient de NaCl et des fractions de 200 µl sont collectées. 100 µl servent au dosage du récepteur par comptage après addition de scintillateur. Le reste est utilisé pour doser la concentration en NaCl par photométrie de flamme.

En standardisant les manipulations, il a été possible de diminuer fortement le volume de la colonne de DEAE-Trisacryl. Ceci a permis de limiter au maximum la dilution consécutive à la chromatographie. Dans le protocole que nous avons couramment utilisé, les volumes de DEAE-Trisacryl étaient de 4 à 5 ml pour 1 à 2 ml de cytosol déposé. Ceci a permis l'obtention d'une fraction exclue, contenant le récepteur transformé, n'ayant pas une dilution supérieure à 25 % du cytosol initial (d'après la concentration en protéines).

Ce problème de dilution est particulièrement important lorsque le récepteur à purifier est préalablement incubé avec le RU 486, car le taux de transformation par chauffage n'excède pas 15 à 20 % des récepteurs totaux. En nous inspirant des techniques décrites par Maniatis *et al.* (1982), nous avons essayé de purifier le récepteur suivant le protocole :

- minicolonne de 1 ml DEAE-Trisacryl équilibrée et laissée sans tampon
- centrifugation 90 sec à 1500 tours/min
- dépôt du cytosol (100  $\mu$ l)
- deuxième centrifugation 90 sec à 1500 tours/min

Cette méthode fonctionne très bien pour les supports de gel-filtration comme l'ACA 22, l'ACA 202 ou GF05 pour de simples dessalages mais n'est pas réalisable pour les chromatographies d'échange d'ions. En effet, même à une force ionique de 60 mM de NaCl, une partie des complexes non transformés était éluée avec les récepteurs transformés.

	Récepteur non transformé (%)	Récepteur transformé (%)	Mérorécepteur (%)
Chromatographie sur minicolonne	6,3 ( $\pm$ 2,4)	90,6 ( $\pm$ 1,6)	4,1 ( $\pm$ 1,1)
Chromatographie HPSEC sur colonne TSK G4000	5 $\pm$ (3)	91,7 ( $\pm$ 6,2)	-

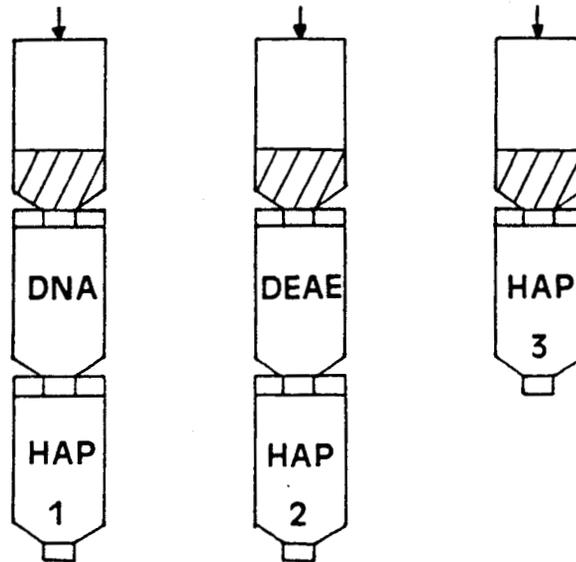
Les valeurs représentent la moyenne de 6 expérimentations dans lesquelles le récepteur cytosolique était initialement incubé soit avec l'acétonide de triamcinolone, soit avec le RU 486.

TABLEAU III - Caractérisation du récepteur transformé homogène préparé par chromatographie sur DEAE-Trisacryl.

Nous avons donc utilisé l'élution traditionnelle par gravité, qui, bien qu'un peu plus longue et conduisant à des fractions plus diluées, donne d'excellents résultats sur le plan de l'homogénéité de la forme du récepteur obtenu. Comme nous le voyons sur le tableau III, celui-ci est sous forme transformée homogène à plus de 90 %.

Un autre avantage de notre technique de purification est l'obtention d'un récepteur transformé dans un tampon de faible force ionique. Ceci nous a permis d'étudier directement le taux de transformation du récepteur sur des critères DNA-cellulose.

Pour cela, nous avons utilisé une technique mise au point pour l'étude des variations de point isoélectrique du récepteur lors de la transformation (Danzé *et al.*, 1987) et dont nous rappellerons brièvement le principe (figure 17). Le complexe hormone-récepteur est analysé sur trois colonnes différentes caractérisées comme suit : la première est composée d'une colonne de DNA-Ultrogel montée en série avec une colonne d'hydroxylapatite, la deuxième d'une colonne de DEAE-Trisacryl montée en série avec une colonne d'hydroxylapatite, la troisième étant une colonne d'hydroxylapatite. Après dépôt du même volume de cytosol sur chaque système de colonne, celles-ci sont lavées dans le tampon d'équilibration pour éliminer le stéroïde libre, puis démontées et la radioactivité du gel d'hydroxyl-apatite comptée. Le récepteur transformé ayant été retenu par le DNA-Ultrogel, la radioactivité contenue dans le gel d'hydroxylapatite de la première colonne correspondra au récepteur non transformé et à une forme de dégradation du récepteur, appelée méréorécepteur. Le récepteur non transformé étant retenu par la DEAE-Trisacryl, la radioactivité de la deuxième colonne correspondra au



### Chromatographie sur minicolonnes

Figure 17 - Analyse des complexes hormone-récepteur par minicolonnes

L'estimation des différentes formes du récepteur est réalisée de la façon suivante :

- H1 : activité des complexes non transformés + mérorécepteur
- H2 : activité des complexes transformés + mérorécepteur
- H3 : activité globale
- H3-H1 : Activité des complexes transformés
- H3-H2 : Activité des complexes non transformés
- H1+H2-H3: mérorécepteur

récepteur transformé et au mérorécepteur alors que la troisième colonne nous donnera l'activité globale du récepteur. Par calcul il est donc possible de déterminer le pourcentage relatif de chacune des formes de récepteur, et ceci en utilisant une quantité très faible de cytosol.

Grâce à cette méthode, nous avons pu déterminer que le cytosol purifié par DEAE-Trisacryl présentant un taux de transformation de 90 % sur des critères DNA-cellulose, le taux de récepteur non transformé étant négligeable (Tableau III). Pour plus de simplicité, dans la suite du texte nous appellerons récepteur transformé purifié le récepteur purifié par cette technique d'échange d'ions.

#### B - MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'ECHANGE

L'étude de l'affinité d'un stéroïde pour le récepteur se fait par mesure des constantes d'association et dissociation (pour revue voir Formstecher, 1980). La constante d'association se calcule classiquement sur un récepteur non lié. Notre étude cherche à comparer les cinétiques d'association et de dissociation lorsque le récepteur est transformé ou non transformé. Si une transformation en l'absence de stéroïde a été décrite pour le récepteur de la progestérone (Yang *et al.*, 1982), il n'en est pas de même pour celui des glucocorticoides et toute étude d'affinité doit donc passer par un échange de stéroïde. Il faudra en effet incuber le récepteur cytosolique non transformé avant de le purifier sous forme transformée. Ensuite, les études d'affinité seront possibles par déplacement du stéroïde lié et essai d'échange avec un autre stéroïde. Lorsque le premier stéroïde est radioactif, il sera possible de faire des études de dissociation par échange avec un

deuxième stéroïde froid. Inversement, l'incubation initiale avec un stéroïde non radioactif permettra l'étude de l'association.

Plusieurs équipes ont développé des techniques d'échange de stéroïde, essentiellement à des fins de dosage du récepteur chez l'être humain ou chez les animaux non surrenalectomisés (la surrenalectomie provoque une déplétion du stéroïde endogène qui a pour conséquence le maintien du récepteur des glucocorticoides au niveau du cytoplasme et augmente le taux de récepteur). Rosner et Polimeni (1978) proposent une technique fondée sur un échange entre la corticostérone et la dexaméthasone en présence de dithiothréitol, agent réducteur stabilisant le récepteur et à 4°C. Cette technique longue a été critiquée par le groupe de Kalimi qui estime que dans ce cas, seulement 50 % des sites sont échangés. En 1981, cette équipe (Barneji et Kalimi, 1981) propose l'utilisation d'agents interagissant avec les groupements thiol. L'incubation de cytosol en présence de pOH mercuribenzoate provoque la dissociation des complexes préformés. Le récepteur est associé avec le deuxième stéroïde après addition de dithiothréitol. En fait, ces auteurs proposent actuellement une méthode associant le molybdate, le dithiothréitol et éventuellement un chauffage à 25°C (Hubbard et Kalimi, 1982 ; Kalimi et Hubbard, 1983 ; Hubbard *et al.*, 1984).

Parmi l'ensemble de ces méthodes, aucune ne semblait convenir. De plus, il nous paraissait intéressant de pouvoir échanger n'importe quel stéroïde sans avoir à tenir compte de leur affinité relative. C'est pourquoi nous avons cherché à mettre au point une technique d'échange de stéroïde rapide et quantitative.

Les agents chimiques comme l'acétonitrile sont connus pour augmenter fortement la dissociation des complexes Ag-Ac (Hodgkinson et Lowry, 1982 ; Lewis et Elder, 1985). Une telle observation a été mise à profit au laboratoire pour purifier un Anticorps antistéroïde (Formstecher *et al.*, 1986). Il semblait donc probable que l'acétonitrile accélère la dissociation du complexe hormone-récepteur. Cependant, pour que ce solvant organique soit un bon candidat pour favoriser les échanges, il est nécessaire que la cinétique d'association obtenue en sa présence ne soit pas perturbée. Idéalement, un bon agent favorisant les échanges de stéroïdes devra associer les trois conditions : accélération de la dissociation hormone-récepteur, accélération de la réassociation du stéroïde avec le récepteur, absence d'effets dénaturants sur le récepteur.

#### 1 - STABILITE DU RECEPTEUR EN PRESENCE D'ACETONITRILE

Avant de déterminer le rôle de l'acétonitrile sur l'association ou la dissociation du stéroïde, il est donc nécessaire d'étudier la stabilité du récepteur en présence de concentrations variables en acétonitrile.

Comme nous le voyons sur la figure 18, les complexes hormone-récepteur non transformés cytosoliques ou partiellement purifiés restent stables pendant environ 1 heure en présence de 8 % d'acétonitrile. Cependant, l'addition d'acétonitrile doit se faire sous agitation pour éviter une dissociation transitoire des complexes liée probablement à une répartition hétérogène de l'acétonitrile.

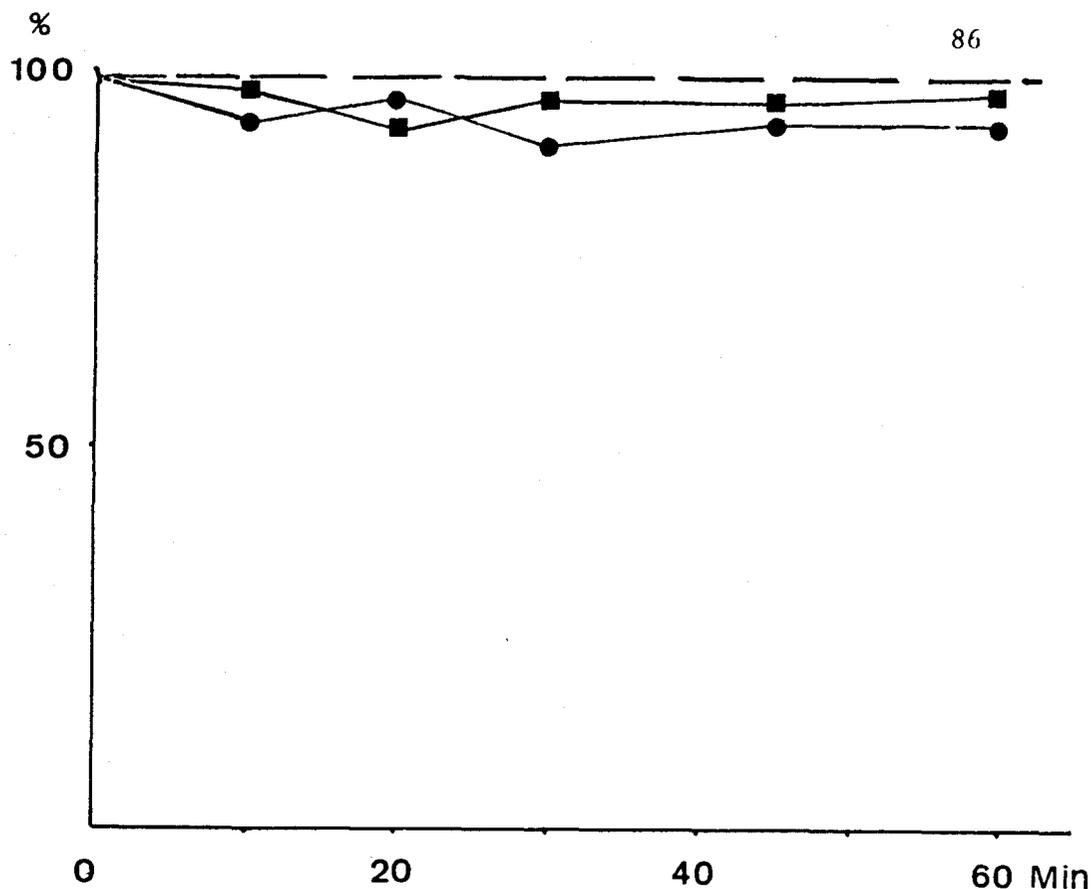


Figure 18 - Stabilité des complexes TA-récepteur en présence ( ● ) ou en absence ( ■ ) de 8 % acétonitrile.

Après incubation avec 30 nM acétonide de triamcinolone tritié le cytosol est séparé en deux échantillons. Le premier est additionné de 8 % acétonitrile, le deuxième de 8 % du tampon d'origine (Tris 20 mM, NaCl 60 mM, EDTA 1 mM, Glycérol 10 %, pH 7,4). Des échantillons sont alors prélevés dans chacun des tubes aux temps indiqués sur la figure et sont analysés par la technique de charbon dextran (Rousseau *et al.*, 1973) La liaison non spécifique est déterminée par le même protocole réalisé à partir du même cytosol mais incubé en présence d'un excès 1000x en hormone froide.

## 2 - MODIFICATION DES CARACTERISTIQUES D'ASSOCIATION ET DE DISSOCIATION

Le tableau IV donne les modifications des constantes de vitesse d'association et de dissociation du récepteur partiellement purifié par précipitation au sulfate de protamine. Cette préparation se fait en présence de molybdate de sodium. Cette cinétique n'intéresse donc que la forme non transformée du récepteur. Comme nous pouvons le voir, l'augmentation du taux d'acétonitrile jusque 8 % aboutit à une augmentation importante de la constante de vitesse de dissociation du  $k_d$  d'environ 140 fois et à une augmentation relativement plus faible de la constante d'association (environ 6 fois). Etant donné qu'en plus le taux de récepteur échangé représente 75 à 85 % des récepteurs totaux, il apparaît que la simple addition d'acétonitrile 8% est une bonne technique pour échanger rapidement le stéroïde.

La modification des cinétiques induite par la présence de 8 % d'acétonitrile est nettement moins marquée pour le récepteur cytosolique (baisse de la demi-vie d'environ 20 fois). Cette différence est probablement liée à la composition du tampon (la concentration en sels contenu dans l'extrait de sulfate de protamine est très élevée), et aussi à la purification du récepteur. Par contre, le récepteur purifié par sulfate de protamine est stabilisé par la présence de molybdate ce qui peut expliquer qu'en absence d'acétonitrile sa stabilité est plus importante que celle du récepteur cytosolique préparé en tampon de faible force ionique sans molybdate.

Acétonitrile	$k_a \times 10^{-5}$ ( $M^{-1}.sec^{-1}$ )	$k_a$ ( $sec^{-1}$ )	demi-vie
0	0,16	6,88	28 heures
4	n.d.	7,40	26 heures
6	n.d.	32,10	6 heures
8	1	963	12 minutes

n.d. non déterminé

TABLEAU IV - Variation de la demi-vie des complexes hormone-récepteur en fonction du taux d'acétonitrile.

Cette détermination a été faite à partir d'extrait de sulfate de protamine. La détermination du  $k_a$  est obtenue par l'incubation à 30 nM du récepteur avec l'acétonide de triamcinolone en présence ou en absence d'un excès 1000 fois de stéroïde non marqué, suivie d'un dosage de la radioactivité liée par la technique de charbon-dextran (Rousseau *et al.*, 1973) à des temps allant de 0 à 48 heures.

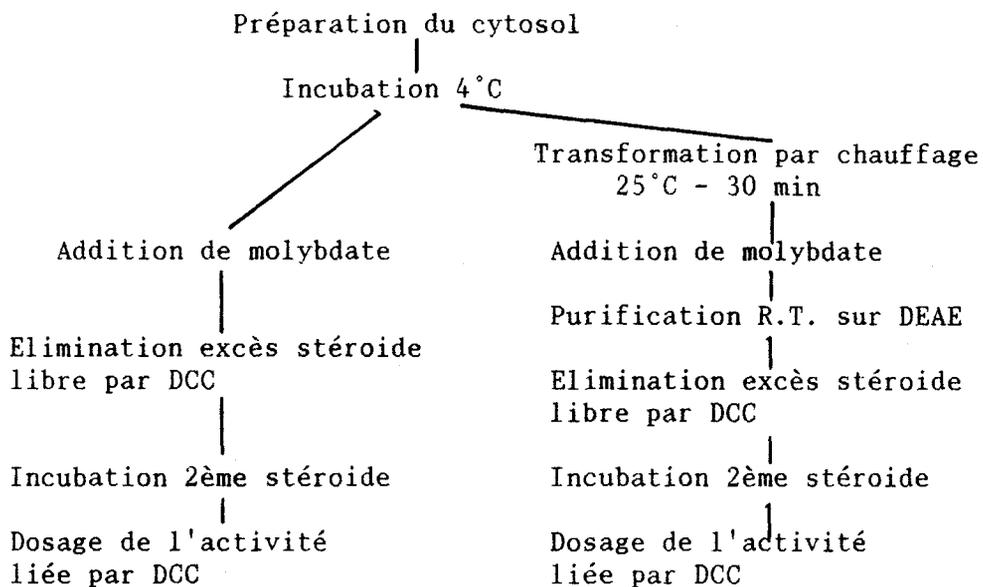
Le  $k_a$  est déterminé d'après le protocole suivant : incubation une nuit du sulfate de protamine avec 30 nM de stéroïde radioactif, élimination du stéroïde non lié par charbon-dextran, réincubation du récepteur avec 30 nM du même stéroïde non marqué et dosage de la décroissance de la radioactivité liée. Chaque détermination du  $k_a$  ou de  $k_a$  s'est faite en présence de 0, 4, 6, 8 % d'acétonitrile.

La technique de préparation du récepteur transformé homogène ayant été mise au point sur cytosol, les résultats suivants ont été obtenus sur le même milieu.

## C - COMPARAISON DES CINÉTIQUES D'ÉCHANGE

### 1 - PRESENCE D'UNE LIAISON ARTEFACTUELLE

Pour comparer les cinétiques d'échange de stéroïde entre le récepteur non transformé et le récepteur transformé nous avons opté pour le protocole suivant :



La première étape d'incubation à 30 nM du stéroïde permet de saturer l'ensemble des sites récepteur. La durée d'incubation du cytosol avec le stéroïde est importante. En effet, il est connu que les complexes hormone-récepteur se transforment spontanément même à 4°C. Nos premières expérimentations ont réalisé les échanges au bout de 4 heures d'incubation, temps suffisamment court pour saturer les sites et pour

limiter au maximum l'apparition de récepteur transformé. Cependant, des essais réalisés avec des périodes d'incubation d'environ 18 heures à 4°C, ont montré, que même en l'absence de molybdate de sodium, le taux de transformation restait inférieur à 10 %. L'apparition de cette transformation à 0°C est essentiellement le fait d'une force ionique élevée (Higgins *et al.*, 1973). Le fait que la force ionique du tampon utilisé dans l'échange ne dépasse pas 60 mM, explique probablement le faible taux de transformation observé. Au vu de ces résultats, tous les échanges ont été réalisés après une nuit d'incubation à 4°C.

Après transformation par chauffage à 25°C, 30 min, nous avons bloqué tout processus de transformation ultérieur par addition de 10 mM molybdate tant pour la fraction cytosolique non chauffée que celle chauffée. Cette dernière est secondairement purifiée par chromatographie sur DEAE TrisAcryl. Avant addition du deuxième stéroïde, l'excès du premier stéroïde non lié au récepteur est éliminé dans les deux cas par la technique du charbon-dextran.

L'analyse de la cinétique d'échange du récepteur non transformé ne nous a posé aucun problème d'interprétation (voir paragraphe suivant). Il n'en a pas été de même pour le récepteur transformé purifié car l'incubation du cytosol avec le deuxième stéroïde montre une augmentation très importante mais transitoire du taux d'hormone liée détectée par la technique du charbon-dextran (figure 19A). De plus, cette liaison supplémentaire disparaît lorsqu'on met un excès 1000 fois du même stéroïde non radioactif.

Avant toute spéculation, nous avons cherché à déterminer l'origine de cette liaison. L'élimination du récepteur à partir d'un

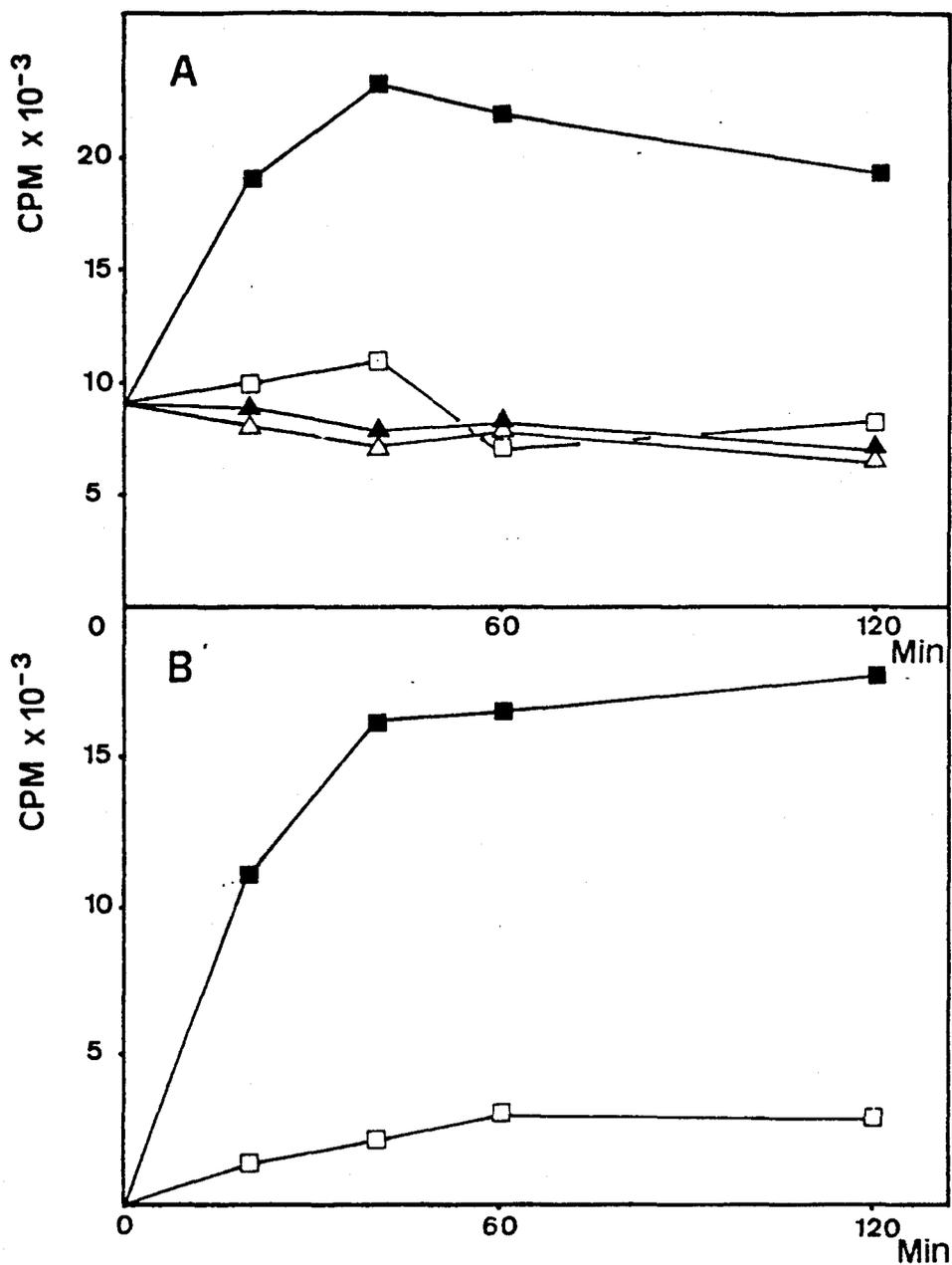


Figure 19 - Présence de sites de liaison ne correspondant pas au récepteur des glucocorticoïdes.

A : Après purification, le récepteur transformé homogène (voir appendice technique), incubé avec 30 nM de triamcinolone non marquée, est divisé en deux aliquotes. La première est immédiatement réincubée avec 60 nM de triamcinolone radioactif en présence (—△) ou en absence (—▲) d'un excès 1000x du même stéroïde froid. Après élimination de l'excès de stéroïde par charbon dextran (Rousseau *et al.*, 1973), le deuxième échantillon est incubé de la même façon (—■ et —□). La radioactivité liée est ensuite dosée pour chaque échantillon aux temps donnés sur la figure par charbon-Dextran. Les résultats de la figure sont indiqués après correction de volume.

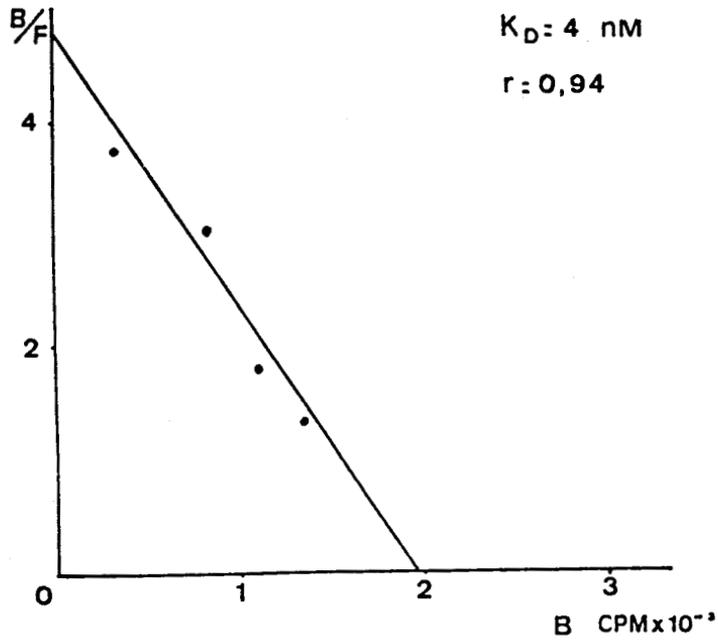
B : même protocole réalisé sur cytosol épuisé (voir appendice technique)

cytosol peut être très facilement réalisée par une incubation de ce cytosol avec un gel d'affinité préparé au laboratoire (Lustenberger, 1986 ; Idziorek *et al.*, 1985). Après deux incubations successives de cytosol avec ce gel, le taux de récepteur encore présent dans le cytosol était inférieur à 10 % de sa valeur d'origine. Ce cytosol dépleted en récepteur présente de nouveau une activité de liaison au stéroïde si on le soumet aux étapes nécessaires à l'échange du récepteur transformé purifié (c'est-à-dire : incubation avec le premier stéroïde, chauffage à 25°C pendant 30 min, passage sur DEAE TrisAcryl, charbon dextran, deuxième incubation, dosage des stéroïdes liés sur charbon dextran) (figure 19B). Cette molécule liant le stéroïde n'est donc pas le récepteur des glucocorticoides.

Nous avons cependant cherché à caractériser cette protéine. Par la réalisation d'un Scatchard, nous avons pu déterminer sa constante de dissociation à l'équilibre qui est d'environ  $4.10^{-9}$  M (figure 20A). Les études de compétition avec d'autres stéroïdes montrent que cette molécule possède aussi une affinité pour la progestérone et l'oestradiol.

Cette molécule lie le mésylate de dexaméthasone de façon covalente. Par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide, nous avons ainsi pu déterminer la taille de cette molécule qui est d'environ 35 KD (figure 20B).

Nous n'avons pas cherché à identifier cette protéine dont l'étude sort de notre thème de recherche. Il est probable que cette liaison soit peu, voire non spécifique, mais si tel n'était pas le cas on pourrait la rapprocher des nombreuses protéines liant les



93

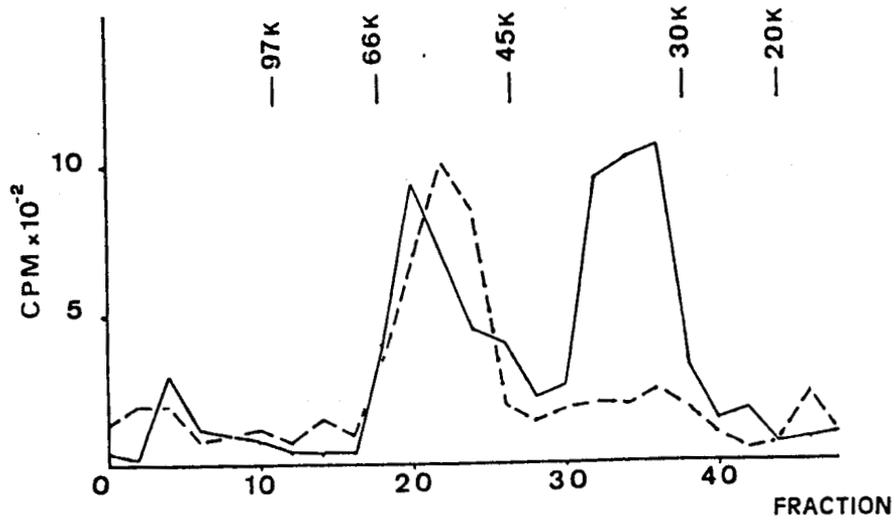


Figure 20 - Caractérisation du site surnuméraire

A : mesure du  $K_D$ . Après préparation de cytosol épuisé, celui-ci est purifié suivant le protocole adopté pour la purification de récepteur transformé homogène. Après charbon dextran, le  $K_D$  est déterminé par la technique de Scatchard (Scatchard, 1949)

B : Après préparation analogue, le cytosol épuisé est incubé avec le mésylate de dexaméthasone tritié 60 mM en présence (---) ou en absence (—) d'un excès de mésylate froid. Le complexe est alors soumis à une électrophorèse dénaturante en milieu SDS (voir appendice technique). Le gel est ensuite coupé en bande de 1 mm de large, digéré dans 200  $\mu$ l d' $H_2O_2$ . La radioactivité est ensuite comptée après addition de scintillateur.

glucocorticoides mais qui ne correspondent pas au récepteur (Amaral *et al.*, 1974 ; Cochet et Chambaz, 1976 ; Koch *et al.*, 1976).

Le fait de ne pas faire de charbon dextran avant l'échange avec le deuxième stéroïde abolit toute liaison artefactuelle. Comme le passage sur DEAE-TrisAcryl du récepteur transformé élimine 90 à 95 % du stéroïde libre, l'omission de l'étape charbon dextran n'apporte pas de changement dans la cinétique d'échange du récepteur transformé purifié.

## 2 - CINÉTIQUE D'ÉCHANGE AGONISTE-AGONISTE

Après tous ces résultats préliminaires, nous avons pu comparer les cinétiques d'échange de stéroïde suivant que le récepteur est transformé ou non. Afin d'éviter toute erreur d'interprétation, chaque expérience possédait les trois échanges suivants : (1) le stéroïde radioactif est échangé avec la même hormone non radioactive (témoin de dissociation) (2) le stéroïde non marqué est échangé avec le même stéroïde radioactif (témoin d'association) (3) le stéroïde radioactif est échangé avec lui-même. Ce troisième contrôle permet de vérifier la stabilité du taux de récepteurs au cours de l'échange.

### - *Echange de stéroïde pour le récepteur non transformé.*

Comme nous pouvons le voir sur la figure 21A, l'échange de stéroïde est fortement accéléré par la présence d'acétonitrile. Celui-ci semble maximal au bout de 30 à 40 min d'incubation. Un tel échange réalisé sur récepteur non transformé partiellement purifié par précipitation au sulfate de protamine montre une cinétique d'échange un peu plus rapide puisque la moitié du stéroïde est échangée en environ 15 min. Ceci est probablement lié à la composition du tampon ainsi qu'au

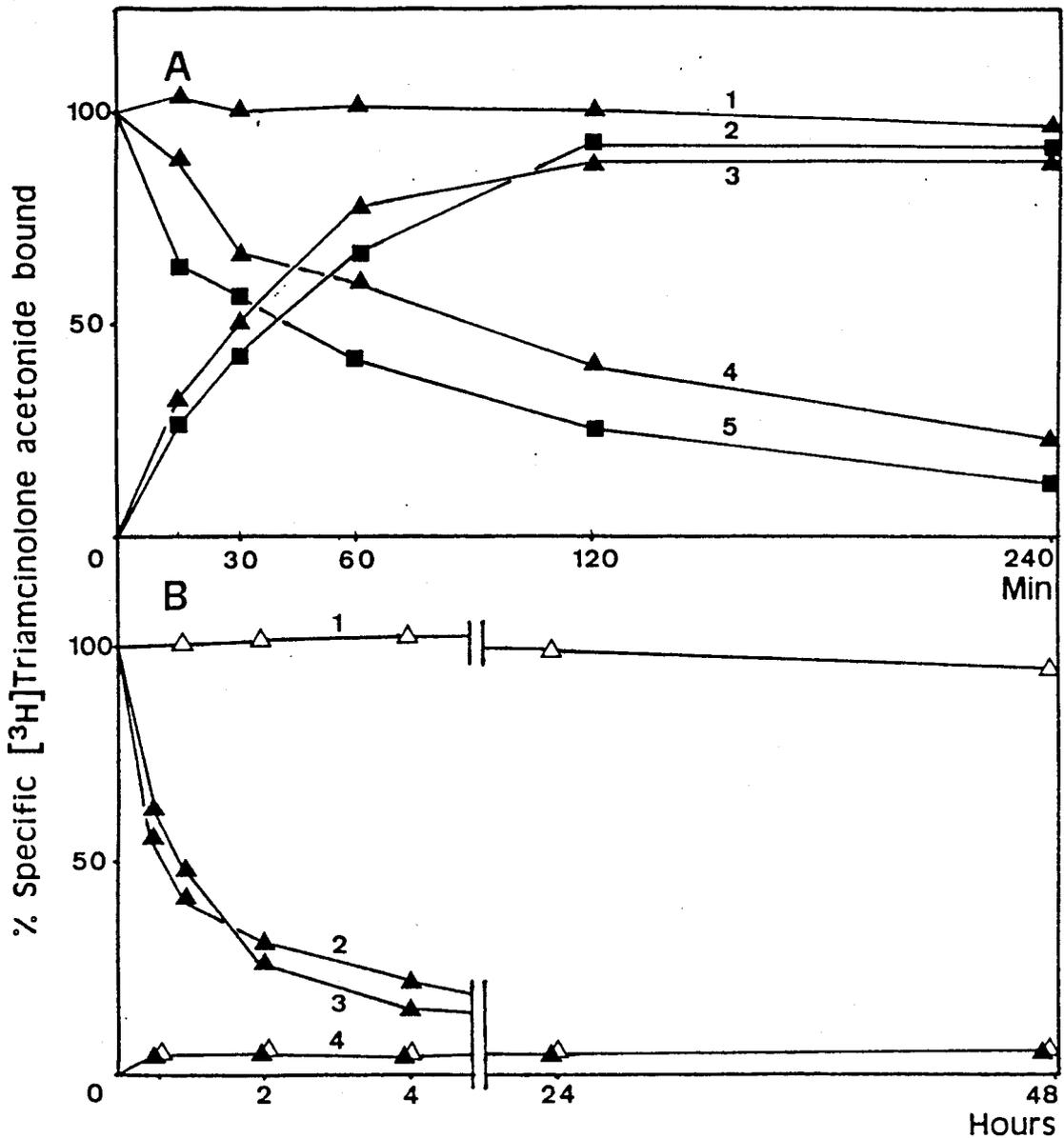


Figure 21 - Cinétique d'échange de stéroïde du récepteur en présence d'acétonitrile 8 %.

A : Le cytosol préparé en tampon Tris 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 60 mM  $\text{MoO}_4$  10 mM, glycérol 10 %, pH 7,4 est incubé avec la TA 30 nM tritiée (1 et 4) ou non radioactive (3). Après charbon dextran le cytosol est réincubé avec 60 nM de la même hormone radioactive (1 et 3) ou non marquée (4) et la radioactivité liée est dosée aux temps indiqués. La liaison spécifique est dosée par charbon dextran et les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité initialement liée. Ainsi la courbe 1 donne la stabilité des complexes, la courbe 3, l'association et la courbe 4 la dissociation des complexes TA-récepteur non transformés partiellement purifiés par précipitation au sulfate de protamine (2-5)

B : Les complexes transformés homogènes incubés avec la TA non marquée (4) ou radioactive (1, 2, 3) sont échangés comme précédemment décrit avec le stéroïde radioactif (2, 4) ou non radioactif (3) en présence (▲) ou en absence (△) de 8 % d'acétonitrile.

faible taux de protéine contenu dans ce cytosol purifié.

Ces modifications de liaisons décrites figure 21B correspondent bien un échange puisque la courbe de dissociation (i.e. échange stéroïde radioactif par stéroïde froid (courbe 3) est en miroir avec la courbe d'association (i.e. échange stéroïde froid par du stéroïde radioactif (courbe 4) et que le nombre total de sites récepteur reste constant tout au long de l'expérience (courbe 1). D'un point de vue quantitatif, cet échange présente un rendement d'environ 75-85 % des récepteurs.

- *Echange de stéroïde pour le récepteur transformé purifié*

Comme nous pouvons le voir sur la figure 21B, il n'existe plus d'échange possible de stéroïde une fois que le récepteur est transformé. En absence d'acétonitrile, la stabilité des complexes transformés est très grande, puisqu'au bout de 48 heures le taux de récepteur transformé n'a baissé que de 15 %. La présence d'acétonitrile augmente fortement la dissociation du récepteur transformé et celui-ci présente alors une demi-vie d'environ 10 à 15 min. Il apparaît donc qu'une fois transformé, le récepteur garde son stéroïde lié, mais le moindre déplacement de l'hormone est irréversible.

Cette constatation explique facilement les résultats de Becker *et al.* (1986) qui montrent qu'*in vitro* le stéroïde n'est pas indispensable à une activité transcriptionnelle. Nos résultats sont en accord avec ceux de Chou et Luttge (1988) qui étudient la capacité de réassociation du récepteur au stéroïde après séparation des formes non transformées et transformées par chromatographie de gel-filtration sur G25. Cependant ces travaux réalisés sur récepteur de cerveau

n'identifient le récepteur transformé que par DNA-cellulose sans vérifier la pureté du récepteur échangé.

### 3 - MODIFICATION DU STEROIDE ECHANGE

Poursuivant nos investigations, nous avons cherché à voir si le fait d'incuber le récepteur avec une antihormone comme le RU 486 modifiait les caractéristiques de l'échange. Le tableau V montre que les complexes non transformés se dissocient moins vite quand le stéroïde lié est le RU 486. Le fait que le rapport demi-vie du récepteur en absence d'acétonitrile sur le rapport de demi-vie en présence d'acétonitrile soit plus important pour la triamcinolone que pour le RU 486 (17,4 et 7,3 respectivement) objective bien cette différence de dissociation. Parcontre, après transformation, cette différence est moins marquée (43,2 pour 32 respectivement pour l'acétonide de triamcinolone et le RU 486). Il est possible que le caractère hydrophobe du solvant soit en grande partie responsable de cette différence.

Après transformation des complexes RU 486-récepteur et purification, aucun échange n'a pu être observé. De plus, on ne peut noter aucune différence de demi-vie entre le récepteur purifié transformé préalablement incubé avec l'acétonide de triamcinolone et celui initialement incubé avec le RU 486 (72 et 75 heures respectivement). Cette dernière constatation contredit donc les résultats de Moguilewski et Philibert (1984) pour qui la transformation stabilise les complexes transformés RU 486-récepteur. En fait, la discordance de nos résultats avec ceux de cette équipe est liée au protocole expérimental utilisé. Moguilewsky et Philibert déterminent la

		Récepteur incubé avec					
		TA			RU 486		
		+	-	rapport	+	-	rapport
Récepteur non transformé	$k_d(\text{sec}^{-1})$	9,6	160		11,3	80	
	demi-vie (min)	1200	69	17,4	1020	140	7,3
Récepteur transformé	$k_d(\text{sec}^{-1})$	2,67	110		2,56	80	
	demi-vie (min)	4320	100	43,2	4500	140	32

Le rapport indiqué sur le tableau correspond au rapport demi-vie des complexes obtenus en absence d'acétonitrile sur la demi-vie des complexes obtenus en présence de 8 % d'acétonitrile.

TABLEAU V - Effets de l'addition de 8 % acétonitrile sur la constante de dissociation du récepteur transformé et non transformé incubé soit avec la triamcinolone soit avec le RU 486.



demi-vie de la liaison observée dans le cytosol incubé préalablement avec la triamcinolone ou le RU 486 et chauffé à 25°C sans aucun fractionnement ultérieur des formes du récepteur présent dans le cytosol. Ils font donc l'hypothèse implicite que le récepteur se trouve essentiellement sous forme transformée dans leur échantillons. Si cette estimation est valable pour les récepteurs incubés avec un agoniste (le chauffage 25°C, 30 min donne des taux de transformation de 70 à 80 %), il n'en est pas de même pour les complexes RU 486-récepteur pour lesquels le taux de transformation ne dépasse pas 15 à 20 % de l'ensemble des récepteurs (Sablonnière *et al.*, 1987).

De plus, leur étude cinétique réalisée à 25°C en l'absence de molybdate aboutit à une augmentation du taux de dégradation du récepteur (Housley *et al.*, 1984). Il est ainsi possible que la diminution de la demi-vie des complexes RU 486-récepteur observée par Moguilewski et Philibert soit en réalité consécutive à une particulière instabilité des complexes non transformés RU 486 à cette température. Lors de l'étude des effets de l'acétonitrile sur le récepteur, nous avons également observé une plus grande instabilité des complexes RU 486-récepteurs non transformés après chauffage. La figure 22 représente la chromatographie de gel-filtration en HPLC des complexes cytosoliques chauffés ou non et en présence de 8 % d'acétonitrile. L'acétonitrile affecte de la même manière les formes transformées (5 nm) et non transformées (7-8 nm) du récepteur incubé avec l'acétonide de triamcinolone (figure 22A). Par contre, seule la forme de haut poids moléculaire (c'est-à-dire la forme non transformée est dégradée lorsque le récepteur est préalablement incubé avec le RU 486 (figure 22B).

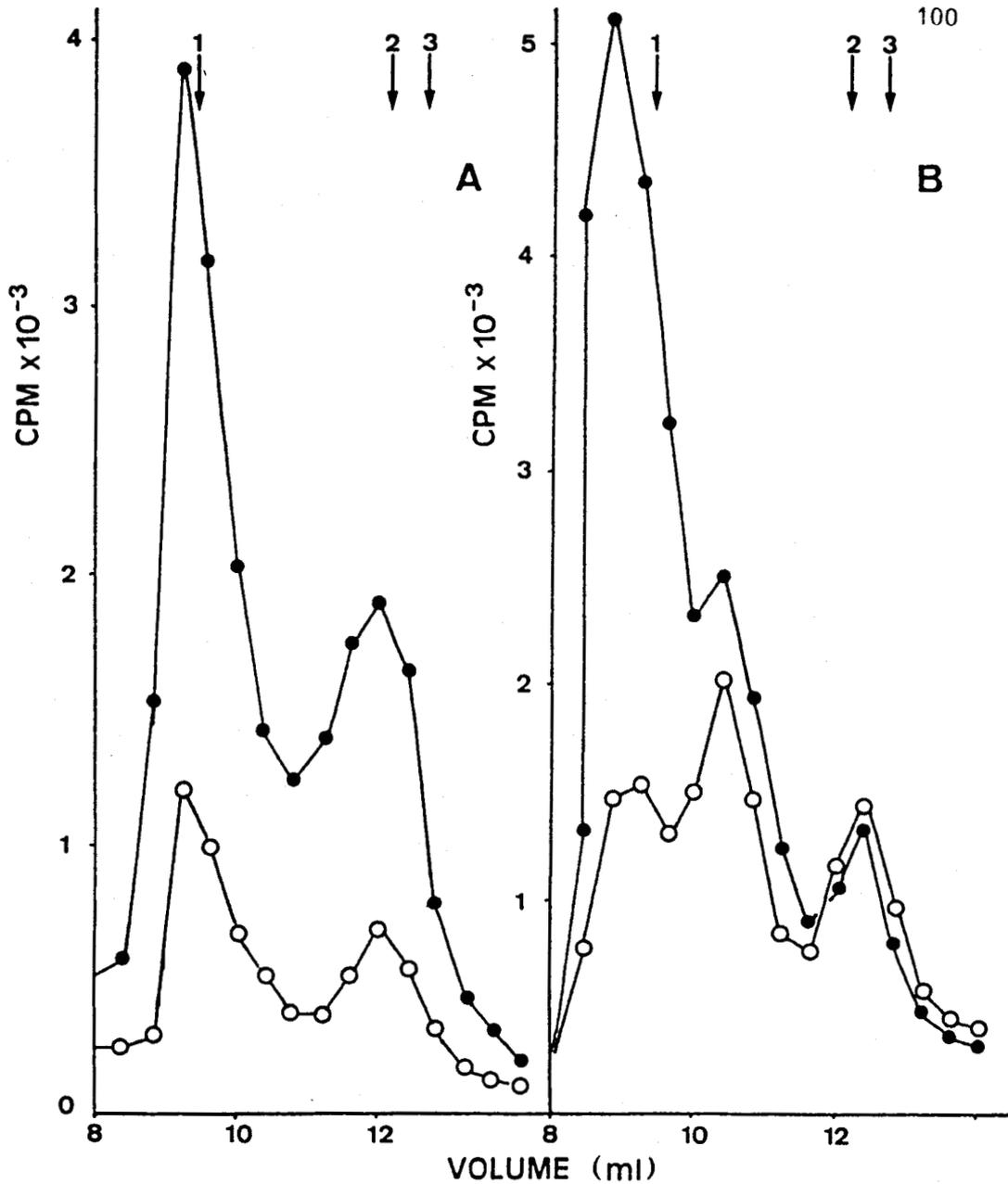


Figure 22 - Analyse par chromatographie d'exclusion de taille des complexes TA-récepteur et RU 486-récepteur.

Les cytosols préparés en tampon tris 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 60 mM, glycérol 10 %, pH 7,4, sont incubés avec 30 nM de TA ou de RU 486 radioactif (respectivement figure A et B). Après incubation une nu à 4°C, chaque échantillon est divisé en deux, la première aliquote est directement injectée, l'autre partiellement transformé par chauffage à 25°C pendant 30 minutes. Chaque échantillon est ensuite analysé par chromatographie. Le contenu de la radioactivité des fractions est tracé en fonction du volume d'éluion des complexes TA-récepteur (figure A) ou RU 486-récepteur (figure B) chauffés (○) ou non (●).

Ainsi, les complexes non transformés et transformés présentent les mêmes caractéristiques, que ceux-ci soient incubés avec l'acétonide de triamcinolone ou le RU 486. De plus, la nature du premier stéroïde lié n'influe pas sur la fonctionnalité ultérieure du stéroïde après échange. Ainsi, un récepteur incubé avec le RU 486, pourra changer de stéroïde et se transformer tout à fait normalement si le deuxième stéroïde est un agoniste. Cette constatation a cependant demandé des vérifications préalables car l'acétonitrile à 8 % interfère dans l'analyse du récepteur par la technique des minicolonnes (voir figure 17) et il est nécessaire de réaliser ces chromatographies après dilution de l'échantillon de telle manière que le taux d'acétonitrile n'excède pas 1 à 2 % .

L'ensemble de ces résultats semble donc totalement en faveur d'un rôle ponctuel du stéroïde dans la transformation. Si tel est le cas, quel que soit le type de stéroïde lié au récepteur (agoniste ou antagoniste), le complexe transformé doit présenter la même capacité pour stimuler la transcription.

#### D - APPLICATIONS DE CES RESULTATS

##### 1 - ETUDE DU SITE ACTIF DU RECEPTEUR

Une application des techniques d'échange peut être l'étude du site actif du récepteur. En effet, la présence du stéroïde protège les acides aminés du site de liaison stéroïde-récepteur contre les réactifs

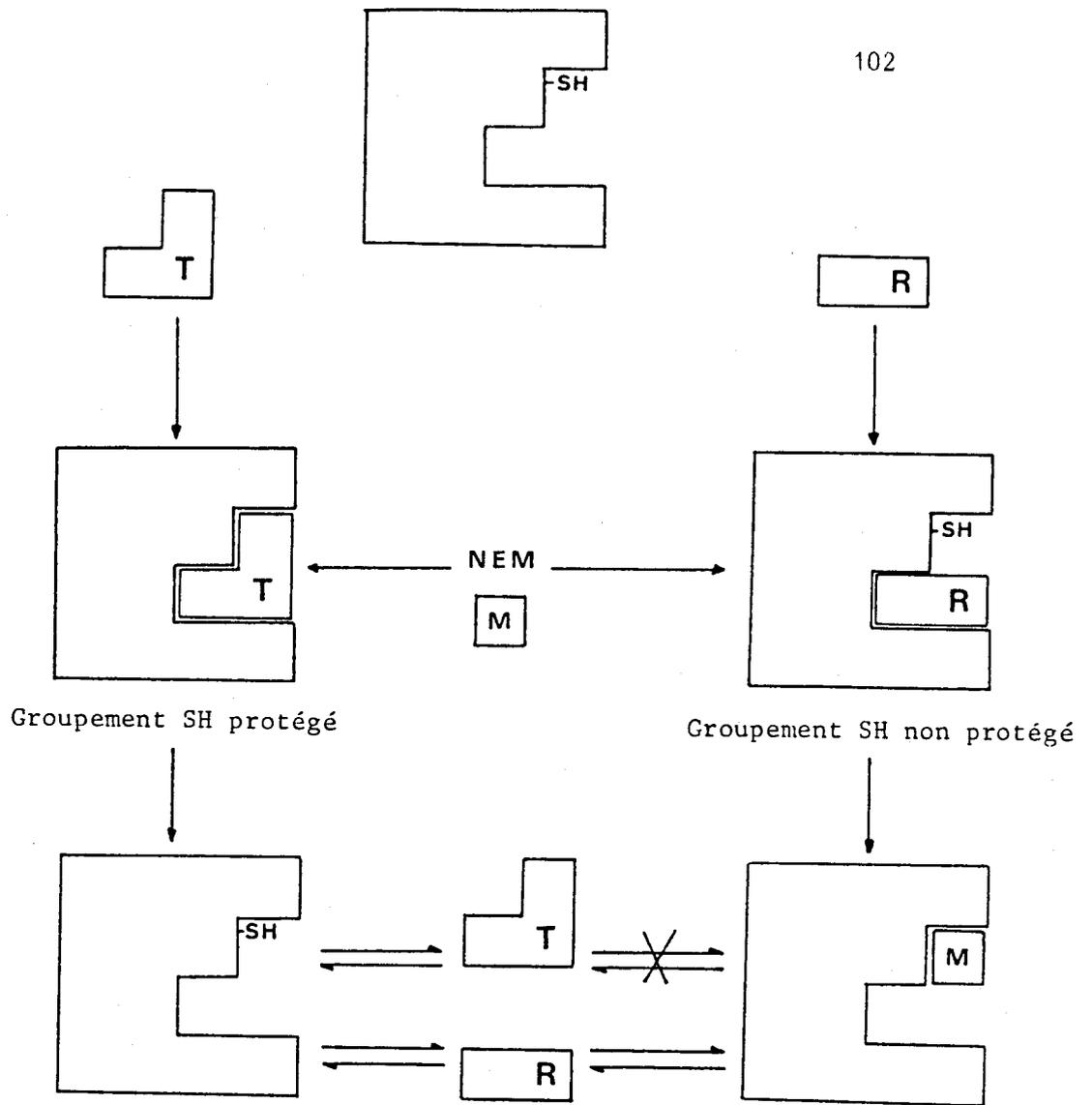


Figure 23 - Application des techniques d'échange de stéroïde à l'étude du site de liaison de l'hormone

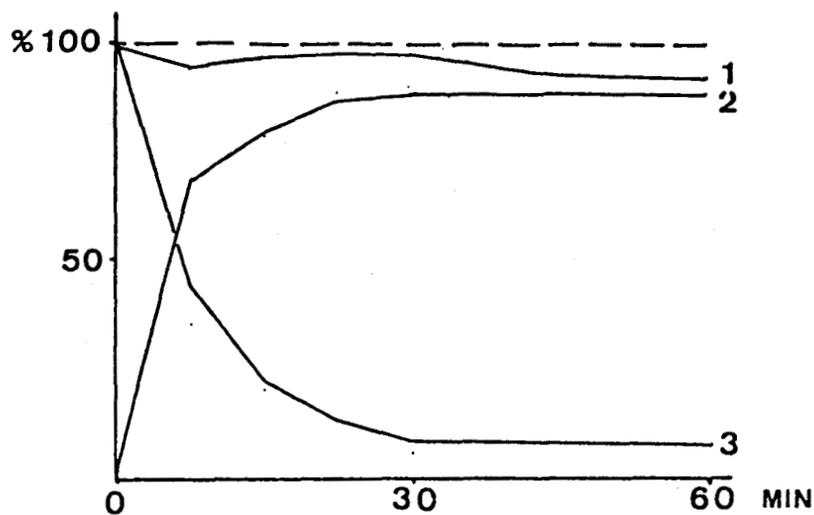
Après liaison avec l'acétonide de triamcinolone (T) ou le RU486 (R), les groupements SH du site actif sont différemment protégés contre l'action de la N-éthylmaléimide (M). Après action du marqueur la triamcinolone ne peut plus prendre la place du RU486

spécifiques ou non pouvant interagir avec eux. Dans l'hypothèse où le positionnement du stéroïde dans le site varie avec la nature du stéroïde (agoniste ou antagoniste), les acides aminés protégés pourront être différents (figure 23).

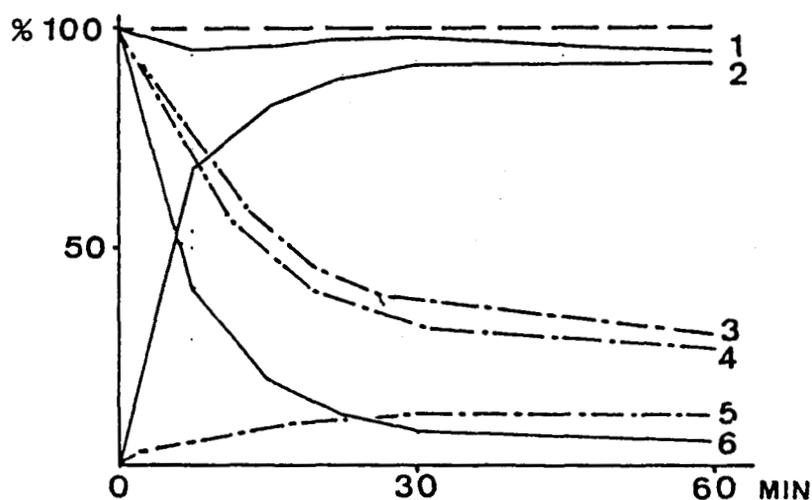
Par une étude différentielle des résultats obtenus avec les agonistes et les antagonistes, il est donc possible d'étudier les acides aminés du site. Parmi les acides aminés essentiels situés dans le site actif, les cystéines jouent certainement un rôle fondamental dans la liaison comme le montrent

(1) le rôle stabilisant des réducteurs comme le  $\beta$ -mercaptoéthanol ou le dithiothréitol (Rees et Bell, 1975 ; Schmid *et al.*, 1976) ou

(2) l'inactivation du récepteur après liaison du récepteur à des réactifs spécifiques des thiols qui sont la N-éthylmaléimide (Young *et al.*, 1975 ; Rees et Bell, 1975) ou l'iodoacétamide (Kalimi et Love, 1980). L'étude de ces cystéines a déjà commencé au laboratoire et l'environnement des cystéines impliquées dans la liaison du stéroïde et dans la transformation a pu être exploré grâce à l'utilisation de maléimides substituées (Formstecher *et al.*, 1984 ; Blicq *et al.*, 1988). Dans le prolongement de ces travaux, il est possible d'étudier le rôle de(s) cystéine(s) dans la cinétique de liaison des stéroïdes. En effet, le marquage par la N-éthylmaléimide peut bloquer ou modifier ces cinétiques de façon différente suivant qu'il s'agisse d'un agoniste ou d'un antagoniste. Ces travaux, repris par T. Burollaud, montrent que le marquage des complexes non transformés par la N-éthylmaléimide, ne



Cytosol initialement incubé  
avec de l'acétonide de Triamcinolone  
Les courbes de stabilité (1), d'association (2) et de  
dissociation (3) ne sont pas modifiées par la présence  
de N éthylmaléimide.



Cytosol initialement incubé  
avec le RU486  
Les courbes de stabilité (1), d'association (2) et de  
dissociation (6) obtenues en absence de N éthylmaléimide  
(échange RU486-TA ou RU486-RU486), ne sont pas modifiées  
par la présence du marqueur des SH si le stéroïde échangé  
est le RU486. Si le deuxième stéroïde est la TA, les  
courbes de stabilité (1), d'association (2) et de  
dissociation (6) sont modifiées respectivement en courbes  
(3), (5) et (4).

Figure 24 - Profil type des cinétiques d'échange de  
stéroïdes obtenues en présence de 8 %  
d'acétonitrile avec ou sans N éthylmaléimide.

modifie pas notablement les échanges TA-RU 486, TA-TA, ni RU 486-RU 486 mais que cela bloque l'échange RU486-TA (figure 24). Dans l'hypothèse proposée par Simons, et selon laquelle deux thiols sont impliqués dans la liaison (Simons *et al.*, 1987), il apparaît qu'une au moins de ces deux cystéines n'est pas indispensable à la liaison RU 486-récepteur. Ceci n'explique peut être pas l'activité antihormonale du RU 486 bien qu'elle puisse y participer puisque

(1) il existe un thiol indispensable à la transformation (Bodwell *et al.*, 1984)

(2) il est possible qu'une des deux cystéines décrite par Simons corresponde en fait à celle de la transformation. Une telle opposition agoniste-antagoniste a aussi été faite récemment par Moudgil *et al.* (1989) sur le récepteur de la progestérone.

Il serait intéressant de continuer ce travail suivant trois axes :

(1) identifier la cystéine marquée par la N-éthylmaléimide lors de notre étude,

(2) appliquer la cinétique d'échange et le marquage à d'autres agonistes et antagonistes pour déterminer si cette différence de marquage est spécifique des antihormones,

(3) appliquer la technique à d'autres réactifs marquant aussi les thiols (réactifs de taille plus ou moins importante) ou marquant d'autres acides aminés.

## 2 - PURIFICATION DES COMPLEXES RU 486-RECEPTEUR TRANSFORME

La fractionnement du récepteur sous forme transformée homogène après passage sur DEAE-TrisAcryl nous a semblé très simple et les rendements étaient tels qu'on pouvait espérer, grâce à quelques améliorations augmenter la concentration des récepteurs transformés même si le taux de purification n'est pas majeur. L'injection de telles préparations à des cellules en culture possédant des gènes corticodépendants doit donner une réponse cellulaire. Si l'action du RU 486 ne se limite pas à un simple blocage de la transformation, la purification des complexes RU486-récepteur transformés et leur injection dans ces mêmes cellules doit donner une réponse cellulaire différente de celle induite par les complexes purifiés TA-récepteur. Par cet abord, il serait donc possible de voir, sur des cellules intactes, si l'action antihormonale a lieu également après la liaison du complexe RU 486-récepteur sur son site GRE comme l'ont proposé Guiochon-Mantel *et al.* (1989). La détermination du taux de récepteur purifié est réalisée par dosage du stéroïde lié. La dissociation des complexes transformés stéroïde-récepteur peut expliquer les faibles rendements de purification que nous avons obtenus.

C'est pour cela que nous avons cherché à améliorer la technique de purification par DEAE-Trisacryl. En fait, les quelques essais de concentration du récepteur transformé homogène par diaflo ou gel-filtration en HPLC ont montré un effondrement important de toute activité de liaison au stéroïde.

Devant un tel échec, nous avons tenté d'autres techniques. Parmi celles-ci, seule la chromatographie de gel-filtration sur ACA22 en tampon de force ionique élevée a donné des rendements équivalents à ceux obtenus par chromatographie sur DEAE-TrisAcryl mais toute manipulation ultérieure aboutit à la perte de la liaison hormone-récepteur.

Il apparaît donc que les protocoles conventionnels de purification des récepteurs transformés (pour revue voir Lustenberger 1986 et Belahsen 1987) restent encore les plus adaptés. Cependant, l'ensemble de nos expérimentations est en faveur d'une relative instabilité de liaison hormone-récepteur transformé. Il existe une dénaturation du domaine de liaison au stéroïde mais pas de celui liant l'ADN. C'est pourquoi un dosage du récepteur transformé par son site ADN nous semble probablement plus adapté pour la détermination du taux de récepteur transformé purifié.

## PARTIE II

### LE RECEPTEUR TRANSFORME. SA CARACTERISATION PAR L'ADN

#### A - RAPPEL DES RESULTATS PRECEDENTS

Dès notre arrivée au laboratoire, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre le récepteur transformé et l'ADN. Nous avons en particulier mis au point une technique quantitative de dosage du taux de récepteur transformé sur la DNA-cellulose. Ceci a permis à S. Blicq d'appliquer cette méthode pour montrer le rôle des maléimides sur la cystéine nécessaire à la transformation (Blicq *et al.*, 1988).

Nous avons aussi pu mettre en évidence que le seul critère différenciant les complexes TA-récepteur des complexes antagoniste-récepteur était le faible taux de transformation, et que par ailleurs, aucune différence notable d'affinité ne pouvait être détectée sur la DNA-cellulose (figure 25) (Danzé 1987 ; Sablonnière *et al.*, 1987). Ces constatations pouvaient être le fait du manque de spécificité de la DNA-cellulose. En effet, l'ADN de thymus possède certainement quelques sites spécifiques (statistiquement 1 toutes les 4096 paires de bases) mais qui doivent être disposés dans les séquences d'ADN non spécifiques. L'affinité du récepteur transformé est donc essentiellement due à des interactions non spécifiques.

Plus récemment, plusieurs auteurs étudiant l'interaction ADN-récepteur sur des séquences spécifiques, ont obtenu des résultats discordants, certains trouvant que la liaison à un antagoniste diminuait l'affinité pour l'ADN (Bourgeois *et al.*, 1984), d'autres ne voyant aucune différence (Moguilewsky et Philibert, 1984). Nos recherches sur ce sujet se sont limitées à étudier si le fait d'enrichir un ADN de plasmide en séquence spécifique de liaison au récepteur (séquence consensus TGTCT répétée trente fois et insérée dans un ADN de plasmide) modifiait l'affinité du récepteur transformé pour cet ADN. En fait, aucune différence n'a pu être observée entre cet ADN et le plasmide non modifié. Ceci n'exclue cependant pas l'existence d'une affinité plus forte des sites ADN spécifiques pour le récepteur, car le taux d'enrichissement n'était peut-être pas suffisant. De plus, l'ADN étudié

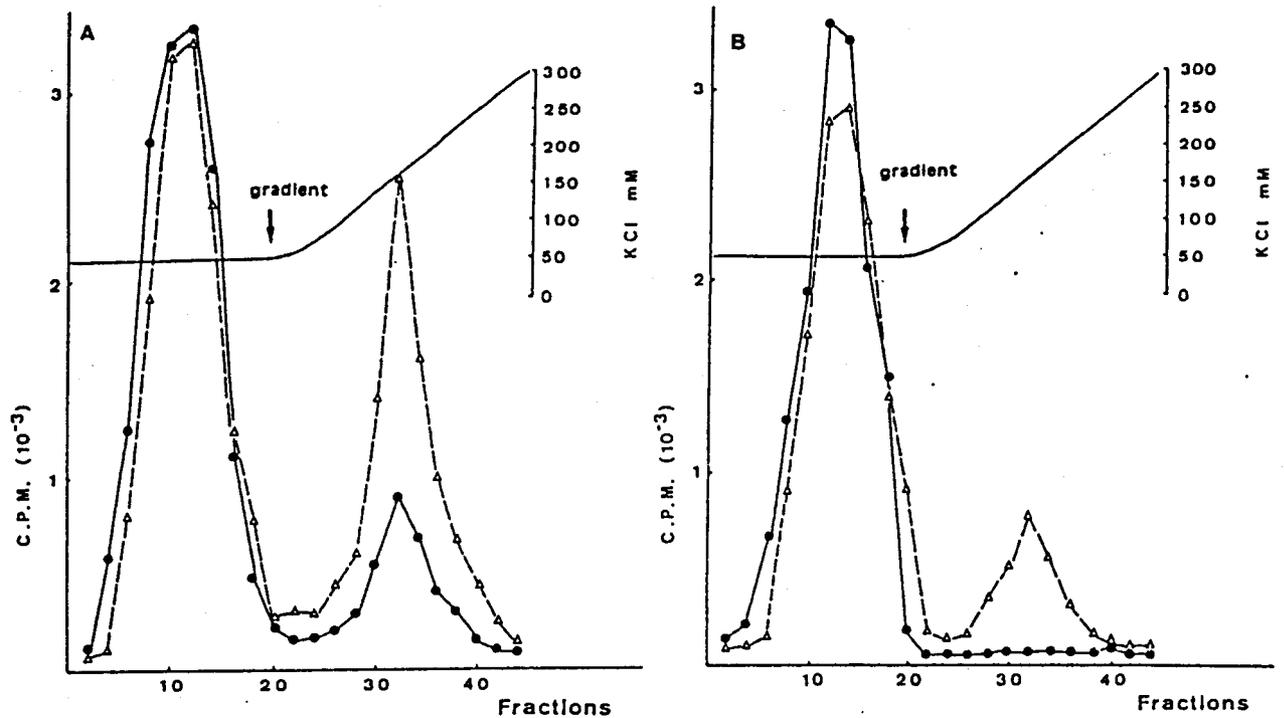


Figure 25 - Analyse des complexes  $^3\text{H}$  TA-récepteur et  $^3\text{H}$  RU 486-récepteur par DNA cellulose

A : Analyse des complexes  $^3\text{H}$  TA-récepteur sur DNA-cellulose. Les colonnes de DNA-cellulose de 2 ml sont équilibrées dans le tampon TENG + molybdate 0,01 M (voir appendice technique, paragraphes I et II). Des échantillons de 0,5 ml incubés avec de l'acétonide de triamcinolone tritié (30 nM/l) chauffés ( $\Delta$ ) ou non ( $\bullet$ ) sont déposés sur chaque colonne sans avoir préalablement éliminé l'excès de stéroïde libre. Après un contact de 5 min, chaque colonne est lavée par 10 ml de tampon TENG + molybdate (débit 0,5 ml/min) puis éluée par un gradient de KCl (0-0,4 M). Des fractions de 0,5 ml sont collectées et des aliquotes de 0,3 ml de chaque fraction sont analysées pour le dosage de la radioactivité, le reste étant utilisé pour le dosage du potassium

B : Le même protocole est réalisé pour les complexes  $^3\text{H}$  RU 486-récepteur chauffés ( $\Delta$ ) ou non ( $\bullet$ ).

étant fixé sur une colonne d'agarose, il est possible que les séquences consensus répétitives ne soient pas accessibles au récepteur transformé.

L'ensemble de ces résultats apporte des constatations générales sur le mode d'interaction entre le récepteur et l'ADN. Le seul moyen de pousser plus loin nos investigations était d'orienter nos recherches vers l'étude entre le récepteur et son site spécifique, travail essentiellement réalisé dans les laboratoires de Biologie Moléculaire. Après avoir vu l'ensemble des techniques nécessaires à ce type d'étude (voir annexe), il nous a semblé que la méthode la plus intéressante dans le cadre de nos travaux était la technique de retard sur gel. En effet, cette technique, dans l'hypothèse où il n'existe qu'une seule bande spécifique permet de séparer le récepteur lié à l'ADN (bande retardée) de l'ADN libre et donc de déterminer le taux de récepteur transformé. Par intégration des bandes, cette méthode pourrait donc être utilisée tant pour des dosages quantitatifs du récepteur transformé que dans un but quantitatif et qualitatif pour l'étude de la pathologie du récepteur des glucocorticoides.

## B - CHOIX DE LA SEQUENCE CONSENSUS ET SA PURIFICATION

### 1. DETERMINATION DE LA SEQUENCE

Depuis 1984, le nombre de séquences d'ADN décrites pour interagir spécifiquement avec le récepteur des glucocorticoides est très important (Tableau VI) et nous ramène à une séquence consensus minima 5' TGGTCT 3' dont nous avons largement parlé dans notre revue bibliographique. Même si le consensus est large, le choix de la séquence n'était pas facile car pour la séquence consensus élargie, la première

moitié du palindrome reste encore assez incertaine. Au moment où nous avons déterminé le choix de notre séquence, trois possibilités nous étaient offertes.

- (1) utilisation d'une séquence déjà décrite dans la littérature
- (2) utilisation du palindrome parfait
- (3) détermination d'une séquence consensus à partir de toutes les séquences déjà décrites

Les séquences correspondant aux deux premiers choix ont déjà été testées et ne présentent donc plus l'intérêt d'une étude nouvelle. Le risque de réaliser une séquence consensus statistique ne liant pas le récepteur existe, mais il nous a semblé plus intéressant de retenir la troisième solution. La séquence consensus statistique que nous avons retenue est : 5'GGTACAATCTGTTCT 3'. En réalité, nous avons fait synthétiser une séquence plus longue contenant à l'extrémité 5' l'enchaînement GATCT et une adénine en extrémité 3'. Après appariement des deux chaînes complémentaires, l'ADN double brin obtenu possède au niveau de ses extrémités 5' une séquence monocaténaire palindromique GATC. Ceci permet de réunir les séquences consensus pour obtenir un ADN répétitif. Un tel choix a été retenu pour utiliser éventuellement cet ADN pour la synthèse de colonne d'affinité à ADN comme cela a été fait par Kadonaga pour la purification du facteur de transcription SP1 (Kadonaga et Tjian, 1986).

En fait, le choix que nous avons réalisé après étude statistique semble avoir été le bon, puisque récemment Beato (1989) a proposé une séquence consensus élargie identique à celle que nous

ORIGINE	SEQUENCE	REFERENCE
	1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20	
LTR MMTV 1.2	T G C A G A A T A A T G T T C T A T T A	Payvar et al. (1983)
LTR MMTV 1.3	G G T T A C A A A C T G T T C T T A A A	Payvar et al. (1983)
LTR MMTV 1.5	T G G T A T C A A A T G T T C T G A T C	Payvar et al. (1983)
LTR MMTV 1.5	G A G C T C T G A G T G T T C T A T T T	Payvar et al. (1983)
LTR MMTV 2.1	A C G C T C T T T T T G T G C T G A A T	Payvar et al. (1983)
LTR MMTV 2.2	G A A A G G A C C A T G T C C T A A T A	Payvar et al. (1983)
LTR MMTV 3.1	G C T T T T A A T C T G A T C T G A C T	Payvar et al. (1983)
HMT IIA	C G G T A C A C T G T G T C C T C C C G	Karin et al. (1984)
hGH	G G G C A C A A T G T G T C C T G A G G	Slater et al. (1985)
RUC I	C T G T T C A C T C T G T T C T A T G C	Cato et al. (1984)
RUC II	C C G G A C A C G G A G T C C T T T T G	Cato et al. (1984)
RUC III	G T G T C A G T C T T G T T C T C C C C	Cato et al. (1984)
Prom. Ribosom.	A C T G A C A C G C T G T C C T	Yamamoto et al. (1984)
Lysozyme I	A A A A T T C C T C T G T G G C T T A G	Van der Ahe et al. (1985)
Lysozyme II	T T G A T T C C T C T G T T C T A C A G	Renkawitz et al. (1984)
PEPCK Distal	A A G T A G G C C A T G T C C C T G C C	Petersen et al. (1988)
PEPCK Proximal	T C C C T T C T C A T G A C C T T T G G	Petersen et al. (1988)
TAT Distal	C T G T A C A G G A T G T T C T A G C T	Jantzen et al. (1987)
TAT Proximal	A G G A C T T G T T T G T T C T A G T C	Jantzen et al. (1987)
TO Distal	C C T T T C A T G A T G T C C T G G C C	Danesch et al. (1987)
TO Proximal	A T G C A T A G C G A G T T C T A G T G	Danesch et al. (1987)
MSV I	G G G G A C C A T C T G T T C T T G G C	Miksicek et al. (1986)
MSV II	C T G T T C C A T C T G T T C T T G G C	Miksicek et al. (1986)
MSV III	G C T G T C T C T C T G T T C C T G A C	Miksicek et al. (1986)
Vitellogénine	G G A T C A A T G T G T T C T	Scheidereit et al. (1986)
Ovalbumine I	T T T T C T G T C T G T T C T	Beato et al. (1988)
Ovalbumine II	G T C A C G T C T T G T T C T	Beato et al. (1988)
Ecdysone	C A T T T C A T C T G T T C T	Scheidereit et al. (1986)
X1Glycoprot. (rat)	T G C A C A A A T G T T C C	Beato et al. (1988)
	G G T A C A . . . T G T T C T	
	10 12 18 27 27 28 18 12 14 29 19 25	
	A: 9 5 8 T: 6 13 4 C: 5 5 6 C: 9 6 11	

5' G G T A C A A T C T G T T C T 3'

TABLEAU VI : Détermination de la séquence consensus utilisée au Laboratoire.

utilisons (Table VI) et plusieurs articles rapportent l'importance particulière de certaines bases de la première partie du palindrome imparfait dans la liaison du récepteur (voir revue bibliographique). Il est cependant possible que d'autres sondes plus efficaces soient ultérieurement décrites. Ceci ne pourra qu'augmenter la précision et la fiabilité de la méthode.

## 2 - PURIFICATION DE L'ADN

L'ADN de synthèse fourni par la Société Eurogentec n'étant pas purifié, nous avons fait notre choix parmi les différentes techniques de purification des sondes. La méthode la plus couramment utilisée est l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, le taux d'acrylamide variant suivant la longueur de l'oligonucléotide. Cependant, les rendements de la méthode sont faibles. Si l'extrémité de l'ADN possède encore son groupement diméthoxytrityl, il est possible de purifier l'oligomère par HPLC en phase reverse ou par une chromatographie sur gel reconnaissant ce groupement. L'avantage de la première méthode est d'utiliser des tampons volatiles.

La technique que nous avons utilisée est la chromatographie d'échange d'ions sur colonne monoQ de chez Pharmacia (système FPLC).

En suivant le protocole proposé par le fabricant nous avons réussi facilement à séparer l'oligomère (figure 26). Cette technique nécessite un dégazage très important des tampons. Le pic recueilli est obtenu dans un volume final important et la concentration en sels est de l'ordre de 0,6 à 0,7 M de NaCl.

Dans un premier temps, nous avons cherché à concentrer les oligomères purifiés par précipitation dans 2 volumes d'éthanol. Cette méthode a présenté un rendement inférieur à 10 %, sans doute consécutif au fait que la séquence oligonucléotidique était trop courte pour précipiter. C'est pourquoi nous avons ensuite utilisé un protocole en 2 temps : (1) dessalage sur une colonne G25, puis (2) lyophilisation des fractions récupérées. Si le rendement de purification obtenu par chromatographie sur monoQ est bon, celui-ci baisse fortement suite aux nombreuses manipulations de dessalage et de lyophilisation. Partant de 0,1  $\mu\text{mol}$  de chacun des deux brins complémentaires d'ADN, nous avons obtenu un rendement final de l'ordre de 40 % et 45 % respectivement pour chacun des brins. La pureté de chaque oligomère a ensuite été contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

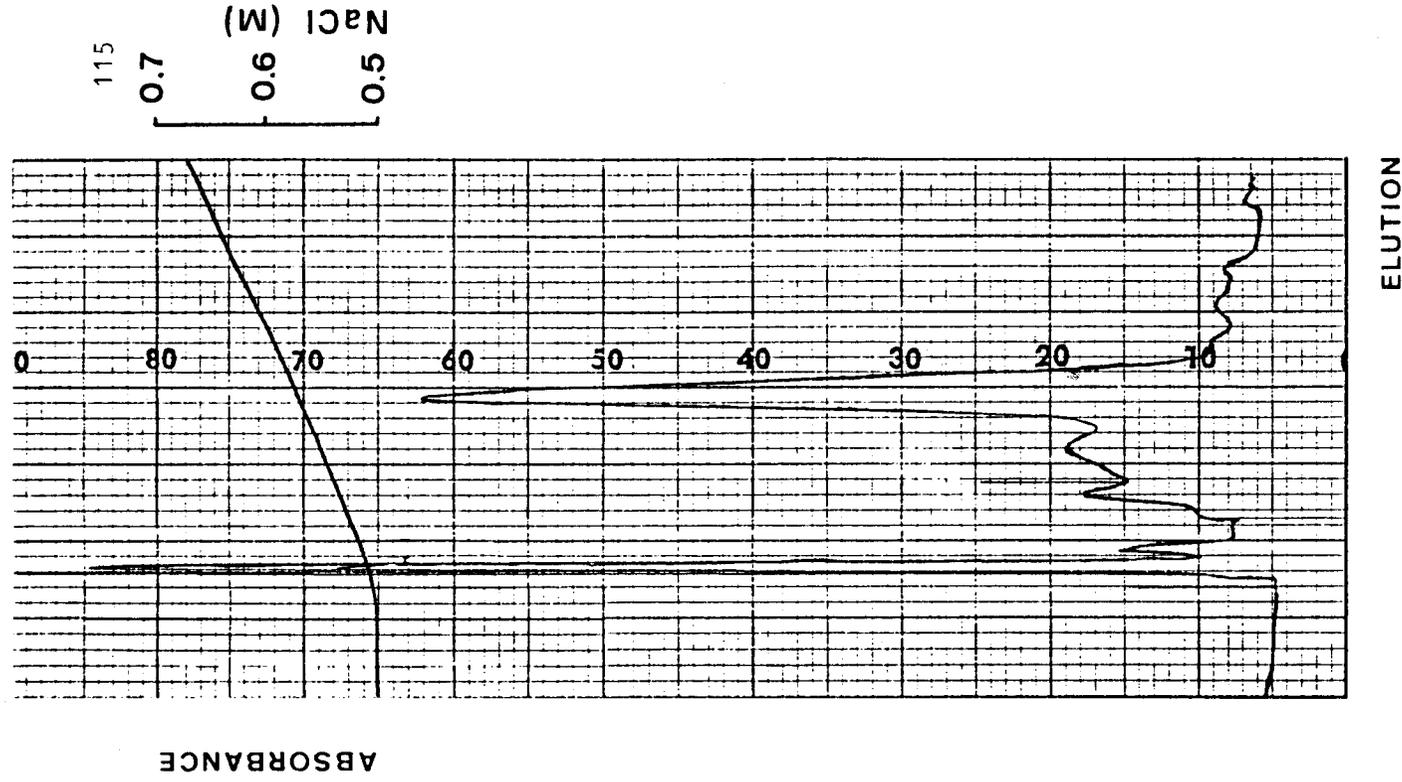


Figure 26 - Purification de l'ADN monobrin par chromatographie sur colonne mono Q.

Les échantillons lyophilisés sont repris dans une solution de NaCl 0,5 M. Ils sont ensuite déposés sur la colonne mono Q préalablement équilibrée dans le même tampon. L'éluion est réalisée à un débit de 1 ml/min par un gradient de NaCl. L'éluion est surveillée par absorbance à 260 nm.

## C - PREMIERS ESSAIS DE RETARD SUR GEL

N'ayant initialement aucune notion de la sensibilité et de la spécificité de la technique, nous avons réalisé nos premiers essais au laboratoire de Biologie Moléculaire de Monsieur le Professeur Martial à Liège. Nous avons pour cela apporté deux préparations cytosoliques : la première étant le récepteur transformé homogène purifié sur DEAE TrisAcryl (voir première partie des résultats), l'autre étant du récepteur incubé et partiellement purifié par précipitation au sulfate de protamine en présence de molybdate de Na.

Le retard sur gel n'est pas une technique standardisée et nécessite une adaptation pour chaque étude. Ne connaissant pas les conditions optimum de liaison, il nous a fallu choisir un protocole dans lequel aucun facteur ne risquait d'empêcher la liaison récepteur-ADN. Le choix du tampon représente le principal paramètre à déterminer. Celui utilisé par l'équipe de Liège est : Tris 10 mM, Hepes 12 mM, KCl 60 mM, MgCl<sub>2</sub> 6,25 mM, EDTA 0,6 mM, Glycérol 12 % pH 7,3. Un tel tampon présente une force ionique nettement inférieure à celle nécessaire à l'élution du récepteur transformé lors des chromatographies sur DNA-cellulose (environ 160 mM KCl). Les autres composants se retrouvent dans la plupart des tampons employés dans les études sur le récepteur. C'est pourquoi dans un premier temps, nous avons utilisé ce tampon et nous avons employé le protocole retenu par l'équipe de Liège.

Après marquage à la T4 kinase et purification (voir appendice technique), 1 µl d'oligonucléotide (0,2 à 0,5 ng) est incubé avec des quantités variables d'extrait cytosolique (taux de protéines variant de 1 à 10 µg) en présence de poly(dI)poly(dC) (1 µg) dans le tampon

précédemment défini. Après incubation 15 min à température ambiante, les échantillons sont déposés sur un gel d'acrylamide à 8 % (voir appendice technique). L'électrophorèse est réalisée sans recirculation (100 V-7 mA) à 12-14°C (cuve électrophorèse dans glace) pour éviter une éventuelle dégradation du récepteur.

Le choix du taux de réticulation du gel a été choisi afin d'obtenir une séparation maximale ADN libre-ADN lié sans pour cela bloquer la migration de l'ADN lié. La migration de l'ADN libre est suivie par des colorants dont la migration correspond à celle d'ADN de longueur définie. Ainsi, le bleu de bromophénol et le xylène cyanol migrent comme des séquences d'ADN de 45 et 160 paires de bases respectivement dans un gel à 8 %. Il est ainsi possible de localiser la distance de migration de l'ADN libre et d'arrêter l'électrophorèse lorsque la séparation est maximale. La présence de colorant dans les incubats pourrait empêcher la liaison entre la protéine et l'ADN. Pour éviter tout résultat erroné, nous avons déposé des colorants dans un couloir témoin. Ce couloir sert en même temps de contrôle puisqu'il correspond à la migration de 1 µl d'ADN radioactif incubé avec le poly(dI)poly(dC) dans le tampon. Ceci permet de vérifier l'absence d'interaction entre l'ADN et les constituants du tampon.

Comme nous le voyons sur la figure 27 (couloirs 6 à 15), le récepteur transformé purifié homogène ne présente qu'une seule bande retardée, déjà intense pour un volume de 0,3 µl de cytosol incubé avec l'ADN. De prime abord, l'affinité de cette protéine est bonne puisque pour un même volume de cytosol incubé, l'augmentation du

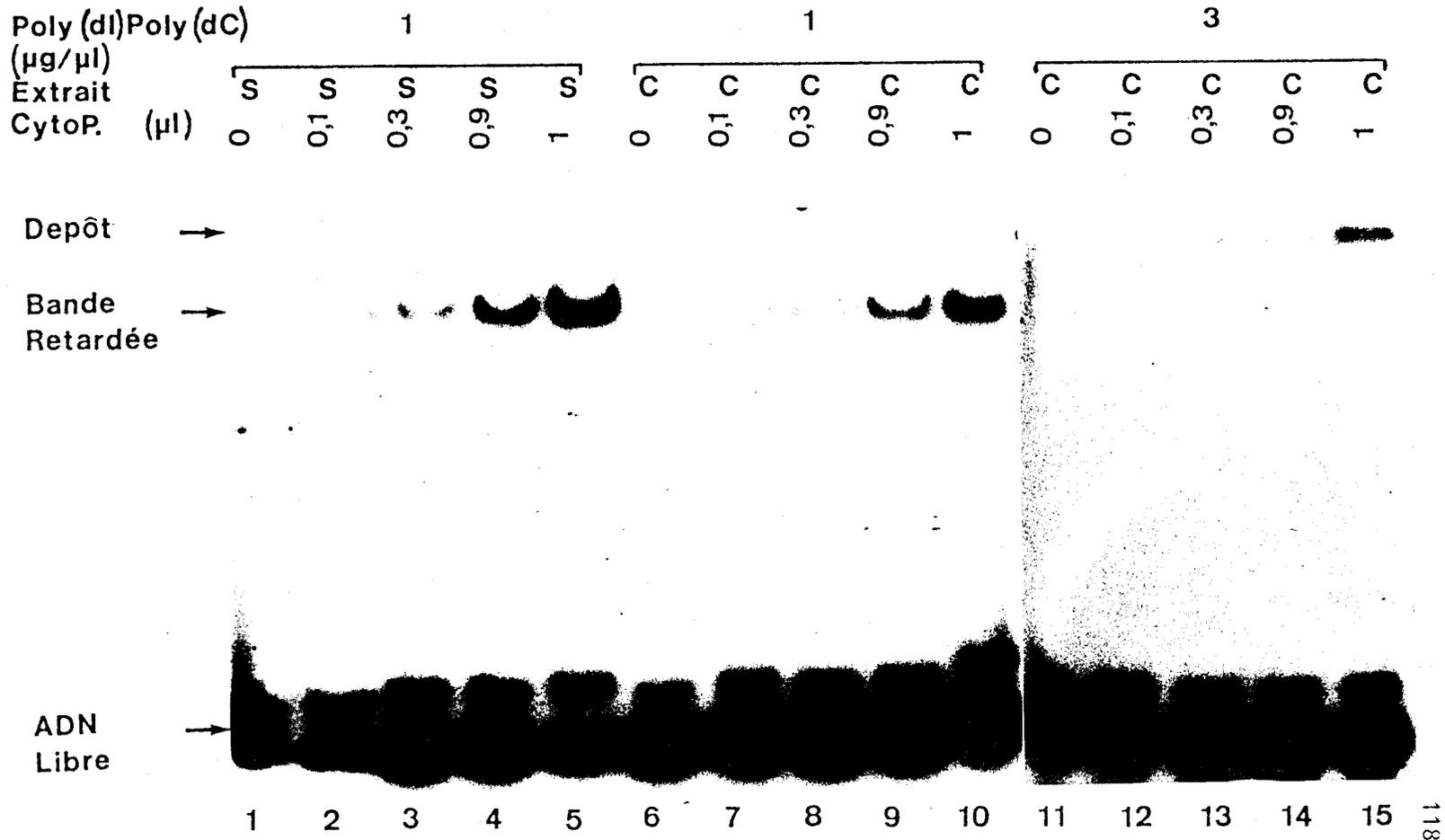


Figure 27 - Retard sur gel réalisé sur foie de rat.  
 Des concentrations croissantes de cytosol ( C ) ou de sulfate de protamine ( S ) préalablement incubés avec la TA 30 nM, sont mis en présence de la sonde GRE radioactive avec un excès de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (couloirs 1 à 10) ou de 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de poly(dI)poly(dC)

poly(dI)poly(dC) de 1 à 3  $\mu\text{g}$  ne modifie pas l'intensité des bandes retardées.

Le récepteur non transformé ne montre pas de bandes retardées (figure 27, couloirs 1 à 5). Une première hypothèse est que la molarité élevée de la solution de sulfate de protamine empêche toute liaison spécifique ou non avec l'ADN. Cependant, la force ionique ne doit certainement pas intervenir dans le résultat parce que l'incubation de l'oligomère marqué avec l'extrait aboutit à une dilution finale très importante. De plus, le taux de récepteur non transformé est concentré d'un facteur de 10 environ par rapport à un cytosol normal. La purification du récepteur transformé homogène donne un taux de récepteur de l'ordre de la moitié des récepteurs cytosoliques initiaux. Ainsi, si on compare les électrophorèses obtenues à une concentration de 0,1  $\mu\text{l}$  de préparation cellulaire, le taux de récepteur non transformé est de 20 fois plus concentré que le récepteur transformé pour lequel on observe déjà une bande retardée. Il semble donc probable que cette bande corresponde au récepteur des glucocorticoides.

D'autres retards sur gel ont été ensuite réalisés sur le récepteur cytosolique de foie de rat. Ils ont mis en évidence la stéroïdo-dépendance de la bande retardée. Ces résultats sont résumés sur la figure 28 qui montre

- (1) l'absence de bande retardée si le cytosol n'est pas préalablement incubé avec la TA (couloirs 1 et 2).
- (2) l'absence de bande retardée si le cytosol incubé avec la TA n'est pas préalablement chauffé à 25°C 30 min (couloirs 3, 6, 8)

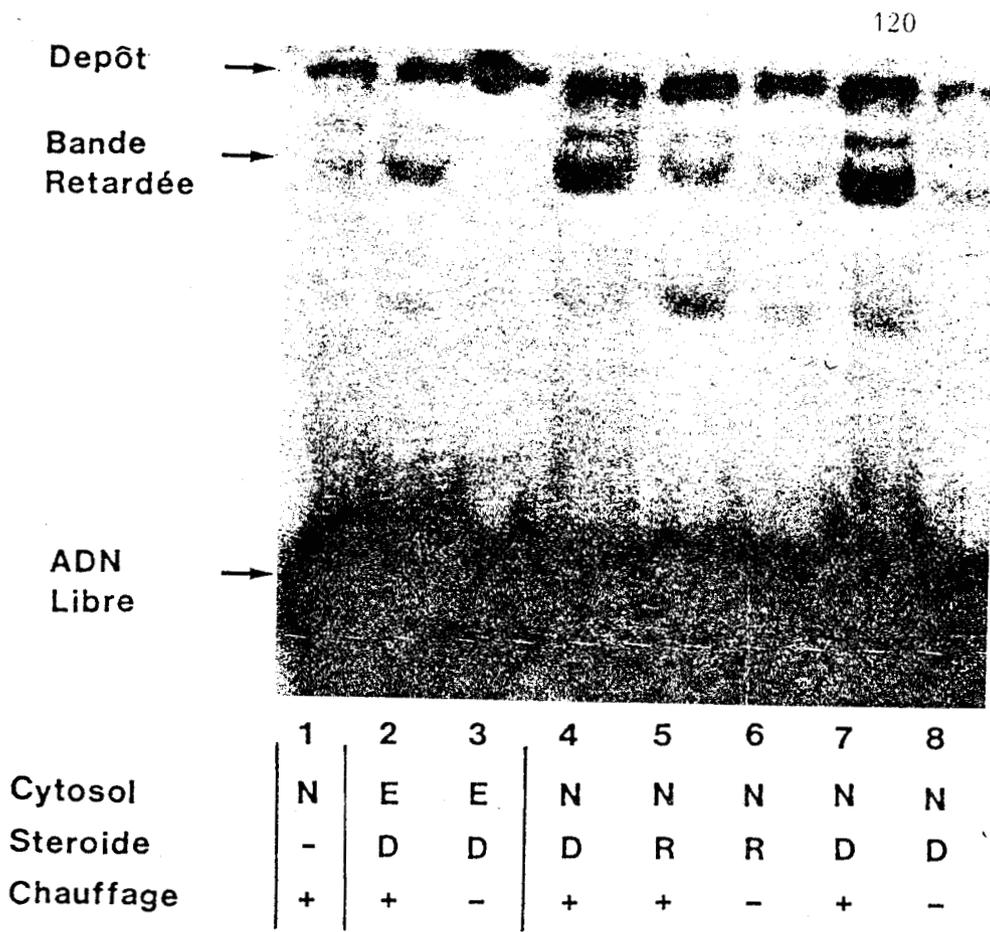


Figure 23 - Hormonodépendance de la bande retardée observée sur cytosol de foie de rat.

Le cytosol est incubé avec la dexaméthasone (D) ou le RU 486 (R) soit directement (N) soit après épuisement en récepteur des glucocorticoïdes par chromatographie d'affinité (voir appendice technique) (E). Les échantillons sont ensuite divisés en deux. Une première aliquote est chauffée (couloirs 1,2,4,5,7), l'autre laissée à 4°C. Chaque échantillon est ensuite incubé avec le GRE marqué pendant 30 min à 4°C puis analysé par électrophorèse.

- (3) l'apparition d'une bande retardée après chauffage du cytosol. Cette bande est peu intense si le cytosol est incubé avec une antihormone comme le RU 486 (couloir 5), plus important s'il est incubé avec la TA (couloirs 4 et 7).
- (4) la déplétion en récepteur du cytosol par chromatographie d'affinité (voir appendice technique) diminue fortement voire abolit la bande retardée (couloirs 2 et 3).

Ces travaux ont été réalisés sur cytosol non purifié. Ceci explique probablement l'existence des deux autres bandes supplémentaires qui ne sont en fait pas spécifiques. Par ailleurs, la figure 28 montre bien l'aspect quantitatif de la technique puisque les bandes retardées des couloirs 4 et 7, issues d'incubations strictement identiques, donnent la même intensité lorsqu'elles sont intégrées.

Devant la sensibilité apparente de la technique, il nous a semblé envisageable de l'appliquer pour le dosage du récepteur des glucocorticoides chez l'homme. Les méthodes jusqu'ici utilisées reposent sur le dosage de la radioactivité du stéroïde lié au récepteur. Cette technique nécessite une quantité relativement importante de sang car le stéroïde est marqué au tritium qui est un émetteur  $\beta^-$  de faible énergie (énergie de rayonnement maximal : 0,018 MeV). L'efficacité de comptage est faible puisqu'elle oscille entre 30 et 50 % suivant les compteurs et l'impression des plaques autoradiographiques est très longue. C'est pourquoi une telle technique est totalement inadaptée en routine pour le

dosage de recepteurs des lymphocytes circulants, et inapplicable chez les enfants.

Le marquage de l'ADN est lui, réalisé au  $^{32}\text{P}$ , élément radioactif également  $\beta^-$  mais dont l'énergie maximale de rayonnement est environ 100 fois supérieure (1,79 MeV). L'efficacité de comptage est ici d'environ 90 % et il est possible de doser une bande radioactive par autoradiographie. L'inconvénient majeur de ce radioélément est sa demi-vie qui est courte (14,2 J) ce qui complique la standardisation de la méthode.

50 ml de sang sont nécessaires pour démontrer l'existence du récepteur et déterminer le nombre de sites. Par des améliorations techniques proposées par L. Storme et grâce à une standardisation, il a été possible de ramener le volume de prélèvement à 20 ml de sang. Après calcul, il nous a semblé qu'un volume de 5 ml pouvait être suffisant pour détecter la présence ou l'absence du récepteur. Ce calcul tient d'ailleurs plus compte de la quantité minima de sang nécessaire à la préparation des lymphocytes que du volume d'extrait cellulaire final à obtenir. En effet, 5 ml de sang donnent entre 100 et 200  $\mu\text{l}$  de préparation cellulaire et il n'en faudra qu'entre 1 à 5  $\mu\text{l}$  par dépôt lors du retard sur gel.

Tout ceci rend la technique de retard sur gel applicable pour n'importe quelle pathologie et plus particulièrement les pathologies pédiatriques congénitales. C'est pourquoi il nous a semblé logique de continuer notre mise au point sur le récepteur des glucocorticoides de lymphocytes humains.

## D - AMELIORATION DES CONDITIONS TECHNIQUES

Tenter de mettre cette technique de dosage au point, c'est d'abord chercher à améliorer le protocole et vérifier ensuite l'aspect qualitatif et quantitatif du dosage. C'est pourquoi il nous a fallu dans un premier temps étudier l'incidence de la préparation des cytosols et celle du tampon d'incubation sur les caractéristiques des bandes obtenues.

### 1 - PREPARATION DES CYTOSOLS ET HOMOGENATS LYMPHOCYTAIRES

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, la séquence consensus GRE lie également le récepteur de la progestérone. Un des critères permettant de mettre en évidence que la bande retardée correspond au récepteur des glucocorticoides, est la modulation de l'intensité de la bande en fonction de la présence ou l'absence de stéroïde. Il est donc nécessaire que le stéroïde soit spécifique du récepteur. C'est pourquoi toutes les incubations réalisées à partir de préparations lymphocytaires humaines ont été faites avec de la dexaméthasone, stéroïde de synthèse ne liant que le récepteur des glucocorticoides.

L'amélioration des préparations cellulaires s'est effectuée progressivement et a été concomitante des autres résultats obtenus par la technique de retard sur gel. Pour plus de clarté, nous résumerons nos observations dans ce paragraphe.

Les premiers cytosols de lymphocytes humains ont été préparés suivant un protocole assez proche de celui retenu par Ph. Lefebvre pour

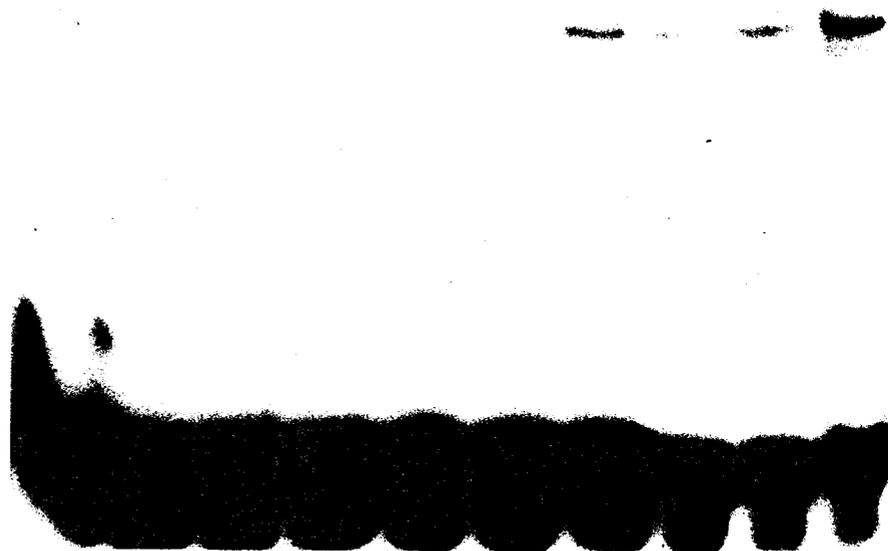
la préparation des cytosols de cellules en culture (Lefebvre, 1988). Après recueil du sang sur héparine et séparation de la population lymphocytaire sur Ficoll, les lymphocytes sont lavés puis lysés dans un tampon de basse force ionique contenant 0,3 % de Triton X-100.

Toutes les autoradiographies obtenues dans ces conditions montrent une bande majeure située à environ 1 cm du puit, et associée à deux ou trois bandes mineures. Après étude de la spécificité (voir paragraphe D2), il apparaît que la bande majeure correspond bien au récepteur des glucocorticoides. La distance de migration par rapport au dépôt est exactement la même que celle observée pour le récepteur de foie de rat pour lequel on n'observait qu'une seule bande.

Un taux de 0,3 % de Triton X-100 peut extraire des protéines nucléaires (Lefebvre, 1988) et pourrait être à l'origine des bandes mineures. C'est pourquoi nous avons essayé de lyser les lymphocytes par ultrasonication. Ces résultats semblaient prometteurs car la lyse cellulaire obtenue est complète. Cependant, les bandes retardées obtenues en retard sur gel apparaissent nettement moins intenses pour des préparations cytosoliques identiques (figure 29). De plus, on observe ici encore la présence de bandes mineures.

Devant de tels résultats, nous sommes revenus aux préparations cytosoliques par adjonction de Triton X-100. A des concentrations de 0,1 % de Triton X 100, il n'est plus observé de bandes parasites et l'intensité de la bande spécifique est proportionnelle au volume de cytosol incubé. Nous pouvons déjà remarquer sur la figure 29, un aspect de la stéroïdo-dépendance de la bande spécifique puisque pour un même volume de cytosol incubé avec l'ADN, l'augmentation de 5 nM à 1  $\mu$ M de la

Préparation	U.S.			TX 100 0,1%			TX 100 0,1%		
	0	1	2	3	1	2	3	1	2

Cytosol ( $\mu\text{l}$ )

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Steroïde nM	-	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	5	5	5	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$
Rapport d'Intensité %					34	35	38	100	100	100

Figure 2) - Intensité de la bande retardée et variation de la technique de lyse cellulaire.

Après prélèvement et purification, les lymphocytes sont répartis en trois groupes. Le premier est lysé par ultrasonication pendant 10 secondes, le deuxième et le troisième lysé dans le tampon C contenant 0,1 % de Triton X 100. Les échantillons sont ensuite centrifugés (voir appendice technique), le surnageant est recueilli et incubé avec 1  $\mu\text{M}$  (couloirs 6,7,8) ou 5  $\mu\text{M}$  couloirs 8,9,10) de dexaméthasone. Chaque échantillon est ensuite étudié par retard sur gel. Les concentrations en cytosol sont de 1  $\mu\text{l}$  (couloirs 2,5,8), 2  $\mu\text{l}$  (couloirs 3,6,9) et 3  $\mu\text{l}$  (couloirs 4,7,10). Le rapport d'intensité des pics correspond au rapport entre l'intensité de la bande retardée induite par le cytosol incubé à 5 nM et l'intensité de la bande obtenue par l'incubation de l'ADN avec le même volume de cytosol mais incubé à 1  $\mu\text{M}$  est définie comme étant égale à 100.

concentration du stéroïde présent dans le cytosol, fait passer l'intensité de la bande retardée d'un facteur de 1 à un facteur de 3 comme cela a pu être mis en évidence par intégration des bandes.

Un taux de 0,1 % de Triton X 100 ne suffit pas toujours à lyser toutes les cellules. De plus, la sensibilité au Triton varie suivant la lignée cellulaire étudiée. Ainsi, pour les préparations cytosoliques, il semble nécessaire de vérifier le taux de lyse cellulaire après action du Triton X 100, ou mieux de rapporter l'intensité des bandes retardées au taux de protéines contenues dans la préparation cytosolique. Une bande retardée présente la plupart du temps un épaulement. Celui-ci ne semble pas dépendre de la préparation cellulaire et le rapport d'intensité des deux bandes ne varie pas en fonction de la quantité de cytosol incubé avec l'ADN (la bande mineure représente toujours 10 à 15 % de l'ensemble des deux pics).

Les préparations cellulaires que nous avons réalisées dans un premier temps cherchaient à étudier le récepteur cytoplasmique. En fait, le dosage de récepteur nucléaire est un sujet aussi très intéressant. Une absence de sensibilité aux glucocorticoides peut être la conséquence de deux types d'anomalies : (1) soit il n'existe pas ou peu de récepteur et ceci est objectivé par une baisse importante de la liaison, que ce soit au stéroïde ou à l'ADN. Cela correspond expérimentalement aux cellules  $r^-$  dont nous avons parlé dans notre revue bibliographique. (2) soit l'anomalie se porte sur un défaut de fonctionnement du récepteur (absence de transfert du complexe hormone-récepteur au noyau, absence de transformation du récepteur ou transformation anormale).

Le dosage du récepteur nucléaire n'est pas abordable par étude du taux de liaison récepteur-stéroïde puisque, après transformation, le récepteur ne lie plus l'hormone (voir résultats personnels, 1ère partie). Par contre, ce récepteur doit reconnaître l'ADN, et la technique de retard sur gel semble parfaitement adaptée pour un tel dosage.

Pour établir avec certitude que la technique de retard sur gel peut servir au dosage du récepteur, il est nécessaire de montrer qu'il existe une relation directe entre le taux de récepteur lié à l'ADN et le taux de récepteur évalué par une technique déjà éprouvée comme celle de la liaison stéroïde-récepteur. Lorsqu'il est appliqué à de faibles quantités de cellules, le dosage du stéroïde lié est réalisé sur cellules entières. Les cellules après purification sont maintenues en survie et incubées avec le stéroïde radioactif. Après lavage, le dosage de la radioactivité intégrée dans les cellules permet de déterminer le taux de récepteur cytoplasmique et nucléaire, transformé ou non.

Pour corréler les deux techniques (dosage par activité de liaison à l'hormone et retard sur gel), il faut que le récepteur présent dans la préparation cellulaire incubée avec l'ADN marqué provienne aussi bien du cytoplasme que du noyau.

Ces deux raisons nous ont poussé à réaliser un homogénat cellulaire dans lequel se trouve l'ensemble du récepteur de la cellule et d'analyser cette préparation en retard sur gel.

Afin d'extraire au maximum le récepteur du noyau, nous avons homogénéisé les cellules dans un tampon associant plusieurs facteurs favorisant la dissociation des complexes récepteur-ADN et qui sont : la

présence de 25 à 50 mM MgCl<sub>2</sub>, de 5-10 mM ZnCl<sub>2</sub>, l'augmentation de la force ionique et enfin le passage d'une concentration de 0,1 à 0,3 % de Triton X 100. En fait, de telles conditions sont inconciliables avec une interaction protéines-ADN. C'est pourquoi les retards sur gel à partir d'homogénat cellulaire nécessitent les étapes suivantes :

- (1) purification cellulaire et lyse dans le tampon adapté
- (2) centrifugation
- (3) dessalage du surnageant suivant le protocole de Maniatis *et al.* (1982) décrit dans l'appendice technique et qui permet de diminuer de 50 à 1 mM le taux de MgCl<sub>2</sub>, de 10 à 0,5 mM le taux de ZnCl<sub>2</sub>, de 160 à 60 mM le taux de NaCl.

Ce protocole semble donner de bons résultats. Il a aussi été appliqué pour l'extraction de protéines cytoplasmiques et nucléaires provenant de cellules HL60. Nous obtenons ici plusieurs bandes mais nous retrouvons toujours la bande majeure. La réalisation de telles préparations est relativement récente et quelques essais infructueux montrent que cette technique est encore perfectible.

Deux améliorations de protocole permettent de déterminer soit le taux de récepteur cytoplasmique, soit le taux de récepteur nucléaire. La première modification est le maintien en survie pendant quelques jours dans un milieu déplété en stéroïde des cellules préalablement purifiées. Le récepteur intracellulaire est alors cytoplasmique et non transformé. La deuxième modification est l'incubation ultérieure de l'extrait cellulaire avec le stéroïde, et cette incubation peut avoir lieu à différents moments de la préparation cellulaire :

(1) incubation des cellules en survie avec le stéroïde.

L'addition du stéroïde provoque le transfert nucléaire du récepteur et sa transformation. Le récepteur dosé ici sera donc le récepteur nucléaire. Si par ailleurs, après préparation cellulaire, l'homogénat est chauffé avant incubation avec l'ADN, nous obtiendrons l'ensemble du récepteur cellulaire.

(2) incubation du stéroïde à l'étape de lyse cellulaire.

Le récepteur incubé est alors cytoplasmique et non transformé. Le chauffage de l'extrait permettra de doser la fraction cytoplasmique du récepteur.

## 2 - COMPOSITION DES TAMPONS

Lors de l'incubation extrait cellulaire-ADN, deux tampons interviennent : celui utilisé pour préparer les extraits cellulaires et celui nécessaire à l'incubation ADN-récepteur.

- A partir du moment où le tampon utilisé pour l'extrait cellulaire permet une bonne préparation du récepteur, ses différents composants semblent peu influencer. Il est vrai que

(1) dans toutes nos préparations cellulaires, le tampon présentait des caractéristiques assez semblables (basse molarité, concentrations en  $MgCl_2$  et  $ZnCl_2$  aux environs de la mM),

(2) lors de l'incubation de l'extrait cellulaire avec l'ADN, le tampon de préparation cellulaire est dilué d'environ 5 à 10 fois.

- La composition du tampon d'incubation protéine-ADN ne semble pas non plus intervenir fortement dans la modification d'intensité des bandes

retardées. Pour éviter d'éventuelles liaisons non spécifiques, nous avons toujours fait nos incubations dans un tampon présentant une force ionique finale comprise entre 60 et 80 mM de NaCl. La seule modification que nous avons faite au cours de nos expérimentations est l'adjonction de 1 mM de ZnCl<sub>2</sub>. En effet, il semble qu'à une telle concentration l'intensité de la bande retardée est plus forte qu'en l'absence totale de ZnCl<sub>2</sub> (voir paragraphe G). Il ne faut cependant pas dépasser cette concentration car le passage de 1 mM à 5 mM de ZnCl<sub>2</sub> dans le tampon d'incubation fait chuter l'intensité de la bande retardée de 1/3.

#### E - CARACTERISATION DE LA BANDE RETARDEE

Caractériser la bande retardée, c'est vérifier (1) sa spécificité vis-à-vis du récepteur et d'autre part (2) sa spécificité vis-à-vis de l'ADN.

##### 1 - SPECIFICITE VIS-à-VIS DU RECEPTEUR

Pour cela, nous avons utilisé le même protocole que celui utilisé pour les récepteurs de foie de rat (figures 30, 31). La première constatation est qu'en l'absence de chauffage préalable, il existe une bande retardée d'intensité faible mais non négligeable.

D'autres facteurs que la présence de 0,3 % de Triton X 100 pourrait expliquer cette anomalie. Toutes les expérimentations sur les lymphocytes ont été réalisées à partir de sang humain provenant de donneurs volontaires. Les cellules étudiées proviennent donc d'un milieu non déplété en stéroïde (présence du stéroïde endogène) et une partie du récepteur est lié à ce stéroïde. De plus, pour mettre au point les techniques, les volumes moyens prélevés étaient de 100 à 200 ml et nous

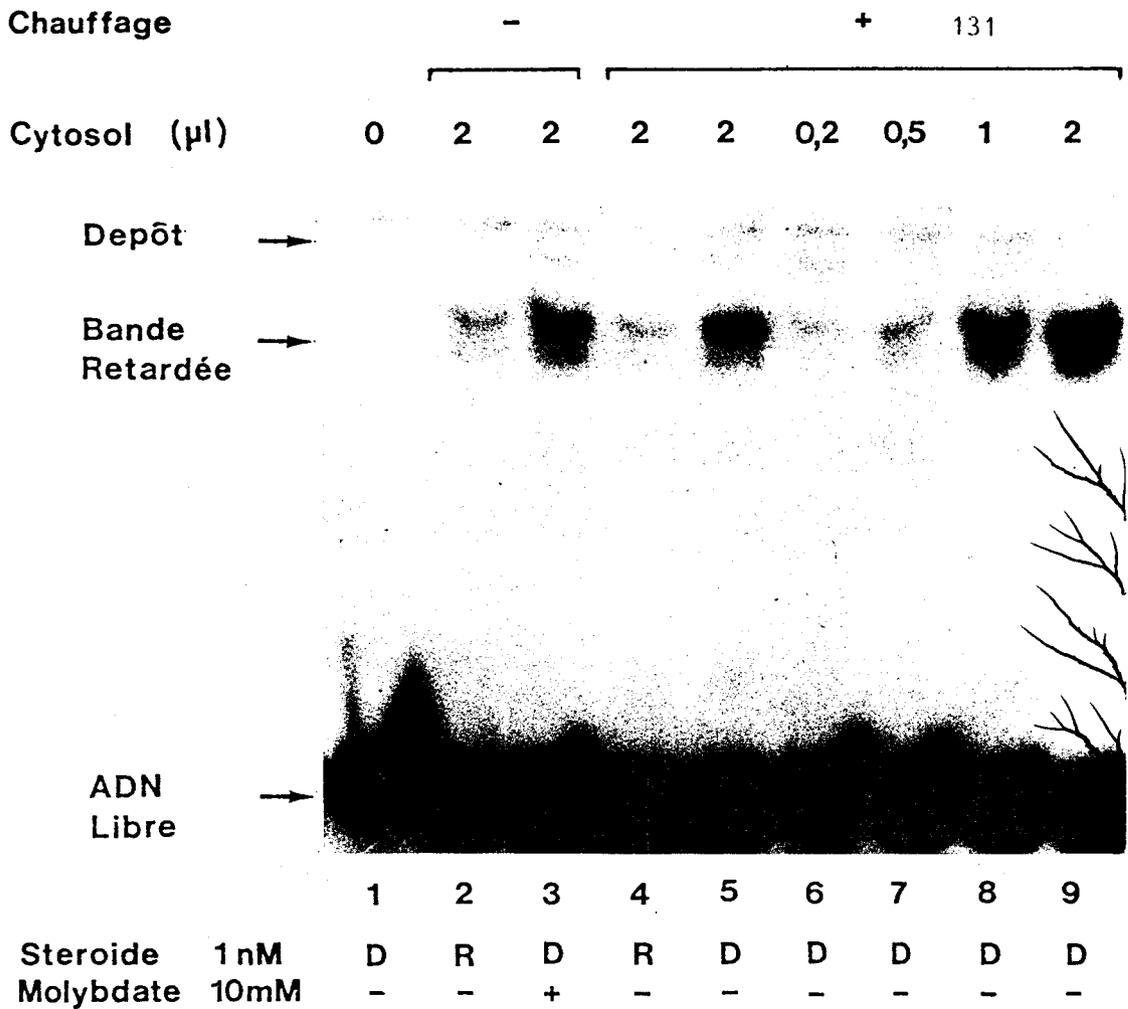


Figure 30 - Hormonodépendance de la bande retardée obtenue sur cytosol de cellules lymphocytaires humaines.

Le protocole est identique à celui décrit figure 32. Le cytosol est incubé avec le RU 486 (R) ou la dexaméthasone (D) préalablement chauffé ou non. Différents volumes de cytosol sont testés.

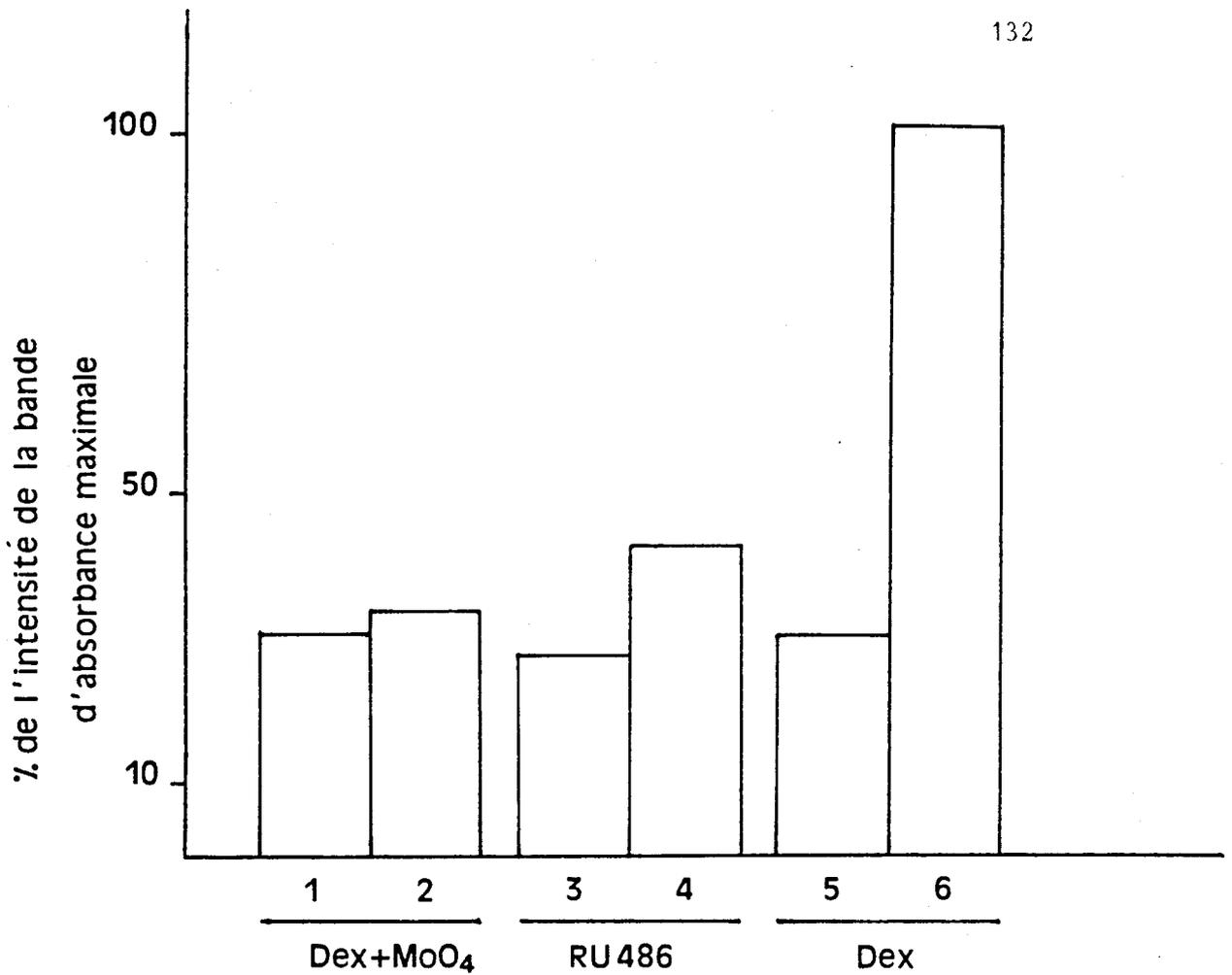


Figure 31 - Intégration des bandes retardées obtenues sur cytosol de cellules lymphocytaires humaines.

Après préparation du cytosol, celui-ci est incubé avec la dexaméthasone en présence ou en absence de MoO<sub>4</sub> 10 mM ou avec le RU 486, une nuit à 4°C. Après chauffage 25°C, 30 min (2,4,6), les complexes sont soumis à un retard sur gel. Les autres échantillons (1,3,5) sont analysés directement. Les bandes retardées révélées par autoradiographie sont intégrées et lues en pourcentage de la bande d'absorbance maximale.

avons cherché à limiter le nombre de prélèvements. C'est pourquoi, le blocage de la transformation par le molybdate ne s'est fait qu'après l'étape de centrifugation du lysat et non immédiatement lors de la lyse.

Il est donc possible que la bande retardée de faible intensité observée en l'absence d'incubation avec la dexaméthasone ou lors de l'incubation de l'extrait avec le stéroïde en présence de molybdate, soit liée au stéroïde endogène qui a fixé une partie du récepteur et s'est transformée lors de la préparation du milieu.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons prélevé le sang, purifié les cellules, puis nous les avons maintenues en survie dans un milieu déplété en stéroïde. Les lymphocytes sont secondairement lysés et incubés ou non avec le stéroïde en présence ou en absence de molybdate. Les essais préliminaires semblent montrer qu'en effet, en absence de stéroïde ou en présence de stéroïde et de molybdate, l'intensité de la bande retardée est fortement diminuée.

Hormis cette différence, nous retrouvons l'ensemble des résultats observés pour le récepteur de foie de rat. Ainsi, on ne constate pas d'augmentation de la bande retardée si le récepteur est en présence de molybdate (figure 31, couloirs 1 et 2) que le cytosol soit préalablement chauffé ou non, l'intensité de la bande retardée ne varie pas si le récepteur est incubé avec le RU 486 (figure 31, couloirs 3 et 4). La déplétion du cytosol en récepteur par chromatographie d'affinité fait disparaître la bande retardée, même si le cytosol déplété est préalablement chauffé. Enfin, le chauffage du récepteur incubé avec la dexaméthasone augmente fortement l'intensité de la bande retardée.

Deux autres critères nous ont également permis d'identifier la protéine liée à la bande retardée (figure 32). D'une part, nous avons cherché à vérifier que la protéine liée à l'ADN lie aussi le stéroïde. Pour cela nous avons incubé le cytosol avec la dexaméthasone radioactive, puis le récepteur a été transformé par chauffage. Le cytosol est secondairement mis en présence de l'oligonucléotide non marqué. Après électrophorèse, le gel est découpé en bandes puis compté en radioactivité. Comme nous le voyons sur la figure 32a, le stéroïde tritié lié au récepteur migre sur une distance d'environ 1 cm du puits, distance correspondant au front de migration de la bande retardée détectée par l'oligonucléotide radioactif. En présence d'un excès de stéroïde froid, il n'existe plus de migration détectable, ce qui montre bien le caractère spécifique de la migration. Il n'a pas été possible d'obtenir une image en pic du profil de migration du stéroïde tritié pour deux raisons. D'une part, la technique que nous employons ne permet pas de déposer des volumes de cytosol très importants. D'autre part, étant donné le manque d'affinité du récepteur transformé pour le stéroïde, les complexes hormone-récepteur doivent probablement se dissocier lors de la migration.

Le deuxième argument est l'identification du récepteur par son site antigénique. La figure 32b montre un retard sur gel selon le protocole suivant :

- le cytosol est incubé avec son stéroïde puis chauffé
- un échantillon est incubé ensuite avec un anticorps monoclonal de souris spécifique (GR 49) reconnaissant le récepteur
- après incubation, chacun des échantillons est incubé soit avec la

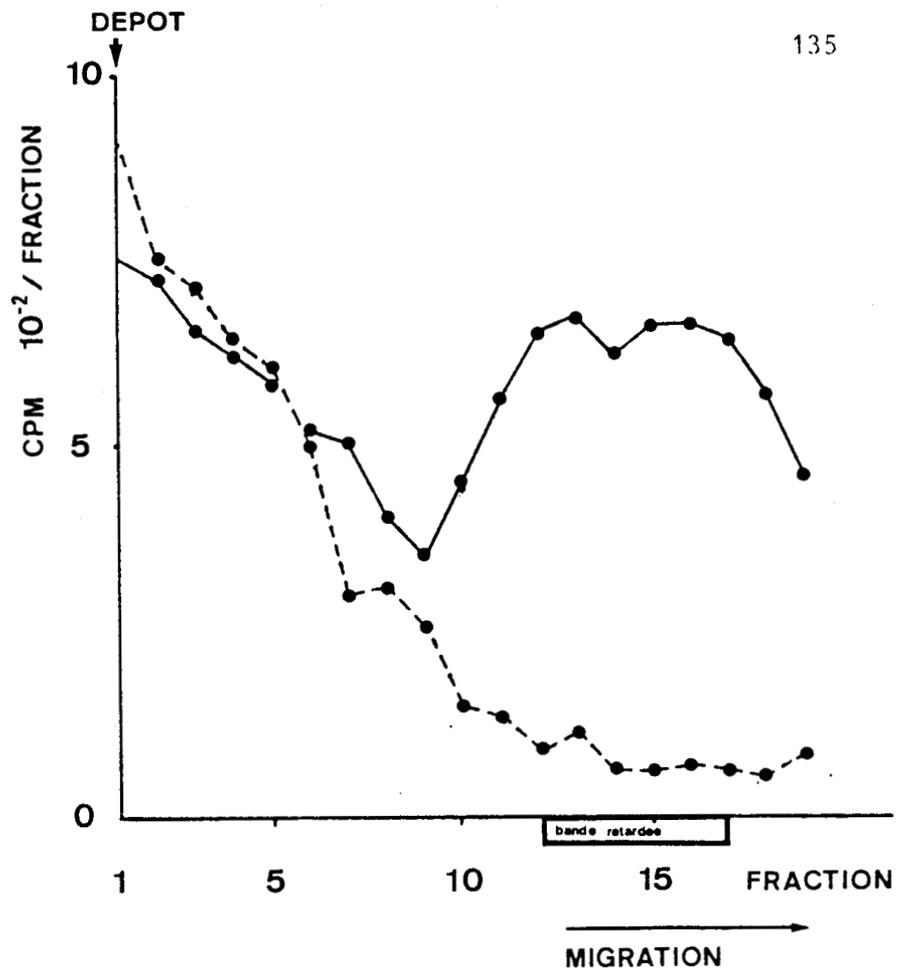


Figure 32 - Identification du récepteur dans la bande retardée.

A : par le stéroïde. Après retard sur gel réalisé sur cytosol incubé avec de la dexaméthasone tritiée et un GRE froid, le gel est découpé en bandes de 0,5 mm, digéré dans  $H_2O_2$  et dosé par addition de scintillateur sur le compteur. Le rectangle inscrit "bande retardée" correspond au niveau de la bande retardée détectée par autoradiographie.

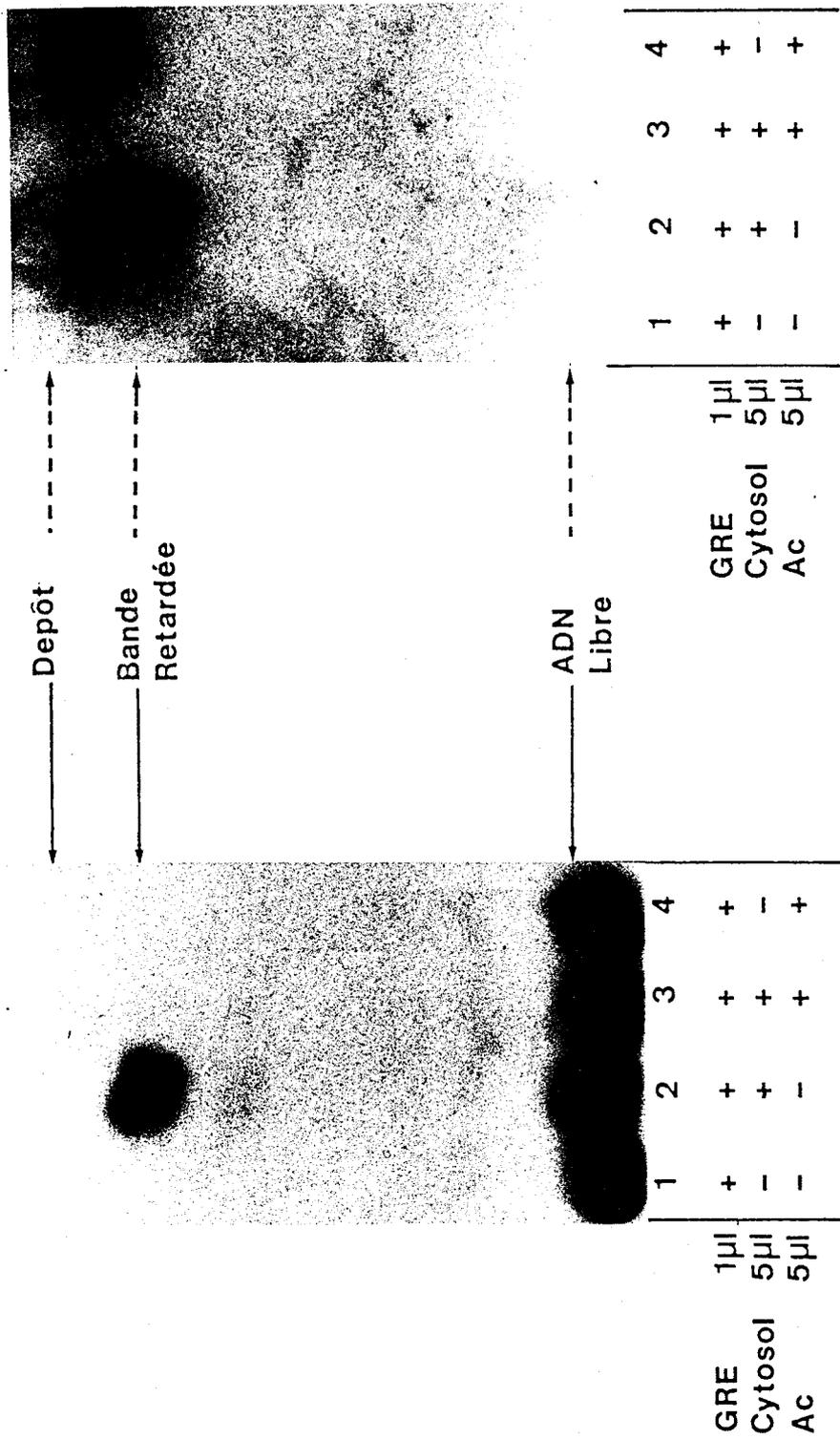


Figure 32 - Identification du récepteur dans la bande retardée  
 B : par anticorps monoclonal (voir texte).

séquence GRE radioactive (figure de gauche, soit avec la sonde GRE froide (figure de droite)

- après dépôt et électrophorèse, la plaque est coupée en deux. La partie radioactive est révélée par autoradiographie. La partie non marquée est transférée sur nitrocellulose et révélée successivement par l'anticorps monoclonal puis par un anticorps antisouris marqué à l'Iode 125.

De cette expérimentation il découle :

(1) la bande retardée liée au cytosol est également révélée par l'anticorps antirécepteur (couloir 2 de chaque figure)

(2) l'incubation du cytosol avec l'anticorps spécifique fait disparaître la bande retardée (couloir 3, figure de gauche). Ceci est probablement dû au fait que le complexe Ac-récepteur ne peut pénétrer dans le gel comme le montre l'absence de bande au niveau du couloir 3 (figure de droite).

(3) l'anticorps seul migre dans le gel mais faiblement et ne lie pas l'ADN (couloir 4).

Ces résultats justifieraient certes un plus ample développement, mais de toute façon, ils objectivent que la bande retardée au niveau du gel correspond bien au récepteur des glucocorticoides.

## 2 - SPECIFICITE DU COMPLEXE ADN-RECEPTEUR ET AFFINITE

La spécificité du récepteur vis-à-vis de l'oligonucléotide a été déterminée par la compétition entre la sonde marquée et deux oligonucléotides non spécifiques dont la séquence est connue. Comme nous

le voyons sur la figure 33, un oligomère non spécifique ne possède que peu d'affinité pour le récepteur puisqu'il faut un excès de 1000 fois pour voir diminuer la bande retardée.

Si la séquence non spécifique possède une relative parenté avec la séquence GRE, il existe une compétition partielle entre le GRE et cette séquence. Tel est le cas de la séquence TRE (Thyroïde Response Element) pour laquelle on observe une communauté de structure partielle des bases (voir revue bibliographique). Alors qu'un excès entre 1000 et 10 000 fois en oligonucléotide non spécifique est nécessaire pour éliminer la bande retardée liée au récepteur, un excès de 10 fois suffit pour le GRE. En présence d'un excès de 100 fois en TRE, la bande retardée disparaît. Il existe donc une compétition partielle entre le GRE et le TRE.

Au vu de tels résultats, il apparaît que l'interaction mise en évidence par le retard sur gel est bien spécifique. Il nous a semblé nécessaire de préciser les caractéristiques de la liaison. D'un point de vue cinétique, la réaction d'association doit être très rapide puisque l'incubation du cytosol avec l'ADN donne le même retard sur gel que cette incubation dure 15 ou 60 minutes.

Nous avons ensuite cherché à déterminer la constante de dissociation à l'équilibre  $K_D$  du récepteur pour son site ADN. Pour cela nous avons suivi le protocole proposé par Baker *et al.* (1986), (voir revue bibliographique). Nous avons donc incubé des volumes fixes de cytosol en faisant varier la concentration en oligonucléotide marqué par des dilutions successives. Cette expérience a été faite pour des

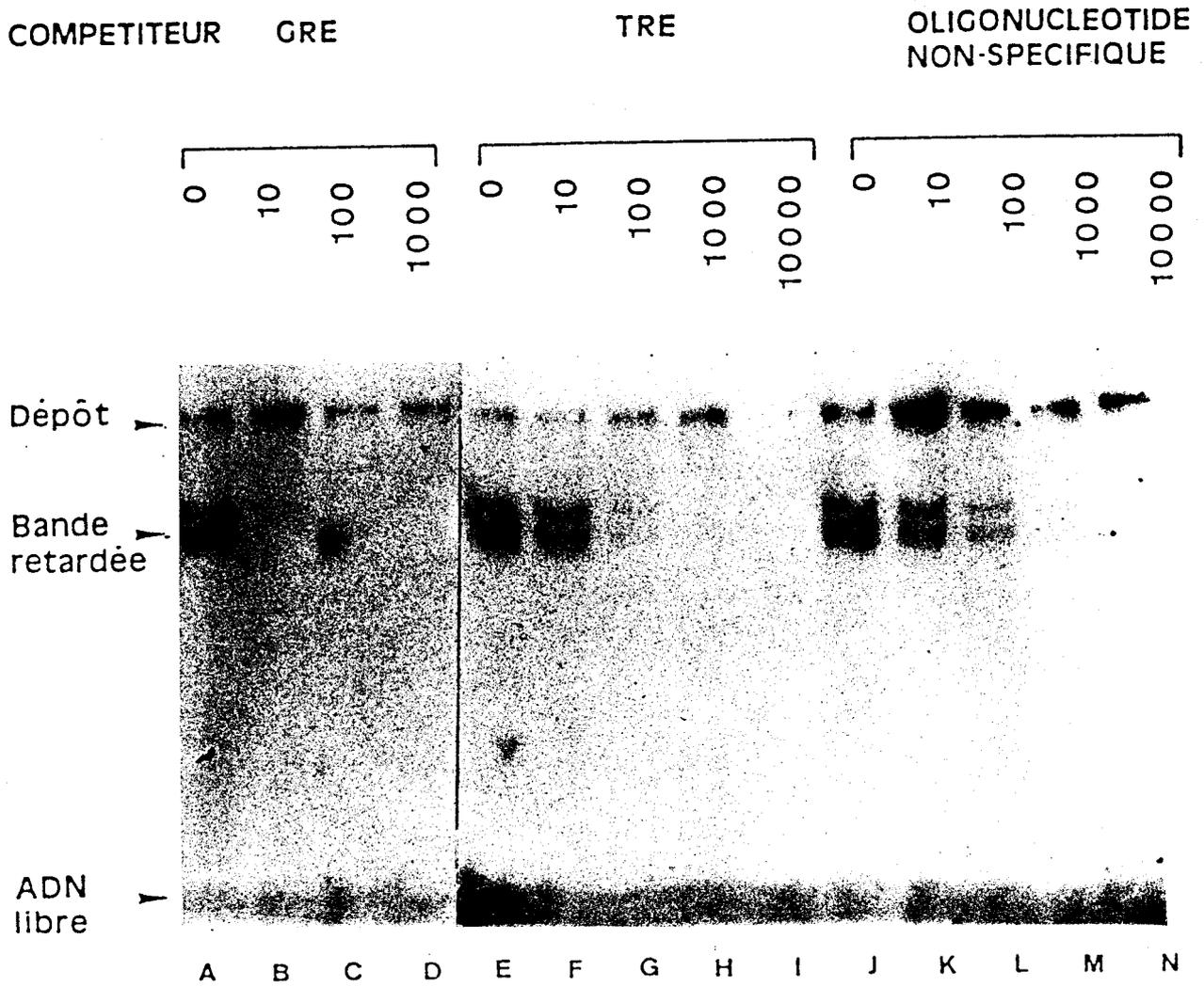


Figure 33 - Spécificité de la bande retardée induite par le cytosol de lymphocytes humains

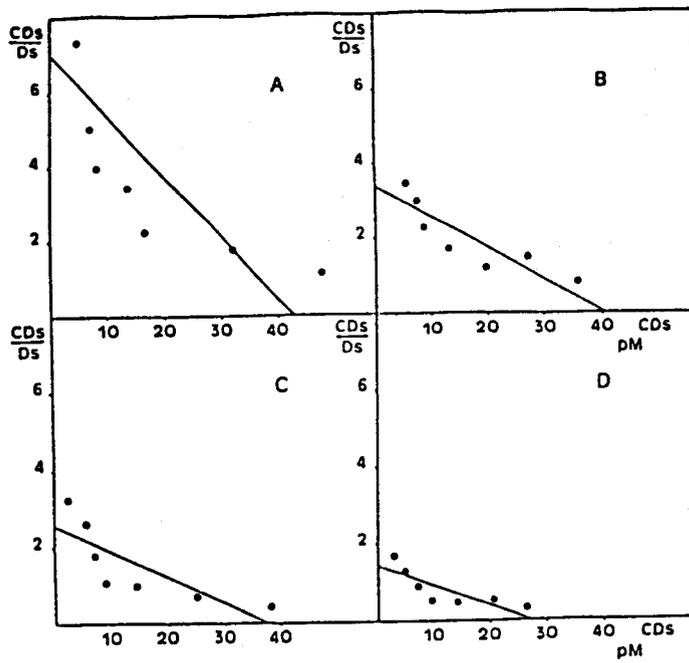
concentrations en poly(dI)poly(dC) qui étaient de 0,5 ; 1 ; 2 et 4  $\mu\text{g}$  pour 10  $\mu\text{l}$  d'incubat final.

Plutôt que de doser les bandes spécifiques et l'ADN total par intégration de l'intensité de chaque couloir obtenu (protocole proposé par Tan *et al.*, 1988), nous avons préféré le protocole suivant : la radioactivité de chaque dilution d'ADN est déterminée par le dosage d'un échantillon au compteur. Connaissant la concentration molaire en ADN de chaque solution, le taux d'ADN lié au récepteur est évalué par découpage de la bande retardée et comptage du gel en radioactivité.

Une telle méthode nous semble plus simple d'un point de vue pratique. En effet, le protocole de Tan *et al.* (1988) nécessite que l'intensité des bandes retardées et celle des bandes correspondant à l'ADN libre ne saturent pas la capacité de lecture du densitomètre. Pour obtenir de tels résultats, il faut modifier les temps d'exposition des films autoradiographiques. Ces temps varieront aussi avec l'activité du  $^{32}\text{P}$  dont la demi-vie est de 14,2 j. Notre protocole se limite à repérer la bande retardée par autoradiographie et n'est donc pas gêné par une éventuelle saturation du densitomètre.

Après essai des différentes techniques de dosage, il apparaît que la méthode la plus fiable est la digestion du gel d'acrylamide dans 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  et l'addition de scintillateur avant comptage. Pour plus de rigueur, tous les tubes ont subi cette préparation avant détermination de la radioactivité.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 34, le  $K_D$  du récepteur de notre oligonucléotide est de l'ordre de  $10^{-10}$  M. L'affinité est donc bonne, tout à fait comparable à celle décrite pour d'autres



	Poly(dI)Poly(dC) µg/ml	$K_A \cdot M \cdot 10^{-9}$ $M \cdot 10^6$	$K_D$ app. (-pente) $M \cdot 10^{10}$	coeff. corr. r	n	
A	0,5	2,35	0,86	11,6	0,73	7
B	1	4,7	0,6	16,7	0,70	7
C	2	9,4	0,47	22	0,73	7
D	4	18,8	0,37	27	0,74	7

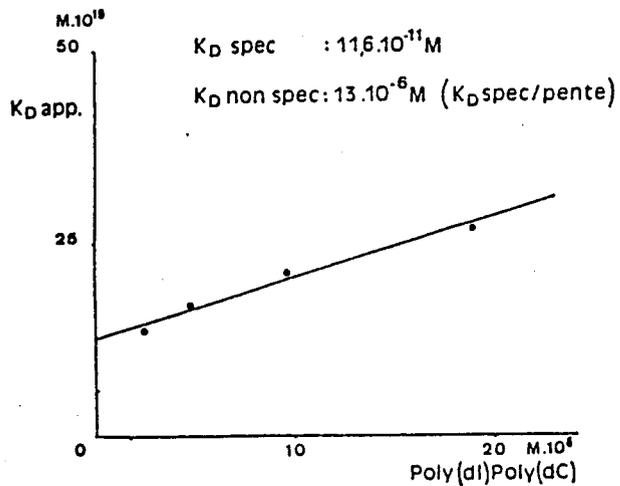


Figure 34 - Mesure de la constante de dissociation à l'équilibre GRE-récepteur de lymphocytes humains.

facteurs de transcription comme le facteur TF III C (Baker *et al.*, 1986), TF III C2 (Boulanger *et al.*, 1987).

Comme nous pouvons le voir sur la figure 35, l'expression du rapport ADN lié/ADN total en fonction de l'ADN total donne une droite pour chaque valeur de poly(dI)poly(dC) (figure A,B,C,D) mais les points expérimentaux sont relativement dispersés. Deux interprétations peuvent expliquer cette observation. D'une part il semble possible de regrouper les points en deux droites distinctes pour chaque figure. Une telle éventualité impliquerait l'existence de deux sites, ou d'une fixation du récepteur en deux étapes. Si le récepteur se fixe sur son GRE à l'état de dimère, il est possible qu'on ait de tels résultats. On pourrait également imaginer une fixation en deux étapes avec une fixation spécifique mais de faible affinité liée au premier doigt à zinc, le deuxième venant stabiliser la liaison secondairement. Une autre interprétation concernant cette observation vient peut-être d'être donnée par Schmid *et al.* (1989). Pour ces auteurs, la demi-vie du complexe récepteur-ADN est très courte (15') lorsqu'il n'existe qu'une seule séquence consensus au sein de l'ADN testé. D'après plusieurs auteurs (Garner et Revzin, 1981 ; Fried et Crothers, 1981, Revzin *et al.*, 1986), la méthode de retard sur gel permet de mesurer une constante d'équilibre si l'équilibre atteint en solution reste figé lors de l'électrophorèse. Il faut donc que la vitesse de dissociation du complexe protéine-ADN soit très lente. Le fait que la demi-vie du complexe récepteur-ADN soit courte explique peut être la dispersion des points expérimentaux et nos résultats ne donnent en fait qu'une valeur approximative de l'affinité du récepteur pour l'ADN.

Pour déterminer plus précisément ces constantes d'affinité, il est sans doute nécessaire d'utiliser des méthodes sans rupture d'équilibre comme celle préconisée par Abraham *et al.* (1988) ou d'employer des méthodes telles que le foot-print si les sondes sont plus longues (voir revue bibliographique).

### 3 - DIMERISATION DU RECEPTEUR

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, le récepteur lié à l'ADN est probablement sous forme dimérique. Ceci a pu être montré par l'utilisation de récepteurs chimériques tant pour les oestrogènes (Kumar et Chambon, 1988) que pour les glucocorticoides (Tsai *et al.*, 1988).

En fait, nous n'avons pas cherché à mettre en évidence l'existence d'une dimérisation. Cependant, lors de nos études sur l'interaction entre le récepteur contenu dans l'extrait cellulaire et notre séquence GRE, nous avons observé des résultats contradictoires, parfois en faveur d'une dimérisation parfois rejetant cette hypothèse.

Par ultracentrifugation en gradient de sucrose, les complexes [<sup>3</sup>H]-Dexaméthasone-récepteur présentent une taille identique lorsqu'ils sont libres ou liés à l'oligonucléotide marqué (figure 35). Cette expérimentation est encore une preuve supplémentaire de l'interaction récepteur-oligonucléotide, mais n'est pas en faveur de la dimérisation du récepteur transformé.

Ces résultats sont en totale opposition avec ceux obtenus par Wrange *et al.* (1989) qui par ultracentrifugation en gradient de sucrose observent un déplacement du pic correspondant au récepteur de 4 à 6 S.

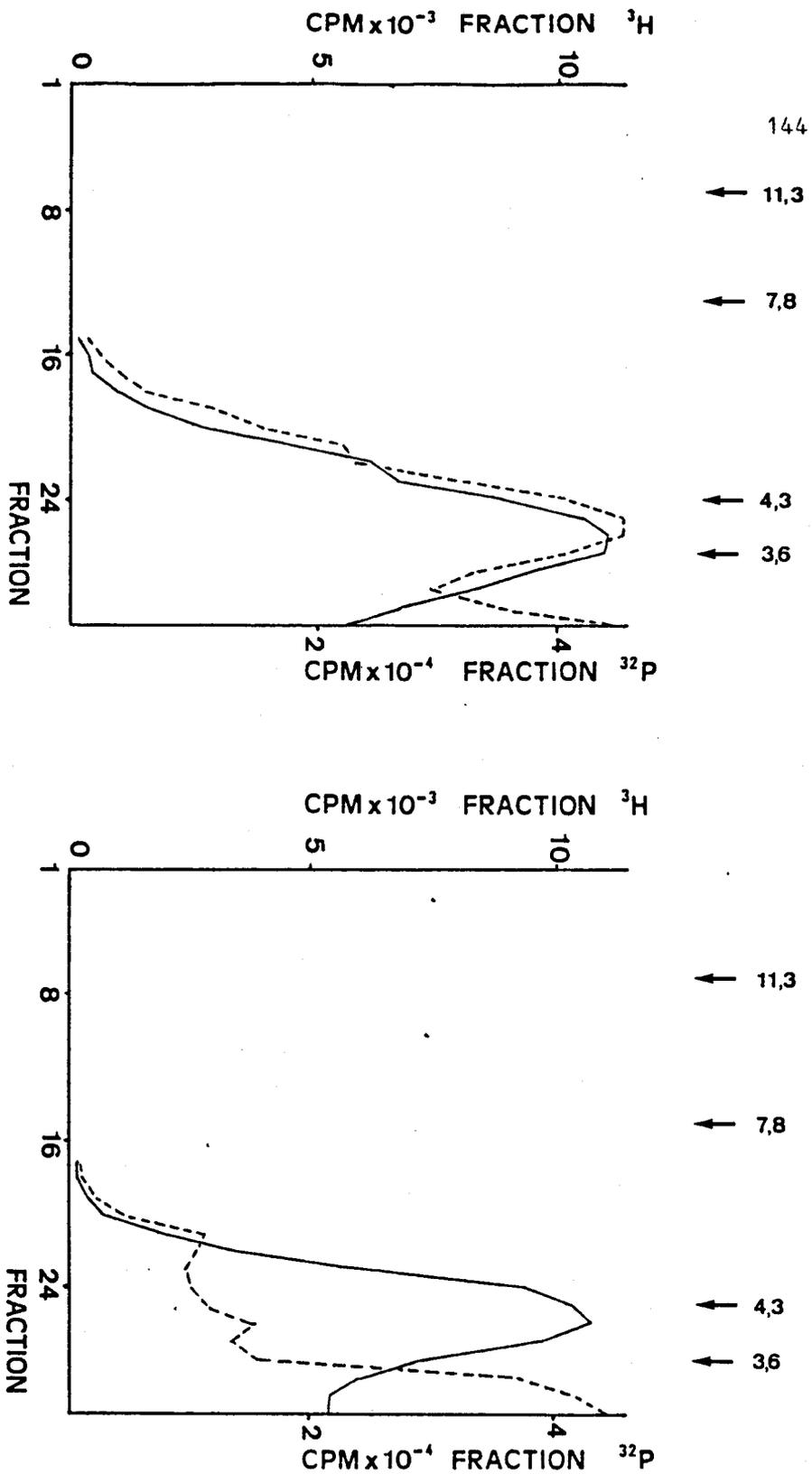


Figure 35 - Gradient de sucrose réalisé sur des complexes récepteurs transformés-GRE.

La courbe en pointillé représente le dosage de la radioactivité tritiée, celle en trait plein le dosage de la radioactivité <sup>32</sup>P. Les flèches indiquent les constantes de sédimentation des protéines utilisées comme standard

Il semble que ce soit bien la dimérisation du récepteur qui provoque cette modification et non l'association du récepteur avec une protéine de 72 Kd comme ces mêmes auteurs l'avaient proposé auparavant (Wrange *et al.*, 1986). La différence entre ces deux résultats a été attribué par ces auteurs (Wrange *et al.*, 1989) à l'affinité de la séquence, et pour eux la dimérisation s'observerait sur des séquences très affines. Peut-être l'affinité de notre séquence n'est-elle pas suffisante. Il se peut aussi que la longueur de la sonde que nous utilisons soit trop petite. En effet, la séquence étudiée par Wrange contient 35 paires de bases alors que la nôtre n'en contient que 21.

Cette absence de modification de taille des complexes ADN-récepteur ainsi que l'existence d'une bande unique observée en retard sur gel, n'est peut-être pas incompatible avec la dimérisation et plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces observations.

(1) La porosité du gel de polyacrylamide est faible puisque la concentration d'acrylamide est de 10 %. Il est possible que les dimères de taille trop importante, ne puissent entrer dans le gel. Dans ce cas les bandes retardées observées correspondraient à des monomères.

(2) L'excès molaire en oligonucléotide est trop important et la dimérisation devient impossible. Cette hypothèse compatible avec la première pourrait expliquer l'observation faite lors de l'application de la technique de retard sur gel au récepteur lymphocytaire humain. Comme nous le voyons sur la figure 36, avec l'augmentation du volume de cytosol incubé pour une même concentration en oligonucléotide, on

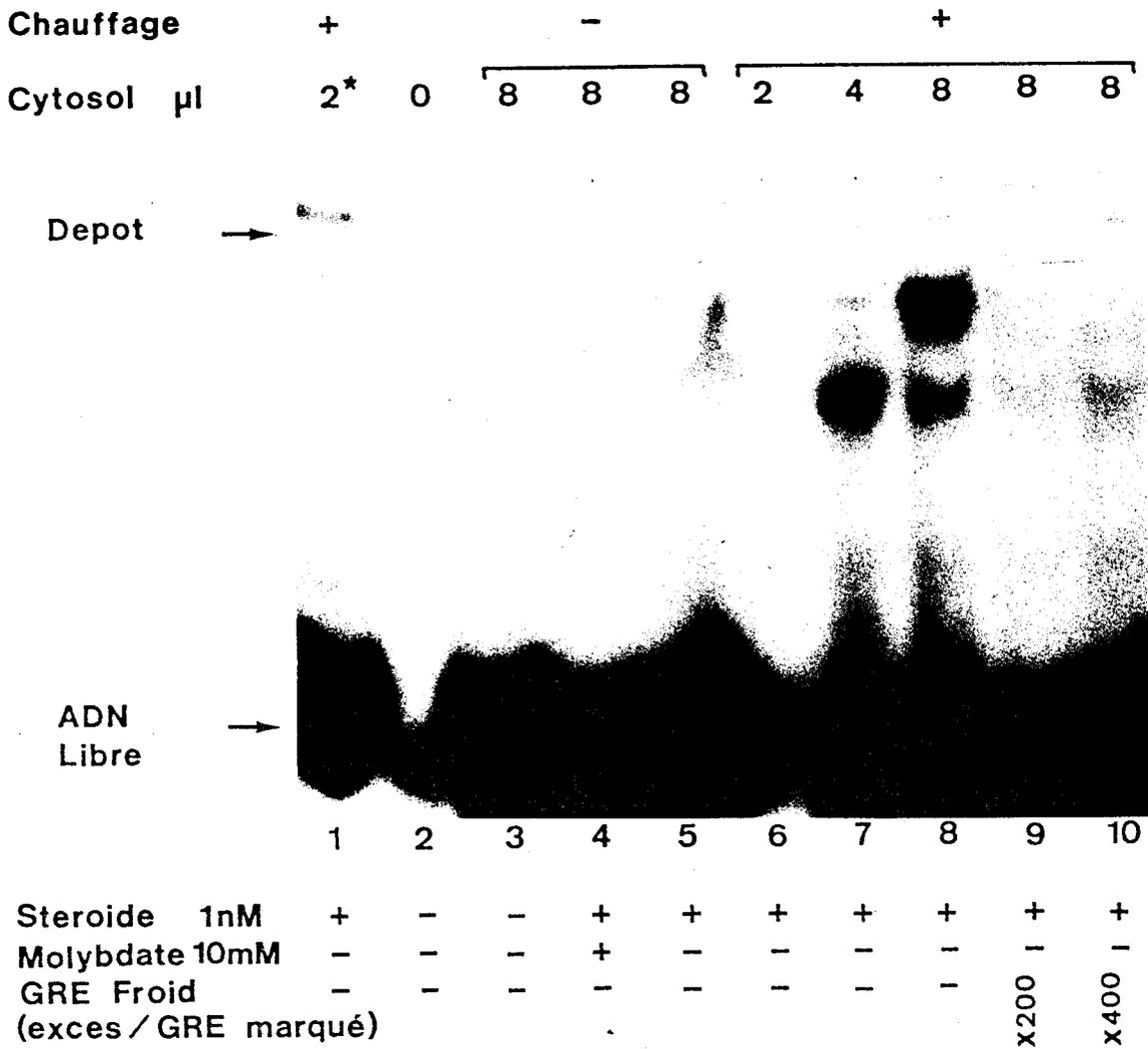


Figure 36 - Modification des bandes retardées en fonction de la concentration de cytosol incubé avec l'ADN

\* Cytosol de foie de rat

observe une modification de la distance de migration de la bande la plus intense. Dans cette électrophorèse réalisée sur un gel de 8 % d'acrylamide (donc avec une concentration moindre en acrylamide), la bande la plus retardée migre de manière identique à la bande retardée induite par l'incubation récepteur foie de rat-ADN (couloir 1 par rapport au couloir 8) et qui sert de témoin. Par contre, à des concentrations plus faibles en cytosol (couloirs 6-7), la bande retardée migre plus loin. Il semble donc qu'il y ait un passage d'une bande faiblement retardée à une bande plus retardée lorsque l'on augmente la concentration en cytosol dans l'incubat. Cette observation pourrait s'expliquer par une dimérisation progressive du récepteur.

Ainsi, à faible concentration en cytosol, il y a peu de récepteur et la liaison a toutes les chances d'être de 1 monomère de récepteur par GRE. En augmentant la concentration en cytosol, l'excès en sonde diminue et la dimérisation peut se produire. Le complexe dimère-GRE étant de taille plus importante, celui-ci migre moins, ce qui explique la diminution de migration de la bande retardée lorsqu'on augmente la concentration en cytosol. Pour confirmer cette hypothèse, il est cependant nécessaire de confirmer la présence de récepteur au niveau de chacune des bandes par l'utilisation d'anticorps.

(3) Une troisième hypothèse est que la longueur de la séquence de l'oligonucléotide est insuffisante pour permettre la fixation de deux sous-unités de récepteur. Ceci est envisageable si on pense au rôle stabilisant des séquences situées de part et d'autre du GRE (Beato, 1989). Il est probable à ce moment que la polymérisation de la sonde par la séquence GATCT permette de répondre à cette hypothèse.

(4) Il est possible que la liaison monomère de récepteur-GRE ne s'observe que dans des circonstances particulières. Tsai *et al.*(1988) ainsi que Kumar et Chambon (1988) mettent en évidence la dimérisation du récepteur grâce à l'utilisation de récepteurs mutés présentant une affinité moindre pour le GRE.

## F - APPLICATION DE LA TECHNIQUE AU DOSAGE DU RECEPTEUR

L'application de la technique de retard sur gel à un dosage qualitatif et quantitatif du récepteur transformé nécessite la vérification de critères de reproductibilité et de répétabilité de la méthode. Si ces dosages sont relativement faciles à obtenir pour un dosage chimique il n'en est pas de même pour un dosage indirect qui ne peut se faire que par intégration de la bande retardée ou par dosage de la radioactivité liée après découpage du gel.

### 1 - STANDARDISATION

Cette étape n'en est actuellement qu'à ses débuts et elle doit tenir compte de plusieurs facteurs.

#### a) Les facteurs liés à la préparation cellulaire

La faible quantité des prélèvements que nous utilisons, fait qu'il est difficile de parfaitement standardiser les préparations. Pour éviter cet écueil, il est nécessaire de rapporter les résultats au nombre de cellules totales ou au taux de protéines contenu dans les préparations. La première solution n'est cependant pas fiable car le rapport ne tient pas compte du taux de lyse cellulaire. Lors de la mise au point de la technique, nous avons vérifié qu'en fait le taux de protéine des extraits variait suivant les préparations (entre 0,8 et 2,2 g/l). Cette constatation n'a cependant pas gêné nos études, car chaque série d'expérience a été réalisée à partir d'un même prélèvement et les variations d'intensité des bandes proviennent donc d'un même extrait cellulaire traité différemment.

Dans les quelques essais d'application de la technique réalisés sur les lymphocytes de patients présentant une hyperéosinophilie et sur la régulation de l'expression du récepteur par les facteurs comme le TNF, nous avons rapporté ces résultats au taux de protéine.

Le problème majeur de la préparation des extraits cellulaires est certainement la présence du stéroïde endogène. Seule la mise en survie des cellules dans un milieu déplété en stéroïde permettra d'obtenir une véritable stéroïdo-dépendance de notre bande retardée.

b - Les facteurs liés à la sonde oligonucléotidique

Le marquage de la sonde par le  $^{32}\text{P}$  en 5' ne pose généralement pas de problème, mais les rendements peuvent varier après la chromatographie de gel-filtration nécessaire pour éliminer l'ATP radioactif libre. La dilution liée à la préparation de la sonde aboutit à un taux d'oligonucléotide de l'ordre de 0,2 à 0,5 ng/ $\mu\text{l}$  soit 10 à 20 fMoles. L'oligomère utilisé est donc en excès par rapport au récepteur présent dans les préparations cellulaires puisque celui-ci est de l'ordre de la fMole.

Etant donné les variations du taux de récepteur, mais aussi de la concentration en oligonucléotide, il est possible qu'une augmentation de la quantité de sonde radioactive incubée évite des modifications de l'intensité des bandes retardées, modifications induites en fait par des variations de concentrations relatives en l'un ou l'autre des éléments.

c - L'analyse de la bande retardée

Ceci est un point fondamental car sur l'analyse de la bande retardée repose toute la fiabilité de la technique. Deux méthodes d'analyses sont réalisables.

- autoradiographie et intégration des bandes retardées

Cette méthode est certes la plus simple. Elle permet l'identification d'autres bandes si elles existent. La quantification par l'intégration des bandes semble être fiable puisqu'il existe une bonne proportionnalité entre le taux de protéines incubées et l'intensité de la bande retardée (figure 37a). Cependant, l'analyse est relativement plus longue car il est impossible d'utiliser un écran intensifiant qui diffuse légèrement la bande retardée et fausse légèrement les résultats (Tan *et al.*, 1988 et observations personnelles).

- autoradiographie et découpage des bandes

Une autoradiographie avec écran suivie du découpage des bandes retardées et comptage de la radioactivité donne des résultats très proches de ceux observés par densitométrie (figure 37b). Cependant, il ne semble pas que le dosage direct des bandes soit la technique la meilleure et il faut même lui préférer l'analyse de la radioactivité après addition d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant une nuit à 50°C pour digérer le gel, avec ou sans addition ultérieure de scintillateur.

Ces vérifications concernant la méthode d'analyse montrent bien la précision de la technique de retard sur gel puisqu'il existe une

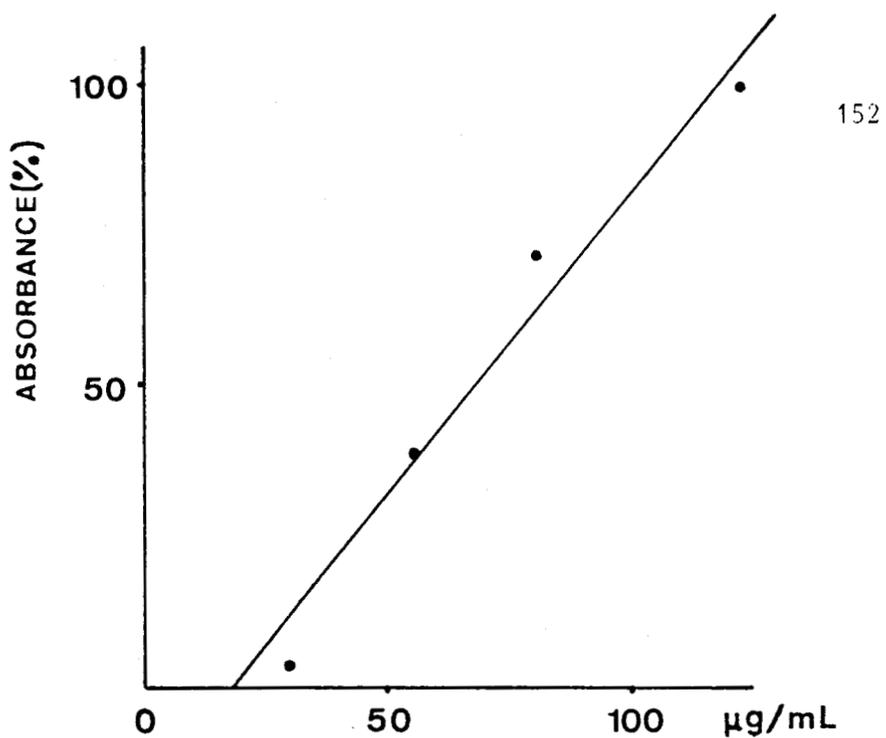


Figure 37a - Corrélation entre l'intensité des bandes retardées et le taux de protéines incubé

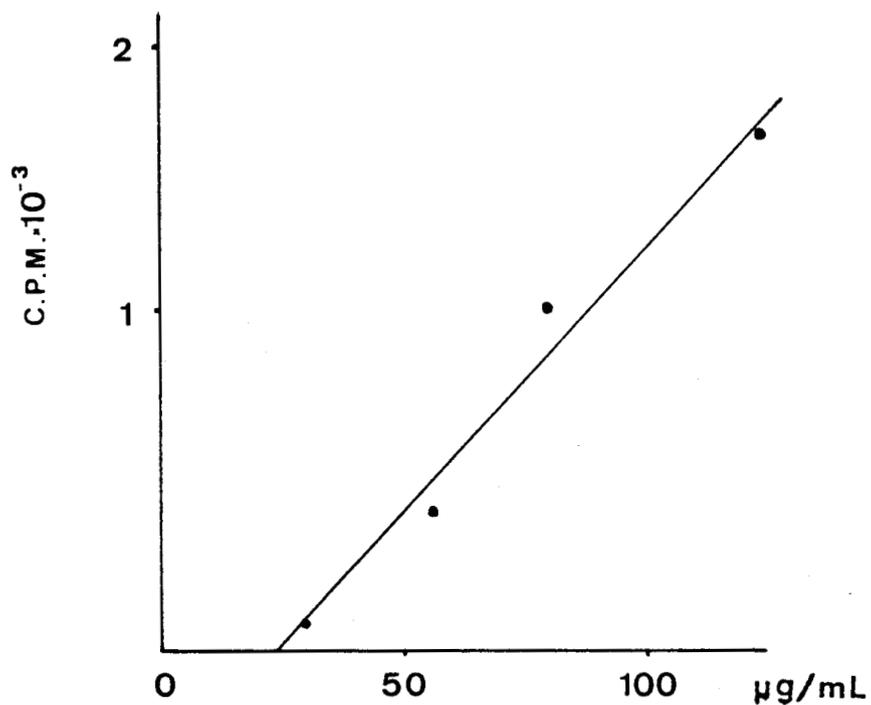


Figure 37b - Corrélation entre l'intensité des bandes retardées et le dosage de la radioactivité de ces bandes

parfaite proportionnalité entre le taux de protéines déposé et l'intensité ou la radioactivité de la bande retardée.

En fait, à terme, il sera probablement nécessaire d'établir ce dosage avec deux contrôles qui éviteront tout problème d'analyse, tant au niveau de la préparation cellulaire qu'au niveau du dosage proprement dit. Le premier contrôle sera le dosage systématique du taux de protéines de chaque préparation, le deuxième étant l'utilisation d'un standard réalisé à partir d'un pool d'extrait cellulaire et servant de référence.

## 2 - REPRODUCTIBILITE ET REPETABILITE DE LA METHODE

Pour déterminer la reproductibilité, nous avons comparé l'intensité des bandes retardées pour un même volume déposé. Cette reproductibilité est bonne puisque pour des bandes de faible intensité le coefficient de variation est de 9 % (moyenne  $27 \pm 3$  n = 8) et pour les bandes de forte intensité celui-ci est de 2 % (moyenne  $83 \pm 4,32$  n = 5).

Etant donné la faible quantité de matériel que nous avons utilisé, il nous a été impossible d'étudier rigoureusement la répétabilité de la méthode. Cependant, pour les quelques échantillons qui ont été dosés à deux reprises par la technique de retard sur gel, il apparaît que

- (1) la congélation des échantillons n'altère pas l'intensité de la bande retardée
- (2) pour un même volume de cytosol déposé, l'intensité de la bande retardée n'est fonction que de la demi-vie de

la sonde. Seule la réalisation d'un standard fait à partir d'un pool de lymphocytes humains permettra de confirmer la bonne reproductibilité et répétabilité de la méthode.

### 3 - CORRELATION AVEC D'AUTRES METHODES

Pour assoir l'aspect quantitatif de notre technique, il est nécessaire de rapporter nos résultats à des méthodes de dosage connues. Actuellement, le seul dosage quantitatif du récepteur est celui du stéroïde lié à la protéine. Ceci nécessite l'élimination du stéroïde libre, soit par l'utilisation de charbon dextran (Rousseau *et al.*, 1972) lorsque le dosage est réalisé *in vitro*, soit par des lavages répétés lorsque le dosage est réalisé sur cellule entière. Il est également possible de connaître la répartition cellulaire de récepteur dans la cellule par des protocoles tels que ceux décrits par P. Lefebvre (1988). Ce type de dosage n'est cependant réalisable qu'à partir de quantité relativement importante de cellules.

Cependant, la signification du dosage [<sup>3</sup>H] stéroïde-récepteur n'est pas la même que celle du dosage par retard sur gel. En effet, dans le premier cas, le dosage représente le taux de stéroïdes spécifiquement lié au récepteur sans préjuger de l'aspect fonctionnel caractéristique du dosage par retard sur gel. Cette deuxième méthode quantifie le taux de récepteur lié à un ADN spécifique, c'est-à-dire le taux de récepteur transformé.

Ces deux dosages ne quantifient donc pas la même fraction du récepteur. De plus, le dosage du récepteur par retard sur gel est gêné par la présence du stéroïde endogène qui peut surévaluer la bande

retardée. Seul le maintien en survie dans un milieu sans stéroïde des cellules purifiées permettrait d'éliminer les bandes retardées observées en absence de stéroïde pour les lymphocytes humains.

Tout le problème est donc de réaliser un dosage du récepteur par retard sur gel et que celui-ci soit corrélé à un facteur constant près, au dosage du récepteur provenant de la même origine mais évalué par sa liaison au stéroïde.

a - Corrélation *in vitro*

Pour corréler les deux méthodes, il est nécessaire de démontrer qu'une variation du taux de stéroïde lié au récepteur s'accompagne d'une variation identique de l'intensité de la bande retardée. Nos premiers essais ont été réalisés en milieu acellulaire avec incubation de cytosol en présence de différentes concentrations en stéroïde tritié. Pour chaque concentration en stéroïde étaient réalisés un dosage du stéroïde lié et un dosage par retard sur gel après avoir chauffé chaque aliquot à 25°C pendant 30 minutes pour obtenir un taux de transformation important.

En fait, la plupart des expérimentations utilisant ce protocole n'ont pas été concluantes et nous n'avons pu obtenir une corrélation très nette entre les deux méthodes. En réalité, ceci n'est guère étonnant puisque l'origine du récepteur dosé par chacune des méthodes n'est pas exactement identique. En effet, le dosage par la technique au charbon dextran permet de réaliser un Scatchard *in vitro* et dose aussi bien le récepteur non transformé, transformé qu'éventuellement le mérorécepteur. Etablir une corrélation entre ce dosage et celui obtenu par retard sur gel implique qu'il existe une

relation strictement proportionnelle entre le taux de stéroïde incubé et le taux de récepteur transformé. Bien que cette hypothèse semble être admise, notre estimation de l'importance des bandes retardées est faussée par

(1) le stéroïde endogène qui n'a pu être éliminé par les lavages lors de la préparation des cellules,

(2) le récepteur déjà transformé et extrait des noyaux lors de la purification du cytosol. De plus, la sensibilité des deux techniques est totalement différente.

b - Corrélation sur cellules maintenues en survie

Dans un deuxième temps, il nous a semblé plus intéressant d'obtenir une corrélation entre l'intensité des bandes retardées induites par le stéroïde sur des cellules en culture et le taux de récepteur déterminé par le stéroïde sur cellules entières.

Les techniques de retard sur gel réalisées sur homogénat cellulaire n'ayant pas encore été parfaitement mises au point, nous nous sommes intéressés à la fraction cytosolique des cellules initialement incubées avec différentes concentrations en stéroïde. Pour cela, nous avons opté pour le protocole suivant :

(1) prélèvement, purification des cellules et incubation de celles-ci avec des concentrations croissantes en dexaméthasone. Le stéroïde lie donc le récepteur puis est transféré au noyau. Ce transfert est d'autant, plus important que la concentration en hormone dans le milieu est grande (Lefebvre 1988).

(2) lyse cellulaire, centrifugation et récupération du cytosol, puis nouvelle incubation avec une concentration saturante en

stéroïde marqué. Seul le récepteur encore présent dans le cytoplasme au moment de la lyse cellulaire pourra donc lier le stéroïde mis lors de la deuxième incubation. Le taux de récepteur détecté ici sera donc inversement proportionnel à la concentration en stéroïde mise lors de la première incubation.

Il est alors possible de doser ce récepteur par le stéroïde (le deuxième stéroïde étant radioactif) ou par retard sur gel après avoir chauffé chaque échantillon de cytosol à 25°C pendant 30 min. La seule différence entre les deux méthodes de dosage est que la première dose tout le récepteur subsistant alors que le retard sur gel n'en dose que la forme transformée.

Nous n'avons ici encore pas obtenu de corrélation significative. Ceci est probablement lié aux faibles quantités de matériel dont nous disposions.

En fait, lors du dosage du récepteur sur cellules entières, la grande majorité du récepteur dosé est un récepteur transformé et nucléaire. Ne parvenant pas à corréler le dosage du récepteur transformé cytoplasmique obtenu par retard sur gel au dosage du récepteur transformé nucléaire dosé sur cellules entières, il nous a semblé logique d'essayer de doser par retard sur gel le taux de récepteur nucléaire.

Après incubation des cellules avec des concentrations croissantes en stéroïde, les cellules lymphocytaires sont lavées puis lysées dans un tampon hypotonique en présence de 0,1 % de Triton X 100. Ce taux de Triton X 100 suffit à lyser les cellules, les protéines nucléaires n'étant pour la plupart pas extraites à un tel taux

(Lefebvre, 1988). Dans l'hypothèse où une faible quantité de récepteur est extraite du noyau, celle-ci est identique pour tous les échantillons cellulaires. Après centrifugation du lysat, le surnageant est éliminé et le culot repris dans le même tampon en présence de 0,3 % de Triton X 100, 10 mM ZnCl<sub>2</sub> et 25 mM MgCl<sub>2</sub>. L'association d'une telle concentration en détergent et du MgCl<sub>2</sub> qui dissocie non spécifiquement les interactions protéine-ADN et du ZnCl<sub>2</sub> qui semble inhiber la liaison récepteur-ADN (voir paragraphe suivant) a permis de solubiliser les récepteurs transformés qui sont récupérés après une deuxième centrifugation au niveau du surnageant.

Après un dessalage rapide (voir appendice technique), l'extrait nucléaire est incubé avec la sonde marquée. Comme nous le voyons sur la figure 38A, il existe une proportionnalité entre la concentration du stéroïde incubé avec les cellules et l'intensité de la bande retardée. En absence d'incubation, on constate encore l'existence d'une faible bande retardée, sans doute liée à la présence du stéroïde endogène.

Le dosage de la radioactivité liée réalisée en parallèle sur cellules entières montre le même profil (figure 38B). Ici en absence de stéroïde, on ne constate pas de liaison puisque le stéroïde endogène est non radioactif. On constate une saturabilité identique pour les deux techniques de dosage puisqu'à 16 nM, tant l'intensité de la bande retardée que le taux de liaison au stéroïde sont maximum.

A une concentration de 32 nM de stéroïde on observe une diminution des deux paramètres étudiés. Les modifications parallèles montrent bien l'identité du dosage entre la technique de retard sur gel

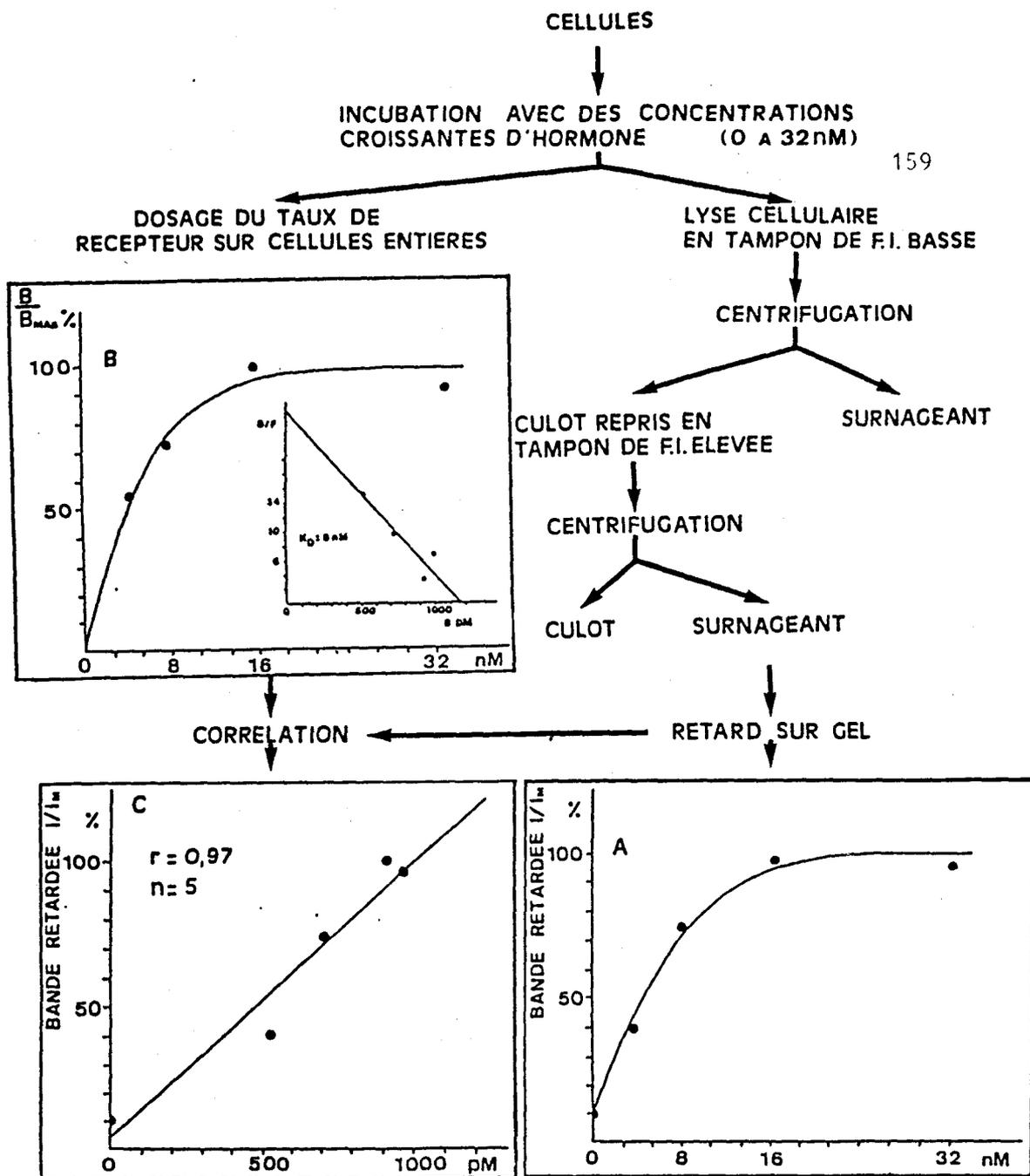


Figure 38 - Corrélation entre le dosage de la radioactivité sur cellules entières et l'intensité des bandes retardées

- effet des variations de concentration en dexaméthasone sur l'intensité des bandes retardées
- analyse en Scatchard sur cellules entières de la liaison à la dexaméthasone
- corrélation liaison sur cellules entières-retard sur gel

et le dosage du récepteur sur cellules entières. Il est possible qu'à des concentrations importantes en stéroïde, il existe un rétrocontrôle négatif diminuant le taux de récepteur transformé nucléaire. La figure 38C montre la très bonne corrélation entre les deux méthodes de dosage puisque le coefficient  $r$  est de 0,98. Ceci nous permet donc d'affirmer que la méthode de retard sur gel est une méthode quantitative pour un dosage fonctionnel du récepteur transformé.

#### G - APPLICATION DU RETARD SUR GEL A LA PATHOLOGIE DU RECEPTEUR

Dans le cadre d'une collaboration avec le service d'Immunologie du Pr. Capron, nous réalisons le dosage du récepteur des glucocorticoides sur cellules entières de patients atteints d'hyperéosinophilie essentielle. Un certain nombre de ces sujets présentaient une diminution du nombre de sites évalués par le dosage de la liaison au stéroïde sur cellules entières. Il nous a donc semblé intéressant de réaliser pour ces patients le dosage du récepteur cytoplasmique par la technique de retard sur gel. Comme nous le voyons sur la figure 39A, tous les patients pour lesquels le nombre de sites récepteur est normal, présentent une bande retardée spécifique d'intensité analogue à celle obtenue pour un extrait cellulaire témoin. Les quelques variations d'intensité que nous avons pu observer, étaient en fait liées au manque de standardisation de la préparation cellulaire (variation du taux de lyse cellulaire et de la concentration en protéine).

Deux sujets présentaient un nombre de sites inférieurs au seuil de détectabilité du dosage par liaison au stéroïde. On estime en

effet que la méthode de dosage du récepteur par le stéroïde ne permet pas la détection du récepteur en dessous de 1000 sites par cellule. En retard sur gel, ces deux patients présentaient une chute importante de l'intensité de la bande retardée, mais celle-ci subsistait dans les deux cas.

Ces résultats montrent bien que la technique de retard sur gel peut être utilisée comme méthode de dosage du récepteur. Ces observations montrent aussi que le seuil de détectabilité du retard sur gel est beaucoup plus bas.

Comme nous l'avons déjà dit, cette méthode apporte des informations supplémentaires.

Un des deux patients possédant un taux de récepteur faible présentait de plus l'apparition d'une bande supplémentaire migrant plus loin que la bande normale (figure 39B). Cette bande anormale n'ayant jamais été rencontrée dans toutes les préparations cellulaires jusqu'ici réalisées, il est possible que cette bande corresponde à un récepteur tronqué. Pour vérifier cette hypothèse, il serait cependant nécessaire d'identifier la protéine contenue dans la bande grâce à l'utilisation d'anticorps antirécepteur. Dans l'hypothèse probable où cette bande correspond bien au récepteur, nous voyons l'intérêt de la technique de retard sur gel qui non seulement permet le dosage du récepteur, mais aussi de montrer l'existence d'une anomalie du récepteur pouvant expliquer la pathologie.

A	Number of Glucocorticoid sites per cell	Intensity of the shifted band (%)	Cytosol Proteins (g/l)
Normal subject	5000	100	2
Patient 1	<1000	28	N.D*
Patient 2	4000	95	2
Patient 3	<1000	30	1,6

\*Non Determined

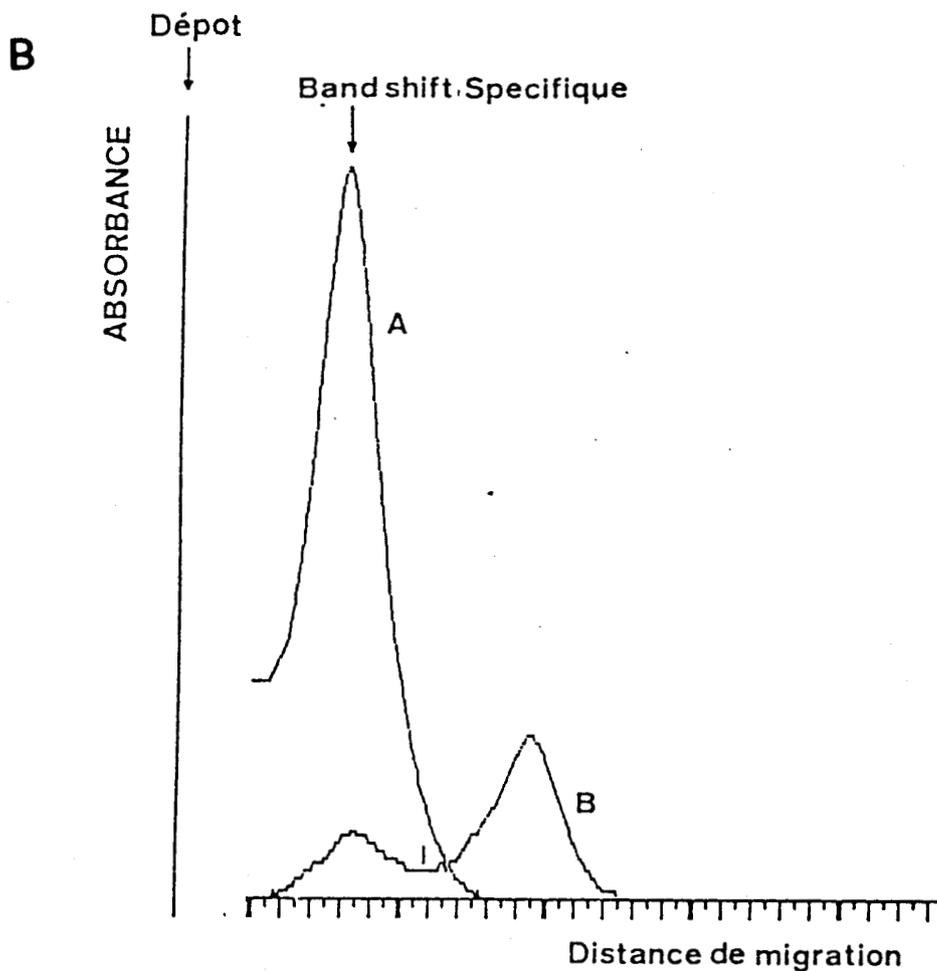


Figure 39 - Application du retard sur gel à la pathologie du récepteur.

A : corrélation entre une baisse du taux de récepteurs dosés sur cellules entières et l'intensité des bandes observées en retard sur gel.

B : Anomalie de la bande retardée

## H - APPLICATIONS DU RETARD SUR GEL A LA CARACTERISATION DU RECEPTEUR

### 1 - ROLE DU ZINC DANS LA LIAISON RECEPTEUR-GRE

Lavin *et al.* (1988) ont rapporté le rôle inhibiteur du zinc dans la liaison entre le récepteur de l'hormone thyroïdienne et son ADN spécifique. Par ailleurs, Norris et Kohler (1983) ont montré que les ions divalents comme le  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Cd}^{++}$  ou le  $\text{Sn}^{++}$  ne modifient pas la transformation mais inhibent la liaison ADN- récepteur des glucocorticoides de hamster à une concentration de 2 mM. Par contre à cette même concentration, le  $\text{MgCl}_2$  ainsi que le  $\text{CaCl}_2$  n'ont aucun effet sur le récepteur.

Etant donné ces résultats, ainsi que le rôle du Zn dans l'établissement des doigts impliqués dans l'interaction récepteur-GRE (voir partie bibliographique), il nous a semblé intéressant d'étudier les variations de liaison récepteur-GRE induits par le  $\text{ZnCl}_2$ . Comme nous le voyons sur la figure 40, la quantité d'ADN retardée augmente d'un facteur de trois environ quand on passe de 0 à 1-2 mM de  $\text{ZnCl}_2$  dans le milieu d'incubation. Cet effet est cependant limité puisqu'à partir de 2,5 mM, on constate une forte diminution de la liaison. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Freedman *et al.* (1988) sur un fragment du récepteur des glucocorticoides de 150 acides aminés.

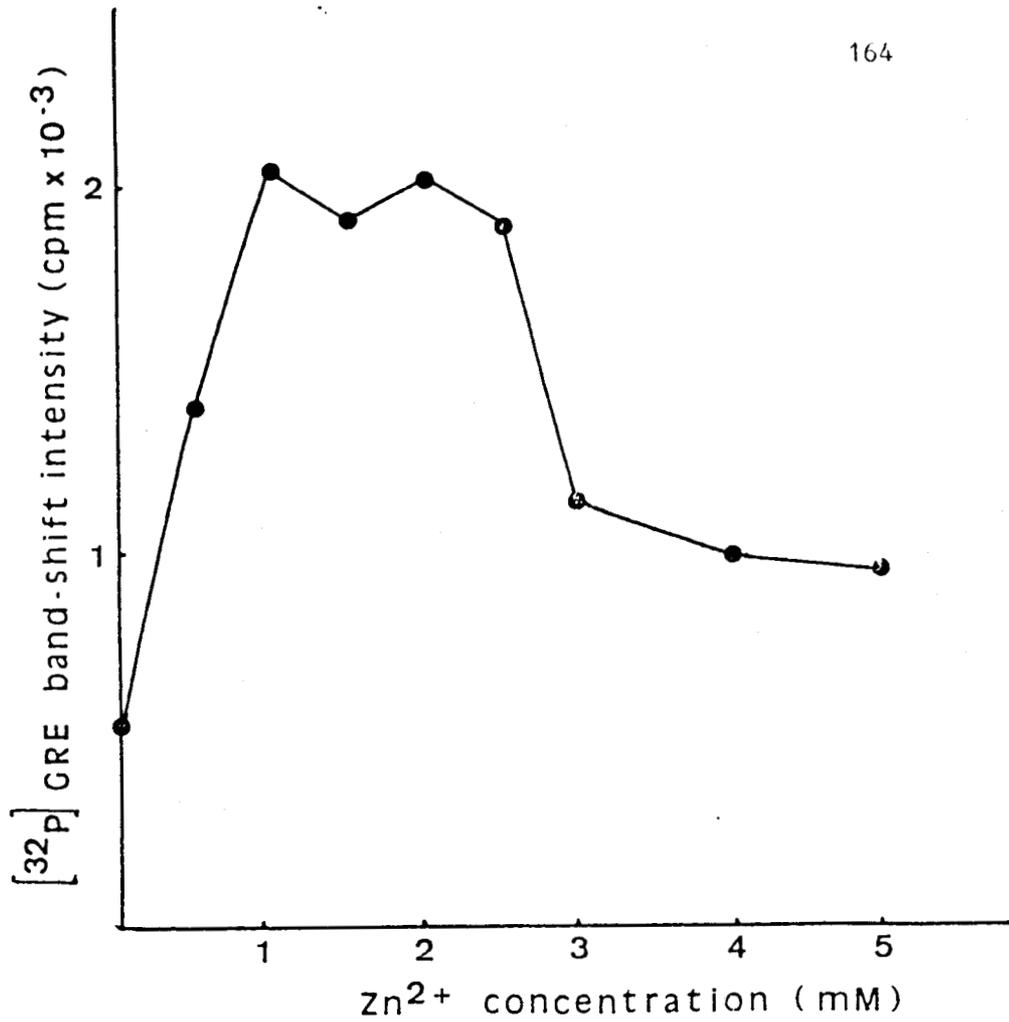


Figure 40 - Rôle du zinc dans l'intensité des bandes retardées

Des concentrations constantes de cytosol sont incubées avec la sonde GRE en présence de concentrations croissantes en  $ZnCl_2$ . Après retard sur gel, les bandes retardées sont découpées, digérées dans  $H_2O_2$  et dosées par radioactivité.

## 2 - COMPETITION ENTRE LE RECEPTEUR ET UN PEPTIDE DE SYNTHÈSE

Notre collaboration avec l'Unité INSERM U16 de la Faculté de Médecine de Lille nous a amené à tester l'interaction entre un peptide de synthèse correspondant au premier doigt à Zn du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des glucocorticoides et la séquence GRE que nous utilisons en retard sur gel.

Ce peptide, en présence de  $ZnCl_2$  change de conformation comme cela a été montré par dichroïsme circulaire et par résonance magnétique nucléaire. Il semble que ce peptide complexe le Zn au niveau des cystéines. Cependant, l'ensemble des résultats obtenus ne semblent pas en faveur d'une interaction feuillet  $\beta$ -hélice  $\alpha$ , comme cela a été proposé pour certains facteurs de transcription comme TFIIIA (Berg 1988).

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence une interaction directe entre la séquence GRE et le peptide. En effet, en retard sur gel deux facteurs interviennent pour limiter la migration des complexes protéine-ADN

(1) la taille du complexe gêne la migration. Ce mécanisme est probablement prépondérant dans le retard de migration des complexes protéine-ADN.

(2) la modification de charge intervient également, la protéine masquant les groupements phosphate. Une éventuelle bande retardée peptide-GRE sera plutôt due à ce deuxième mécanisme.

Nous avons réalisé de nombreux essais tentant de mettre en évidence une bande retardée par interaction directe ADN-peptide. Nous

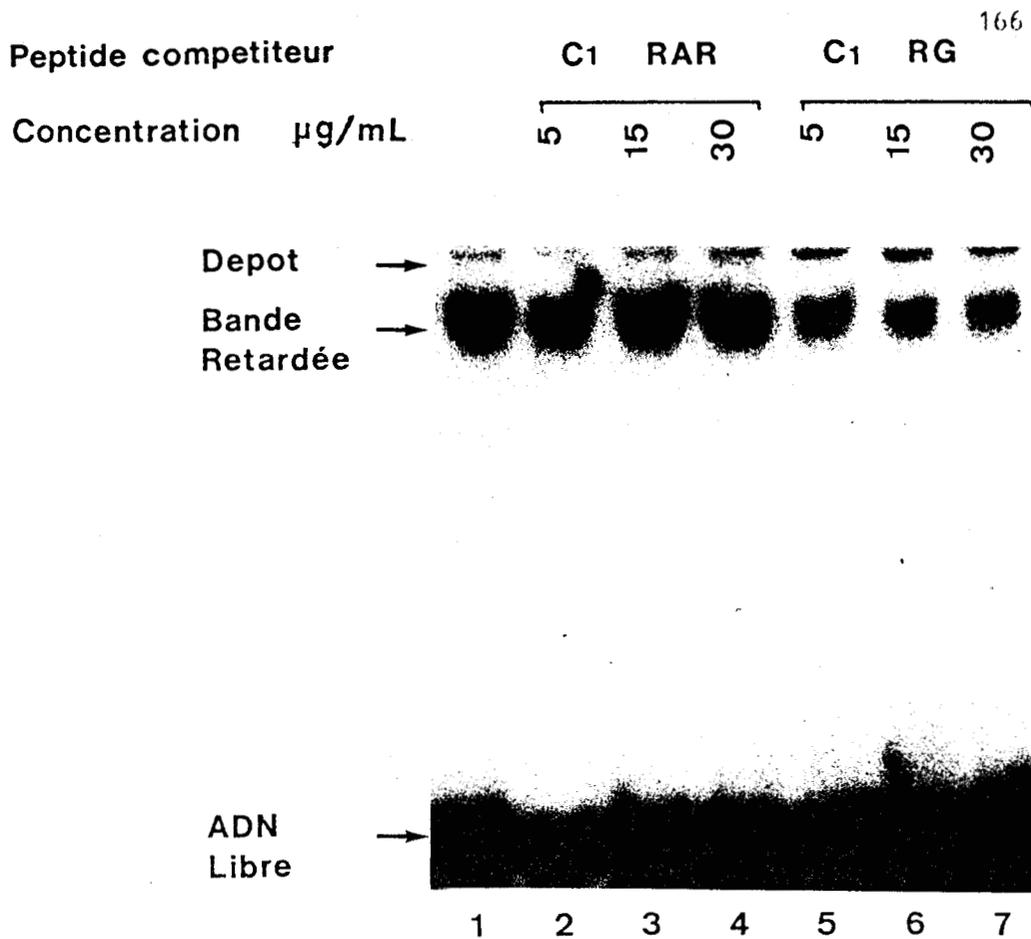


Figure 41 - Compétition peptide doigt à zinc-récepteur des glucocorticoïdes par retard sur gel.

Des concentrations constantes de cytosol sont incubées avec la sonde GRE marquée en présence de concentrations croissantes en peptides correspondant au premier doigt du récepteur des glucocorticoïdes (couloirs 5,6,7) ou de celui de l'acide rétinoïque (couloirs 2,3,4).

avons particulièrement modifié nos conditions électrophorétiques en utilisant des gels de 20 % d'acrylamide, ou des gels en gradient de 10 à 20 % d'acrylamide. Nous avons aussi modifié nos conditions d'incubation (baisse de la force ionique, absence de poly(dI)poly(dC) présence de  $ZnCl_2$  et hautes concentrations en peptides). En fait, nous n'avons jamais pu mettre en évidence de bande retardée.

Deux possibilités s'offrent donc à nous : soit le peptide ne possède réellement pas d'affinité, soit cette affinité est faible et ne peut donc être mise en évidence par le retard sur gel.

Dans le premier cas, il est possible que le peptide ne présente d'affinité envers l'ADN qu'associé avec le deuxième doigt. Cependant, la plupart des résultats montrent que la spécificité de liaison est liée à ce premier doigt (voir revue bibliographique). Il semblait donc plus vraisemblable que l'affinité peptide-GRE soit faible.

Plusieurs techniques permettant l'étude des interactions protéine-ADN de faible affinité ont été proposées. Elles reposent pour la plupart sur des dosages de l'affinité sans rupture d'équilibre, c'est-à-dire qu'un des deux composants du complexe est retrouvé en quantité constante tout au long de l'expérimentation. Ces méthodes utilisent des quantités de matériel très importantes et n'étaient donc pas accessibles pour notre étude.

C'est pour cela que nous avons opté pour un abord indirect, réalisant une compétition entre le récepteur et le peptide de synthèse, vis-à-vis de la séquence GRE. Comme nous le voyons sur la figure 41, la présence de concentrations croissantes en peptide diminue l'intensité de la bande retardée (couloirs 5, 6 et 7 comparés au couloir 1). Il existe

donc bien une compétition entre le peptide et le récepteur lymphocytaire. Lorsque le peptide compétiteur est présent, les variations d'intensité des bandes retardées sont faibles et dans la plupart de nos expériences, le passage de 5 µg/ml à 30 µg/ml de peptide ne modifiait pas considérablement la bande retardée. Ceci est normal car le peptide ayant un poids moléculaire de 300 environ, les concentrations molaires en compétiteur oscillent entre 170 µM et 1 mM. De telles concentrations sont en large excès par rapport au récepteur des glucocorticoides. Ces résultats tendent aussi à montrer que l'affinité du peptide est faible. Si le peptide lyophilisé est repris dans un tampon ne contenant pas de ZnCl<sub>2</sub> et que la compétition se fait elle-aussi en absence de ZnCl<sub>2</sub>, on ne constate pas de compétition entre le peptide et le récepteur.

Le doigt à zinc correspondant au domaine de liaison à l'ADN du récepteur de l'acide rétinoïque a également été synthétisé. Bien qu'il possède une structure proche de celle du doigt du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des glucocorticoides, il existe une compétition, mais beaucoup plus faible puisque l'intensité des bandes retardées n'est que faiblement diminuée (figure 41, couloirs 2,3,4 comparés au couloir 1).

Nous avons réalisé une compétition analogue en utilisant un autre peptide de synthèse correspondant à une partie de la séquence N-terminale du récepteur de l'acide rétinoïque. Ce peptide, présente une taille analogue à celle des peptiudes doigt mais la séquence est totalement différente. Ce peptide ne présente aucune affinité pour le récepteur. Le fait que toutes les compétitions aient été observées en

présence d'un large excès en oligonucléotide non spécifique poly(dI)poly(dC) confirme que l'inhibition obtenue est spécifique.

Il semble donc que le peptide correspondant au premier doigt du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des glucocorticoides présente une affinité faible pour la séquence GRE mais que cette liaison est spécifique.

Cette reconnaissance n'est cependant pas stable puisqu'on ne peut observer de liaison directement. Ceci est peut-être lié au manque du deuxième doigt peptidique dont le rôle est, semble-t-il de stabiliser la liaison récepteur-GRE.

#### CONCLUSIONS ET DEVELOPPEMENTS ULTERIEURS

L'ensemble de nos résultats montre que la technique de retard sur gel peut être utilisée pour l'étude du récepteur des glucocorticoides. Nous avons identifié le récepteur lié à l'ADN essentiellement sur des critères d'hormono-dépendance de la bande retardée. Cette hormono-dépendance a été facile à mettre en évidence au niveau du récepteur cytosolique de foie de rat. Les préparations cellulaires réalisées à partir de lymphocytes humains ont presque toujours montré une bande retardée de faible intensité en absence d'incubation avec le stéroïde. Nous avons cependant toujours constaté une augmentation de l'intensité de la bande après incubation avec la dexaméthasone. La mise en survie des lymphocytes dans un milieu dépourvu de stéroïdes doit nous permettre d'eliminer cette bande retardée.

Par ailleurs, l'ensemble des résultats concernant l'action du RU 486 semblent cohérents puisque nous constatons un ralentissement de la transformation (Sablonnière *et al.*, 1986), une baisse du taux de transfert nucléaire (Lefebvre *et al.*, 1988). En retard sur gel, nous avons également observé une faible intensité des bandes correspondant aux cytosols incubés avec le RU 486.

Cette hormono-dépendance avait déjà été mise en évidence par Becker *et al.* (1986) grâce au footprint génomique. Des résultats apparemment différents obtenus par Willmann et Beato (1986) s'expliquent parfaitement par ceux que nous avons obtenus par la technique d'échange. En effet, nous avons montré qu'une fois transformé, il existait une dissociation hormone-récepteur très facile, mais ce mécanisme n'implique pas de dénaturation du site de liaison à l'ADN. Ainsi, même en l'absence d'hormone, le récepteur transformé peut lier *in vitro* son site GRE.

Les résultats sont nettement moins clairs pour le récepteur des oestrogènes et surtout celui de la progestérone. Suivant les auteurs, la liaison du récepteur à l'ADN serait induite ou serait indépendante de la stimulation hormonale. Maggi *et al.* (1984) décrivent une liaison du récepteur de la progestérone même en l'absence de stéroïde. Plus récemment, la même équipe étudie l'hormono-dépendance de la liaison récepteur-progestérone par retard sur gel. Ces auteurs (Bagchi *et al.*, 1988), tout comme Edwards *et al.* (1989) constatent l'existence d'une liaison à l'ADN dépendant de la présence de l'hormone.

Venant contredire ces résultats, Rodriguez *et al.* (1989) trouvent que l'hormone n'est pas nécessaire pour la liaison du récepteur à l'ADN.

Le récepteur étudié par Rodriguez *et al.*(1989) se trouve sous une forme monomère 4S qui, d'après Edwards *et al.* (1988) ne correspond pas au récepteur ayant une affinité pour les sites PRE. Pour obtenir ce récepteur, il a été nécessaire de le purifier dans un milieu de haute force ionique et en absence de molybdate de sodium. Bailly *et al.* (1986) démontrent que la purification fait disparaître le caractère hormono-dépendant de la liaison récepteur-GRE. Il semble donc probable que le récepteur étudié par Rodriguez *et al.*(1989) corresponde en fait à un récepteur transformé en l'absence d'hormone par la purification.

L'hormono-dépendance peut également être mise en évidence par les antihormones comme nous l'avons fait pour le récepteur des glucocorticoides. A côté de la liaison du taux de transformation, plusieurs auteurs ont proposé que l'action antihormonale soit liée à une fixation faible des complexes transformés antihormone-récepteur sur leur site ADN spécifique. De telles hypothèses ont été émises pour le récepteur des oestrogènes (Evans *et al.*, 1982) ou pour celui de la progestérone (Rauch *et al.*, 1985 ; Bailly *et al.*, 1986 ; Guiochon-Mantel, 1988).

Comme nous le voyons, le débat concernant le rôle du stéroïde dans la transformation et dans la liaison à l'ADN reste encore ouvert. Tous les faits décrits jusqu'ici ne sont pas mutuellement exclusifs et les divergences observées peuvent être liées aux préparations cellulaires ou aux protocoles retenus. L'ensemble de ces résultats nous amène à deux questions :

- (1) Le rôle du stéroïde agoniste est-il le même quel que soit la nature du récepteur ?

- (2) Les antihormones agissent-elles toujours au même niveau pour inhiber la réponse ou existe-t-il différents modèles de blocage suivant la nature du récepteur et/ou de l'antistéroïde ?

La technique de retard sur gel semble parfaitement adaptée pour répondre en partie à ces questions. Pour cela, il est nécessaire de tester l'hormono-dépendance des bandes retardées induites par les différents récepteurs obtenus à partir de lignées cellulaires n'exprimant qu'un type de récepteur. Pour pouvoir comparer les récepteurs entre eux, il faut que la préparation cellulaire se limite à une lyse sans purification ou autre traitement pour éviter tout artefact lié au protocole. L'utilisation du retard sur gel permettra de montrer pour chaque récepteur

(1) l'action de l'antihormone. Soit l'antistéroïde donne une bande retardée plus faible. Dans ce cas, l'inhibition due à l'hormone se situe au niveau d'une baisse de la transformation. Soit la bande retardée est de même intensité. La compétition entre la sonde SRE et un ADN non spécifique permettra de montrer si l'action antihormonale concerne une transformation anormale ou un manque d'affinité envers des séquences spécifiques.

Nous ne pourrons cependant pas montrer par cette technique une éventuelle anomalie ultérieure à la fixation du récepteur sur l'ADN.

Une application du retard sur gel que nous avons développé dans nos résultats est le dosage du récepteur des glucocorticoides.

Cette mise au point n'est certes pas encore terminée mais la plupart des problèmes majeurs semblent résolus. En fait, la complexité du sujet a essentiellement été liée aux cellules testées. L'amélioration de la standardisation de nos préparations cellulaires doit nous permettre de vérifier nos résultats. Elle doit particulièrement nous confirmer la corrélation que nous avons observée entre le dosage du récepteur par le stéroïde et celui obtenu par retard sur gel.

Parmi les nombreuses autres applications, nous pensons appliquer cette technique à l'étude du récepteur de l'acide rétinoïque. Ce récepteur reconnaît la séquence spécifique TRE (Umesono *et al.*, 1988). Les quelques essais réalisés sur cytosol de cellules HL 60 n'ont montré que des bandes retardées d'intensité très faible. Parmi ces bandes une semble spécifique car elle est induite par l'acide rétinoïque et un ADN non spécifique n'éteint pas la bande retardée. Cependant, ces résultats ne sont pas encore définitifs et il est possible que l'étude du récepteur de l'acide rétinoïque ne soit réalisable qu'au niveau du noyau puisqu'il semble que ce soit sa localisation majeure (Hashimoto *et al.*, 1988)

## APPENDICE TECHNIQUE

## A - PREPARATION DES CYTOSOLS ET HOMOGENATS CELLULAIRES

## 1 - TAMPONS

Tampon A : Tris-HCl 20 mM, pH 7,4  
 NaCl 60 mM  
 EDTA 1 mM  
 Mercaptoéthanol 10 mM

Tampon B : TES 20 mM, pH 7,4  
 NaCl 160 mM  
 EDTA 1 mM  
 Mercaptoéthanol 10 mM  
 Molybdate de sodium 10 mM

Tampon C : TES 10 mM pH 7,4  
 EDTA 1 mM  
 MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM  
 Dithiothreitol 1 mM  
 PMSF 1 mM  
 Triton X 100 0,3 %  
 Glycérol 10 %

Tampon PBS : - Phosphate de Na 50 mM, pH 7,4  
 - NaCl 150 mM

Tampon KP 160 : - Phosphate de potassium 160 mM, pH 7,4  
 - β-mercaptoéthanol 20 mM  
 - Molybdate de sodium 10 mM  
 - Glycérol 10 %

## 2 - PREPARATION DES CYTOSOLS DE FOIE DE RAT

Des rats mâles Wistars sont surrénalectomisés quelques jours avant leur sacrifice. L'adjonction de NaCl 9 p.1000 dans leur eau de boisson permet leur survie durant cette période. Après le sacrifice les foies sont perfusés avec du NaCl à 9 p.1000 puis avec le tampon d'incubation (tampon A). Les foies sont alors homogénéisés grâce à un Potter verre-téflon dans un volume de tampon A. Ceux-ci sont ensuite centrifugés à 300.000 g (50 000 t/min) pendant 40 min. Le surnageant est ensuite recueilli par aspiration et le pH est réajusté à 7,4.

Tous les tampons sont maintenus dans la glace et la préparation du cytosol a lieu à 4°C dès que le foie est prélevé.

Les tubes sont ensuite incubés avec l'hormone à des concentrations variant entre 15 et 30 nM suivant l'expérience.

### 3 - PURIFICATION PAR LE SULFATE DE PROTAMINE DU CYTOSOL DE FOIE DE RAT

Une purification partielle du récepteur a été obtenue par précipitation du cytosol par le sulfate de protamine. Le protocole est le suivant (Govindan *et al.*, 1978) :

- Préparation du cytosol dans le tampon KP160
- Incubation du cytosol (1 volume) avec 0,11 volume de sulfate de streptomycine (solution à 10 % dans de l'eau distillée) sous agitation à 4°C pendant 20 min.
- Centrifugation à 18 000g pendant 10 minutes et élimination du précipité.
- Reprise du surnageant (1,11 volume) avec 0,12 volume de sulfate de protamine (solution à 0,75 % dissoute à chaud dans de l'eau distillée) sous agitation à 4°C pendant 40 min.
- Centrifugation 18 000g pendant 10 minutes et élimination du surnageant.
- Reprise du précipité dans 0,1 volume de tampon KP160 homogénéisé au Dounce puis centrifugé à 20000g pendant 20 minutes.
- Le surnageant est alors repris et incubé.

### 4 - PURIFICATION DE RECEPTEUR TRANSFORME HOMOGENE

Des colonnes de 3 ml sont remplies de DEAE TrisAcryl (IBF, Villeneuve-la-Garenne, France) et équilibrées en tampon A additionné de 10 mM de molybdate.

Après chauffage à 25°C pendant 30 minutes, les cytosols sont déposés sur la colonne à un débit de 0,25 ml/minute.

La fraction exclue est alors collectée. La radioactivité liée est déterminée par la technique du charbon dextran (Rousseau *et al.*, 1973).

### 5 - PREPARATION DES CYTOSOLS DE LYMPHOCYTES HUMAINS

Les tubes de sang (20 à 60 ml) sont prélevés sur EDTA et mis à 4°C. Ils sont ensuite centrifugés 15 minutes à 1000 t/min à 4°C. Le surnageant est conservé après une deuxième centrifugation afin de doser la cortisolémie. Le culot est repris dans du tampon PBS pH 7,2 à raison de un volume pour deux volumes de tampon.

Les cellules sont déposées sur un milieu de séparation des lymphocytes (MSL, Eurobio, Paris) (2 vol/1 vol MSL), puis centrifugés à 24°C, 400g pendant 30 minutes. Les lymphocytes forment un anneau au niveau de l'interface Tampon-Milieu de séparation. Ils sont alors récupérés et lavés trois fois dans du tampon PBS (trois centrifugations de 10 minutes à 400 g).

Les lymphocytes sont alors comptés dans une cellule de Malassez et leur viabilité est vérifiée par coloration au bleu Trypan. Après une

nouvelle centrifugation, le culot lymphocytaire est lysé à 0°C dans du tampon C pendant 30 minutes.

Après centrifugation du lysat à 30000g pendant 30 minutes à 0°C, le surnageant est récupéré et incubé.

#### 6 - PREPARATION DE CYTOSOLS DEPLETES EN RECEPTEUR

1 ml de cytosol est mis en présence de 200 µl de gel d'affinité préparé au laboratoire et équilibré dans le tampon A. L'ensemble est mis une nuit à 4°C sous agitation douce.

Le cytosol est alors élué jusqu'à assèchement du gel d'affinité. Le même protocole est répété trois à quatre fois. L'activité résiduelle en récepteur des glucocorticoides est déterminée par incubation du cytosol déplété avec l'acétonide de triamcinolone tritié et dosage de l'activité liée par charbon dextran.

## B - PROTOCOLES UTILISES POUR L'ETUDE DES ECHANGES DE STEROIDES

### 1. TECHNIQUES D'ECHANGE

Le cytosol est incubé pendant 4 heures à 0°C en présence du premier stéroïde non marqué. Après élimination du stéroïde libre par la technique de charbon dextran, les complexes non transformés sont réincubés avec le deuxième stéroïde tritié en présence ou en absence de 8 % d'acétonitrile.

Après purification partielle (voir I.D.), les complexes transformés stéroïde-récepteur sont réincubés avec 30 à 60 nM de stéroïde radioactif en présence ou en absence de 8 % d'acétonitrile.

Après des incubations variant entre 5 minutes et 3 jours, des échantillons de 0,1 ml sont prélevés en double et la radioactivité liée est déterminée par la méthode du charbon dextran.

Pour déterminer la liaison non spécifique, on réalise un échange stéroïde froid-stéroïde tritié en présence d'un excès 1000 fois du deuxième stéroïde mais non marqué.

### 2 - DETERMINATION DE LA DEMI-VIE

La détermination de la demi-vie est réalisée grâce à un protocole analogue. La première incubation se fait en présence de 30 nM de stéroïde tritié (acétonide de triamcinolone ou RU 486) en présence ou en absence d'un excès 1000 fois du même stéroïde non marqué afin de déterminer la liaison spécifique.

La cinétique de dissociation est alors déterminée par la réincubation des complexes, transformés ou non, avec le deuxième stéroïde non marqué en présence ou en absence de 8 % d'acétonitrile.

### 3 - CARACTERISATION DU RECEPTEUR

#### a) Analyse des formes du récepteur par minicolonnes

Différents protocoles ont pu être utilisés, mais il apparaît que la méthode la plus simple est la plus fiable soit la suivante :

##### a.1) Préparation des colonnes

Matériel : Seraclear TM 8 tubes  
 DEAE Tris Acryl TM (IBF France)  
 DNA-cellulose (Sigma Chemicals)  
 Biogel HTP™ (Biorad)

Tampon d'équilibre : Tris 0,05 M  
 Mercaptoéthanol 0,01 M  
 Molybdate 0,010 M  
 Glycérol 10 % pH 7,

##### Montage des colonnes :

Les colonnes utilisées sont en fait des tubes Seraclear (Technicon Instruments Corporation Tarrytown, N.Y. U.S.A.) dont on a

découpé la base. Celle-ci est ensuite raccordée à un tuyau de pompe à galets.

L'hydroxylapatite HTP™ est mise dans le tampon à raison de 1g/10 ml et laissée à 0°C pendant un minimum de 4 heures.

Pendant ce temps, mettre 1,5 ml de DEAE-Tris-Acryl™ et de DNA-cellulose, chacun dans des tubes Seraclear et équilibrer ces colonnes dans le tampon. Déposer à la surface de chaque support un disque GF/C(Whatman LTD).

L'hydroxylapatite étant équilibrée, prélever sous agitation 2 ml de suspension et les mettre dans trois tubes Seraclear montés en colonnes.

Adapter les colonnes de DEAE-Tris-Acryl et de DNA-cellulose comme cela est montré sur la figure 17.

Une même quantité de cytosol est déposée sur chacune des trois colonnes. Une fois les dépôts réalisés, les colonnes sont lavées dans le tampon A en présence de 10 mM molybdate à un débit de 0,5 ml/minute par 6 à 10 volumes de colonne.

Les colonnes sont ensuite démontées, chaque colonne d'hydroxylapatite séchée puis mise en tube à scintillation avec 3 ml de scintillateur puis mis au compteur.

#### a.2 - Analyse des résultats

Le pourcentage de chaque forme est déduit par calcul des récepteurs fixés sur les disques d'hydroxylapatite (H).

- H1 : activité des complexes non transformés + méréorécepteur
- H2 : activité des complexes transformés + méréorécepteur
- H3 : activité globale
- H3-H1 : activité des complexes transformés
- H3-H2 : activité des complexes non transformés
- H1+H2-H3 = méréorécepteur

Les résultats sont ensuite exprimés en pourcentage de l'activité totale.

#### b) Chromatographie liquide d'exclusion de taille haute performance

##### b.1 - Matériel

Le système chromatographique est composé :

- d'une pompe Waters 6000A équipée d'un injecteur U6K avec une boucle de 2 ml.
- d'une précolonne TSK GSWP (7,5 x 75 mm) et d'un fritté métallique de 1 µm placé en amont.
- de colonne TSK G3000 ou TSK G4000
- d'un spectrophotomètre 480 LC (Waters, Milford, Ma)
- et d'un collecteur Gilson 201 (Gilson, France)

##### b.2 - Chromatographie

La colonne est équilibrée en tampon B, filtré, dégazé et maintenu à 4°C. La colonne est également mise dans la glace.

Les échantillons (100 µl) sont alors injectés et élués à un débit de 0,5 ml/minute. Des fractions de 250 µl sont recueillies grâce au collecteur. 200 µl sont alors prélevés et soumis à une mesure de radioactivité.

### b.3 - Calibration

Les colonnes analytiques sont régulièrement calibrées grâce à un kit de protéines standards qui sont : la thyroglobuline ( $R_s = 8,5$  nm), la ferritine ( $R_s = 6,1$  nm), la catalase ( $R_s = 5,2$  nm), l'aldolase ( $R_s = 4,8$  nm) et la sérualbumine ( $R_s = 5,6$  nm)

#### c) Electrophorèse en gel de polyacrylamide

##### c.1. Matériel

##### c.1.1. Solution A Solution B d'acrylamide 7,5 % de concentration

Acrylamide	75g	30g
Bisacrylamide	2g	0,8g
Tris	45,3g	15,1g
TEMED (Tétraméthyl- éthylènediamine)	0,3 ml	0,5 ml
SDS	1g	1g
H <sub>2</sub> O qsp	1000 ml	1000 ml

le pH est ajusté par HCl 6N

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

##### c.1.2. Tampon d'électrophorèse concentré (4x)

Tris	12g
Glycocolle	57,2g
SDS	4g
ajusté à pH 8,3 par HCl 6N	qsp 1000 ml

##### c.1.3. Témoin de poids moléculaire

Nous avons utilisé le Kit Pharmacia qui présente 6 témoins : Myosine (200 KDa),  $\beta$ -galactosidase (116 KDa), Phosphorylase b (97,6 KDa), sérualbumine (66,2 KDa), Ovalbumine (42,6 KDa) et anhydrase carbonique bovine (31 KDa)

#### c.2 - Protocole

Le matériel utilisé est le système Biorad

Après avoir coulé un bouchon d'acrylamide (5 ml de solution A + 50  $\mu$ l de persulfate) entre les deux plaques de verre (150 x 100 x 1,5 mm), dépôt du mélange 30 ml de solution A + 60  $\mu$ l de persulfate.

Après polymérisation du gel pendant 10 min à 50°C, un gel de concentration (7,5 ml solution B + 15  $\mu$ l de persulfate) est déposé et le peigne est ajouté rapidement.

Après polymérisation, on réalise une préélectrophorèse (40 mA courant constant), les échantillons sont alors déposés après avoir été traités 5 minutes à 100°C dans une solution de SDS 2,5 % et 5 % de mercaptoéthanol.

Après électrophorèse (40 mA, courant constant), le gel est analysé par découpage des couloirs en bandes de 1 à 2 mm de large. Ces bandes sont alors soumises à une mesure de radioactivité après addition de scintillateur.

## C - PROTOCOLES UTILISES POUR LES ETUDES EN RETARD SUR GEL

### 1. PURIFICATION DE L'OLIGOMERE

Nous avons utilisé le matériel décrit dans le paragraphe B.3.b, associé à une pompe avec gradient Waters 660.

La colonne utilisée sans préfiltre est une colonne MonoQ (Pharmacia), équilibrée dans un tampon NaOH 0,1 M, NaCl 0,5 M stérile, filtré et dégazé.

Chacun des deux brins d'ADN livré détritylé et lyophilisé est repris dans ce même tampon. Les différentes étapes de purification décrites ci-dessous sont réalisées pour chacun des brins. Les échantillons sont déposés sur la colonne à un débit de 1 ml/minute. L'élimination des oligomères non retenus est suivie en absorbance à 260 nm. Le tampon final du gradient est NaOH 0,01 M, NaCl 0,9 M stérile, filtré et dégazé. Après retour de la D.O. à la ligne de base, le gradient est démarré et va de 0,5 M de NaCl à 0,9 M en 80 minutes.

Des fractions de 1 ml sont collectées. Les tubes correspondant au pic d'absorbance majeur sont alors dessalés sur des colonnes G25 équilibrées dans de l'eau stérile. Les fractions sont ensuite lyophilisées dans une centrifugeuse SpeedVac.

Les tubes sont repris dans 75 µl d'eau et mis sous agitation douce une nuit, et réunis. 5 µl sont prélevés, dilués au 1/100 et l'absorbance est dosée à 260 nm. La concentration en oligomère est alors obtenue suivant l'équation  $1 \text{ DO} = 20 \text{ µg/ml}$  pour un oligomère de 20 bases (Maniatis, 1982).

La pureté de l'oligomère est vérifiée par électrophorèse en gel d'acrylamide à 20 %.

### 2. APPARIEMENT DES BRINS

Chacun des brins est reconstitué dans de l'eau à une concentration de 1 µg/µl. 30 µl de chaque échantillon sont alors incubés ensemble en présence de 40 µl H<sub>2</sub>O et 8 µl NaCl 5 M. L'incubation est mise dans un bain-marie à 100°C. Celui-ci est immédiatement éteint et le tube est laissé dans le bain-marie jusqu'à ce que celui-ci soit revenu à température ambiante.

### 3. LE RETARD SUR GEL

#### a) Matériel

- <sup>32</sup>P ATP PB 10168 3000 Ci/mmol 10 mCi/ml AMERSHAM
- Oligonucléotide 60 ng/ml (double brin 21 bp)
- Kinase (polynucléotide kinase) Biolabs n° 201 (conserver à - 20°C)
- Poly(dI)poly(dC) Pharmacia, ref. 27 7875.02

## - Tampons :

- Tampon kinase 10 x : Tris 0,5 M, pH 7,6  
MgCl<sub>2</sub> 0,1 M  
Spermidine 1 mM  
EDTA 1 mM  
Dithiothréitol 50 mM
- Tampon incubation 5 x : Tris 50 mM, pH 7,4  
NaCl 300 mM  
ZnCl<sub>2</sub> 10 mM  
MgCl<sub>2</sub> 5 mM  
Dithiothréitol 5 mM  
Glycérol 50 %
- Tampon électrophorèse 4 x : Tris 100 mM  
Glycine 752 mM

## b) Marquage de la sonde

- Incuber
  - 0,5 µl oligonucléotide
  - 1 µl tampon kinase 10 %
  - 2,5 µl <sup>-32</sup>P ATP
  - 5 µl H<sub>2</sub>O
- Ajouter 0,5 µl de kinase, mettre à 30°C pendant 15 min.
- Centrifuger
- Ajouter de nouveau 0,5 µl de kinase, mettre à 30°C pendant 15 min.
- Eliminer l'ATP libre par chromatographie sur G25 équilibrée dans de l'eau (colonne réalisée dans une seringue intradermique de 1 ml et à écoulement spontanée)
- Recueillir par fraction de deux ou trois gouttes et doser la radioactivité des fractions. Collecter le pic exclu, faire un pool et
- Répartir en aliquotes de 10 à 20 µl dans des tubes Eppendorf
- Congeler à - 20°C dans un récipient en plomb les échantillons de sonde marquée. Les échantillons sont utilisables dans les 10 à 15 jours suivant la préparation de la sonde.

## c) Protocole

c.1 - gel

- Caractéristiques du gel:
  - . gel d'acrylamide à 10 % dans le tampon d'incubation 5 x dimension : 9 x 7 x 0,05 cm
  - . migration : prerun : 2h à 15 mA constant (150 V)  
run : 40-45' à 15 mA  
cuve maintenue à 4°C dans la glace  
contrôle de la migration par bleu de bromophénol
- Caractéristiques de l'incubation:
  - . Préincubation :(Prémix)  
par échantillon : : 1 µl sonde marquée  
1 µl poly(dI)poly(dC)  
2 µl Tp incubation 5x  
centrifuger pour mélanger
  - . Incubation Prémix-cytosol:  
Addition de 0,5 à 5 µl de préparation cellulaire au Prémix  
Compléter à 10 µl de volume final  
Centrifuger  
Laisser en contact 4°C pendant 30 min avant le dépôt

#### c.2 - Autoradiographie

Démouler le gel, mettre sur support plastique et recouvrir d'un film plastique type "cellofrais" contact avec le film autoradiographique entre une nuit et trois jours suivant la radioactivité ou la présence d'un écran.

#### c.3 - Dosage de la bande retardée au compteur de radioactivité

Après avoir localisé la bande retardée par autoradiographie, celle-ci est découpée et placée dans un tube à scintillation. Après addition de 200 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en solution aqueuse à 30 %, les tubes sont mis une nuit à l'étuve à 50°C pour digérer le gel.

Le lendemain, les tubes sont comptés, soit directement, soit par addition de scintillateur.

#### c.4 - Transfert sur nitrocellulose

##### c.4.1. Matériel

- Appareil de transfert TE22 Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, Californie)
- Nitrocellulose Schleicher et Schüll BA85 (0,45 µm)
- Tampon : Tris/HCl 25 mM pH 8,3  
Glycocolle 150 mM  
Méthanol 20 %

#### c.4.2. Protocole

Le gel de polyacrylamide est mis en contact avec la feuille de nitrocellulose préalablement imbibée de tampon. Le transfert est réalisé en 1 heure à 500 mA, la cuve étant maintenue à 10-15°C dans un bain de glace.

#### c.4.3. Immunorévélation

- Tampons : - TBS Tris/HCl 10 mM pH 7,4  
NaCl 150 mM

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

- Anticorps : -GR49 (Ac monoclonal provenant de liquide d'ascite, dilué au 1/400<sup>e</sup>)  
-Anticorps de mouton antisouris marqué à l'Iode 125 (Amersham)

- Protocole :

Après transfert, la feuille de nitrocellulose est déposée dans le tampon TBS contenant 5 % de lait en poudre. Après 1 heure d'incubation à 37°C, la feuille est lavée deux fois par le tampon TBS, 1 fois par le tampon TNT puis incubée avec le premier anticorps dilué au 1/400<sup>e</sup> dans le tampon TNT. L'incubation dure 1 heure à 37°C.

La feuille de nitrocellulose est alors lavée deux fois par le tampon TNT pour éliminer les anticorps non fixés. L'incubation avec le deuxième anticorps marqué à l'Iode 125 est réalisée de la même façon.

Après lavage dans le tampon TNT et séchage à l'air ambiant, la feuille de nitrocellulose est mise dans un sachet plastique étanche puis mise en autoradiographie.

### 4 - ADAPTATION POUR LES COMPETITIONS

#### 4.1 - Compétition avec d'autres oligonucléotides.

Ceci permet d'établir la spécificité de la bande retardée mise en évidence.

Le protocole est identique à celui décrit précédemment.

Cependant, l'ADN compétiteur doit être incubé avec le prémix.

Secondairement, l'ensemble prémix-ADN non spécifique est mis en présence de l'extrait cellulaire.

#### 4.2 -Compétition avec le peptide doigt à zinc

Le peptide est mis en présence de l'extrait nucléaire avant d'ajouter le prémix.

### D - GRADIENT DE SUCROSE

- Saccharose 5 % dans tampon KP160 (p/v)  
- saccharose 20 % dans tampon KP160 (p/v)

Les gradients sont coulés grâce à une chambre à gradient dans des tubes en pollyallomere (13 x 51 mm, Beckman) et mis à 0°C. Les échantillons (50 à 100 µl) sont ensuite déposés et les tubes scellés.

Après centrifugation à 55 000 rpm dans un rotor vertical VT180 (Beckman), à 4°C pendant 2 heures. Les tubes sont prélevés puis percés à leur base grâce à un collecteur Beckman (Fraction recovery system).

Le gradient est récupéré par fraction de 8 gouttes. Chaque fraction est ensuite comptée soit directement, soit par addition de liquide de scintillation.

La mesure du coefficient de sédimentation est réalisée par comparaison avec des standards centrifugés dans les mêmes conditions et dont on connaît le coefficient de sédimentation ( $S_{20,w}$ ) : catalase (11,3S), aldolase (7,8 S), Sérumalbumine (4,3 S) et peroxydase (3,6 S).

## E - DIVERS

a) Mesure de la liaison du stéroïde au récepteur  
(Rousseau *et al.*, 1972)

## a.1) Préparation du charbon

- Charbon activé Norit	3g
- Dextran	0,3g
- Tampon A	100 ml

Le charbon est lavé plusieurs fois dans de l'eau, avant d'être mis dans le tampon A.

## a.2) Dosage

2 volumes de cytosol sont incubés avec 1 volume de charbon, agités au Vortex pendant 15 secondes puis laissés en contact pendant 15 minutes. Les tubes sont alors centrifugés pendant 5 minutes à 4 000 rpm. Le surnageant est prélevé pour le dosage de la radioactivité.

## b) Elimination des petites molécules par centrifugation

Cette méthode utilise la technique proposée par Maniatis (1982). Des seringues intradermiques sont montées en colonnes. Elles sont ensuite remplies de 1 ml de support de gel-filtration (GF 05, GF 25, ACA 202) et équilibrées dans le tampon désiré sous écoulement libre.

Les colonnes sont ensuite laissées jusqu'à "assèchement" de la partie supérieure de la colonne. Chaque colonne est centrifugée à 1500 rpm pendant 90 secondes à vitesse équilibrée. Le tampon élué est éliminé. Sur chaque colonne, il est alors possible de déposer entre 50 et 100 µl d'extrait à dessaler. Après dépôt, les colonnes sont de nouveau centrifugées pendant exactement le même temps que précédemment.

Les extraits élués peuvent être recueillis et utilisés pour des analyses ultérieures.

## c) Comptage de la radioactivité

La radioactivité est mesurée par un compteur à scintillation LKB 1214. Les échantillons tritiés sont mis dans une solution de liquide scintillant LKB "Optiphase". Le rendement est ici de 50 % environ.

Les échantillons marqués au  $^{32}\text{P}$  sont comptés soit directement, soit après addition de scintillateur, le rendement est ici de 95 % .

## d) Autoradiographie

Les films utilisés pour les autoradiographies sont des films Kodak X-Omat (13 x 18). Après contact avec ou sans écran, ceux-ci sont révélés par le révélateur G150 (Afga-Gevaert) jusqu'à ce que les bandes retardées soient bien visibles. Le film est alors rincé dans de l'eau et fixé dans le fixateur G350 (Agfa-Gevaert) pendant 30 minutes environ. Le film est alors lavé dans de l'eau distillée puis séché à l'air ambiant.

## e) Intégration des bandes retardées

Les bandes retardées ont été lues sur un intégrateur Helena.

## f) Dosage des protéines

Le protocole est celui de Idziorek (1985) et utilise une coloration au bleu de Coomassie G250 adaptée sur analyseur centrifuge Cobas bio (Roche)

## 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 ont été effectués sur un analyseur Cobas Bio selon les protocoles suivants :

- Température des cuves	30°C
- Longueur d'onde	595 nm
- Temps de 1ère lecture	2 min

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

- 60 µl d'échantillon
- 15 µl de diluant
- 225 µl de réactif



## ANNEXE

## METHODES D'ABORD DES INTERACTIONS RECEPTEUR-ADN

Les méthodes d'étude de l'interaction protéine-ADN varient suivant la pureté des molécules biologiques étudiées. Un des facteurs limitant ces études est donc le degré de purification de l'ADN mais surtout de la protéine concernée. Le répresseur Lac d'*E. coli* a été purifié à homogénéité et il a été possible d'étudier précisément l'interaction entre ce répresseur et un oligomère spécifique de 36 paires de bases correspondant au Lac-opérateur grâce à des méthodes physiques comme la Résonance Magnétique Nucléaire (Schleif, 1988).

Cependant, il est rarement possible d'utiliser cette méthode ou d'autre comme la cristallographie vu le manque de pureté du matériel employé.

Etudier une interaction entre une protéine et une séquence d'ADN présente plusieurs buts qui sont les suivants :

- mise en évidence d'une interaction spécifique entre les deux molécules.
- détermination des motifs d'ADN permettant l'identification de la protéine.
- inversement, détermination des caractéristiques de la protéine (taille, séquence particulière impliquée dans l'interaction, dimérisation éventuelle).

De telles études reposent sur l'utilisation de techniques biochimiques (caractérisation de la protéine) et de techniques de biologie moléculaire (création de chimères ou de protéines mutées au niveau d'un ou plusieurs acides aminés permettant l'étude du site de liaison de la protéine à l'ADN). Avant d'étudier l'interaction entre les récepteurs et leur site ADN, nous décrirons ces méthodes d'études qui pour la plupart ont eu un grand développement depuis environ 15 ans.

a - Filtration sur nitrocellulose

La filtration sur nitrocellulose représente une méthode simple et fiable pour mettre en évidence l'existence d'une interaction ADN-protéine. Après incubation de la protéine avec une sonde marquée au  $^{32}\text{P}$ , seule la fraction oligonucléotidique liée à la protéine sera retenue sur le filtre puis dosée (Riggs et al., 1970). Une telle méthode nécessite une grande standardisation dans la réalisation du protocole car une augmentation des lavages des filtres de nitrocellulose par le tampon ou une modification de la force ionique de ce tampon peut fortement modifier les résultats. La compétition entre l'oligonucléotide marqué et un ADN aléatoire montrera la spécificité de la liaison.

Il est possible d'améliorer la méthode par (1) purification préalable des facteurs nucléaires et par (2) extraction de l'ADN retenu sur le filtre. Cet ADN est alors soumis à une électrophorèse qui permet de déterminer la taille des fragments d'ADN ayant lié le facteur nucléaire.

Une telle étude a été faite pour des facteurs nucléaires hautement purifiés comme le facteur NF1 (Rosenfeld et Kelly, 1986) ou comme le répresseur lactose d'*E. coli* (Whitson et al., 1987). Dans ce

dernier modèle, la simple utilisation de ce protocole a permis de montrer l'influence du superenroulement de l'ADN dans la liaison de l'ADN avec le répresseur.

Des études analogues ont été réalisées sur des protéines moins purifiées et produites en quantité beaucoup plus faible comme les récepteurs stéroïdiens. Des fragments d'ADN de séquence connue sont coupés par des enzymes de restriction puis marqués au  $^{32}\text{P}$ . L'analyse par électrophorèse des fragments retenus sur nitrocellulose permet de localiser les sites d'interaction ADN-récepteur.

Le principal ADN étudié par cette méthode a certainement été la séquence LTR de MMTV tant pour le récepteur des glucocorticoides (Payvar *et al.*, 1981 ; 1983 ; Govindan *et al.*, 1982 ; Geisse *et al.*, 1982) que celui de la progestérone (Von der Ahe *et al.*, 1985 ; Chalepakis *et al.*, 1988) ou le gène de l'utéroglobine de la rate pour les deux récepteurs (Cato *et al.*, 1984 ; Bailly *et al.*, 1986).

Une étude plus précise a été menée pour le gène de la métallothionéine (Karin *et al.*, 1984). Par la création de mutants délétés de leur extrémité 5', ces auteurs ont pu localiser le site d'interaction récepteur des glucocorticoides-ADN à environ -265/-245 paires de bases du CAP.

Par cette même méthode Bailly *et al.* (1986) ont obtenu des résultats semblant minimiser le rôle du stéroïde dans la liaison récepteur-ADN. D'après ces auteurs, il semble que, quel que soit son état (libre, lié avec un agoniste comme le R5020 ou avec un antagoniste comme le RU 486), le récepteur de la progestérone lie des sites spécifiques du gène de l'utéroglobine avec la même affinité. Ces auteurs

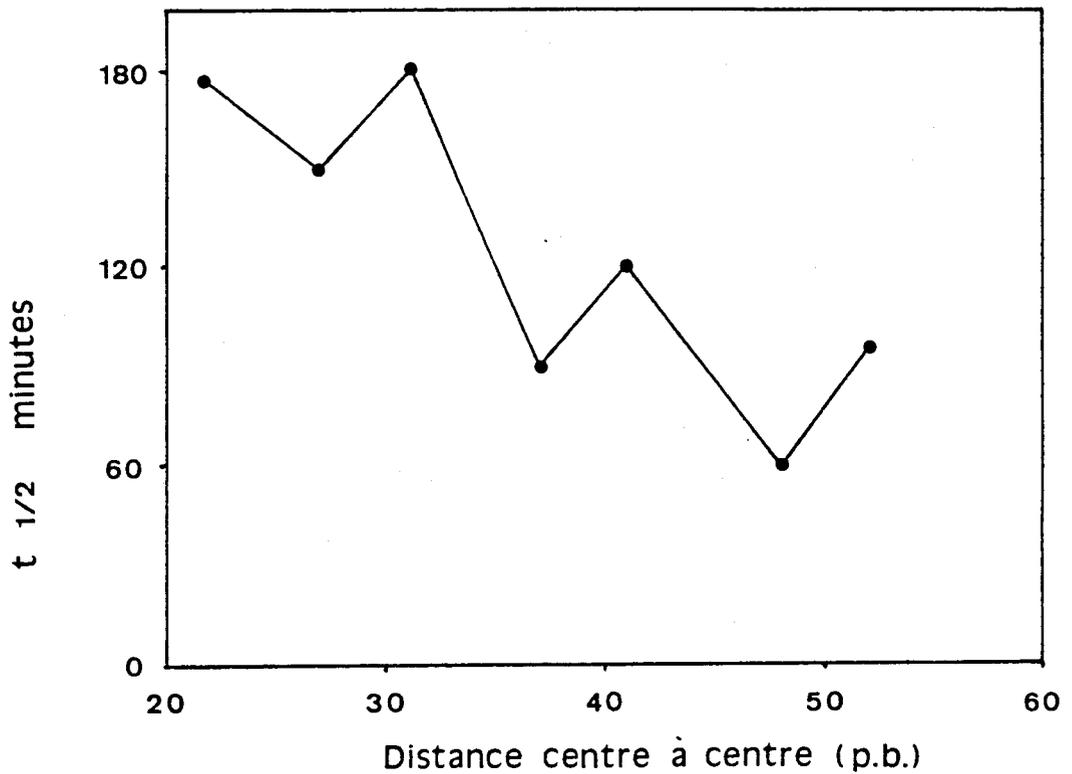


Figure 42 - Détermination de la demi-vie du complexe GRE-récepteur des glucocorticoïdes par la technique de filtration sur nitrocellulose suivant Schmid et al. (1989)  
 Les 7 sondes testées correspondent à des séquences ADN présentant deux sites GRE éloignés respectivement de 21, 27, 31, 37, 41, 48 et 52 bases.

n'ont cependant pas vérifié l'absence de différences qualitatives dans la liaison récepteur-ADN.

Tout récemment, Schmid *et al.* (1989) utilisent cette méthode pour déterminer la demi-vie du complexe récepteur des glucocorticoides-GRE . Pour cela, après incubation 30 min à 25°C du récepteur purifié avec la sonde radioactive, le complexe est mis en présence d'un excès 1000 fois en plasmide non marqué, puis est analysé par filtration sur nitrocellulose au bout de temps variables. Après extraction de l'ADN retenu, électrophorèse et autoradiographie des gels, il est possible de quantifier l'intensité des bandes obtenues. Ceci permet de déterminer le taux de récepteur encore lié à la sonde en fonction du temps. Par ce protocole, Schmid *et al.* (1989) démontrent que la demi-vie des complexes récepteur-GRE n'est que de 12 à 15 min alors que la liaison récepteur-ADN est plus stable si la sonde possède deux GRE successifs, situés du même côté de la double hélice et faiblement séparés (Figure 42).

#### b - Le retard sur gel

##### b.1 - Principe

Avec l'intérêt accru des interactions protéine-ADN s'est développée récemment une technique simple, rapide et permettant de mettre en évidence l'existence d'une ou plusieurs interactions entre une sonde marquée et un mélange de protéines. Cette méthode appelée technique de retard sur gel (Gel Retardation Assay, Bandshift Assay ou Gel Mobility Shift Assay) a été décrite par Fried et Crothers (1981) et repose sur une modification de la migration électrophorétique d'une sonde marquée à travers un champ électrique après interaction avec une ou plusieurs protéines (figure 43).

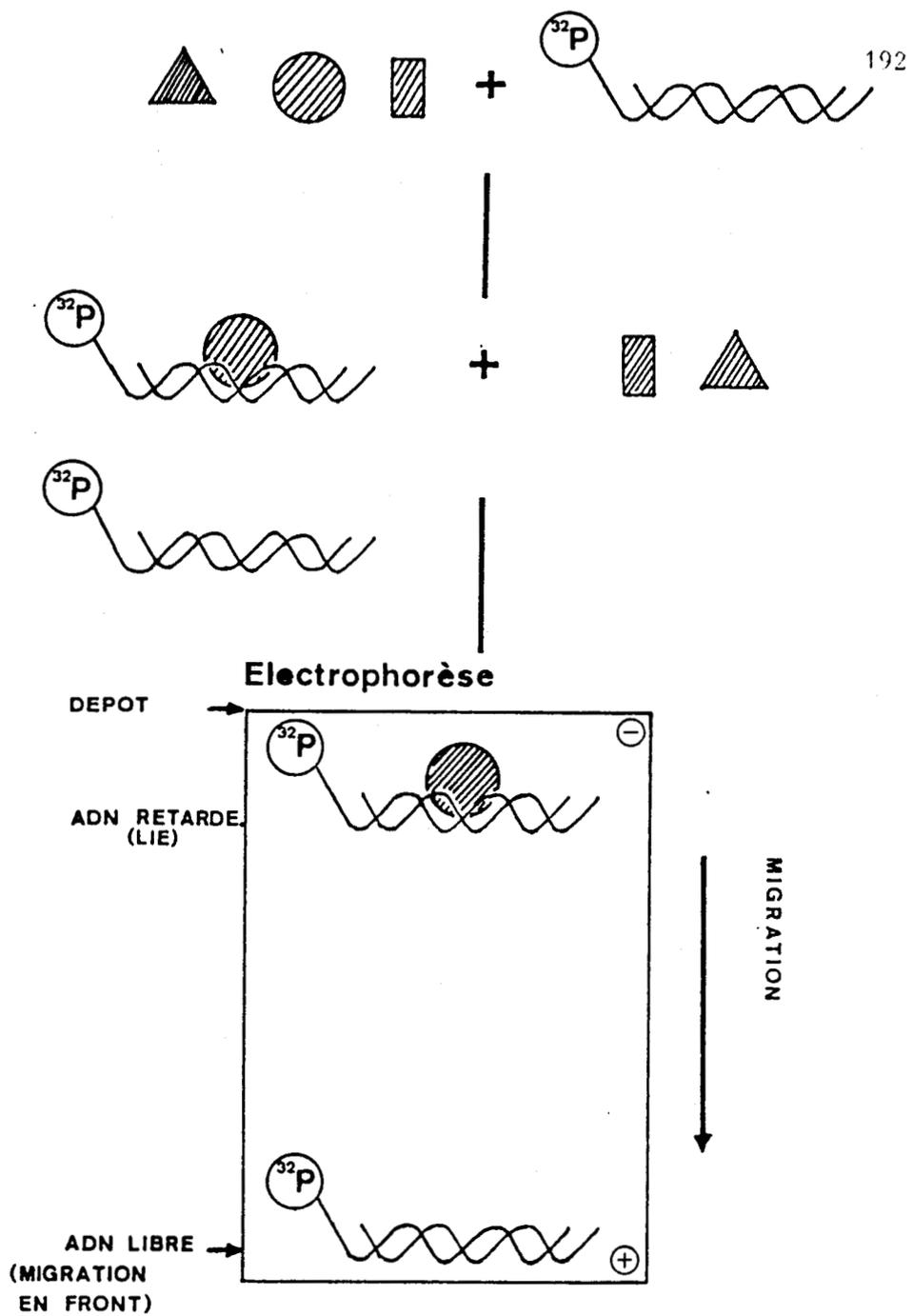


Figure 43 - Principe du retard sur gel.

## b.2 - Intérêt

L'intérêt majeur de cette technique est la possibilité d'étudier les interactions protéine-ADN à partir d'un milieu protéique non purifié. En effet, la migration du complexe protéine-ADN varie en fonction du taux d'acrylamide composant le gel d'électrophorèse, en fonction de la taille de la protéine liée et des modifications de charges induites par la liaison protéine-ADN. Ainsi, en jouant sur la porosité du gel, il est possible de déterminer le nombre de protéines différentes d'un point de vue taille et qui présentent une affinité pour une séquence nucléotidique particulière.

La présence dans l'incubât d'un excès d'environ 1000 fois en oligonucléotide froid non spécifique de synthèse, comme le poly(dI)poly(dC), ou naturel comme l'ADN de sperme de saumon élimine en grande partie ces bandes non spécifiques.

La spécificité réelle d'un facteur pour une séquence d'ADN précise se fait par compétition. Pour cela, l'incubation comportera les protéines, la sonde radioactive, le poly(dI)poly(dC) et des concentrations croissantes d'un oligonucléotide quelconque non marqué. Si un excès de 10 à 100 fois en oligonucléotide froid efface la bande retardée, il y a compétition entre la sonde radioactive et l'oligonucléotide, la liaison n'est donc pas spécifique. Il faut cependant connaître la séquence de l'oligonucléotide compétiteur car celui-ci peut posséder une structure analogue au site impliqué dans l'interaction avec l'ADN testé et fausser les résultats. Cette technique n'identifie cependant pas la ou les protéine(s) impliquée(s) dans la liaison avec l'ADN.

De nombreuses applications de la méthode ont été réalisées tant sur des préparations nucléaires (Dignam *et al.*, 1983) que sur des extraits cellulaires totaux (Manley *et al.*, 1980). Cependant il n'existe pas de protocole bien défini pour l'ensemble des protéines étudiées. Suivant les cas, les auteurs utilisent des concentrations en protéines variées allant de moins 1  $\mu\text{g}$  à 15-20  $\mu\text{g}$ . La composition des tampons varie elle aussi bien qu'en général la force ionique du milieu reste faible. Les concentrations des gels d'acrylamide sont fonction de la taille de l'oligonucléotide étudié. Enfin, de nombreux auteurs utilisent une recirculation des tampons lors de l'électrophorèse. Comme nous le voyons, la diversité des protocoles rend compte de la nature empirique de la technique et chaque étude nécessite une mise au point particulière.

Cette technique ne donne des résultats que pour des fragments d'ADN de 300 paires de bases ou moins (Henninghausen et Lugan, 1987). Elle est donc limitée à des régions d'ADN dont le rôle fonctionnel a déjà été établi. Certaines applications utilisent des séquences relativement courtes allant jusqu'à 25 paires de bases. Dans ce cas, l'étude porte sur des fragments oligonucléotidiques connus pour interagir avec les protéines du milieu étudié. C'est dans ce cadre que nous avons appliqué cette méthode. La sensibilité de la méthode est d'environ deux fois supérieure à celle de la technique de filtration sur nitrocellulose selon Henninghausen et Lugan (1987). Elle possède de plus l'avantage d'être nettement plus reproductible et standardisable. Tous ces faits rendent donc la méthode très attractive.

### b.3 - Détermination de la constante d'association

Il est possible de déterminer la constante d'association à l'équilibre (Boulangier *et al.*, 1987). Cette détermination semble cependant moins aisée que dans l'étude de la liaison entre une protéine et son ligand.

En effet, le retard sur gel est réalisé en présence d'un excès en oligomère non spécifique [poly(dI)poly(dC)] afin d'éviter la fixation des protéines nucléophiles non spécifiques sur la sonde. Ainsi, le facteur protéique testé pourra aussi bien se lier avec la sonde spécifique radioactive qu'avec l'oligomère non spécifique. Il existe donc deux constantes d'association à déterminer.

Celle-ci se fera de manière indirecte (Tan *et al.*, 1988 ; Boulangier *et al.*, 1987). Dans un premier temps, il faut déterminer la constante d'association apparente pour des valeurs variables en oligomère non spécifique. La variation de ces constantes apparentes en fonction de concentrations en oligomère non spécifique donne une droite dont l'extrapolation à l'origine permet de déterminer la constante réelle d'association ( $K_s$ ) mais aussi la constante d'association pour l'ADN non spécifique ( $K_{ns}$ ). Cependant, cette méthode n'est réalisable que si l'équilibre atteint en solution est figé lors de l'électrophorèse. Il est donc nécessaire que la vitesse de dissociation des complexes soit très lente.

Par cette méthode Baker *et al.* (1986) ont pu déterminer les valeurs de  $K_s$  et  $K_N$  qui sont respectivement de  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  et  $2,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  dans le cas de l'interaction entre le facteur de transcription TF IIIC et les gènes tRNA chez la levure. De plus, ils ont pu montrer

l'incidence de mutations ponctuelles au niveau du gène pouvant aller jusqu'à abolir l'affinité entre les deux molécules. D'une manière générale, les constantes d'association avec l'ADN spécifique semblent être comprises entre  $10^{10}$  et  $10^{11}$  M<sup>-1</sup> alors que celles correspondant au non spécifique varient de  $6 \cdot 10^4$  à  $6,5 \cdot 10^7$  M<sup>-1</sup>.

#### b.4 - Etudes stoechiométriques

Il est possible par la méthode de retard sur gel de déterminer la présence d'une ou plusieurs molécules liant la séquence d'ADN spécifique. Cette éventualité est fréquemment rencontrée et beaucoup de protéines lient l'ADN en association avec d'autres, ou se lient à l'ADN puis se dimérisent (cas des récepteurs stéroïdiens). Il est également possible d'observer une compétition entre deux facteurs protéiques liant le même site ADN ou des sites voisins. Ainsi, après avoir identifié une bande retardée, Hendrickson et Schleif (1985) ont étudié l'influence de la méthylation des purines sur cette interaction. Ceci leur a permis de démontrer que la protéine AraC lie l'ADN à l'état de dimère au niveau du site de régulation araI de l'opéron BAD d'*E.coli*. La méthylation des purines permet de plus de connaître la zone minimale occupée par la protéine.

De même, la technique de retard sur gel a permis d'étudier la stoechiométrie de liaison entre le facteur nucléaire CREB (phosphoprotéine impliquée dans l'induction de la réponse du gène de la somatostatine de rat par l'AMP cyclique) et une séquence spécifique d'ADN appelée CRE (cAMP response element) (Yamamoto *et al.*, 1988). Cette étude réalisée sur du matériel purifié a permis de montrer l'existence

de deux bandes retardées, l'une correspondant au monomère, l'autre à un multimère.

La liaison protéine-ADN intéresse la plupart du temps plusieurs protéines. Celles-ci peuvent interagir directement sur l'ADN pour leur propre compte et/ou s'associer entre elles. Dans les deux cas, le retard sur gel peut apporter des informations sur le mode de liaison. Ainsi, l'interaction entre le produit du protooncogène Fos, le facteur de transcription AP1/Jun et sa séquence d'ADN spécifique ont été étudiés par cette méthode (Neuberg *et al.*, 1989). Fos et AP1/Jun lient la séquence d'ADN à l'état de dimère et donnent ainsi une bande retardée. Par mutagenèse dirigée, il est possible d'obtenir un produit de l'oncogène Fos muté par une modification d'acides aminés au niveau de la région liant AP1/Jun. Ce changement n'affecte pas la formation du dimère Fos-AP1/Jun mais fait disparaître la bande retardée. Les deux facteurs nucléaires formeraient donc un complexe protéique, chaque composant intervenant pour moitié dans l'interaction avec le site ADN spécifique.

De même, le retard sur gel a permis d'identifier l'existence de plusieurs facteurs nucléaires liant une séquence d'ADN correspondant à la région enhancer du virus de la leucémie chez la souris Moloney (Speck *et al.*, 1987). Ces auteurs étayent leurs affirmations sur les constatations suivantes :

(1) la sonde correspondant à la séquence enhancer donne des bandes retardées spécifiques,

(2) les bandes subsistent pour des fragments de la séquence enhancer qui ne se recourent pas.

Deux de ces facteurs sont connus. Le premier est le facteur de transcription NF1, l'autre, le récepteur des glucocorticoïdes. La détermination à la base près du site d'interaction de chacun de ces facteurs, a permis d'affirmer l'existence de zones de chevauchement au niveau de l'ADN pour certains sites de liaison. Il y aurait donc une compétition dans la liaison de ces facteurs, l'un inhibant la fixation de l'autre. Cet empêchement stérique pourrait être à l'origine de la régulation des gènes par plusieurs facteurs. Dans le modèle de Speck, il reste cependant encore à montrer le rôle fondamental de chacun de ces sites.

#### b.5 - Etude de la protéine

Comme nous venons de le voir, la caractérisation par retard sur gel des protéines liant l'ADN est très limitée. Dans l'hypothèse où l'étude porte sur des facteurs protéiques purifiés, il est possible d'obtenir des renseignements sur les caractéristiques de ces protéines. On pourra ainsi montrer que la protéine s'associe à l'ADN à l'état de monomère ou de multimère, ou localiser la zone d'interaction entre l'ADN et la protéine. Ainsi, Marzouki *et al.* (1986) précisent le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription . Pour cela, ils étudient les modifications des bandes retardées avant et après digestion sélective de la protéine.

Pour Schrader et Rodriguez (1989), il est possible de déterminer le poids moléculaire des complexes impliqués dans une bande retardée en adaptant la technique de retard sur gel. Pour cela, ils réalisent un gel d'acrylamide en gradient 3-25 % et utilisent de DATD (N,N'-diallyltartardiamide) comme cross-linker réversible. Lors de



l'électrophorèse, un couloir est réservé à des marqueurs de poids moléculaire et l'électrophorèse est arrêtée lorsque les témoins ne migrent plus. Le gel est ensuite soit séché et autoradiographié pour localiser les bandes retardées, soit dissout dans l'acide periodique 10 mM puis transféré sur nitrocellulose. Il est alors possible de déterminer le poids moléculaire des complexes ainsi que d'en déterminer la composition par l'emploi d'anticorps spécifiques. Par cette méthode, ces auteurs confirment la liaison du récepteur de la progestérone à l'état de dimère sur leur séquence spécifique de reconnaissance.

c - Footprint

c.1- Principe

Cette méthode plus ancienne que le retard sur gel apporte des renseignements différents sur l'interaction de la protéine-ADN. Initialement décrite par Galas et Schmitz (1978), elle associe successivement une liaison protéine -ADN, une digestion partielle de l'ADN lié par une DNase suivie d'une électrophorèse. La digestion aléatoire de l'ADN donne des oligonucléotides de longueur régulièrement croissante, sauf dans les zones protégées par les protéines liées à l'ADN. L'électrophorèse montrera ainsi des trous correspondant aux zones protégées. Cette méthode a permis d'identifier de nombreux sites de liaison dont ceux des récepteurs stéroïdiens décrits au niveau de la séquence LTR de MMTV (Payvar *et al.*, 1983), du gène humain de la GH, du gène de la métallothionéine (Karin *et al.*, 1984) ou celui de la tyrosine aminotransférase (Jantzen *et al.*, 1987).

## c.2 - Intérêt

Le grand intérêt du footprint est de localiser des sites d'interaction protéine-ADN sur des séquences relativement longues et vient donc en complément de la technique de retard sur gel. De plus, elle permet de préciser s'il existe un site unique ou si ceux-ci sont multiples. C'est ainsi que 5 GRE (séquence consensus de reconnaissance pour les récepteurs des glucocorticoides) ont pu être mis en évidence au niveau de la séquence LTR de MMTV (Scheidereit et Beato, 1984).

Il est aussi possible de déterminer l'affinité de la protéine pour la séquence d'ADN. Celle-ci est mise en évidence par la persistance du footprint en présence de quantités croissantes d'oligonucléotide non spécifique mis en compétition. Cette méthode donne une estimation de l'affinité et de la spécificité du footprint obtenu.

La technique du footprint est en fait issue de la technique de séquençage de l'ADN de Maxam et Gilbert (1980). Il est donc possible de déterminer la séquence d'ADN impliquée dans l'interaction protéine-ADN. Cependant, le footprint utilisant la DNase I ne permet pas de déterminer les limites de l'empreinte très précisément.

L'utilisation de coupures chimiques améliore fortement la localisation précise des sites d'interaction. Deux protocoles sont proposés: soit la coupure utilisant la réduction du peroxyde d'hydrogène par le fer ( $Fe^{2+}$ ) (Tullius *et al.*, 1986), soit celle réalisée à partir d'un complexe méthidium-propyl-EDTA (Hertzberg et Dervan, 1984). Dans le deuxième cas, ce complexe chélate le fer et s'intercale entre les paires de bases. Le clivage semble ainsi être lié à l'intervention de radicaux

hydroxyl consécutifs à l'oxydation du fer. Ces méthodes s'avèrent beaucoup plus performantes que le footprint à la DNase puisqu'elles peuvent indiquer la zone de protection à la base près et sont totalement indépendantes de la séquence à cliver.

Il semble aussi possible d'étudier la stoechiométrie d'une liaison par footprint quantitatif. L'interaction entre le récepteur des glucocorticoides de foie de rat et son site ADN spécifique (contenu dans un fragment de la séquence LTR de MMTV) a ainsi pu être étudiée par Wrangé *et al.* (1989). Leur protocole consiste à quantifier, pour des concentrations variables en récepteur, le taux de récepteur pouvant lier l'ADN lorsque la sonde obtenue (figure 44) est à des concentrations saturantes, et de corrélérer chaque valeur avec le taux de récepteur effectivement lié pour des concentrations non saturantes en ADN. Le premier paramètre est déterminé par ultracentrifugation en gradient de sucrose. La détermination du taux de récepteur effectivement lié est obtenu par les étapes suivantes :

(1) réalisation d'une série de footprints en présence de concentrations croissantes en récepteur, pour différentes concentrations d'ADN,

(2) intégration de chaque footprint obtenu,

(3) détermination de la courbe de saturation du site d'ADN en fonction du taux de récepteur déposé et ceci pour chaque concentration en ADN,

(4) détermination graphique de la concentration en récepteur donnant 50 % de saturation des sites ADN. Chacun de ces points, caractérisant le récepteur réellement lié pour un taux de

récepteur total connu est rapporté au taux de récepteur total pouvant lier l'ADN déterminé par ultracentrifugation. La pente de la droite obtenue donnera alors le nombre de protéines liées sur le site. Cette méthode semble confirmer la dimérisation du récepteur sur son site ADN.

#### d - Protection envers l'exonucléase

La méthode de protection de l'ADN envers l'exonucléase III est en réalité la première méthode ayant permis l'étude de l'interaction protéine-ADN. Elle ne peut en fait s'intéresser qu'à la localisation de la séquence d'ADN impliquée dans la liaison.

Le principe en est le suivant : l'enzyme, une exonucléase dégradant l'ADN de 3' vers 5', libère des fragments d'ADN jusqu'à ce qu'elle se heurte à une protéine déjà liée sur l'ADN. Le protocole initialement décrit par Shalloway *et al.* (1980) présente les étapes suivantes : incubation du facteur nucléaire avec la séquence à étudier marquée au  $^{32}\text{P}$  en 5', digestion par l'exonucléase, électrophorèse et autoradiographie du gel. La détermination de la taille de l'ADN marqué permet alors de localiser le site d'interaction protéine-ADN.

Cette méthode intéresse donc plutôt des protéines purifiées bien que l'amélioration de la technique puisse la rendre accessible à l'étude d'extraits nucléaires de cellules eucaryotes comme l'a montré Wu (1985). Cette technique nécessite un contrôle de spécificité car le fragment d'ADN marqué détecté par autoradiographie peut correspondre à une séquence d'ADN bloquant l'activité de l'enzyme et non à une

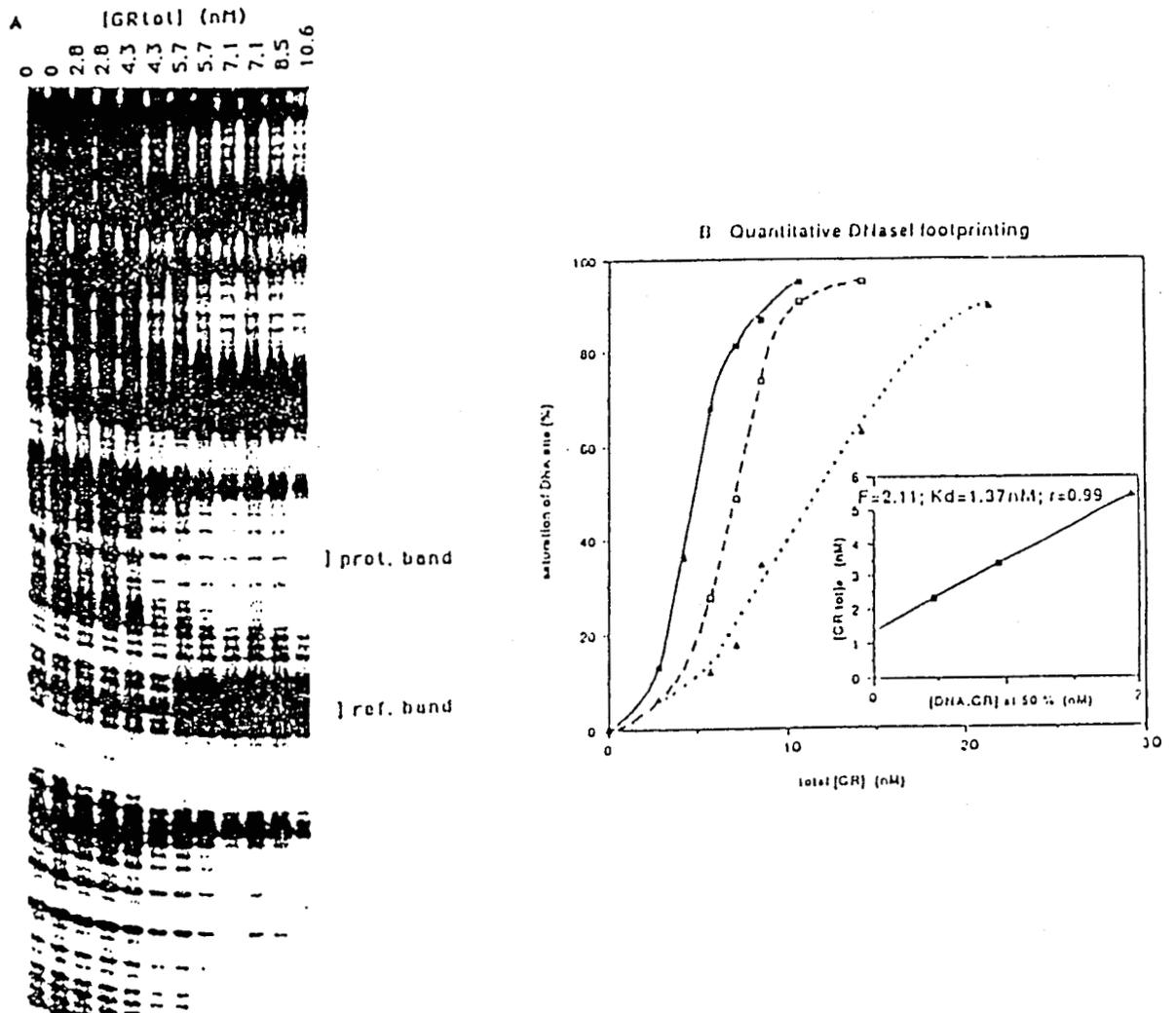


Figure 44 - Détermination de la constante d'association par Footprint (Wrange et al., 1989)

- A : Footprint réalisé à concentrations croissantes en récepteur des glucocorticoïdes
- B : Détermination du taux de saturation des sites ADN en fonction du taux de récepteur

protéine. Des études de compétition avec des oligonucléotides aléatoires permettent de lever le doute.

Si la séquence d'ADN étudiée présente plusieurs sites spécifiques de liaison pour une protéine, plusieurs bandes seront observées et l'intensité des bandes sera proportionnelle au taux d'occupation de la protéine sur chacun des sites. Cette notion a permis à Von der Ahe *et al.* (1985) de déterminer l'affinité relative des récepteurs des glucocorticoides et de la progestérone pour les différents sites spécifiques situés sur les séquences promoteurs du LTR de MMTV et du gène du lysozyme.

#### e - Southwesternblotting

Une méthode relativement récente développée par Bowen *et al.* (1980) permet l'étude de l'interaction entre un ADN et une protéine préalablement caractérisée par sa masse. Cette technique fait intervenir successivement une électrophorèse des protéines en milieu dénaturant, une renaturation, un transfert des protéines sur nitrocellulose et une révélation du support par l'oligonucléotide marqué au  $^{32}\text{P}$ . Cette technique séduisante encore appelée "Southwesternblotting" a été appliquée à l'interaction du récepteur des glucocorticoides avec la séquence LTR de MMTV (Silva *et al.*, 1987). Le fait que la bande marquée au mésylate de dexaméthasone révélée sur le gel dénaturant corresponde à la bande déterminée par la sonde marquée, identifie bien le récepteur. Peu d'études ont développé cette méthode qui pourrait cependant présenter de nombreux intérêts dans l'étude de régulations multifactorielles et dans l'identification des facteurs protéiques impliqués dans des interactions protéine-ADN.

#### f - Identification des bases impliquées dans la liaison

Toutes les méthodes que nous venons de décrire définissent l'existence d'une interaction entre protéine et ADN, et précisent parfois la zone d'interaction au niveau de cet ADN. Il est possible d'affiner cette étude par la détermination des bases impliquées dans la liaison en utilisant les méthodes de footprint ou de retard sur gel associées aux techniques d'interférence chimique décrites par Siebenlist et Gilbert (1980).

Ces méthodes font appel à des modifications chimiques des bases avant ou après interaction de la protéine avec l'ADN. Deux types de modifications ont été proposées par Siebenlist et Gilbert (1980). Ce sont d'une part l'éthylation des phosphates grâce à l'utilisation d'un excès d'éthylnitrosourée et d'autre part la méthylation des azotes 3 et 7 des bases puriques après interaction avec le diméthylsulfate. L'inhibition de la liaison protéine-ADN induite par ces modifications (appelées éthylation ou méthylation interférence) ainsi que la détermination des bases non modifiées, protégées par la liaison préalable de l'ADN à la protéine (méthylation protection) permettent la détermination des bases impliquées dans l'interaction protéine-ADN.

Lorsqu'elles sont associées aux méthodes de footprint, les techniques de méthylation sont suivies de clivage de l'ADN puis d'une électrophorèse suivant le protocole de Maxam et Gilbert, Hendrickson et Schleif (1985) ont modifié ce protocole, par un clivage rendu spécifique des méthylguanines en chauffant 30 min à 90 °C l'ADN en présence de 10 % de pipéridine, ou par un clivage des bases puriques méthylées non spécifiquement.

Récemment, Speck et Baltimore (1987) ont proposé l'association de ces méthodes de marquage aux techniques de retard sur gel. Ils ont ainsi pu disséquer les sites de liaison entre une séquence enhancer du virus de leucémie murine et chacun des six facteurs impliqués dans cette liaison. Dans le cas des récepteurs des glucocorticoides, les techniques de protection contre la méthylation des purines ont permis à Scheidereit et Beato (1984) de postuler dès 1984 que la liaison du récepteur à certains sites du LTR de MMTV impliquait deux molécules de récepteur orientées tête-bêche sur la séquence GRE.

#### g - Méthodes d'identification "*in vivo*"

Toutes les méthodes que nous avons montrées jusqu'ici sont réalisées *in vitro*, sur des séquences plus ou moins longues d'ADN préalablement purifiées. Il est cependant important de savoir si ces zones d'interaction sont également retrouvées à l'intérieur de la cellule elle-même et si elles possèdent un rôle fonctionnel dans l'expression d'un gène.

Deux principales méthodes ont été décrites et reposent sur un principe commun. Le matériel de départ (cellule entière, noyau entier ou partiellement fragmenté) est digéré par des nucléases qui lysent l'ADN en fragments variables suivant la présence ou l'absence des facteurs nucléaires fixés sur cet ADN. L'identification des séquences intéressantes est réalisée ensuite par hybridation de celles-ci avec une sonde oligonucléotidique spécifique marquée au  $^{32}\text{P}$ . Avant de pouvoir réaliser ces méthodes "*in vivo*", il est donc nécessaire de connaître la structure du gène à étudier. La séquence intéressante doit être parfaitement connue pour utiliser à bon escient les enzymes de

restriction qui vont servir de point de repère pour localiser la (ou les) zone(s) d'interaction du gène avec le(s) facteur(s) nucléaire(s).

La première application est celle proposée par Wu (1984). Sa technique dérive en fait de la technique de protection contre l'exonucléase III. Dans son protocole, le noyau est partiellement fragmenté avant traitement par l'exonucléase III qui va dégrader l'ADN de 3' vers 5' jusqu'à ce qu'elle soit bloquée par un facteur protéique. Les fragments d'ADN subsistants sont alors coupés par des endonucléases de restriction, ce qui permet de connaître les séquences terminales des nouveaux fragments. Ceux-ci sont alors soumis à une électrophorèse puis transférés sur nitrocellulose et révélées par hybridation avec une sonde marquée correspondant au brin complémentaire. La stimulation *in vivo* modifiera la répartition des bandes identifiées par autoradiographie. Connaissant le site de lyse de l'enzyme de restriction, il est possible de localiser l'endroit où est fixée la protéine.

Le footprint génomique applique la méthode du footprint à des gènes stimulés *in vivo*. Mise au point par Jackson et Felsenfeld (1985, 1988), cette méthode présente les étapes suivantes (Figure 45) : le noyau ou la cellule entière est digéré par des nucléases ou par différents facteurs chimiques. Ces coupures sont plus ou moins nombreuses suivant l'absence ou la présence de facteurs nucléaires. On purifie les fragments d'ADN puis on les hybride avec une sonde oligonucléotidique spécifique de la zone à identifier et marquée au P<sup>32</sup> à son extrémité 5'. Les fragments sont ensuite de nouveau purifiés pour n'obtenir que des ADN double brin. Ainsi, les séquences

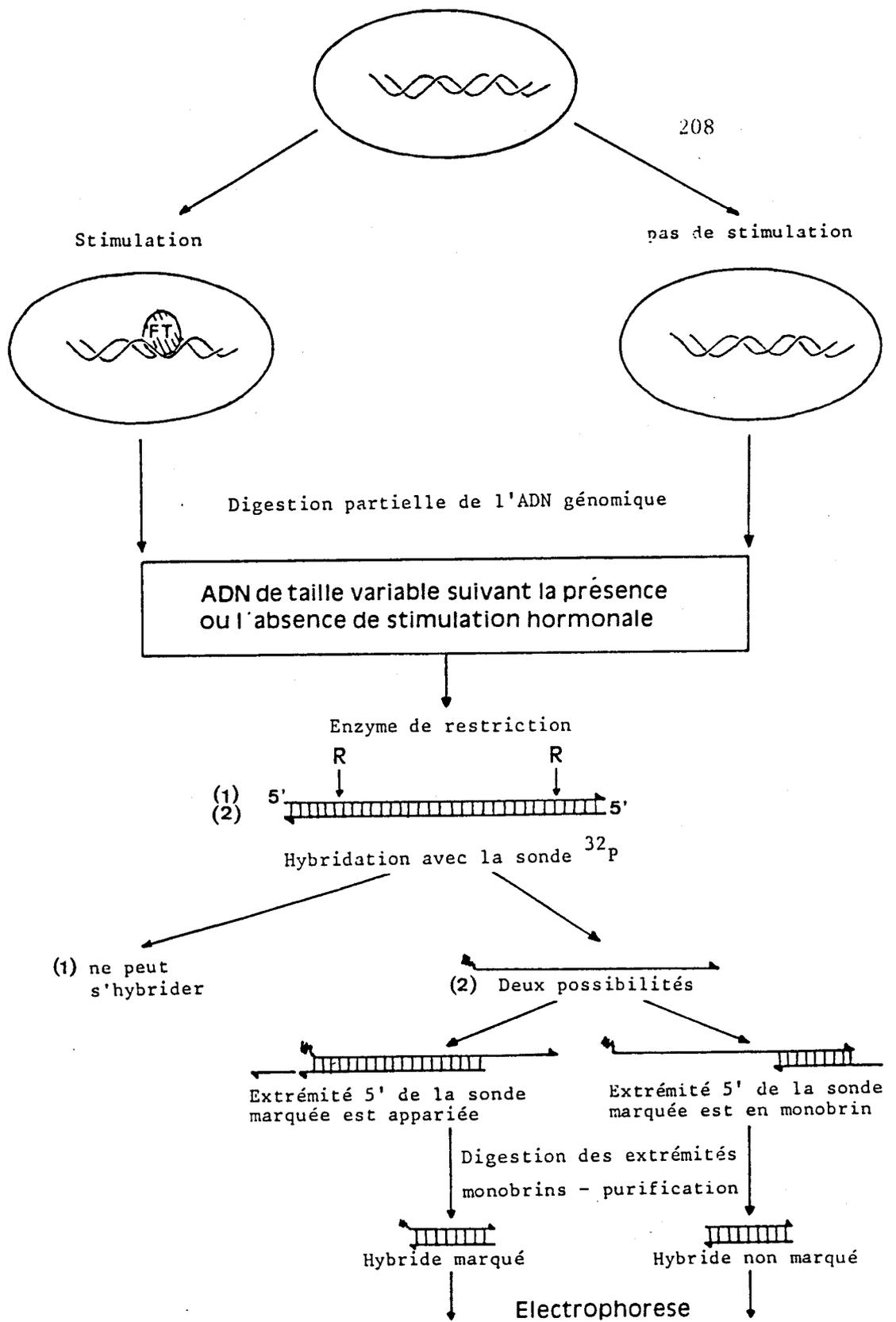


Figure 45 - Principe du Footprint Génômique

d'ADN hybridées ne pourront correspondre qu'à des séquences ayant une extrémité 5' radioactive servant de point de repère pour l'étude ultérieure. Les séquences d'ADN sont alors soumises à une électrophorèse et autoradiographiées. L'interprétation se fera donc comme pour un footprint classique et la présence d'une protéine ayant interagi avec l'ADN sera visualisée par une absence de bandes.

L'agent de clivage ou de modification utilisé sur cellules entières est la plupart du temps un agent chimique comme le diméthylsulfate, le psoralène ou la néocarcinostatine car les cellules sont plus résistantes aux nucléases que les noyaux isolés (Jackson et Felsenfeld, 1988).

L'étude du site promoteur du gène de la TAT a bénéficié de telles études. Cette région de l'ADN est composée de trois sites présentant une hypersensibilité à DNase I et situés à -2,5 Kb, -1 Kb et -0,2 Kb (sites III, II et I respectivement). Le site le plus distal présente des séquences spécifiques pour la liaison du récepteur des glucocorticoides. Dans un premier temps, Becker *et al.* (1986) ont étudié ce site par footprint génomique et ont corrélé les empreintes obtenues à la présence ou à l'absence d'induction hormonale. Ces études, réalisées sur une lignée cellulaire d'hépatome exprimant la TAT (lignée FTO-2B), ont montré l'existence d'empreintes dont l'apparition est dépendante de la stimulation hormonale. Par ailleurs, la même expérimentation réalisée sur des cellules XC qui n'expriment pas la TAT, montre une répartition des bandes indépendante de toute stimulation hormonale et identique à celle observée pour les cellules FTO-2B non stimulées. Une différence dans la réactivité au diméthylsulfate peut expliquer les différences

d'empreintes obtenues entre les techniques *in vivo* et les techniques *in vitro*.

Plus récemment, Becker *et al.* (1987) se sont intéressés aux deux autres sites du même gène. Ils montrent l'existence d'empreintes indépendantes de toute stimulation hormonale. Ils constatent une parfaite corrélation entre les résultats de footprint *in vivo* et ceux de footprint *in vitro*. Ces résultats amènent à deux conclusions. D'une part la régulation de l'expression d'un gène n'est pas uniquement la conséquence de la liaison de facteur(s) nucléaire(s) mais peut faire intervenir d'autres mécanismes comme des changements de la structure de la chromatine et/ou des modifications de l'ADN.

D'autre part, cela montre clairement l'importance de corréler des expérimentations *in vivo* avec des expérimentations *in vitro*.

#### h - Apport d'autres méthodes

##### - Technique de compétition

La compétition entre un ADN aléatoire et un ADN correspondant à une séquence spécifique permet d'obtenir des informations sur l'affinité protéine-ADN. Cette méthode ne s'applique bien entendu qu'à des protéines facilement identifiables une fois liées à l'ADN.

Pfahl (1982) utilise cette méthode pour mettre en évidence l'existence de sites de haute affinité pour le récepteur des glucocorticoides au niveau de fragments de LTR de MMTV. Les récepteurs purifiés ou non, liés au stéroïde tritié et transformés sont incubés avec de la DNA-cellulose en présence de quantités croissantes en ADN spécifique. La DNA-cellulose est séparée de la séquence spécifique par

centrifugation. Après lavage, le culot de DNA-cellulose est compté pour estimer le taux de récepteur encore lié. Par la même étude, Pfahl (1982) montre que les récepteur provenant de cellules nt<sup>-</sup> (cellules lymphoïdes de souris résistantes aux glucocorticoides et possédant des récepteur liant normalement le stéroïde) présentent encore une affinité pour les ADN spécifique et non spécifique, mais plus faible. Par ailleurs, ces récepteurs gardent une affinité supérieure pour l'ADN spécifique.

Bourgeois *et al.* (1984) utilisent ce protocole de compétition pour caractériser le complexe transformé RU 486-récepteur des glucocorticoides. Pour eux, l'incubation avec le RU 486, stéroïde antagoniste, aboutit à la formation d'un complexe transformé présentant moins d'affinité pour les sites spécifiques que le complexe agoniste-récepteur.

- Analyse des sondes biotinylées :

Une fois biotinylées, les sondes d'ADN associées aux facteurs nucléaires lient le système streptavidine-agarose. Il est alors possible de séparer l'ADN libre de l'ADN lié par centrifugation et de purifier ce dernier. Cette technique a été utilisée par Glass *et al.* (1987 ; 1988) dans leur étude de la liaison du récepteur à T<sub>3</sub> à son site de liaison TRE. Cette méthode leur a permis d'étudier l'affinité entre le récepteur à T<sub>3</sub> de rat et leur TRE par Scatchard. Les constantes de dissociation récepteur-T<sub>3</sub>-TRE varient entre  $1,23 \cdot 10^{-9}$  M (récepteur T<sub>3</sub> d'origine hépatique) et  $1,09 \cdot 10^{-9}$  M (récepteur T<sub>3</sub> d'origine hypophysaire).

- Méthodes d'analyse purement biochimique :

Elles permettent l'étude de la stoechiométrie de la liaison protéine-ADN. Ainsi Wrangé *et al.* (1986 ; 1989) utilisent l'ultracentrifugation en gradient de sucrose pour montrer que le récepteur des glucocorticoides purifié et lié à l'ADN présente une augmentation de taille pouvant correspondre à l'association de protéines.

i - Conclusion

La caractérisation ou l'interaction protéine-ADN a bénéficié de la mise au point récente de nombreuses méthodes qui permettent de préciser aussi bien le site de liaison au niveau de l'ADN et sur la protéine que d'étudier la protéine elle-même et la stoechiométrie de liaison. La plupart des travaux réalisés jusqu'ici s'intéressent à des protéines possédant des constantes d'affinité relativement élevées (comprises entre  $10^{-9}$  et  $10^{-12}$  M en moyenne). L'étude de protéines ayant une affinité plus faible nécessitera l'utilisation d'autres méthodes comme celle proposée par Abrahams *et al.* (1988) dans laquelle une électrophorèse réalisée dans un milieu contenant une concentration constante en ligand lui permet d'étudier l'association de l'ARN de transfert de la phénylalanine d'*E. coli*- complexe Kirromycine-EFT<sub>u</sub>-GDP et d'en déterminer le  $K_D$  comme étant de l'ordre de  $10^{-6}$  M. Ce protocole est en fait issu de la technique de gel-filtration de Hummel et Dreyer (1962) permettant l'étude d'interactions protéine-protéine ayant une faible affinité entre elles et qui pourrait certainement être appliquée à l'interaction protéine-ADN. A côté de ces études concernant

l'association des deux facteurs, il est important de vérifier le caractère fonctionnel de ces liaisons et donc d'associer les techniques *in vitro* aux méthodes *in vivo*.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abrahams, J.P., Kraal, B., Bosch, L. (1988)  
Zone-interference gel electrophoresis : a new method for studying weak protein-nucleic acid complexes under native equilibrium conditions. *Nuc. Acids Res.*, 16 : 10099-10108.
- Adler, S., Waterman, M.L., He, X., Rosenfeld, G.M. (1988)  
Steroid mediated inhibition of rat prolactin gene does not require the receptor DNA binding domain. *Cell*, 52 : 685-695.
- Akerblom, I.E., Slater, E.P., Beato, M., Baxter, J.D., Mellon, P.L. (1988)  
Negative regulation by glucocorticoid through interference with a cAMP responsive enhancer. *Science*, 241 : 350-353.
- Alnemri, E.S., Litwack, G. (1989)  
Glucocorticoid-reduced lymphocytolysis is not mediated by an induced endonuclease. *J. Biol. Chem.*, 264 : 4104-4111.
- Altschmied, J., Muller, M., Baniahmad, A., Steiner, C., Renkawitz, R. (1986)  
Cooperative interaction of chicken lysozyme enhancer sub-domain partially overlapping with a steroid binding site. *Nuc. Acid Res.*, 17 : 4975-4991.
- Amaral, L., Lin, K., Samuels, A.J., Werthamer, S. (1974)  
Human liver nuclear transcortin. Its postulated role in glucocorticoid regulation of genetic activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 362 : 332-345.
- Anderson, J.E., Ptashne, M., Harrison, S.C. (1987)  
Structure of repressor operator complex of bacteriophage 434. *Nature*, 326 : 846-852.
- Antakly, T., Eisen, H.J. (1984)  
Immunocytochemical localisation of glucocorticoid receptor in intact target cells. *Endocrinology*, 115 : 1984-1989.
- Arriza, J.L., Weinberger, C., Cerulli, G., Glaser, G., Handelin, B.L., Housman, D.E., Evans, R.M. (1987)  
Cloning of human mineralocorticoid receptor cDNA : structural and functional kinship with the human glucocorticoid receptor. *Science*, 237 : 268-271.
- Bagchi, M.K., Elliston, J.F., Tsai, S.Y., Edwards, D.P., Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (1988)  
Steroid hormone-dependent interaction of human progesterone receptor with its target enhancer element. *Mol. Endocrinol.*, 2 : 1221-1229.

- Bailly, A., LePage, C., Rauch, M. Milgrom, E. (1986)  
Sequence-specific binding of the progesterone receptor to the  
uteroglobin gene : effects of hormone, antihormone and receptor  
phosphorylation. *Embo J.*, 5 : 3235-3241.
- Baker, R.E., Gabrielsen, O., Hall, B.D. (1986)  
Effects of tRNA<sup>Tyr</sup> point mutations on the binding of yeast RNA  
polymerase III transcription factor C. *J. Biol. Chem.*, 261 : 5275-5282
- Barneji, A., Kalimi, M. (1981)  
Development of an [<sup>3</sup>H]glucocorticoid exchange assay in rat liver  
cytosol. *Steroids*, 37 : 409-421.
- Beato, M., Arnemann, J., Chalepakis, G., Gross, B., Klockgeter, R.,  
Pobeckert, G., Slater, E., Schauer, M., Willmann, T. (1988)  
Steroid hormones and gene regulation. in *Progress in Cancer Research and  
Therapy*, Bresciani, F., King, R.J.B., Lippman, M.E.,  
Raynaud, J.P. ed. : 1-11.
- Beato, M. (1989)  
Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56 : 335-344.
- Becker, P.B., Gloss, B., Schmid, W., Strahle, U., Schutz, G. (1986)  
In vivo protein DNA interactions in a glucocorticoid response element  
require the presence of the hormone. *Nature*, 324 : 686-688.
- Becker, P.B., Ruppert, S., Schütz, G. (1987)  
Genomic footprinting reveals cell type specific DNA binding of  
ubiquitous factors. *Cell*, 51 : 435-443.
- Belhasen, Y. (1987)  
Purification et caractérisation du récepteur des glucocorticoides sous  
forme transformée. Thèse de Doctorat en Biochimie.
- Bell, P.A., Jones, T.R. (1982)  
Discrimination between agonists and antagonists by means of receptor  
binding studies, in *Hormone Antagonism*, M.K. Agarwal Ed., Walter de  
Gruyter, Berlin : 391-405.
- Bell, P.A., Weatherhill, P.J. (1986)  
Physicochemical characteristics of the interaction of the RU 38486 with  
glucocorticoid receptor *in vitro* and the role of molybdate. *J. Ster.  
Biochem.*, 25 : 473-481.

- Ben-Or, S. (1983)  
Development of responsiveness to glucocorticoid hormones. *J. Steroid Biochem.*, 19 : 305-314.
- Ben-Or, S., Chrambach, A. (1983)  
Heterogeneity of the glucocorticoid receptors : molecular transformation during activation detected by electrofocusing. *Arch. Biochem. Biophys.*, 221 : 343-353.
- Berg, J.M. (1988)  
Proposed structure for the zinc binding domains from transcription factor TFIIIA and related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 99-102.
- Birnbaum, M.J., Baxter, J.D. (1986)  
Glucocorticoid regulate the expression of a rat growth hormone gene lacking 5' flanking sequences. *J. Biol. Chem.*, 261 : 291-
- Birnbaumer, M., Schrader, W.T., O'Malley, B.W. (1983)  
Photoaffinity labeling of the chick progesterone receptor protein. *J. Biol. Chem.*, 258 : 1637-1644.
- Blicq, S., Danze, P.M., Dumur, V., Formstecher, P., Dautrevaux, M. (1988)  
Inhibition of glucocorticoid receptor transformation, subunit dissociation and temperature dependant inactivation by various N-substituted alkylmaleimides. *Biochemistry*, 27 : 8436-8442.
- 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 : 4237-4242.
- Borgna, J.L., Fauque, J., Rochefort, H. (1984)  
A monoclonal antibody to the estrogen receptor discriminates between the non-activated and activated estrogen and anti-estrogen-receptor complexes. *Biochemistry*, 23 : 2162-2168.
- Boulanger, P., Yoshinaga, S.K., Berk, A. (1987)  
DNA-binding properties and characterization of human transcription factor TFIIIC2. *J. Biol. Chem.*, 262 : 15098-15105.
- Bourgeois, S., Pfahl, M., Baulieu, E.E. (1984)  
DNA-binding properties of glucocorticoid receptors bound to the steroid antagonist RU 38486. *Embo J.*, 3 : 751-755.
- Bowen, B., Steinberg, G., Laemmli, U.K., Weintraub, M. (1980)  
The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. *Nuc. Acid Res.*, 8 : 1-20.

- Brennan, R.G., Matthews, B.W. (1989a)  
Structural basis of DNA protein recognition. *Trends Biochem. Sci.*,  
14 : 286-290.
- Brennan, R.G., Matthews, B.W. (1989b)  
The helix-turn-helix DNA binding motif. *J. Biol. Chem.*, 264 : 1903-1906.
- Bresnick, E.H., Dalman, F.C., Sanchez, E.R., Pratt, W.B. (1989)  
Evidence that 90 KDa heat shock protein is necessary for the steroid  
binding conformation of the L-cell glucocorticoid receptor. *J. Biol.  
Chem.*, 264 : 4992-4997.
- Brown, T.R., Lubahn, D.B., Wilson, E.M., Joseph, D.R., French, F.S.,  
Migeon, C.J. (1988)  
Deletion of the steroid-binding domain of the androgen receptor gene in  
our family with complete androgen insensitivity syndrome : evidence for  
further genetic heterogeneity in this syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA*, 85 : 8151-8155.
- Buckland, R., Wild, F. (1989)  
Leucine Zipper motif extends. *Nature*, 338 : 547.
- Buetti, E., Kühnel, B. (1986)  
Distinct sequence elements involved in the glucocorticoid regulation of  
the mouse mammary tumor virus promoter identified by linker scanning  
mutagenesis. *J. Mol. Biol.*, 190 : 379-389.
- Burch, J.B.E., Weintraub, M. (1983)  
Temporal order of chromatin structural changes associated with  
activation of the major chicken vitellogenine gene. *Cell*, 33 : 65-76.
- Carlstedt-Duke, J., Okret, S., Wrangé, O., Gustafsson, J.A. (1982)  
Immunochemical analysis of the glucocorticoid receptor : identification  
of a third domain separated from steroid and DNA binding domains. *Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA*, 79 : 4260-4264.
- Carlstedt-Duke, J., Strömstedt, P.E., Persson, B., Cederlund, E.,  
Gustafsson, J.A., Jörnvall, H. (1988)  
Identification of hormone interacting amino acid residues within the  
steroid binding domain of the glucocorticoid receptor in relation to  
other steroid hormone receptor. *J. Biol. Chem.*, 263 : 6842-6846.
- Cato, A.C.B., Geisse, S., Wenz, M., Westphal, H.M., Beato, M. (1984)  
The nucleotide sequences recognized by the glucocorticoid receptor in  
the rabbit uteroglobin gene region are located for upstream the  
initiation of transcription. *Embo J.*, 3 : 2771-2778.
- Cedar, H. (1988)  
DNA methylation and gene activity. *Cell*, 53 : 3-4.

- Chalepakis, G., Postma, J.P.M., Beato, M. (1988a)  
A model for hormone receptor binding to the mouse mammary tumor virus regulatory element based on hydroxyl radical footprinting. *Nuc. Acid Res.*, 16 : 10237-10247.
- Chalepakis, G., Arnemann, J., Slater, E., Brüller, H.J., Gross, B., Beato, M. (1988b)  
Differential gene activation by glucocorticoids and progestins through the hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus. *Cell*, 53 : 371-382.
- Chou, Y.C., Luttge, W.G. (1988)  
Activated type II receptors in brain cannot rebind glucocorticoids relationship to progesterone's antiglucocorticoid actions. *Brain Res.*, 440 : 67-78.
- Chrousos, G.P., Vingerhoeds, A.C.M., Louriaux, L., Lipsett, M.B. (1982)  
Primary cortisol resistance : a family study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 56 : 1243-1245.
- Cochet, C., Chambaz, C.M. (1976)  
Glucocorticoid binding in the chicken liver cytosol. Characterization of five macromolecular binding components. *Biochim. Biophys. Acta*, 444 : 240-251.
- Colman, P.D., Feigelson, P. (1976)  
Partial purification of the activated hepatic glucocorticoid receptor complex. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 5 : 33-40.
- Compton, M.M., Cidlowski, J.A. (1986)  
Rapid *in vivo* effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic DNA. *Endocrinology*, 118 : 38-45.
- Compton, M.M., Cidlowski, J.A. (1987)  
Identification of a glucocorticoid induced nuclease in thymocytes. *J. Biol. Chem.*, 262 : 8288-8293.
- Cote, G.J., Gagel, R.P. (1987)  
Dexamethasone differentially affects the level of calcitonin and calcitonin gene related peptide mRNAs expressed in a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J. Biol. Chem.*, 261 : 15524-15528.
- Cozzarelli, N. (1980)  
DNA gyrase and supercoiling of DNA. *Science*, 207 : 953-960.
- Cross, M., Mangelsdorf, I., Wedel, A., Renkawitz, R. (1988)  
Mouse lysozyme M gene : Isolation, characterization and expression studies. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85 : 6232-6236.

Dalman, F.C., Sanchez, E.R., Lin, A.L.Y., Perini, F., Pratt, W.B. (1988)  
Localization of phosphorylation sites with respect to the functional domains of the mouse L-cell glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.*, 263 : 12259-122

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

Induction of rat tryptophane oxygenase gene in mediated by two widely separated glucocorticoid responsive gene element. *Embo J.*, 6 : 635-640.

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. (1983)

Transformation du complexe hormone-récepteur à glucocorticoïdes et signification biologique. Thèse de Médecine, Lille.

Danze, P.M. (1987)

Microhétérogénéité de charge des complexes glucocorticoïde-récepteur et transformation. Mémoire pour l'obtention du DERBH, Lille.

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

Microheterogeneity of agonist and antagonist glucocorticoid receptor complexes detected by isoelectrofocusing and modification induced by receptor activation. *Biochim. Biophys. Acta*, 927 : 129-138

Danze, P.M., Richard, C., Formstecher, P., Dautrevaux, M. (1989)

Steroid receptor exchange assay in the presence of acetonitrile. Application to the study of glucocorticoid and antiglucocorticoid receptor complexes. *Steroids*, in press.

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

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

De Franco, D., Yamamoto, K.R. (1986)

Two different factors act separately or together to specify functionally distinct activities at a single transcriptional enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, 6 : 993-1001.

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

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

Denis, M., Gustafsson, J.A. (1989)

Translation of glucocorticoid receptor mRNA *in vitro* yields a non activated protein. *J. Biol. Chem.*, 264 : 6005-6008..

- Dierks, P., Van Ooyen, A., Cochran, M.D., Dobkin, C., Reiser, J., Weissmann, (1983)  
Three regions upstream from the cap site are required for efficient and accurate transcription of the rabbit  $\beta$ -globin gene in mouse 3T6 cells. *Cell*, 32 : 695-706.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G. (1983)  
Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolate mammalian nuclei. *Nuc. Acids Res.*, 11 : 1475-1489.
- Dobson, A.D.W., Conneely, O.M., Beattie, W., Maxwell, B.L., Mak, P., Tsai, M.J., Schrader, W.T., O'Malley, B.W. (1989)  
Mutational analysis of the chicken progesterone receptor. *J. Biol. Chem.*, 264 : 4207-4211.
- Dynan, W.S. (1989a)  
Modularity in promoters and enhancers. *Cell*, 58 : 1-4.
- Dynan, W.S. (1989b)  
Understanding the molecular mechanism by which methylation influences gene expression. *Trends in Genet.*, 5 : 35-36.
- Economidis, I., Rousseau, G.G. (1985)  
Association of the glucocorticoid receptor with ribonucleic acid. *Febs Lett.*, 181 : 47-53.
- Edwards, D.P., Kühnel, B., Estes, P.A., Nordeen, S.K. (1989)  
Human progesterone receptor binding to mouse mammary tumor virus deoxyribonucleic acid : dependence on hormone and non receptor nuclear factor(s). *Mol. Endocrinol.*, 3 : 381-391.
- Eliard, P.H., Marcham, M., Rousseau, G.G., Formstecher, P., Mathy-Hartert, M., Belayew, A., Martial, J.A. (1985)  
Binding of the human glucocorticoid receptor to defined regions in the human growth hormone and placental lactogen genes. *DNA*, 4 : 409-417.
- Eliard, P.H., Rousseau, G.G. (1984)  
Thermodynamics of steroid binding to the human glucocorticoid receptor. *Biochem. J.*, 218 : 395-404.
- Eisen, H.J., Glinsmann, W. (1976)  
Partial purification of the glucocorticoid receptor from rat liver : a rapid two-step procedure using DNA-cellulose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70 : 367-372.
- Eisen, H.J., Glinsmann, W. (1978)  
Maximizing the purification of the activated glucocorticoid receptor by DNA-cellulose chromatography. *Biochem. J.*, 171 : 177-183.
- Evans, R.M. (1988)  
The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240 : 889-895.

- Evans, R.M., Hollenberg, S.M. (1988)  
Zinc fingers : Gilt by association. *Cell*, 52 : 1-3.
- Evans, E., Baskevitch, P.P., Rochefort, M. (1982)  
Estrogen-receptor-DNA interaction. Difference between activation by estrogen and anti-estrogen. *Eur. J. Biochem.*, 128 : 185-191.
- Formstecher, P. (1980)  
Les stéroïdes 17 $\beta$ -carboxamides : une nouvelle classe d'antiglucocorticoides. Mémoire pour l'obtention du DERBH, Lille.
- Formstecher, P., Dumur, V., Danze, P.M., Sablonniere, B., Dautrevaux, M. (1984)  
Inactivation of unbound rat liver glucocorticoid receptor by N-alkylmaleimides at subzero temperatures. *Biochim. Biophys. Acta*, 802 : 306-313.
- Formstecher, P. (1986)  
Le site de liaison aux stéroïdes du récepteur des glucocorticoides. Doctorat ès-Sciences Naturelles, Option Biochimie.
- Formstecher, P., Hammadi, H., Bouzerna, N., Dautrevaux, M. (1986)  
Rapid purification of antisteroid antibodies by high performance affinity chromatography. *J. Chromatogr.*, 360 : 379-390.
- Freedman, L.P., Luisi, B.F., Korszun, Z.R., Basavappa, R., Sigler, P.B., Yamamoto, K.R. (1988)  
The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature*, 334 : 543-546.
- Fried, M., Crothers, D.M. (1981)  
Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nuc. Acid Res.*, 9 : 6505-6525.
- Fritton, H.P., Igo-Kemenes, T., Nowock, J., Strech-Jurk, U., Theisen, M., Sippel, A.E. (1984)  
Alternative sets of DNase I-hypersensitive sites characterize the various functional states of the chicken lysozyme gene. *Nature*, 311 : 163-165.
- Fuxe, K., Wikstrom, A.C., Ockret, S., Agnati, L.F., Marstrand, A., Yu, Z.K., Granholm, L., Zoli, M., Vale, W., Gustafsson, J.A. (1985)  
Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. *Endocrinol.*, 117 : 1803-1812.
- Gagne, D., Pons, M., Philibert, D. (1985)  
RU 38486 : a potent antiglucocorticoid in *in vitro* and *in vivo*. *J. Ster. Biochem.*, 23 : 247-251.

- Galas, D.J., Schmidtz, A. (1978)  
DNAase footprinting a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nuc. Acids Res.*, 9 : 3157-3170.
- Gametchu, B., Harrisson, R.W. (1984)  
Characterization of a monoclonal antibody to the rat liver glucocorticoid receptor. *Endocrinology*, 114 : 274-279.
- Garner, M.M., Revzin, A. (1981)  
A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions : application to components of *E. coli* lactose operon regulatory system. *Nuc. Acids Res.*, 9 : 3047-3060.
- 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.
- Giguere, V., Ong, E.S., Segui, P., Evans, R.M. (1987)  
Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*, 330 : 624-629.
- Geisse, S., Scheidereit, C., Westphal, H.M., Hynes, N.E., Groner, B., Beato, M. (1982)  
Glucocorticoid receptors recognize DNA sequences in an around murine mammary tumor virus. *Embo J.*, 1 : 1613-1619.
- Glass, C.K., Franco, R., Weinberger, C., Albert, V.R., Evans, R.M., Rosenfeld, M.G. (1987)  
A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates transactivation by thyroid hormone. *Nature*, 329 : 738-741.
- Glass, C.K., Holloway, J.M., Devary, O.V., Rosenfeld, M.G. (1988)  
The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. *Cell*, 54 : 313-323.
- Golaz, S., Beck, G. (1984)  
Antagonism of glucocorticoid action in HTC cells. *J. Ster. Biochem.*, 20 : 259-262.
- Govindan, M.V., Spiess, E., Majors, J. (1982)  
Purified glucocorticoid receptor-hormone complex from rat liver cytosol binds specifically to cloned mouse mammary tumor virus long terminal repeats *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 : 5157-5161.
- Green, S., Chambon, P. (1987)  
Estradiol induction of a glucocorticoid responsive gene by a chimaeric receptor. *Nature*, 325 : 75-77.

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.

Greene, G.L., Gilna, P.W., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., Shine, J. (1986)  
Sequence and expression of human estrogen receptor. *Science*, 231 : 1150-1154.

Grody, W.W., Schrader, W.T., O'Malley, B.W. (1982)  
Activation, transformation and subunit structure of steroid hormone receptors. *Endocrine Reviews*, 3 : 142-156.

Groner, B., Ponta, H., Beato, M., Hynes, N.E. (1983)  
The proviral DNA of the mouse mammary tumor virus : its use in the study of molecular details of steroid hormone action. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 32 : 101-116.

Guertin, M., Baril, P., Bartkowiak, J., Anderson, A., Belanger, L. (1983)  
Rapid suppression of  $\alpha_1$ -foetoprotein gene transcription by dexamethasone in developing rat liver. *Biochemistry*, 12 : 4296-4302.

Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Ragot, T., Bailly, A., Atger, M., Misrahi, M., Perricaudet, M., Milgrom, E. (1988)  
Receptor bound to antiprogesterin form abortive complexes with hormone responsive elements. *Nature*, 336 : 695-698.

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

Hackey, J.F., Pratt, W.B. (1971)  
Characterization and partial purification of the glucocorticoid binding component from mouse fibroblasts. *Biochemistry*, 10 : 3002-3008.

Hager, G.L. (1984)  
The mouse mammary tumor virus as a model for gene expression in mammary tissue. *Rec. Prog. Hormone Res.*, 40 : 121-142.

Halazonetis, T.D., Georgopoulos, K., Greenberg, M., Leder, P. (1988)  
c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos forming complexes of different binding affinities. *Cell*, 55 : 917-924.

Han, J., Thomson, A., Needman, M., Webb, P., Parker, M. (1988)  
Characterization of response elements for androgens, glucocorticoid and progestins in mouse mammary tumour virus. *Nuc. Acids Res.*, 16 : 5263-5276.

Hashimoto, Y., Kagechika, H., Kawachi, E., Sudo, K. (1988)  
Specific uptake of retinoids into human promyelocytic leukemia cells HL-60 by retinoid-specific binding protein possibly the true retinoid receptor. *Jpn. J. Cancer Res.*, 79 : 473-483.

Hecht, A., Berkenstam, A., Strömstedt, P.E., Gustafsson, J.A., Sippel, A.E. (1988)  
A progesterone responsive element maps to the far upstream steroid dependent DNase hypersensitive site of chicken lysozyme chromatin. *Embo J.*, 7 : 2063-2073.

Helbecque, N., Henichart, J.P. (1988)  
Les "doigts à zinc", élément de reconnaissance de l'ADN. *Medecine/Sciences*, 4 : 624-628.

Helbecque, N., Danze, P.M., Hamy, F., Henichart, J.P., Formstecher, P. (1989)  
Metal-dependent folding and DNA-binding properties of a synthetic zinc finger from glucocorticoid receptor (soumis à publication).

Hendrickson, W., Schleif, R. (1985)  
A dimer of AraC protein contacts three adjacent major groove regions of the ara I DNA site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 3129-3133.

Henninghausen, L., Lubon, H. (1987)  
Interaction of proteins with DNA *in vitro*. in *Methods in Enzymology*, 152, S.L. Berger, A.R. Kimmel, Ed., : 721-735.

Hertzberg, R.P., Dervan, P.B. (1984)  
Cleavage of DNA with methidium propyl-EDTA-iron (II) : reaction conditions and product analyses. *Biochemistry*, 23 : 3934-3945.

Hill, S.M., Fuqua, S.A.W., Chamnes, G.C., Greene, G.L., Mc Guire, W.C. (1989)  
Estrogen receptor expression in human breast cancer associated with an estrogen receptor gene restriction fragment length polymorphism. *Cancer Res.*, 49 : 145-148.

Higgins, S.J., Rousseau, G.G., Baxter, J.D., Tomkins, G.M. (1973a)  
Nature of nuclear acceptor sites for glucocorticoid and estrogen receptor complexes. *J. Biol. Chem.*, 248 : 5873-5879.

Higgins, S.J., Rousseau, G.G., Baxter, J.D. (1973b)  
Early events in glucocorticoid action. Activation of steroid receptor and its subsequent specific nuclear binding studied in a cell-free system. *J. Biol. Chem.*, 248 : 5866-5872.

Hodgkinson, S.C., Lowry, P.J. (1982)  
Selective elution of immunoadsorbed anti-(human prolactin) immunoglobulins with enhanced immunochemical properties. *Biochem. J.*, 205 : 535-541.

- Holbrook, N.J., Bodwell, J.E., Jeffries, M., Munck, A. (1983)  
Characterization of non activated and activated glucocorticoid receptor complexes from intact rat thymus cells, *J. Biol. Chem.*, 258 : 6477-6485.
- Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerulli, G., Gro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Evans, R.M. (1985)  
Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor. *Nature*, 318 : 635-641.
- Hollenberg, S.M., Giguere, V., Segui, P., Evans, R.M. (1987)  
Colocalisation of DNA binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell*, 49 : 39-46.
- Hollenberg, S.M., Evans, R. (1988)  
Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*, 55 : 899-906.
- Hope, I.A., Struhl, K. (1987)  
GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA. *Embo J.*, 6 : 2781-2784.
- Moriuchi, M., Isohashi, F., Okamoto, K., Sakamoto, Y. (1984)  
Partially purified "activated" receptor glucocorticoid complex from rat liver : regulation of nuclear chromatin and DNA-cellulose binding of "activated" complex by pyrophosphate and ATP. *J. Biochem.*, 96 : 727-737.
- Housley, P.R., Grippo, J.F., Dahmer, M.K., Pratt, W.B. (1984)  
Inactivation, activation and stabilization of glucocorticoid receptors. in : *Biochemical Action of Hormones (XI)* G. Litwack ed., Academic Press, London : 347-376.
- Howard, K.J., Distelhorst, C.N. (1988)  
Evidence for the intracellular association of the glucocorticoid receptor with the 90 KDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.*, 263 : 3474-3481.
- Hubbard, J., Kalimi, M. (1982)  
Synergistic effect of molybdate plus dithiothreitol on stabilization, reactivation, and partial purification of the kidney glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.*, 257 : 14263-14270.
- Hubbard, J.R., Shirwany, T.A., Kalimi, M. (1984)  
Rapid high temperature exchange assay for the hepatic glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biochem.*, 65 : 95-99.
- Hughes, M.R., Malloy, P.J., Kieback, D.G., Kesterson, R.A., Pike, J.W., Feldman, D., O'Malley, B.W. (1988)  
Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. *Science*, 242 : 1702-1705.

Hummel, J.P., Dreyer, W.J. (1962)

Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration. *Biochim. Biophys. Acta*, 63 : 530-532.

Ichikawa, K., Bentley, S., Fee, M., De Groot, L.J. (1987)

Modification of deoxyribonucleic acid-thyroid hormone receptor interaction by histones. *Endocrinology*, 121 : 893-899.

Idziorek, T., Formstecher, 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.

Jackson, P.D., Felsenfeld, G. (1985)

A method for mapping intranuclear protein-DNA interactions and its application to a nuclease hypersensitive site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 2296-2300.

Jackson, P.D., Felsenfeld, G. (1987)

*In vivo* footprinting of specific protein-DNA interactions. in : *Methods in Enzymology*, 152, S.L. Berger, A.R. Kimmel ed. : 735-755.

Jantzen, H.M., Strahle, J., Gross, B., Stewart, P., Schmid, W.,

Boschart, M., Mischicek, R., Schutz, G. (1987a)

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

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

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

Jensen, E.V., Desombre, E.R. (1973)

Estrogen-receptor interaction : Estrogen hormones effect transformation of specific receptor proteins to a biochemically functional form. *Science*, 182 : 126-134.

Jentoft, J.E., Smith, L.M., Fu, X., Johnson, M., Leis, J. (1988)

Conserved cysteine and histidine residues of the avian myeloblastosis virus nucleocapsid protein are essential for viral replication but are not "zinc-binding fingers". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 7094-7098.

Jung-Testas, I., Baulieu, E.E. (1984)

Anti-steroid action in cultured L-929 mouse fibroblasts. *J. Ster. Biochem.*, 20 : 301-306.

Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R., Tjian, R. (1987)

Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*, 51 : 1079-1090.

Kahn, A. (1988)

L'amplification *in vitro* des fragments d'ADN par PCR (polymerase chain reaction) : un tournant génétique. *Medecine/Sciences*, 4 : 515-518.

Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F., Smith, A.E. (1984a)  
Sequence requirements for nuclear localization of SV40 large T-antigen. *Nature*, 311 : 33-38.

Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., Smith, A.E. (1984b)  
A short aminoacid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39 : 499-509.

Kalimi, M., Love, K. (1980)

Role of chemical reagents in the activation of rat hepatic glucocorticoid receptor complex. *J. Biol. Chem.*, 255 : 4687-4690.

Kalimi, M., Hubbard, J.R. (1983)

Development of an exchange assay for cytosolic glucocorticoid receptors using the synergistic effects of molybdate plus dithiothreitol. *Endocrinology*, 113 : 1161-1163.

Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, M., Richards, R.I., Krauter, P., Westphal, H.M., Beato, M. (1984)

Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature*, 308 : 513-519.

Kerepesi, T., Aranyi, P., (1985)

Low levels of glucocorticoid binding sites in circulating lymphocytes of premature infants suffering from hyaline membrane disease. *J. Steroid Biochem.*, 22 : 151-154.

Kirsch, T.M., Miller-Diener, A., Litwack, G. (1986)

The nuclear matrix is the site of glucocorticoid receptor complex action in the nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137 : 640-648.

Klock, G., Strahle, U., Schutz, G. (1987)

Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct. *Nature*, 329 : 734-736.

Klug, A., Rhodes, D. (1987)

Zinc fingers : A novel protein motif for nucleic acid recognition. *Trends Biochem.*, 12 : 464-499.

Kobayashi, M., Sasaoka, T., Takata, Y., Ishibashi, O., Subibayashi, M., Shigeta, Y., Isatomi, A., Nakamura, E., Tamaki, M., Teraoka, H. (1988)

Insulin resistance by unprocessed insulin proreceptors point mutation at the cleavage site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 153 : 657-663.

- Koch, B., Lutz, B., Briaud, B., Mialhe, C. (1976)  
Heterogeneity of pituitary glucocorticoid binding evidence for a transcortine-like compound.  
Biochim. Biophys. Acta, 444 : 497-507.
- Koyasu, S., Nishida, E., Kodanaki, T., Yahara, I. (1986)  
Two mammalian heat shock protein, hsp 90 and hsp 100, are actin binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 : 8054-8061.
- Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jix, J.R., Chambon, P. (1987)  
Functional domain of the human estrogen receptor. Cell, 51 : 941-951.
- Kumar, V., Chambon, P. (1988)  
The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. Cell, 55 : 145-156.
- Laemmli, U.K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 : 680-687.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., Mc Knight, S.L. (1988)  
The leucine zipper : a hypothetical structure common to a new class of DNA binding protein. Science, 240 : 1759-1764.
- Langer, S.J., Ostrowski, M.C. (1988)  
Negative regulation of transcription *in vitro* by a glucocorticoid response element is mediated by a trans-acting factor. Mol. Cell. Biol., 8 : 3872-3881.
- La Pointe, M.C., Chang, C.H., Vedeckis, W.V. (1986)  
Structure of the mouse glucocorticoid receptor rapid analysis by size-exclusion high-performance liquid chromatography. Biochemistry, 24 : 2094-2101.
- Lavin, T.N., Baxter, J.D., Horita, S. (1988)  
The thyroid hormone receptor binds to multiple domains of the rat growth hormone 5'-flanking sequence. J. Biol. Chem., 263 : 9418-9426.
- Lee, S.W., Tsou, A.P., Chan, H., Thomas, J., Petrie, K., Eugui, E.M., Allison, A.C. (1988)  
Glucocorticoid selectively inhibit the transcription of the interleukin-1 gene and decrease the stability of interleukin-1 m-RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 : 1204-1208.
- Lees, J.A., Fawell, S.E., Parker, M.G. (1989)  
Identification of two transactivation domains in the mouse oestrogen receptor. Nuc. Acids Res., 17 : 5477-5488.

- Lefebvre, P., Formstecher, P., Richard, C., Dautrevaux, M. (1988a)  
RU 486 stabilizes a high molecular weight form of the glucocorticoid receptor containing the 90 K non-steroid binding protein in intact thymus cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 150 : 1221-1229.
- Lefebvre, P., Danze, P.M., Sablonniere, B., Richard, C., Formstecher, 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.
- Levy, B.W., Baxter, J.D. (1976)  
Distribution of thyroid and glucocorticoid hormone receptor in transcriptionally active and inactive chromatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 68 : 1045-1051.
- Lewis, J.G., Elder, P.A. (1985)  
Fractionation of cortisol antisera by immunoabsorption chromatography. Characterization and use in an enzyme linked immunosorbent (ELISA). *J. Steroid Biochem.*, 22 : 387-390.
- Libby, P.R. (1972)  
Effect of hormones on histone acetylation. in : *Estrogen Target Tissues and Neoplasia*, T.L. DAO ed., Chicago Univ. Chicago Press : 85-100.
- Lukola, A., Ackerman, K., Pessa, T. (1985)  
Human lymphocytes glucocorticoid receptors reside mainly in the cytoplasm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131 : 877-882.
- Luttge, W.G., Gray, H.E., Densmore, C.L. (1984)  
Hydrodynamic and biochemical properties correlates of the activation of the glucocorticoid receptor. *J. Steroid Biochem.*, 20 : 545-553.
- Lustenberger, P. (1986)  
La chromatographie d'affinité des récepteurs des hormones stéroïdes : application à la purification du récepteur des glucocorticoides du foie de lapin. Thèse de Doctorat, Lille.
- Mader, S., Kumar, V., de Verneuil, H., Chambon, P. (1989)  
Three aminoacids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature*, 338 : 271-274.
- Maggi, A., Schrader, W.T., O'Malley, B.W. (1984)  
Progesterone-binding sites of the chick oviduct receptor. *J. Biol. Chem.*, 259 : 10956-10966.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Manley, J.L., Fire, A., Cano, A., Sharp, P.A., Gefter, M.L. (1980)  
DNA-dependent transcription of adenovirus genes in a soluble whole-cell  
extract. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 3855-3859.

Martinez, E., Givel, F., Wahli, W. (1987)  
The estrogen-responsive element as an inducible enhancer : DNA sequence  
requirements and conversion to a glucocorticoid responsive element. Embo  
J., 6 : 3719-3727.

Marzouki, N., Camier, S., Ruet, A., Moenne, A., Sentenac, A. (1986)  
Selective proteolysis defines two DNA binding domains in yeast  
transcription factor I. Nature, 323 : 176-178.

Matthews, B.W. (1988)  
No code for recognition. Nature, 335 : 294-295.

Maxam, A.M., Gilbert, W. (1980)  
Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages.  
Methods in Enzymology, 65 : 499-560.

Mc Cormack, M., Campanelli, J.T., Ramaswami, M., Mathew, M.K., Tanouye,  
M.A. (1989)  
Leucine-zipper motif update. Nature, 340 : 103

Mendel, D.B., Bodwell, J.E., Gametchu, B., Harrisson, 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.

Middelbrook, J.L., Wong, M.D., Ishii, N., Aronow, L. (1975)  
Subcellular distribution of glucocorticoid receptor in mouse  
fibroblasts. Biochemistry, 14 : 180-186.

Miesfield, R., Godowski, P.J., Maler, B.A., Yamamoto, K.R. (1987)  
Glucocorticoid receptor mutants that define a small region sufficient  
for enhancer activation. Science, 236 : 423-427.

Miksicek, R., Heber, A., Schmid, W., Danesh, U., Posseckert, G., Beato,  
M., Schutz, G. (1986) Glucocorticoid responsiveness of the  
transcriptional enhancer of moloney murine sarcoma virus. Cell, 46 :  
283-290.

- Miksicek, R., Borgmeyer, U., Nowock, I. (1987)  
Interaction of the TGGCA-binding protein with upstream sequences is required for efficient transcription of mouse mammary tumor virus. *Embo J.*, 6 : 1355-1360.
- Milgrom, E., Atger, M., Bailly, A. (1976)  
Interactions of rat liver glucocorticoid receptor with DNA. *Eur. J. Biochem.*, 70 : 1-11.
- Milgrom, E. (1981)  
Activation of steroid receptor complexes. in : *Biochemical Actions of Hormones*, vol. VIII : 465-492.
- Miller, J.M., Mc Lachlan, A.D., Klug, A. (1985)  
Repetitive zinc binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *Embo J.*, 4 : 1605-1612.
- Miller, P.A., Ostrowski, M.C., Hager, G.L., Simons, S.S. (1984)  
Covalent and non-covalent receptor glucocorticoid complexes preferentially bind to the same regions of the long terminal repeat of the murine mammary tumour proviral DNA. *Biochemistry*, 23 : 6883-6889.
- Miller, N.R., Simons, S.S. (1988)  
Steroid binding to hepatoma tissue culture cell glucocorticoid receptors involves at least two sulfhydryl groups. *J. Biol. Chem.*, 163 : 15217-15225.
- Miller-Diener, A., Schmidt, T.D., Litwack, G. (1985)  
Protein kinase activity associated with the purified rat hepatic glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 4003-4007.
- Misrahi, M., Atger, M., D'Auriol, L., Loosfelt, T.H., MMeriel, G., Fridlanski, F., Galibert, F., Milgrom, E. (1987)  
Complete aminoacid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned DNA. *Biochem. Biophys. Res. commun.*, 143 : 740-748.
- Mitchell, P.J., Tjian, R. (1989)  
Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding protein. *Nature*, 245 : 371-378.
- Miyabe, S., Harrisson, R.W. (1982)  
*In vivo* activation and nuclear binding of the At-T20 mouse pituitary tumor cell glucocorticoid receptor. *Endocrinology*, 112 : 2174-2180.
- Moguilewski, M., Philibert, D. (1984)  
RU 38486 : Potent antiglucocorticoid activity correlated with strong binding to the cytosolic receptor followed by an impaired activation. *J. Steroid Biochem.*, 20 : 271-276.

- Moore, D.D., Marks, A.R., Buckley, D.I., Kapler, G., Payvar, F., Goodman, H.M. (1985)  
The first intron of the human growth hormone gene contains a binding site for glucocorticoid receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 699-702.
- Moudgil, V.K., Kruczak, V.H., Eessalu, T.E., Paulose, C.S., Taylor, M.G., Hansen, J.C. (1981)  
Activation of progesterone receptor by ATP. Eur. J. Biochem., 118 : 547-555.
- Moudgil, V.K., Lombardo, G., Eessalu, T., Eliezer, N. (1986)  
Hormone dependency of transformation of rat liver glucocorticoid receptor *in vitro* : effects of heat, salt and nucleotides. J. Biochem., 99 : 1005-1016.
- Moudgil, V.K., Anter, M.J., Hurd, C. (1989)  
Mammalian progesterone receptor shows differential sensitivity to sulfhydryl modifying agents when bound to agonist and antagonist ligands. J. Biol. Chem., 264 : 2203-2211.
- Munck, A., Leung, K. (1976)  
Glucocorticoids and mechanism of action, in : Receptors and Mechanism of action of steroid hormones (II), J.R. Pasqualini Ed., Walter de Gruyter : 312-367.
- Munck, A., Mc Guyre, P.M., Holbrook, N.J. (1984)  
Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacology, Endocrine Rev., 5 : 25-42.
- Nawata, H., Kensaku, S., Higuchi, K., Kato, K.I., Ibayashi, H. (1987)  
Decreased deoxyribonucleic acid binding of glucocorticoid-receptor complex cultured skin fibroblasts from a patient with glucocorticoid resistance syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab., 65 : 219-226.
- Neuberg, M., Schuerman, M., Hunter, J.B., Muller, R. (1989)  
Two functionally different regions in Fos are required for the sequence-specific DNA interaction of the Fos/Jun protein complex. Nature, 338 : 589-590.
- Nevins, J.R. (1983)  
The pathway of eukaryotic mRNA formation. Ann. Rev. Biochem., 52 : 441-466.
- Norris, J.S., Kohler, P.O. (1983)  
Syrian hamster glucocorticoid receptors. Characteristics of binding of partially purified receptor to DNA. J. Biol. Chem., 258 : 2350-2356
- Northrop, J.P., Gametchu, B., Harrison, R.W., Ringold, G.M. (1985)  
Characterization of wild type and mutant glucocorticoid receptors from rat hepatoma and mouse lymphoma cells. J. Biol. Chem., 260 : 6398-5403.

- Northrop, J.P., Danielsen, M., Ringold, G.M. (1986)  
Analysis of glucocorticoid unresponsive cell variants using a mouse glucocorticoid receptor cDNA clone. *J. Biol. Chem.*, 261 : 11604-11070.
- Okret, S., Wikstrom, A.C., Wrangle, O., Andersson, B., Gustafsson, J.A. (1984)  
Monoclonal antibodies against the rat liver glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 : 1609-1613.
- Okret, S., Wikstrom, A.C. (1985)  
Molybdate stabilized glucocorticoid receptor : evidence for a receptor heteromer. *Biochemistry*, 24 : 6581-6586.
- O'Malley, B.W., Spelsberg, T.C., Schrader, W.T., Chytil, F., Steggles, A.W. (1972)  
Mechanism of interaction of a hormone-receptor complex with the genome of a eucaryotic target cell. *Nature*, 235 : 141-144.
- Oro, T.E., Hollenberg, S.M., Evans, R.M. (1988)  
Transcriptional inhibition by a glucocorticoid receptor- $\beta$ -galactosidase fusion protein. *Cell*, 55 : 1109-1114.
- Orti, E., Mendel, D.B., Smith, LL.I., Munck, A. (1989)  
Agonist-dependent phosphorylation and nuclear dephosphorylation of glucocorticoid receptors in intact cells. *J. Biol. Chem.*, 264 : 9728-9731.
- Otwinowsky, R.W., Schevitz, R.W., Zhang, R.G., Lawson, C.L., Joachimiak, A., Marmorstein, R.Q., Luisi, B.F., Sigler, P.B. (1988)  
Crystal structure of trp repressor/operator complex at atomic resolution. *Nature*, 335 : 321-329.
- Payvar, F., DeFranco, D., Firestone, G.L., Edgar, B., Wrangle, O., Okret, S., Gustafsson, J.A. (1983)  
Sequence specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA within and upstream of the transcribed region. *Cell*, 35 : 381-392.
- Payvar, F., Wrangle, O., Carlstedt-Duke, J., Okret, S., Gustafsson, J.A., Yamamoto, K.R. (1981)  
Purified glucocorticoid receptors bind selectively in vitro to a cloned DNA fragment whose transcription is regulated by glucocorticoids *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 6628-6632.
- Perlmann, T., Wrangle, O. (1988)  
Specific glucocorticoid receptor binding to DNA reconstituted in a nucleosome. *Embo J.*, 7 : 3073-3079.
- Perrot-Applanat, M., Logeat, F., Groyer, M.T., Milgrom, E. (1985)  
Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies. *Endocrinology*, 116 : 1473-1478.

- Petersen, N.D., Magnuson, M.A., Granner, D.K. (1988)  
Location and characterisation of two widely separated glucocorticoid response elements in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biol.*, 8 : 96-104.
- Pfahl, M. (1982)  
Specific binding of the glucocorticoid-receptor complex to the mouse mammary tumor proviral promoter region. *Cell*. 31 : 475-482.
- Picard, D., Yamamoto, K.R. (1987)  
Two signals mediate hormone-dependent nuclear localisation of the glucocorticoid receptor. *Embo J.*, 6 : 3333-3340.
- Picard, D., Salser, D.J., Yamamoto, K.R. (1988)  
A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell*. 54 : 1073-1080.
- Plesko, M.M., Hargrove, J.L., Granner, D.K., Chakley, R. (1983)  
Inhibition of sodium butyrate of enzyme induction by glucocorticoid and dibutyl cyclic AMP. *J. Biol. Chem.*, 258 : 13738-13744.
- Pratt, W.B. (1987)  
Transformation of glucocorticoid and progesterone receptor to the DNA binding state. *J. Cell. Biol.*, 35 : 51-68.
- Pratt, W.B., Jolly, D.J., Hollenberg, S.M., Giguere, V., Cadepond, F., Evans, R.M., Baulieu, E.E. (1988)  
A region in the steroid binding domain determines the formation of the non-DNA binding, 9S glucocorticoid receptor complex. *J. Biol. Chem.*, 263 : 267-273.
- Ptashne, M. (1986)  
Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature*, 322 : 697-701.
- Ptashne, M. (1988)  
How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature*, 335 : 683-689.
- Raaka, B.M., Samuels, H.H. (1983)  
The glucocorticoid receptor in GH1 cells. *J. Biol. Chem.*, 258 : 417-425.
- Raaka, B.M., Finnerty, M., Sun, E., Samuels, H.H. (1985)  
Effect of molybdate on glucocorticoid receptor of GH3 cells. *J. Biol. Chem.*, 260 : 14009-14012.
- Rajpert, E.J., Lemaigre, F.P., Eliard, P.H., Place, M., Lafontaine, D.A., Belayew, A., Martial, J.E., Rousseau, G.G. (1986)  
Glucocorticoid receptors bound to the antagonist RU 486 are not down-regulated despite their capacity to interact *in vitro* with defined gene regions. *J. Ster. Biochem.*, 26 : 513-520.

- Rauch, M., Loosfelt, M., Philibert, D., Milgrom, E. (1985)  
Mechanism of action of an antiprogestosterone, RU 486 in the rabbit  
endometrium. *Eur. J. Biochem.*, 148 : 213-218.
- Raynaud, J.P., Bonne, C., Bouton, M.M., Moguilewski, M., Philibert, D.,  
Azadian, G. (1975)  
Screening for antihormones by receptor studies. *J. Ster. Biochem.*, 6 :  
615-622.
- Raynaud, J.P., Bouton, M.M., Ojasoo, T. (1980)  
The use of interaction kinetics to distinguish potential antagonists  
from agonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, 6 : 324-327.
- Rees, A.M., Bell, P.A. (1975)  
The involvement of receptor sulfhydryl groups in the binding of steroids  
to the cytoplasmic glucocorticoid receptor from rat thymus. *Biochim.  
Biophys. Acta*, 411 : 121-132.
- 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 receptor as a  
probe of receptor structure. *Biochemistry*, 23 : 5376-5384.
- Renkawitz, R., Schutz, G., Von Der Ahe, D., Beato, M. (1984)  
Sequences in the promoter region of the chicken lysozyme gene required  
for steroid regulation and receptor binding. *Cell*, 37 : 503-510.
- Revzin, A., Ceglarek, J.A., Garner, M.M. (1986)  
Comparison of nucleic acid-protein interactions in solution and in  
polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 153 : 172-177.
- Richard-Foye, H., Hager, G.L. (1987)  
Sequence-specific positioning nucleosomes over the steroid inducible  
MMTV promoter. *Embo J.*, 6 : 2321-2328.
- Riggs, A.D., Suzuki, H., Bourgeois, S. (1970)  
*Lac* repressor-operator interaction. I. Equilibrium studies. *J. Mol.  
Biol.*, 48 : 67-83.
- Rochefort, H., Borgna, J.L., Evans, E. (1983)  
Cellular and molecular mechanism of action of antiestrogens. *J. Steroid  
Biochem.*, 19 : 69-74.
- Rodriguez, R., Carson, M.A., Weigel, N.L., O'Malley, B.W., Schrader,  
W.T. (1989)  
Hormone-induced changes in the *in vitro* DNA-binding activity of the  
chicken progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.*, 3 : 356-362.
- Rosner, W., Polimeni, S. (1978)  
An exchange assay for the cytoplasmic glucocorticoid receptor in the  
liver of the rat. *Steroids*, 31 : 427-438.

- Rousseau, G.G., Baxter, J.D., Tomkins, G.M. (1972)  
Glucocorticoid receptors : relation between steroid binding and biological effects. *J. Mol. Biol.*, 67 : 99-115.
- Rousseau, G.G., Baxter, J.D., Higgins, S.J., Tomkins, G.M. (1973)  
Steroid induced nuclear binding of glucocorticoid receptors in intact hepatoma cells. *J. Mol. Biol.*, 79 : 539-554.
- Sabbah, M., Redeuilh, G., Baulieu, E.-E. (1989)  
Subunit composition of the estrogen receptor.  
*J. Biol. Chem.*, 264 : 2397-2400
- Sablonniere, B., Danze, P.M., Formstecher, P., Lefebvre, P., Dautrevaux, M. (1986)  
Physical characterisation of the activated and non activated forms of the glucocorticoid receptor complexes bound to the steroid antagonist RU 486. *J. Ster. Biochem.*, 25 : 605-614.
- Sablonniere, B., Lefebvre, P., Formstecher, P., Dautrevaux, M. (1987)  
Improved Stokes radius measurement of the glucocorticoid receptor using TSK G3000 SW and TSK G4000SW high performance size exclusion columns. *J. Chromatogr.*, 403 : 183-196.
- Sablonniere, B., Economidis, I., Lefebvre, P., Place, M., Richard, C. Formstecher, P., Rousseau, G.G., Dautrevaux, M. (1988)  
RNA-binding to the untransformed glucocorticoid receptor : sensitivity to substrate-specific ribonucleases and characterization of a RNA associated with the purified receptor. *Eur. J. Biochem.*, 177 : 371-382.
- Sanchez, E.R., Toft, D.O., Schleseinger, 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.
- Sauer (1988)  
*Genes Dev.*, 2 : 807-816.
- Scatchard, 1949  
The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51 : 660-666.
- Scheidereit, C., Geisse, S., Westphal, H.M., Beato, M. (1988)  
The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumor virus. *Nature*, 304 : 749-752.
- Scheidereit, C., Beato, M. (1984)  
Contacts between receptor and DNA double helix within a glucocorticoid regulatory element of mouse mammary tumor virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 : 3029-3033.

Scheidereit, C., Krauter, P., Von Der Ahe, D., Janich, S., Rabenau, O., Cato, A.C.B., Suske, G., Westphal, H.M., Beato, M. (1986)  
Mechanism of gene regulation by steroid hormones. *J. Steroid Biochem.*, 24 : 19-24.

Schleif, R. (1988)  
DNA binding by proteins. *Science*, 241 : 1182-1187.

Schmid, H., Grote, H., Sekeris, C.E. (1976)  
Stabilization and characterization of the dexamethasone-binding proteins in rat liver cytosol. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 5 : 223-241.

Schmid, W., Scherer, G., Danesch, V., Zengraf, H., Matthias, P., Strange, C.M., Rowekamp, W., Schutz, G. (1982)  
Isolation and characterization of the rat tryptophan oxygenase gene. *Embo J.*, 1 : 1287-1293.

Schmid, W., Strahle, U., Schutz, G., Schmitt, J., Stunnenberg, M. (1989)  
Glucocorticoid receptor binds cooperatively to adjacent recognition sites. *Embo J.*, 8 : 2257-2263.

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

Schmidt, T.J., Miller-Diener, A., Webb, M.L., Litwack, G. (1985)  
Thermal activation of purified rat hepatic glucocorticoid receptor (evidence for a two-step mechanism). *J. Biol. Chem.*, 260 : 16255-16262.

Schmidt, T.J. (1986)  
*In vitro* activation and DNA-binding affinity of human lymphoid CEM-C7 cytoplasmic receptors labelled with the RU 486. *J. Steroid Biochem.*, 24 : 853-863.

Schrader, W.T., Rodriguez, R. (1989)  
Analysis of the chicken progesterone receptor composition and DNA binding activity. 9th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry, Las Palmas, Canary Islands, Spain.

Schuermann, M., Neuberger, M., Hunter, J.B., Jenuwein, T., Ryseck, R.P., Bravo, R., Muller, R. (1989)  
The leucine repeat motif in Fos protein mediated complex formation with Jun/AP-1 and is required for transformation. *Cell*, 56 : 507-516.

Schule, R., Muller, M., Otsuka-Murakami, H., Renkawitz, R. (1988)  
Cooperativity of the glucocorticoid receptor and the CACCC-box binding factor. *Nature*, 332 : 87-90.

Shalloway, D., Kleinberger, T., Livingston, D.M. (1980)  
Mapping of SV40 DNA replication origin region binding sites for the SV40 T antigen by protection against exonuclease III digestion. *Cell*, 20 : 411-422.

- Sibley, C.H., Tomkins, G.M. (1974)  
Isolation of lymphoma cell variants resistant to killing by glucocorticoids. *Cell*, 2 : 213-220.
- Siebenlist, U., Gilbert, W. (1980)  
Contacts between *Escherichia coli* RNA polymerase and an early promoter of phage T7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 : 122-126.
- Silva, C.M., Tully, D.B., Petch, L.A., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A. (1987)  
Application of a protein-blotting procedure to the study of human glucocorticoid receptor interactions with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 1744-1748.
- Simons, S.S. (1977)  
Glucocorticoid receptors steroid complex binding to DNA competition between DNA and DNA-cellulose. *Biochim. Biophys. Acta*, 496 : 349-358.
- Simons, S.S., Miller, P.A. (1984) Comparison of DNA binding properties of activated covalent and non covalent glucocorticoid receptors. *Biochemistry*, 23 : 6876-6882.
- 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.
- Singh, V.B., Moudgil, V.K. (1984)  
Protein kinase activity of purified rat liver glucocorticoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 125 : 1067-1073.
- Slater, E., Rabenau, O., Karin, M., Baxter, J.D., Beato, M. (1985)  
Glucocorticoid receptor binding and activation of a heterologous promoter in response to dexamethasone by the first intron of the human growth hormone gene. *Mol. Cell. Biol.*, 5 : 2984-2992.
- Speck, N.A., Baltimore, D. (1987)  
Six distinct nuclear factors interact with the 75-base-pair repeat of the moloney murine leukemia virus enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, 7 : 1101-1110.
- Stalder, J., Larsen, A., Engel, J.D., Dolan, M., Groudine, M., Weintraub, M. (1980)  
Tissue-specific DNA cleavages in the globin chromatin domain introduced by DNase I. *Cell*, 20 : 451-460.
- Strahle, U., Klock, G., Schutz, G. (1987)  
A DNA sequence of 15 pb is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 7871-7875.

- Strahle, U., Schmid, W., Schutz, G. (1988)  
Synergistic action of the glucocorticoid receptor with transcription factors. *Embo J.*, 7 : 3389-3395.S
- Strahle, U., Boshart, M., Klock, G., Stewart, F., Schutz, G. (1989)  
Glucocorticoid and progesterone specific effects are determined by differential expression of the respective hormone receptors. *Nature*, 339 : 629-632.
- Struhl, K. (1989)  
Helix-turn-helix, zinc finger, and leucine zipper motifs for eucaryotic transcriptional regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 14 : 137-140.
- Tan, S., Ammperer, G., Richmond, T.J. (1988)  
Interactions of purified transcription factors : binding of yeast MATa1 and PRTF to cell type specific, upstreal activating sequences. *Embo J.*, 7 : 4255-4264.
- Tanuma, S., Johnson, G.S. (1983)  
ADP-ribosylation of nonhistone high mobility group proteins in intact cells. *J. Biol. Chem.*, 258 : 4067-4070.
- Theveny, B., Bailly, A., Rauch, C., Rauch, M., Delain, E., Milgrom, E. (1987)  
Association of DNA bound progesterone receptor. *Nature*, 329 : 79-81.
- Thompson, E.B., Lippman, M.E. (1974)  
Mechanism of action of glucocorticoids, *Metabolism*, 23 : 159-202.
- Tienrungroj, W., Sanchez, E.R., Housley, P.R., Harrisson, R.W., Pratt, W.B. (1987)  
Glucocorticoid receptor phosphorylation, transformation and DNA binding. *J. Biol. Chem.* 262 : 17342-17349.
- Tora, L., Gaub, M.P., Mader, S., Dierich, A., Bellard, M., Chambon, P. (1988)  
Cell-specific activity of a GGTC A half-palindromic oestrogen-responsive element in the chicken ovalbumin gene promoter. *Embo J.*, 7 : 3771-3778.
- Toral, L., Mullick, A., Metzger, O., Ponglikitmongkol, M., Park, I., Chambon, P. (1989)  
The cloned human oestrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding properties. *Embo J.*, 8 : 1981-1986.
- Toth, K., Aranyi, P. (1983)  
Effect of heat treatment on glucocorticoid receptor complex : dependence on steroid structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 761 : 196-203.
- Tsai, R.Y., Carlstedt-Duke, J., Weigel, N.L., Dahlman, K., Gustafsson, J.A., Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (1988)  
Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element : evidence for receptor dimer formation. *Cell*, 55 : 361-369.

- Tsawdaroglou, N.H., Tzavaras, T.J., Sekeris, C.E. (1984)  
The effect of partially purified dexamethasone receptor on RNA synthesis in rat thymus and liver nuclei. *J. Steroid Biochem.* 20 : 295-300.
- Tullius, T.D., Dombroski, B.A. (1986)  
Hydroxy radical "foot-printing" : high-resolution information about DNA-protein contacts and application to repressor and Cro protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 5469-5473.
- Tzavaras, T.J., Tsawdaroglou, N.H., Sekeris, C.E. (1989)  
Interaction of cytosol fractions containing activated glucocorticoid-receptor complexes from rat liver and thymus with heterologous nuclei: effects on transcription. *Febs Lett.*, 250 : 30-34.
- Umesono, K., Giguere, V., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. (1988)  
Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature*, 336 : 262-265.
- Vedeckis, V.W. (1983)  
Subunit dissociation as a possible mechanism of glucocorticoid receptor activation. *Biochemistry*, 22 : 1983-1989.
- Vingerhoeds, A.C.M., Thijssen, J.H.N., Schwarz, F. (1976)  
Spontaneous hypercortisolism without Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 43 : 1128-1133
- Von Der Ahe, D., Janich, S., Scheidereit, C., Renkawitz, R., Schutz, G., Beato, M. (1985)  
Glucocorticoid and progesterone receptors bind to the same sites in two hormonally regulated promoters. *Nature*, 313 : 706-709.
- 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.
- Webster, N.J.G., Green, S., Jin, J.R., Chambon, P. (1988)  
The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell*, 54 : 199-207.
- Wei, L.L., Sheridan, P.L., Krett, N.L., Francis, M.D., Toft, D.O., Edwards, D.P., Horwitz, K.B. (1987)  
Immunologic analysis of human breast cancer progesterone receptor. II. Structure, phosphorylation and processing. *Biochemistry*, 26 : 6262-6272.

Weinberger, C., Hollenberg, S.M., Ong, E.S., Harmon, J.M., Brower, S.T., Cidlowski, J., Thompson, E.B., Rosenfeld, G.M., Evans, R.M. (1985)  
Identification of human glucocorticoid receptor cDNA clone by epitope selection. *Science*, 228 : 740-742.

Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J., Evans, R.M. (1986)  
The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*, 324 : 641-644.

Weintraub, H., Groudine, M. (1976)  
Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science*, 193 : 848-856.

Weisbrod, S., Weintraub, H. (1979)  
Isolation of a subclass of nuclear proteins responsive for conferring a DNase I-sensitive structure of globin chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 630-634.

Welshons, W.V., Lieberman, M.E., Gorski, J. (1984)  
Nuclear localization of unoccupied estrogen receptors. *Nature*, 302 : 747-750.

Westphal, H.M., Beato, M. (1980)  
The activated glucocorticoid receptor of rat liver. Purification and physical characterization. *Eur. J. Biochem.*, 106 : 395-403.

Westphal, H.M., Moldenhauer, G., Beato, M. (1982)  
Monoclonal antibodies to the rat liver glucocorticoid receptor. *Embo J.*, 1 : 1467-1471.

Whitson, P.A., Hsiem, W.T., Wells, R.D., Matthews, K.S. (1987)  
Influence of supercoiling and sequence context on operator DNA binding with lac repressor. *J. Biol. Chem.*, 262 : 14592-14599.

Willman, T., Beato, M. (1986)  
Steroid free glucocorticoid receptor binds specifically to mouse mammary tumor virus DNA. *Nature*, 324 : 688-691.

Witte, M.W., Dickson, R.C. (1988)  
Cysteine residues in the zinc finger and amino acids adjacent to the finger are necessary for DNA binding by the LAC9 regulatory protein of *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Cell. Biol.*, 8 : 3726-3733.

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 glucocorticoid receptor from rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.*, 259 : 4534-4541.

- Wrangé, O., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A. (1986)  
Stoichiometric analysis of the specific interactions of the  
glucocorticoid receptor with DNA. *J. Biol. Chem.* 161 : 11770-11778.
- Wrangé, O., Eriksson, P., Perlmann, T. (1989)  
The purified activated glucocorticoid receptor is a homodimer. *J. Biol.  
Chem.*, 264 : 5253-5259.
- Wu, C., Gilbert, W. (1981)  
Tissue-specific exposure of chromatin structure at the 5' terminus of  
the rat preproinsulin II gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 1577-  
1580.
- Wu, C. (1984)  
Two protein-binding sites in chromatin implicated in the activation of  
heat-shock genes. *Nature*, 309 : 229-234.
- Wu, C. (1985)  
An exonuclease protection assay reveals heat-shock element and TATA box  
DNA-binding proteins in crude nuclear extract. *Nature*, 317 : 84-87.
- Yamamoto, K.R. (1985)  
Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene  
network. *Ann. Rev. Genet.*, 19 : 209-252.
- Yamamoto, K.K., Gonzalez, G.A., Biggs III, W.H., Montminy, M.R. (1988)  
Phosphorylation induced binding and transcriptional efficacy of nuclear  
factor CREB. *Nature*, 334 : 494-498.
- 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.
- Young, H.A., Parks, W.P., SCOLNICK, E.M. (1975)  
Effect of chemical interacting agents on glucocorticoid receptor  
proteins in mouse and hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72 :  
3060-3064.
- Zaret, K.S., Yamamoto, K.R. (1984)  
Reversible and persistent changes in chromatin structure accompany  
activation of a glucocorticoid-dependent enhancer element. *Cell*, 38 :  
29-38.
- Zwelling, L.A., Kerrigan, D., Lippman, M.E. (1983)  
Protein-associated intercalator-induced DNA scission is enhanced by  
estrogen stimulation in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,  
80 : 6182-6186.

## TABLE DES MATIERES

### PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

	Pages
A - INTRODUCTION	6
B - LE RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES, LA PROTEINE ET SE TRANSFORMATION	13
1 - Localisation des récepteurs	13
2 - Abord biochimique du récepteur des glucocorticoides	14
a - Le récepteur complexe transformable	14
b - Le récepteur transformé	18
3 - Le récepteur et son stéroïde	19
a - Le rôle du stéroïde dans la transformation	19
b - La liaison du stéroïde au récepteur transformé	22
4 - Structure du récepteur sous forme monomérique	23
a - Le domaine de liaison au stéroïde	26
b - Le domaine de liaison à l'ADN	28
C - LE RECEPTEUR TRANSFORME PAR L'ADN	35
1 - Notion de sites accepteurs	35
2 - Régulation de la transcription par les récepteurs stéroïdiens	36
a - Détermination de la séquence consensus GRE	36
b - Localisation et orientation du GRE	37
c - Interaction entre le GRE et son récepteur	41
d - Comparaison avec d'autres SRE	44
e - Dimérisation des récepteurs stéroïdiens	47
f - Récepteur et inhibition de la transcription	52
3 - Action des stéroïdes sur la chromatine	53
a - Existence de sites hypersensibles à la DNase I	53
b - Stéroïdes et altérations chromosomiques	56
c - Stéroïdes et modification de l'ADN	58
4 - Régulation multiple de l'expression des gènes	59
a - Régulation multiple des gènes par les récepteurs stéroïdiens	60
b - Association récepteurs stéroïdiens-facteurs de transcription	62
5 - Les modèles de la régulation des gènes par les stéroïdes	65

D - CONCLUSION	72
----------------	----

## PARTIE RESULTATS

INTRODUCTION	75
--------------	----

PARTIE I : LE RECEPTEUR TRANSFORME : CARACTERISATION PAR LE STEROIDE	76
---	----

A - PREPARATION DU RECEPTEUR TRANSFORME	77
---	----

B - MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'ECHANGE	83
---	----

1 - Stabilité du récepteur en présence d'acétonitrile	85
--	----

2 - Modification des caractéristiques d'association et de dissociation	87
---	----

C - COMPARAISON DES CINETIQUES D'ECHANGE	89
--	----

1 - Présence d'une liaison artefactuelle	89
--	----

2 - Cinétique d'échange agoniste-agoniste	94
---	----

- Echange de stéroïde pour le récepteur non transformé	94
---	----

- Echange de stéroïde pour le récepteur transformé purifié	96
---	----

3 - Modification du stéroïde échangé	97
--------------------------------------	----

D - APPLICATION DE CES RESULTATS	101
----------------------------------	-----

1 - Etude du site actif du récepteur	101
--------------------------------------	-----

2 - Purification des complexes RU 486-récepteur transformé	106
---	-----

PARTIE II - LE RECEPTEUR TRANSFORME : CARACTERISATION PAR L'ADN	107
---	-----

A - RAPPEL DES RESULTATS PRECEDENTS	107
-------------------------------------	-----

B - CHOIX DE LA SEQUENCE CONSENSUS ET SA PURIFICATION	110
---	-----

1 - Détermination de la séquence	110
----------------------------------	-----

2 - Purification de l'ADN	113
---------------------------	-----

C - PREMIERS ESSAIS DE RETARD SUR GEL	116
---------------------------------------	-----

D - AMELIORATION DES CONDITIONS TECHNIQUES	123
--	-----

1 - Préparation des cytosols et homogénats lymphocytaires	123
--	-----

2 - Composition des tampons	129
-----------------------------	-----

E - CARACTERISATION DE LA BANDE RETARDEE	130
--	-----

1 - Spécificité vis-à-vis du récepteur	130
--	-----

2 - Spécificité du complexe ADN-récepteur et affinité	137
--	-----

3 - Dimérisation du récepteur	143
-------------------------------	-----

F - APPLICATION DE LA TECHNIQUE AU DOSAGE DU RECEPTEUR	149
1 - Standardisation	149
a. Les facteurs liés à la préparation cellulaire	149
b. Les facteurs liés à la sonde oligonucléotidique	150
c. Analyse de la bande retardée	151
2 - Reproductibilité et répétabilité de la méthode	153
3 - Corrélation avec d'autres méthodes	154
a. Corrélation <i>in vitro</i>	155
b. Corrélation sur cellules maintenues en survie	156
G - APPLICATION DU RETARD SUR GEL A LA PATHOLOGIE DU RECEPTEUR	160
H - APPLICATION DU RETARD SUR GEL A LA CARACTERISATION DU RECEPTEUR	163
1 - Rôle du zinc dans la liaison récepteur-GRE	163
2 - Compétition entre le récepteur et un peptide de synthèse	165
CONCLUSION ET DEVELOPPEMENTS ULTERIEURS	169
APPENDICE TECHNIQUE	174
A - PREPARATION DES CYTOSOLS ET HOMOGENATS CELLULAIRES	174
1 - Tampons	174
2 - Préparation des cytosols de foie de rat	174
3 - Purification par le sulfate de protamine du cytosol de foie de rat	175
4 - Purification du récepteur transformé homogène	175
5 - Préparation des cytosols de lymphocytes humains	175
6 - Préparation des cytosols déplétisés en récepteur	176
B - PROTOCOLES UTILISES POUR L'ETUDE DES ECHANGES DE STEROIDE	177
1 - Technique d'échange	177
2 - Détermination de la demi-vie	177
3 - Caractérisation du récepteur	177
a. Analyse des formes du récepteur par minicolonnes	177
b. Chromatographie liquide d'exclusion de taille haute performance	178
c. Electrophorèse en gel de polyacrylamide	179
C - PROTOCOLES UTILISES POUR LES ETUDES EN RETARD SUR GEL	180
1 - Purification de l'oligomère	180
2 - Appariement des brins	180
3 - Le retard sur gel	180
4 - Adaptation pour les compétitions	183
D - GRADIENT DE SUCROSE	183
E - DIVERS	185

ANNEXE	187
Méthodes d'abord des interactions ADN	
a. Filtration sur nitrocellulose	188
b. Le retard sur gel	191
c. Footprint	199
d. Protection envers l'exonucléase	202
e. Southwesterblotting	204
f. Identification des bases impliquées dans la liaison	205
g. Méthodes d'identification <i>in vivo</i>	206
h. Apport d'autres méthodes	210
i. Conclusion	212
 BIBLIOGRAPHIE	 214

## LISTE DES FIGURES

### PARTIE I

	Pages
Figure 1 - Complexe d'initiation de la transcription et complexe enhancer.	7
Figure 2 - Elements de régulation en cis et en trans	7
Figure 3a - Mécanisme d'action des hormones stéroïdes	9
Figure 3b - Les différents niveaux d'action possibles du stéroïde sur le récepteur	9
Figure 4 - Schéma hypothétique du mécanisme de la transformation suivant Vedeckis <i>et al.</i> (1985)	17
Figure 5 - Homologies de séquences et d'organisation entre les récepteurs des stéroïdes et apparentés (Evans, 1988)	24
Figure 6 - Action hypothétique du MMTS et du DTT sur les groupements SH du site de liaison au stéroïde du récepteur des glucocorticoides (Miller et Simons, 1988)	27
Figure 7 - Modèle hélice $\alpha$ -coude-hélice $\alpha$ : structure et interaction avec l'ADN	30
Figure 8 - Modèle des doigts à zinc : A - B : structure C : interaction avec l'ADN	30
Figure 9 - Effets de mutations ponctuelles de base sur l'activité de l'élément de réponse au stéroïde suivant Ham <i>et al.</i> (1988)	40
Figure 10 - Modèle d'interaction entre les domaines liant l'ADN du récepteur des glucocorticoides et leur site GRE (Chalepakis <i>et al.</i> , 1988a)	43
Figure 11 - Affinité TRE-récepteur T <sub>3</sub> et modification de la distance séparant deux hémipalindromes (Glass <i>et al.</i> 1988)	46
Figure 12 - Substitution de bases et passage d'une ERE à un GRE (Kloch <i>et al.</i> 1987)	48
Figure 13 - Structure des leucine-zippers (Landschulz <i>et al.</i> , 1988)	51

Figure 14 - Sites d'hypersensibilité à la DNase I	54
A : gène de la vitellogénine (Burde et Weintraub, 1983)	
B : gène du lysozyme (Fritton <i>et al.</i> , 1984)	
Figure 15 - Modèles d'interaction entre HRE, récepteur et d'autres facteurs de transcription (Theveny <i>et al.</i> , 1987)	68

## PARTIE II

Figure 16 - Chromatographie sur DEAE-Trisacryl du récepteur cytosolique des glucocorticoïdes	78
Figure 17 - Analyse des complexes hormone-récepteur par minicolonnes	82
Figure 18 - Stabilité des complexes TA-récepteurs en présence ou en absence de 8 % acétonitrile	86
Figure 19 - Présence de sites de liaison ne correspondant pas au récepteur des glucocorticoïdes	91
Figure 20 - Caractérisation du site surnuméraire	93
Figure 21 - Cinétique d'échange de stéroïde du récepteur en présence d'acétonitrile	95
A : le récepteur non transformé	
B : le récepteur transformé	
Figure 22 - Analyse par chromatographie d'exclusion de taille des complexes TA-récepteur et RU 486-récepteur	100
Figure 23 - Application des techniques d'échange à l'étude du site de liaison de l'hormone	102
Figure 24 - Protection différentielle des SH du site de liaison par la TA et le RU 486	104
Figure 25 - Analyse des complexes [ <sup>3</sup> H]TA-récepteur et [ <sup>3</sup> H]RU 486-récepteur par DNA-cellulose	109
Figure 26 - Purification de l'ADN monobrin par chromatographie sur colonne mono Q	115
Figure 27 - Retard sur gel réalisé sur foie de rat	118
Figure 28 - Hormonodépendance de la bande retardée observée sur cytosol de foie de rat	120

Figure 29 - Intensité de la bande observée et variation de la technique de lyse cellulaire	125
Figure 30 - Hormonodépendance de la bande retardée obtenue sur cytosol de cellules lymphocytaires humaines	131
Figure 31 - Intégration des bandes retardées obtenues sur cytosol de cellules lymphocytaires humaines	132
Figure 32 - Identification du récepteur dans la bande retardée A : par le stéroïde B : par anticorps monoclonal	135 136
Figure 33 - Spécificité de la bande retardée vis-à-vis du GRE	139
Figure 34 - Mesure de la constante de dissociation à l'équilibre GRE-récepteur	141
Figure 35 - Gradient de sucrose des complexes récepteurs transformés-GRE	144
Figure 36 - Modification des bandes retardées en fonction de la concentration du cytosol incubé avec l'ADN	146
Figure 37 - Corrélation entre les bandes retardées et le taux de protéines incubées	152
Figure 38 - Corrélation entre le dosage de la radioactivité sur cellules entières et l'intensité des bandes retardées	159
Figure 39 - Application du retard sur gel à la pathologie du récepteur	162
Figure 40 - Rôle du zinc dans l'intensité des bandes retardées	164
Figure 41 - Compétition peptide doigt à zinc-récepteur des glucocorticoides par retard sur gel	166
Figure 42 - Détermination de la demi-vie du complexe GRE-récepteur des glucocorticoides par la technique de filtration sur nitrocellulose suivant Schmid <i>et al.</i> (1989)	190
Figure 43 - Principe du retard sur gel	192
Figure 44 - Détermination de la constante d'association par footprint (Wrange <i>et al.</i> , 1989) A : Footprint réalisé à concentrations croissantes en récepteur des glucocorticoides B : Détermination du taux de saturation des sites ADN en fonction du taux de récepteur	203

Figure 45 - Principe du footprint génomique 208

B - TABLEAUX

	Pages
I - PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
TABLEAU I : Classification des doigts à zinc	32
TABLEAU II : Les séquences consensus des différents récepteurs stéroïdiens	38
II - PARTIE RESULTATS	
TABLEAU III : Caractérisation du récepteur transformé homogène	50
TABLEAU IV : Variation de la demi-vie des complexes hormone-récepteur en fonction du taux d'acétonitrile	88
TABLEAU V : Effets de l'addition de 8 % d'acétonitrile sur la constante de dissociation du récepteur transformé et non transformé incubé soit avec la triamcinolone soit avec le RU 486	98
TABLEAU VI : Détermination de la séquence consensus GRE utilisée au laboratoire	112

