

50376
1993
187

50376
1993
187

Université des Sciences et Technologies de Lille

U.F.R. de Biologie

Année 1993

PETOURNE

n° d'ordre 1155

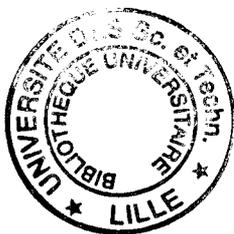
Thèse

présentée à l'Université de Lille I

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

OPTION BIOCHIMIE



par

Thierry BUROLLAUD



ETUDE DU SITE ACTIF DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES

**"Modalités comparées de son interaction avec
les stéroïdes agonistes et antagonistes."**

présentée le 5 Juillet 1993 devant la commission d'examen

Jury:

Président: Monsieur le Professeur A. VERBERT

**Rapporteurs: Monsieur le Professeur P. LUSTENBERGER
Monsieur le Docteur G. TEUTSCH**

**Examineurs: Monsieur le Professeur M. DAUTREVAUX
Monsieur le Professeur P. FORMSTECHE**



030 050437 9

"*L'observation* est l'investigation d'un phénomène naturel, et *l'expérience* est l'investigation d'un phénomène modifié par l'investigateur."

Introduction à l'étude de la médecine expérimentale. C. Bernard. (1813-1878).

à mes parents

à mon frère Didier

à mes proches

à mes ami(e)s

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Biochimie Structurale de la Faculté de Médecine de Lille sous la direction de **Monsieur le Professeur M. DAUTREVAUX**. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accordé sa confiance et je le remercie de participer au jury de cette thèse.

Je tiens à adresser aussi mes plus vifs remerciements à:

- **Monsieur le professeur A. VERBERT** qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse,

- **Monsieur le professeur P. LUSTENBERGER**

- **Monsieur le Docteur G. TEUTSCH**

Je vous remercie d'avoir bien voulu accorder un peu de votre temps à la lecture de ce travail. Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de le juger.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Monsieur le professeur P. FORMSTECHE**R pour m'avoir intégré dans son équipe, m'avoir confié cet intéressant travail et pour l'avoir suivi avec grand intérêt jusqu'à son terme en participant au jury de cette thèse.

Je remercie **tous les membres du laboratoire** qui ont contribué de près ou de loin à ce travail: Marie-Thérèse, Claude, Viviane, Bernard, Isabelle, Nathalie et plus particulièrement Pierre-Marie pour son grand dévouement et sa patience.

Je remercie également pour leur travail et leur bonne humeur **l'ensemble du personnel du laboratoire**: Bernadette, Pascaline, Françoise, Madame Morel, Philippe et plus particulièrement Sylvie qui a surveillé la frappe de ce mémoire.

RESUME

Nous avons étudié la sensibilité sélective de liaison aux stéroïdes du récepteur des glucocorticoïdes (RGC) soumis à un traitement par des réactifs spécifiques des groupements thiols (dérivés maléimides). Ont été explorées les corrélations possibles entre la structure chimique des stéroïdes testés, leur activité biologique et la sensibilité de leur liaison à la modification chimique des thiols du récepteur. Des stéroïdes agonistes (acétonide de triamcinolone ou TA, dexaméthasone ou Dex, RU 26988, RU 28362, deacylcortivazole ou COR) et antagonistes (RU 486, DXB) ont été testés. Des réactions de compétition en absence de réactif ont montré que tous ces ligands se lient au RGC au niveau du même domaine de liaison. La liaison de la TA tritiée au récepteur libre préincubé avec différentes alkylmaléimides est presque totalement inhibée. Au contraire, la liaison du RU 486 tritié n'est que légèrement affectée après traitement initial par la N-éthylmaléimide (NEM) alors qu'une diminution plus significative est observée si la taille du substituant alkyl des maléimides est augmentée.

Des réactions d'échange de stéroïdes en présence de 8 % d'acétonitrile montrent que le RU 486 semble incapable de protéger le site de liaison des effets de la NEM contrairement à la TA. Ce manque de protection peut être lié à la présence du substituant volumineux en position 11 beta du RU 486 car, en absence de celui-ci, le RU 26988 et le RU 28362, qui portent cependant la même chaîne latérale 17 alpha que le RU 486, protègent le site des effets de la NEM. De plus, le blocage par le ligand de l'action de la NEM ne semble pas être en relation avec son activité biologique. En effet, le COR ne semble offrir aucune protection du site alors que des dérivés 17 beta carboxamides de la dexaméthasone comme le DXB permettent cette réassociation TA-récepteur. Tous ces faits montrent que les ligands caractérisés par un substituant volumineux en 3 (COR) et/ou en 11 (RU 486) sont positionnés différemment dans le site du RGC par rapport aux ligands habituels (TA, Dex) de ce récepteur.

Parallèlement, dans le but de comprendre le positionnement final au niveau du site du substituant 11 beta qui génère une activité agoniste ou antagoniste, nous avons étudié plusieurs dérivés du RU 486, stéroïdes marqueurs d'affinité potentiels du RGC. Deux dérivés, le RU 52585 et le RU 56894, présentent un taux d'échange relativement faible vis-à-vis de la Dex même en présence de 8 % d'acétonitrile. Ces deux stéroïdes semblent pourtant stabiliser le récepteur sous la forme non transformée théoriquement échangeable à un taux élevé. Ces résultats suggèrent que le RU 52585 et le RU 56894 forment avec le RGC des complexes covalents non échangeables et que ces deux stéroïdes sont donc des marqueurs d'affinité potentiels.

SUMMARY

The differential sensitivity of the rat liver Glucocorticoid Receptor (GR) to sulfhydryl group modifying agents (NEM and derivatives) when bound to various agonist and antagonist ligands was studied. Competition assays in normal conditions showed that all the used steroids bound to the same Hormone Binding Domain or HBD. [³H] Triamcinolone Acetonide (TA) binding was nearly completely abolished by previous treatment of the unbound receptor with maleimides. On the contrary, [³H] RU 486 binding was only slightly affected by treatment with N-ethylmaleimide (NEM) and more significantly decreased with maleimides bearing bulky substituents.

Ligand exchange experiments, in the presence of acetonitrile, demonstrated that, unlike the agonist TA, the antiglucocorticoid RU 486 was unable to protect the GR binding site from the effects of NEM. This lack of protection would seem to be due to the presence of the bulky 11 beta substituent in RU 486 since RU 26988 and RU 28362, two 11 beta hydroxylated glucocorticoids bearing the same 17 alpha propynyl side chain as RU 486 but lacking the 11 beta substituent could protect GR against NEM. The ability of a GR ligand to prevent NEM inactivation of TA binding appeared unrelated to its agonist or antagonist nature: deacylcortivazol, a potent agonist, afforded no protection whereas partial antagonists of the 17 beta carboxamide series did. These data strongly suggest that compounds bearing bulky substituents on the steroid A and/or C rings, like deacylcortivazol and RU 486, are positioned differently from canonical glucocorticoids in the steroid binding groove of the GR.

Moreover, the interaction of GR with several RU 486 analogs, bearing reactive groups and therefore being potential affinity labels of PR and/or GR, was studied. All these analogs display a high affinity towards the rat thymus GR, as measured by competition assays. Two of them seem particularly interesting since after preincubation with the GR, they appear only partially exchangeable with dexamethasone, even in the presence of acetonitrile. Moreover, we checked (by size exclusion chromatography and immunodetection) that the GR complexed with these two derivatives was still in the 7nm untransformed, i.e. its stable and theoretically highly exchangeable form. Therefore the two poorly exchangeable compounds have probably formed covalent complexes with the receptor.

COMMUNICATIONS

Ce travail effectué dans le laboratoire de Biochimie Structurale de la Faculté de Médecine de Lille (Professeur M. Dautrevaux) sous la direction du Professeur P. Formstecher a fait l'objet des communications suivantes:

- PUBLICATIONS

Formstecher, P., Lefebvre, P. and Burollaud, T.

Hormones et antihormones. Le modèle stéroïdien.

J. Pharm. Belg. **46** (1991) 37-48.

Burollaud, T., Danze, P. M., Tbarka, N., Formstecher, P. and Dautrevaux, M.

Binding of RU 486 and Deacylcortivazol to the glucocorticoid receptor is insensitive to sulfhydryl modifying agents.

J Steroid Biochem. Mol. Biol. **44** (1993) 217-225.

- COMMUNICATIONS PAR AFFICHES

"17 ème Forum des Jeunes Chercheurs Biochimie et Biologie Moléculaire".

(3-6 juillet 1990, Villeneuve d'Ascq)

"Rôle possible de deux groupements thiols différents dans la liaison spécifique de l'acétonide de triamcinolone et du RU 486 au récepteur des glucocorticoïdes du foie de rat".

Burollaud, T., Danze, P. M., Sablonniere, B., Formstecher, P. et Dautrevaux, M.

"8^{ème} international congress on hormonal steroids".

(16-21 septembre 1990, The Hague, The Netherlands)

"Distinct sulfhydryl groups are essential for the binding of Triamcinolone Acetonide and RU 486 to the glucocorticoid receptor".

Burollaud, T., Danze, P. M., Sablonniere, B., Formstecher, P. and Dautrevaux, M.

- MEMOIRES

- Année 1989: Mémoire pour l'obtention du **DEA des Sciences de la Vie et de la Santé**.

Titre du mémoire: "Action de la N-éthyl-maléimide sur les réactions d'échanges entre agonistes et antagonistes au niveau du récepteur des glucocorticoïdes du foie de rat".

(Mise au point de la méthode, échanges TA/RU 486).

- Année 1991: Mémoire pour l'obtention du **Mastère en Drug Design**.

Titre du mémoire: "Action de la N-éthyl-maléimide sur les réactions d'échanges entre agonistes et antagonistes au niveau du récepteur des glucocorticoïdes du foie de rat".

(utilisation de 7 stéroïdes différents: Dex, TA, RU 486, COR, RU 28362, RU 26988, DXB).

TABLE DES MATIERES

	PAGE
- ABREVIATIONS.	14
- REVUE GENERALE.	
- - INTRODUCTION: "Quand les cellules parlent...".	16
 PARTIE n°1: "Le récepteur". 	
- I/ <u>Mode d'action des hormones glucocorticoïdes.</u>	19
- II/ <u>Localisation du récepteur des glucocorticoïdes.</u>	21
- III/ <u>Différentes formes du récepteur.</u>	22
- - A/ Forme non transformée du récepteur.	22
- - B/ Importance du molybdate.	25
- - C/ Récepteur sous forme transformée.	27
- IV/ <u>Structure du récepteur.</u>	27
- - A/ Domaine A/B ou partie N-terminale de la protéine.	30
- - B/ Domaine C.	32
- - C/ Domaine D.	35
- - D/ Domaine(s) E/F - Etude des acides aminés essentiels à la fixation des agonistes.	35
1) Réactifs spécifiques.	38
2) Marquage d'affinité.	41
3) Mutagénèse dirigée.	44
- V/ <u>Importance et rôle du ligand dans le fonctionnement des récepteurs stéroïdiens.</u>	47

PARTIE n°2: "Les ligands naturels et synthétiques".

- I/ <u>Rôles des glucocorticoïdes à l'échelon physiologique.</u>	51
- II/ <u>Corrélation Structure du stéroïde - Activité de liaison au récepteur.</u>	51
- - A/ Définition.	51
- - B/ Mesure de l'activité <i>in vivo</i> .	52
- - C/ Mesure de l'activité <i>in vitro</i> .	52
- - D/ Classification des stéroïdes.	53
- - E/ Intérêts des analogues structuraux.	54
- - F/ Principales conclusions des études de RSA.	54
1) Carbone n°3.	58
2) Carbone n°17.	60
3) Carbone n°11.	61
- III/ <u>Mécanisme d'action des ligands antagonistes.</u>	63
1) Complexes RU 486-RGC.	68
2) Complexes RU 486-RP.	68
- IV/ <u>Acides aminés essentiels dans l'interaction antagoniste-récepteur.</u>	72
- - A/ Réactifs spécifiques.	72
- - B/ Marquage d'affinité et mutagénèse dirigée.	73
B/1/ Récepteur des oestrogènes.	73
B/2/ Récepteur des glucocorticoïdes et celui de la progestérone.	75

- RESULTATS ET DISCUSSION.

PARTIE n°1:

"Sensibilité comparée aux réactifs des thiols de la liaison de ligands agonistes ou antagonistes au RGC."

- 1) <u>Influence du traitement aux réactifs spécifiques des thiols sur la capacité de liaison du RGC.</u>	81
- 2) <u>Influence du traitement à la NEM sur les réactions de compétition.</u>	90
- 3) <u>Influence du traitement aux réactifs spécifiques des thiols sur les possibilités d'échange de ligand.</u>	93
- - A/ Réactions d'échange en l'absence de traitement par les réactifs des thiols.	95
- - B/ Influence des réactifs spécifiques d'acides aminés sur les échanges.	95
B-1/ Influence de la NEM.	95
a) Incubation initiale avec la TA.	95
b) Incubation initiale avec le RU 486.	97
α) Deuxième ligand ajouté: RU 486.	97
β) Deuxième ligand ajouté: TA.	97
B-2/ Influence de l'IA.	100
- 4) <u>Réactions d'échange avec d'autres ligands du RGC.</u>	103
- - A/ Influence du substituant en position 11 (RU 988 et RU 362).	103
- - B/ Influence du substituant en position 17 (le DXB).	104
- - C/ Influence du substituant en position 3 (le COR).	105
- 5) <u>Essai d'identification directe du ou des groupement(s) thiol(s) concerné(s).</u>	113

PARTIE n°2:**"Stéroïdes marqueurs d'affinité."**

- 1) Mesure de l'affinité de liaison des différents stéroïdes pour le RGC
par réactions de compétition. 122
- 2) Réactions d'échange entre stéroïdes au niveau du domaine
de liaison au ligand. 126
- 3) Détermination de l'état activé ou non des complexes RU 585-RGC
et RU 894-RGC. 128

- CONCLUSION ET PERSPECTIVES. 132
- APPENDICE TECHNIQUE. 138
- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES. 155
- LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX. 184

ABREVIATIONS UTILISEES

ADN: Acide Déoxyribonucléique.
Anti-H: Anti-hormone.
ARE: "Androgen Responsive Element".
ARN (m ARN): Acide ribonucléique (messenger).
Br CN: Bromure de cyanogène.
Complexe H-R: Complexe hormone-récepteur.
Complexe antiH-R: Complexe antihormone-récepteur.
COR: Déacylcortivazole.
Cpm: Coups par minute.
Cys: Cystéine.
DCC: Méthode au charbon dextran.
Dex: Dexaméthasone.
DTNB: 5-5'-Dithiobis(2-nitrobenzène).
DTT: Dithiothreitol.
EDTA: Acide éthylène diamine tétra acétique.
ERE: "Estrogen Responsive Element".
GRE: "Glucocorticoid Responsive Element".
HRE: "Hormone Responsive Element".
HSP: Heat shock protein.
IA: Iodoacétamide.
kDa: kilodalton(s).
Mét: Méthionine.
MMTS: Méthyl méthane thiol sulfonate.
MRE: "Mineralocorticoid Responsive Element".
NEM: N-éthyl-maléimide.
NLS: Nuclear localization signal.
PRE: "Progesterone Responsive Element".
RA: Récepteur des androgènes.
RAR: Récepteur de l'acide rétinoïque.
RE: Récepteur des oestrogènes.
RGC: Récepteur des glucocorticoïdes.
RM: Récepteur des minéralocorticoïdes.
RSA: Relations structure-activité.
RP: Récepteur de la progestérone.
RT: Récepteur des hormones thyroïdiennes.
TA: Acétonide de triamcinolone.
TAF/TIF: Transcriptional activated/intermediate factor/function.

REVUE GENERALE

"QUAND LES CELLULES PARLENT...."

L'évolution des organismes pluricellulaires est étroitement liée à la capacité qu'ont leurs cellules de communiquer entre elles. Cette communication intercellulaire est indispensable pour un développement harmonieux des cellules, pour leur organisation en tissus, pour le contrôle de leur division et la coordination de leurs activités. La transmission de l'information entre les cellules est réalisée soit par des contacts directs entre cellules voisines soit par l'intermédiaire de médiateurs chimiques dont un des principaux représentants sont les hormones. Celles-ci se divisent en deux groupes: les hormones d'origine protéique et les hormones stéroïdiennes: glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes, vitamine D, hormones sexuelles (androgènes, oestrogènes, progestagènes). Ces substances sont véhiculées par le sang en provenance de cellules sécrétoires spécialisées plus ou moins éloignées de la cellule-cible. Les cellules dont l'activité sera modifiée par les hormones possèdent des molécules de nature protéique capables de les reconnaître spécifiquement: ce sont les récepteurs qui sont localisés:

- soit au niveau de la membrane plasmique (hormones protéiques)
- soit au niveau du cytoplasme ou du noyau des cellules-cibles (hormones stéroïdes).

Celles-ci, contrairement aux premières, doivent donc, pour être reconnues par leurs récepteurs, traverser la membrane plasmique. Les hormones expriment le message qu'elles portent par l'intermédiaire de cette molécule réceptrice. Les hormones stéroïdes sont synthétisées à partir du cholestérol et possèdent donc toutes la même structure de base (un noyau polycyclique hydrophobe); seules leurs différences structurales minimales (au niveau des substituants de ce noyau) expliquent la diversité de leurs effets biologiques (reproduction, inflammation, métabolisme des sucres, activités rénales, ...).

Notre étude porte sur le fonctionnement de ces hormones stéroïdes, et en particulier sur les hormones glucocorticoïdes et leur récepteur spécifique (RGC).

Les glucocorticoïdes sont considérés comme les hormones du stress, leur action globale étant d'augmenter la résistance de l'organisme à diverses agressions (rôle anti-inflammatoire et anti-prolifératif). Comme leur nom l'indique, ils jouent par ailleurs un rôle important dans le métabolisme du sucre (au niveau surtout de la néoglucogénèse). Nos travaux ont cherché à préciser certains aspects concernant la formation du complexe hormone-récepteur après reconnaissance des deux partenaires. Cette interaction au mécanisme encore mal établi est indispensable pour la transmission du message initialement dû à l'hormone seule. C'est pourquoi:

Dans une première partie, nous décrivons la structure originale de ce récepteur en insistant sur le domaine de liaison au stéroïde avec les acides aminés supposés essentiels à l'interaction hormone-récepteur.

Dans une deuxième partie, nous nous attarderons sur les ligands de ce récepteur d'origine naturelle ou synthétique, agonistes ou antagonistes (appelés aussi anti-hormones). Ces derniers, au contraire des agonistes qui induisent les mêmes effets que les hormones naturelles, inhibent complètement le récepteur. De plus, les ligands synthétiques présentent des intérêts non négligeables dans le domaine de la recherche ou dans le domaine médical.

1^{ère} partie
"Le récepteur"

I - MODE D'ACTION DES HORMONES GLUCOCORTICOÏDES (figure n° 1)

Les hormones glucocorticoïdes sont liées dans le plasma à une protéine spécifique de transport, la transcortine ou "Corticosteroid Binding Globulin" (CBG). Une partie de la fraction libre des stéroïdes, liposolubles, pénètre dans les cellules-cibles par simple diffusion (étape n°1). Le mécanisme exact de la pénétration cellulaire reste encore mystérieux mais l'hypothèse d'un transporteur membranaire, actif ou non, n'est pas non plus totalement à exclure. Un tel transporteur, membranaire, de nature protéique, différent de la CBG ou du récepteur nucléaire, a été découvert par marquage d'affinité (IBARROLA *et al*, 1992). Très récemment, un transporteur actif de la corticostérone, inséré au niveau de la membrane plasmique du foie de rat, a été mis en évidence. Celui-ci fonctionne à des concentrations sanguines physiologiques en glucocorticoïdes et il serait impliqué, au niveau fonctionnel et régulateur, dans le mécanisme d'action biologique des glucocorticoïdes (ALLERA et WILDT, 1992 a et b). De plus, ces auteurs n'ont pas observé de diffusion passive de la corticostérone à travers la membrane plasmique et pensent donc que ce transporteur est indispensable pour un transfert effectif du stéroïde de la transcortine du sang au récepteur situé à l'intérieur de l'hépatocyte. Une fois à l'intérieur de la cellule, le stéroïde (S) se lie, de manière réversible, avec une forte affinité, à une structure protéique soluble cytoplasmique appelée récepteur ou RGC (étape n°2). Après la fixation du stéroïde au récepteur, sous forme hétérooligomérique ou non transformée, le complexe hormone-récepteur, ainsi formé, subit une activation ou transformation. Celle-ci est caractérisée par la dissociation de l'hétérooligomère et l'acquisition, par la suite, d'une haute affinité pour l'ADN (étape n°3). Après passage dans le noyau (étape de translocation, étape n°4) et dimérisation (homodimère actif), le complexe se lie au génome au niveau d'une séquence nucléotidique partiellement palindromique appelée GRE ("Glucocorticoid Responsive Element", étape n°5). Cette interaction complexe-ADN déclenche alors la réponse cellulaire caractérisée par la transcription de gènes spécifiques hormono-dépendants. Les mARN, ainsi formés, sont traduits en protéines, souvent enzymatiques, provoquant les effets biologiques spécifiques observés.

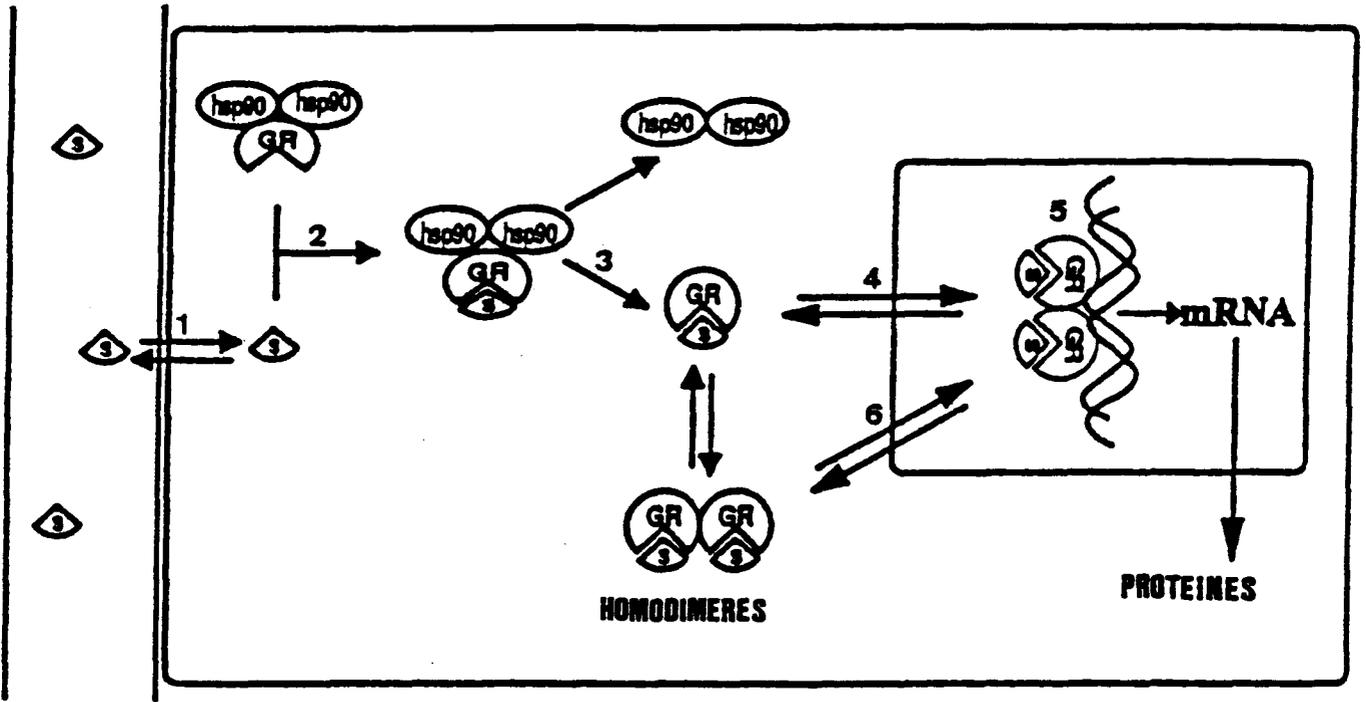


figure n°1

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

1. Pénétration cellulaire de l'hormone (S).
2. Liaison de l'hormone au récepteur (domaine E).
3. Transformation du complexe hormone-récepteur.
4. Translocation du complexe transformé du cytoplasme vers le noyau.
5. Interaction du récepteur (domaine C) avec le génome (au niveau du GRE).
6. Recyclage et régulation du taux de récepteur.

GRE: Glucocorticoid Response Element.

GR: Glucocorticoid Receptor.

II - LOCALISATION DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES

La localisation cellulaire du récepteur, en absence de ligand, sous forme non transformée, est encore très controversée. Toutefois, la localisation cytoplasmique initiale est la plus communément admise pour le RGC ce qui rend l'étape de translocation nucléaire caractéristique de ce récepteur. De plus, ceci expliquerait l'existence et le rôle des deux séquences NLS ("Nuclear Localization Signal") présentes dans la structure du récepteur (PICARD et YAMAMOTO, 1987; SCHREIBER *et al*, 1992). En fait, le modèle présenté ici est rejeté pour les autres récepteurs nucléaires en particulier pour les récepteurs des hormones sexuelles (progestérone et oestrogènes) (une seule séquence NLS présente dans la séquence peptidique) dont la localisation semble être uniquement nucléaire avant même la liaison à l'hormone (PICARD *et al*, 1990). Nous pouvons diviser artificiellement les récepteurs en deux classes selon leur localisation initiale en absence de tout ligand (classification selon GUIOCHON-MANTEL *et al*, 1992):

1) Localisation cytoplasmique:

- RGC (PICARD et YAMAMOTO, 1987; WIKSTROM *et al*, 1987; LEFEBVRE *et al*, 1988, a; ALEXIS *et al*, 1992).

- RM (LOMBES *et al*, 1990; FARMAN *et al*, 1991).

2) Localisation nucléaire:

- récepteurs non liés à l'ADN: RP (PERROT-APPLANAT *et al*, 1985); RA (HUSMANN *et al*, 1990); RE (KING et GREENE, 1984; KUMAR et CHAMBON, 1988); RAR (NERVI *et al*, 1989).

- récepteurs liés à l'ADN: RT et Récepteur de la vitamine D (WALTERS *et al*, 1981).

Le doute subsiste toujours sur la localisation exacte du RGC (CARSON-JURICA *et al*, 1990) car plusieurs auteurs sont partisans d'une localisation nucléaire de celui-ci comme

pour tous les autres récepteurs de cette famille au vue de leur organisation structurale commune (voir paragraphe n° IV, 1^{ère} partie de la revue générale) (BRINCK *et al*, 1992; PEKKI *et al*, 1992).

III - DIFFERENTES FORMES DU RECEPTEUR

Le récepteur présente au cours de son action au moins deux états conformationnels différents particulièrement importants:

- le récepteur sous forme non transformée (ou hétéropolymère) ne pouvant pas lier l'ADN.
- le récepteur sous forme transformée capable de lier l'ADN.

Pour certains auteurs, le récepteur existerait aussi sous une forme transformée intermédiaire ne pouvant pas encore lier l'ADN. Dans ce cas, le domaine responsable de la liaison à l'ADN ou domaine C serait encore bloqué par d'autres protéines ou par un autre domaine du récepteur comme le domaine de liaison du ligand ou domaine E (HUTCHISON *et al*, 1992 a, b).

A - FORME NON TRANSFORMEE DU RECEPTEUR

Le récepteur non transformé se présente sous la forme d'un complexe hétéropolymérique de haut poids moléculaire, complexe stabilisé *in vitro* par le molybdate de sodium (voir ci-dessous). Sa masse moléculaire d'environ 300 kDa a été estimée à partir du coefficient de sédimentation (8-9 S) (VEDECKIS, 1983) et du rayon de Stokes (8-9 nm) (HOLBROOK *et al*, 1984) déterminés préalablement. Cet ensemble hétéropolymérique ne contient qu'une seule unité liant le stéroïde (le récepteur proprement dit de masse moléculaire de 94 kDa environ) (GEHRING et ARNDT, 1985; OKRET *et al*, 1985) associée à différentes molécules:

a) Certaines de ces molécules ont été identifiées comme appartenant à la famille des protéines de choc thermique ou HSP. Il s'agit d'une HSP 70 à liaison transitoire (PRATT *et al*, 1992), d'une HSP 56 (SANCHEZ, 1990) et de deux molécules d'HSP 90 présentes par molécule de récepteur (DENIS *et al*, 1987). Cette association HSP-récepteur non transformé, certaine *in vitro* (DENIS *et al*, 1988, 1989), a été montrée *in vivo* par différentes méthodes comme l'utilisation d'agents de couplage de protéines (REXIN *et al*, 1991, a, b; 1992) (ALEXIS *et al*, 1992) ou d'antagonistes (anti-glucocorticoïdes) comme le RU 486 (LEFEBVRE *et al*, 1988, a; voir 2^{ème} partie de la revue générale).

Plusieurs hypothèses ont été émises quant au(x) rôle(s) de ces HSP associées. Pour certains auteurs, elles joueraient un rôle dans le transport intracellulaire (étape de translocation, KOYASU *et al*, 1986). En effet, plusieurs études ont montré l'association du RGC au cytosquelette (microfilaments, microtubules) par l'intermédiaire de l'HSP 90 (SANCHEZ *et al*, 1988; AKNER *et al*, 1991; MIYATA et YAHARA, 1991). Pour d'autres, la liaison HSP 90 - récepteur masquerait en partie le site de liaison à l'ADN expliquant l'absence de liaison à l'ADN du récepteur non transformé (PRATT *et al*, 1987, 1988; PONGRATZ *et al*, 1992). Ces HSP, en particulier l'HSP 70, seraient aussi impliquées dans le repliement tridimensionnel (conformation) du récepteur (PRATT *et al*, 1992) et dans le transport nucléaire comme pour le RP (ONATE *et al*, 1991; PERROT-APPLANAT *et al*, 1992). Par ailleurs, le rôle de l'HSP 90 dans la liaison du stéroïde au récepteur ou plutôt dans la capacité du récepteur à lier un ligand reste encore discuté. L'HSP 90 (revue; PRATT, 1990), en effet, joue un rôle de "chaperon" vis-à-vis notamment du récepteur des glucocorticoïdes (NEMOTO *et al*, 1990) et de celui de la dioxine (PONGRATZ *et al*, 1992). Il semblerait que, pour ces deux récepteurs, celle-ci soit indispensable pour l'expression de cette activité de liaison en stabilisant une conformation particulière du récepteur capable de lier le ligand. Plusieurs arguments en faveur de ce rôle de chaperon existent: nous pouvons signaler que le RGC sous forme activée (dissociation des HSP 90) perd totalement sa capacité de liaison à l'hormone (DANZE *et al*, 1990). Par ailleurs, la traduction *in vitro* du RGC dans un lysat de réticulocyte de lapin (dans lequel

l'HSP 90 est présente) reconstitue totalement son activité de liaison à l'hormone, alors que cette activité n'apparaît pas du tout dans un système ne contenant pas d'HSP 90 comme le lysat de germe de blé (PRATT *et al*, 1992, b). Pour d'autres récepteurs, l'HSP 90 n'aurait que peu d'effets sur cette interaction H-R (récepteur des androgènes; NEMOTO *et al*, 1992).

Une autre protéine de choc thermique, la protéine 59 ou P 59, mise en évidence par des méthodes immunochimiques, est aussi associée à ce complexe (KUTAI *et al*, 1992). Cette protéine, multifonctionnelle, serait une immunophiline, protéine capable de se lier à des immunosuppresseurs utilisés en thérapeutique humaine comme le FK 506 ou la rapamycine (composés inhibant les réactions immunologiques) (RENOIR *et al*, 1992). Le ligand immunosuppresseur naturel de la P 59 est inconnu. Au sein du complexe récepteur, cette protéine P 59 semble liée uniquement à l'HSP 90, elle-même reliée à la sous-unité réceptrice, faisant alors partie indirectement du complexe (RENOIR *et al*, 1990; LEBEAU *et al*, 1992; PEATTIE *et al*, 1992). C'est pourquoi on appelle aussi cette molécule "HBI" pour "Heat shock Binding Immunophilin" ("immunophiline qui lie la protéine de choc thermique"). RENOIR *et al* (1992) ont remarqué qu'*in vitro* la fixation d'un immunosuppresseur ne provoquait pas l'activation du RP (absence de dissociation de la P 59 et des HSP 90) mais augmentait la liaison (taux multiplié par 2) de la progestérone (ainsi que celle d'un anti-progestérone) au RP (meilleure stabilisation du récepteur). Ceci montre aussi que le site de liaison de l'HSP 90 est distinct de celui des immunosuppresseurs. De plus, comme dans toutes les immunophilines, la P 59 est aussi le siège d'une activité enzymatique de type rotamase, enzyme modifiant l'orientation des chaînes peptidiques au niveau des résidus prolines. Par ailleurs, cette protéine possède également un site de liaison de la calmoduline calcium-dépendant (régulation de l'activité de protéines intracellulaires) et un autre site pour la liaison de l'ATP et du GTP (rôle encore inconnu). Au vu des propriétés de chacune de ces deux protéines, ce complexe HSP 90-P 59 pourrait jouer un rôle important dans les mécanismes de survie cellulaire et de transport intracellulaire des protéines.

b) L'association d'acides ribonucléiques (ARN) avec le RGC a été retrouvée *in vitro* et *in vivo* (SABLONNIERE *et al*, 1988) mais leur rôle dans la formation du complexe hétéropolymérique reste obscur (ECONOMIDIS *et al*, 1985).

c) Le RGC non transformé est une phosphoprotéine *in vivo* et les acides aminés concernés par la phosphorylation sont souvent des résidus sérines et/ou thréonines localisés dans le domaine immunogène N-terminal ou domaine A/B (CARSON-JURICA *et al*, 1990; BODWELL *et al*, 1991). La phosphorylation de certaines tyrosines ou sérines paraissent aussi nécessaires pour l'activation du RE (tyrosine 537 dans le RE humain, CASTORIA *et al*, 1993) ou du RP respectivement (WEIGEL *et al*, 1992, a). De façon générale, la phosphorylation des récepteurs nucléaires semble être importante pour leur action mais son ou ses niveaux d'intervention reste(nt) une énigme (KING, 1992; DAHLMAN-WRIGHT *et al*, 1992).

B - IMPORTANCE DU MOLYBDATE (figure n° 2)

Le molybdate de sodium est considéré comme un "stabilisateur" de l'hétéropolymère ou par certains auteurs comme un "inhibiteur" de la transformation. En effet, 10 mM de molybdate de sodium inhibe réversiblement la transformation (DAHMER *et al*, 1984). Le mécanisme moléculaire exact de l'action du molybdate est encore hypothétique. L'action stabilisatrice du molybdate sur le récepteur passerait par la formation d'un complexe entre cet ion métallique et des résidus de cystéines (KAY et MITCHELL, 1968; PRATT, 1987). Cet ion renforcerait surtout les interactions entre les deux molécules d'HSP 90 et la sous-unité réceptrice au niveau du domaine E (domaine de liaison au stéroïde) (DENIS *et al*, 1987; MESHINCHI *et al*, 1990).

C - RECEPTEUR SOUS FORME TRANSFORMEE (figure n° 3)

La transformation confère au récepteur une affinité envers l'ADN. Cette étape s'accompagne d'un changement de taille du complexe initial 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 4 S (VEDECKIS, 1983). Une augmentation du point isoélectrique est aussi observée (BEN-OR et CHAMBRACH, 1983; DANZE *et al*, 1987). Le mécanisme de la transformation est probablement une dissociation du complexe initial en un monomère (le récepteur proprement dit) (MENDEL *et al*, 1986; GUSTAFSSON *et al*, 1989). La réversibilité de cette transformation *in vitro* (PRATT *et al*, 1992, a; SCHERRER *et al*, 1992) et surtout *in vivo* (problème du "recyclage" du récepteur, étape n°6, figure n° 1) reste encore une notion très discutée. Toutefois, en présence d'un lysat de réticulocyte de lapin (contenant les différentes HSP dont l'HSP 70) et d'un récepteur nucléaire (traduit, immunopurifié et dissocié au préalable des HSP) sous certaines conditions (température, molybdate de sodium, ATP), le récepteur peut être reconstitué sous une forme non transformée (complexe hétéropolymérique) tout à fait fonctionnelle (capacité de liaison à l'hormone). Ceci constitue le premier système montrant la réversibilité de la transformation *in vitro* uniquement (PRATT *et al*, 1992, b).

IV - STRUCTURE DU RECEPTEUR

Le RGC présente une organisation en domaines fonctionnels distincts commune à tous les récepteurs nucléaires (voir figure n° 4). Cette organisation a été déterminée par différentes méthodes biochimiques, immunologiques et génétiques. Le premier récepteur nucléaire cloné fut celui des glucocorticoïdes (HOLLENBERG *et al*, 1985). Ce récepteur avait été purifié au début des années 80 chez le rat (SIMONS *et al*, 1981). A l'aide de récepteurs purifiés, de nombreux anticorps avaient été fabriqués. Grâce aux anticorps, des clones ADNc (ADN complémentaires) ont été isolés (WEINBERGER *et al*, 1985).

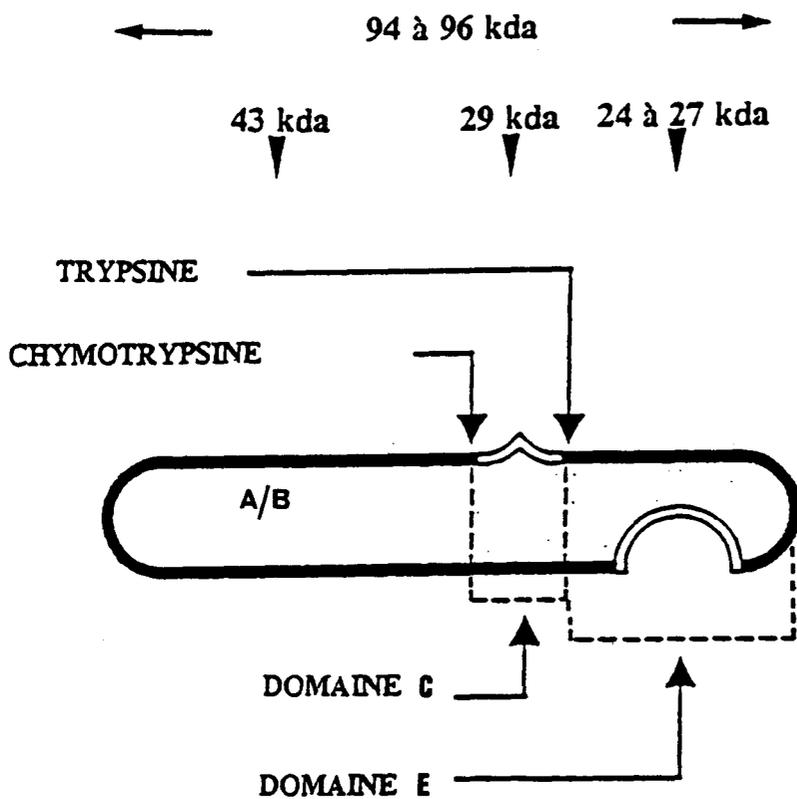


figure n°3
 MODELE STRUCTURAL DU RECEPTEUR SOUS FORME TRANSFORMEE
 (AVEC LES SITES DE COUPE DES PROTEASES EXOGENES)
 (d'après le modèle de MUNCK et al, 90)

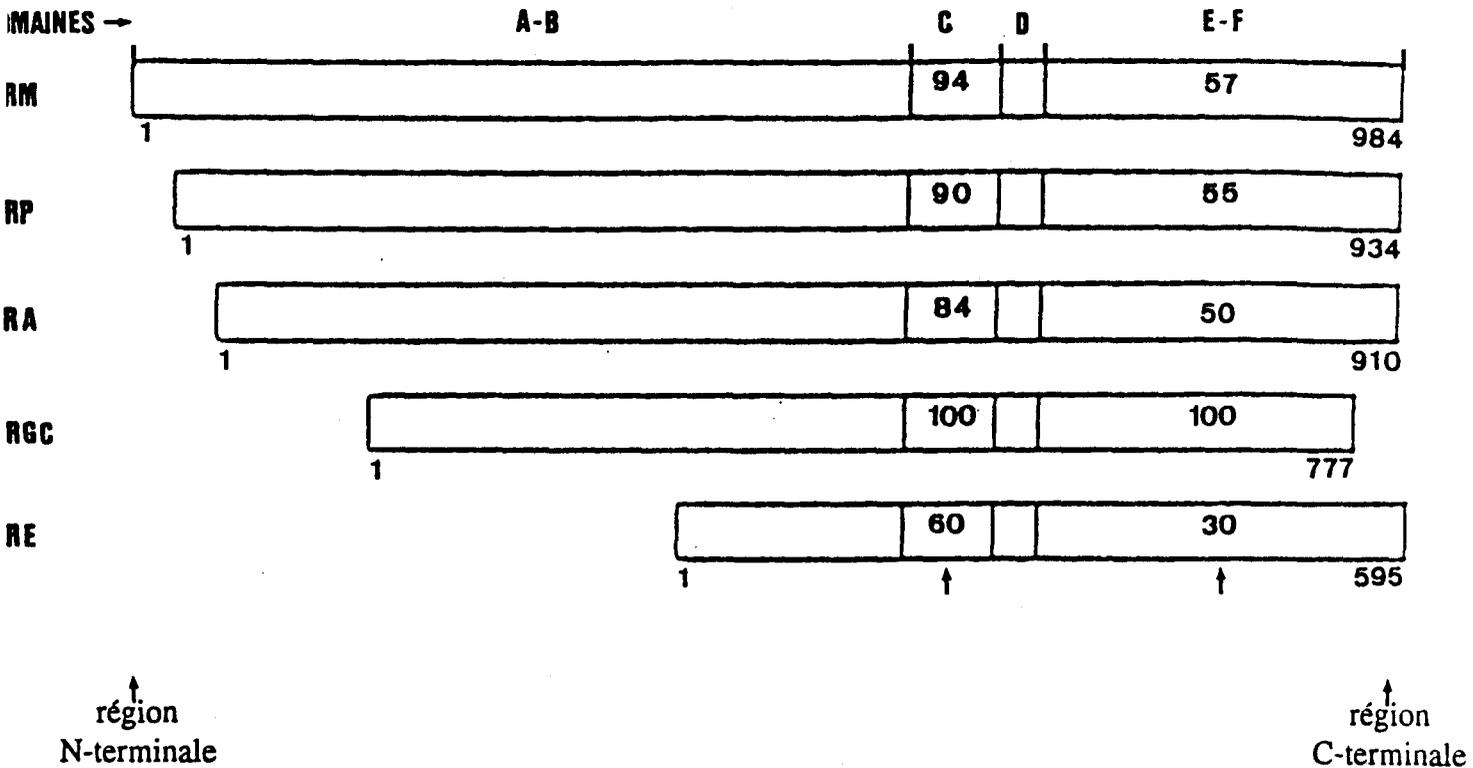


figure n°4

MODELE STRUCTURAL DES RECEPTEURS NUCLEAIRES

Les nombres situés à l'intérieur des cadres représentent les pourcentages d'homologie des acides aminés des domaines C et E/F des différents récepteurs nucléaires humains par rapport au récepteur de référence choisi arbitrairement, le RGC humain (100 %). Les pourcentages sont calculés après alignement des séquences conservées de chaque récepteur. Le nombre total d'acides aminés pour chaque récepteur est indiqué en bas à droite des cadres.

La séquence complète codant pour le récepteur humain des glucocorticoïdes a été déterminée (HOLLENBERG *et al*, 1985). Elle comporte 4800 nucléotides dont 2331 codant pour la protéine soit 777 acides aminés. La séquence complète codant pour le récepteur des glucocorticoïdes de rat a été déterminée (MIESFELD *et al*, 1986). Elle code pour une protéine de 795 acides aminés présentant une très grande homologie de séquence avec le récepteur humain. L'expression de la région codante a été obtenue *in vitro*, après transfection, et a conduit à l'obtention d'un récepteur tout à fait fonctionnel. Par ailleurs, l'étude fonctionnelle de divers mutants artificiels des récepteurs stéroïdiens a montré que tous ces récepteurs étaient bâtis sur un même modèle structural (GIGUERE *et al*, 1986). CARLSTEDT-DUKE *et al* (1987), quant à eux, ont réalisé des protéolyses limitées (trypsine, chymotrypsine) (figure n° 3) et effectué des coupures chimiques spécifiques sur le RGC avec le BrCN par exemple. Ils ont ainsi retrouvé la même séquence peptidique et cette organisation identique en domaines fonctionnels. On trouve ainsi en partant de l'extrémité N-terminale (GREEN et CHAMBON, 1988) (figure n° 5):

A - DOMAINES A/B OU PARTIE N-TERMINALE DE LA PROTEINE

Cette région est très peu conservée d'un récepteur nucléaire à l'autre aussi bien par la taille, très variable, que par la séquence en acides aminés (EVANS, 1988; BEATO, 1989). Ce domaine est immunodominant et contient les épitopes de la plupart des anticorps anti-récepteurs réalisés (CARSTEDT-DUKE *et al*, 1982). Il serait impliqué principalement dans l'activation transcriptionnelle (site d'attachement du facteur activateur TAF-1) (HOLLENBERG *et al*, 1987; HOLLENBERG et EVANS, 1988; DANIELSEN *et al*, 1987). La fixation de ce facteur transcriptionnel est indépendante de la liaison du ligand (facteur constitutif). Par ailleurs, d'autres fonctions ont été évoquées mais elles restent beaucoup moins argumentées.

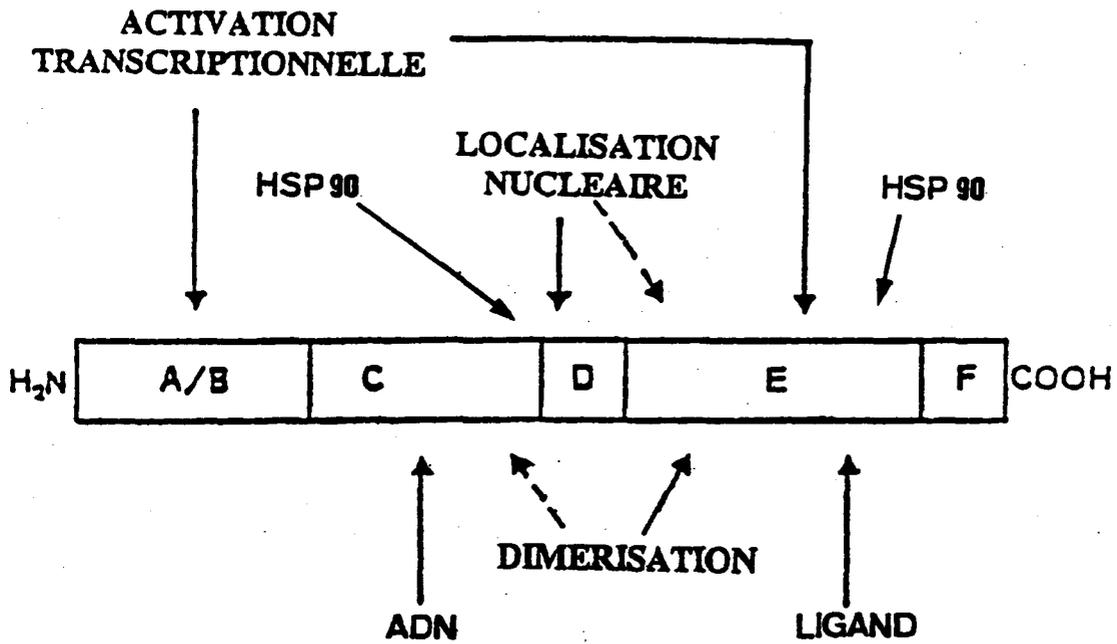


figure n° 5
ORGANISATION STRUCTURE/FONCTION DU RECEPTEUR

B - DOMAINE C

Ce domaine central d'environ 70 acides aminés représente un des deux domaines fonctionnels particulièrement importants du récepteur car il correspond au site de liaison de l'ADN. C'est le domaine le mieux conservé (40 à 95 % par rapport au RGC) dans la famille des récepteurs nucléaires. Il contient neuf cystéines très conservées et plusieurs acides aminés basiques (lysine, arginine) qui jouent un rôle capital. Huit des neuf cystéines sont impliquées dans une liaison à un métal (du zinc) pour former des structures en forme de doigt (deux au total). Chaque doigt est composé de quatre cystéines qui coordonnent une molécule de zinc. Ces deux atomes de zinc sont requis pour la conformation correcte de la molécule dont dépend la fixation spécifique à l'ADN. La boucle de chaque doigt contient 12 à 13 acides aminés et les deux doigts sont séparés par une région linéaire de 15 à 17 acides aminés (figure n° 6).

Le premier doigt (C1) en position N-terminale du domaine détermine la reconnaissance spécifique de l'élément de réponse sur l'ADN ou HRE. Par la suite, MADER *et al* (1989) ont démontré de façon remarquable par mutagenèse dirigée que la sous-région C1 comprend dans sa partie C-terminale ("boîte P") trois acides aminés impliqués plus particulièrement dans cette reconnaissance ou "discrimination" d'une séquence palindromique spécifique ERE d'une séquence GRE. Pour la première sous-famille comprenant les séquences GRE, MRE, PRE et ARE, il s'agirait d'une glycine, d'une sérine et d'une valine (par exemple, la glycine 458, la sérine 459 et la valine 462 pour le RGC de rat; étude réalisée par différentes mutations ponctuelles; ZILLIACUS *et al*, 1991; ALROY et FREEDMAN, 1992). Pour la sous-famille comprenant la séquence ERE, il s'agirait d'un acide glutamique, d'une glycine et d'une alanine respectivement.

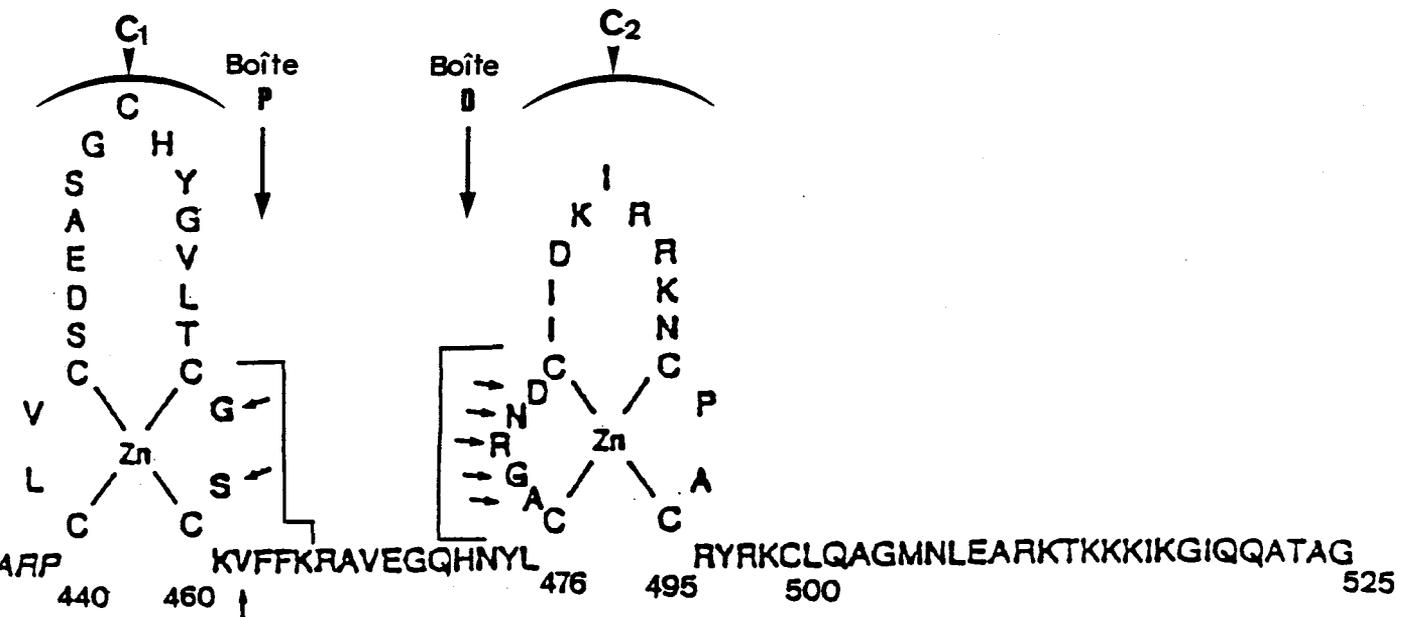


figure n°6
 DOMAINE DE LIAISON A L'ADN
 OU
 DOMAINE C

Les numéros portés par les acides aminés correspondent à la séquence peptidique du RGC de rat (440-525). Les acides aminés n°458, 459 et 462 (G, S, V) appartenant au premier doigt à zinc sont impliqués dans la reconnaissance spécifique de la cible ou HRE (séquence nucléotidique palindromique située sur l'ADN). Les acides aminés n°477 à 481 (A, G, R, N, D) appartenant au deuxième doigt à zinc sont impliqués dans les interactions protéine(s)-protéine(s) (dimérisation du récepteur).

A: alanine. N: asparagine. V: valine.
 D: acide aspartique. R: arginine.
 G: glycine. S: sérine.

Le deuxième doigt (C2) en position C-terminale du domaine, contenant les acides aminés basiques, est impliqué dans les interactions protéine-protéine comme les interactions récepteur-récepteur dans le cas de la dimérisation ("boîte D") (GREEN et CHAMBON, 1988; EVANS, 1988; DAHLMAN-WRIGHT *et al*, 1991).

Il est important de signaler qu'à ces deux niveaux (c'est-à-dire dimérisation du récepteur et fixation du dimère sur la séquence HRE), des différences (plus ou moins nettes) semblent exister selon l'activité biologique développée par le ligand (agoniste, antagoniste). Il est donc important de connaître les détails du mécanisme exact de cette interaction pour comprendre l'activation (agoniste) ou non (antagoniste) de la transcription. Nous en reparlerons dans la deuxième partie de cette revue générale (voir paragraphe n° III). Par ailleurs, la structure tridimensionnelle du domaine de liaison à l'ADN du RGC a été déterminée par des études cristallographiques (LUISI *et al*, 1991) et possède les caractéristiques suivantes: le domaine C peut être séparé en deux modules qui correspondent aux deux doigts de zinc C1 et C2. Chaque module est constitué d'une zone contenant le zinc et d'une hélice alpha immédiatement adjacente. Les deux modules sont imbriqués l'un dans l'autre pour former un seul domaine globulaire; les hélices alpha de chaque module se croisent avec un angle de 90° et se stabilisent l'une l'autre par des interactions entre résidus hydrophobes. Il est clair maintenant que l'hélice alpha du module C1 (contenant les acides aminés essentiels Val, Ser et Gly) impliquée dans la reconnaissance spécifique des HRE est plaquée dans le grand sillon de la molécule d'ADN et, qu'ainsi, la boîte P, impliquée dans la reconnaissance spécifique du HRE, est très proche des bases discriminantes du site. Seul le résidu valine serait en contact avec l'ADN. Ces trois acides aminés seraient donc d'une importance primordiale pour la détermination de la spécificité de liaison du récepteur sur l'HRE (ALROY et FREEDMAN, 1992; ZILLIACUS *et al*, 1992).

Outre la liaison à l'ADN et la dimérisation, d'autres rôles ont été évoqués pour le domaine C comme la liaison de l'HSP 90. Ce dernier rôle expliquerait en partie l'absence de liaison à l'ADN du récepteur sous forme non transformée.

C - DOMAINE D

C'est une région charnière, très variable, portant un signal de localisation nucléaire ou NL1 (séquence de 5 à 6 acides aminés basiques riche en lysine surtout), indépendant de la liaison du stéroïde.

D - DOMAINE(S) E/F -- ETUDE DES ACIDES AMINES ESSENTIELS A LA FIXATION DES HORMONES GLUCOCORTICOIDES

Ce domaine, d'environ 200 acides aminés, est situé dans la partie C-terminale de la protéine et constitue le deuxième domaine fonctionnellement important du récepteur: c'est le domaine de liaison du stéroïde. Cette région globalement hydrophobe est relativement peu conservée au niveau des acides aminés mais ceci s'explique compte tenu de la grande diversité des ligands des récepteurs nucléaires. Ce domaine possède une organisation générale fonctionnelle et structurale sans doute très complexe car, outre sa fonction de liaison du stéroïde, il serait responsable aussi en partie:

- de la dimérisation du récepteur (LEE *et al*, 1992).
- de la translocation nucléaire: il contient en effet un signal de localisation nucléaire (NL2) dépendant de la fixation du ligand (PICARD et YAMAMOTO, 1987).
- de la liaison de l'HSP 90: il constitue en effet un point de contact majeur de l'HSP 90 (DENIS *et al*, 1988; PRATT *et al*, 1988; HOWARD *et al*, 1990; HOUSLEY *et al*, 1990;

DALMAN *et al*, 1991) dont l'interaction avec le récepteur apparaît nécessaire pour une bonne liaison du stéroïde (BRESNICK *et al*, 1989; NEMOTO *et al*, 1990).

- et un rôle dans la transactivation transcriptionnelle. En effet, ce domaine constitue le site d'attachement du facteur activateur TAF-2 qui ne serait actif qu'après fixation du ligand (DANIELIAN *et al*, 1992). Ce facteur inductible est donc susceptible d'être directement influencé par l'activité biologique développée par le ligand fixé. Ceci constitue un autre point essentiel où s'exprime la différence de mécanisme d'action entre les agonistes et les antagonistes (voir paragraphe n° III, 2^{ème} partie de la revue générale).

Nous allons nous étendre un peu plus sur la liaison du stéroïde au récepteur, liaison qui constitue la fonction principale de ce domaine. Celui-ci, comprenant 200 acides aminés en moyenne, est, si sa structure est globulaire, d'une taille à peine supérieure à celle du stéroïde fixé. Nous pouvons donc croire, à première vue, que l'ensemble des acides aminés du site peut participer directement ou indirectement à l'interaction hormone-récepteur. Pour identifier plus précisément, parmi tous ces acides aminés, ceux qui sont essentiels à cette interaction, il existe trois méthodes principales:

*** l'utilisation de réactifs covalents spécifiques** pour définir l'importance de tel ou tel groupe d'acides aminés dans cette interaction. Ces réactifs vont réagir avec les acides aminés essentiels du site actif, mais aussi avec les autres résidus d'acides aminés accessibles à la surface du récepteur. La démonstration indirecte de l'existence d'un résidu essentiel dans le site lui-même ne pourra être apportée que par des expériences de protection du site par la fixation préalable du ligand. En théorie, l'identification directe du ou des acides aminés essentiels du site est possible à condition de disposer de beaucoup de récepteur et de recourir à un marquage différentiel des acides aminés du site (voir partie "Résultats et Discussion").

* **l'utilisation de stéroïdes marqueurs d'affinité.** On utilise ici des analogues du ligand naturel portant une fonction réactive grâce à laquelle un marquage covalent est possible. Ces marqueurs, ayant une bonne affinité et une bonne spécificité de liaison pour le site actif, doivent permettre un marquage covalent spécifique de celui-ci.

* **la mutagenèse dirigée.** Elle peut être utilisée selon diverses modalités. La réalisation de délétions plus ou moins importantes permet de définir la taille minimale du domaine de liaison. L'introduction d'acides aminés supplémentaires en divers endroits de la séquence introduit une modification supposée plus ou moins locale de la structure du site. En fait, la méthode de choix est la mutagenèse ponctuelle avec remplacement d'un seul acide aminé supposé essentiel par un autre de nature différente, de taille inférieure et non susceptible d'entraîner une modification majeure de la conformation du site de liaison. Si cet acide aminé est réellement essentiel à la liaison, sa mutation entraînera une chute importante de l'affinité pour le ligand. Au contraire, s'il est situé hors du site actif, ou même dans celui-ci mais en ne contractant que peu ou pas d'interactions avec le ligand (ou si cette interaction ne rend compte que d'une modeste partie de l'énergie de liaison ligand-récepteur), la mutation n'aura pas d'effet perceptible sur l'affinité. En pratique, il est difficile d'envisager la mutagenèse dirigée en aveugle de chacun des 200 acides aminés du site et il semble plus réaliste de se focaliser d'abord sur ceux dont l'approche chimique (utilisation des réactifs spécifiques d'acides aminés) a d'abord suggéré le caractère essentiel. L'étude de mutants naturels peut également apporter des informations intéressantes.

Nous allons résumer ici les principaux résultats fournis par ces différentes méthodes dans le cas du RGC.

1) réactifs spécifiques (figure n° 7)

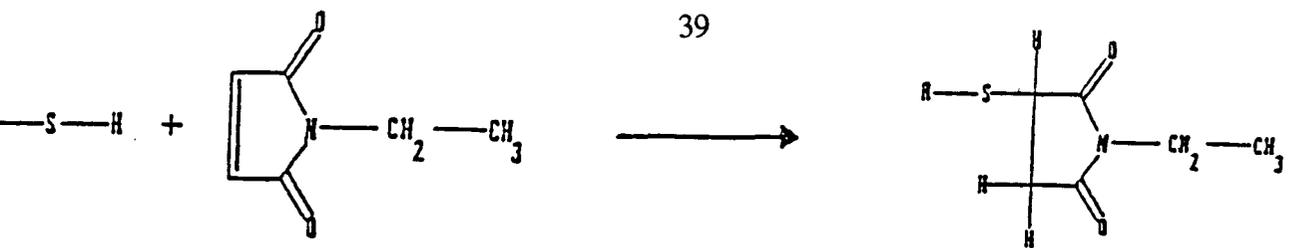
La notion de l'existence dans ce domaine d'au moins un groupement thiol nécessaire au maintien de la capacité de liaison du récepteur au stéroïde a été montrée par la sensibilité du récepteur à différents réactifs plus ou moins spécifiques:

a) Les agents "réducteurs" des thiols, tels que le β -mercaptoéthanol et le dithiothreitol (DTT), sont capables d'augmenter la durée de demi-vie du récepteur sans augmenter toutefois la capacité de liaison du récepteur à l'hormone (REES et BELL, 1975).

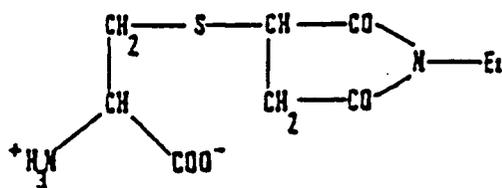
b) Les agents "bloquant" les thiols de manière réversible, tels que les organo-mercuriels (COTY, 1980; HARRISON *et al*, 1983), le MMTS et le DTNB (BODWELL *et al*, 1984; TIENRUNGROJ *et al*, 1987; MILLER et SIMONS, 1988). Le récepteur inactivé par ces dérivés peut en effet être totalement régénéré par addition d'un réducteur tel que le DTT à forte concentration.

c) Les agents "alkylants" tels que l'iodoacétamide et les dérivés maléimides N-substitués bloquent les groupements thiols de manière irréversible (YOUNG *et al*, 1975). Le récepteur libre est inactivé en présence de ces réactifs. Par contre, la liaison préalable au récepteur d'un stéroïde synthétique à forte affinité comme la dexaméthasone (agoniste) protège complètement le site de liaison des effets de ces réactifs (et des précédents).

d) Les effets du sélénite (TASHIMA *et al*, 1989), du peroxyde d'hydrogène (BRESNICK *et al*, 1988) et de l'arsenite et dérivés (LOPEZ *et al*, 1990) sur le RGC ont été aussi étudiés et confirment l'importance des groupements thiols dans cette interaction. En effet, en présence de ces produits, ces auteurs ont remarqué que la liaison du ligand pouvait être inhibée de façon réversible par la formation vraisemblable d'un pont disulfure intramoléculaire impliquant deux groupements thiols voisins. De façon surprenante,



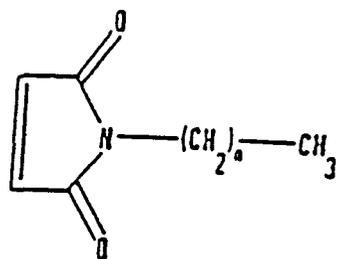
Réaction d'alkylation par la N-éthylmaleimide (cas général).



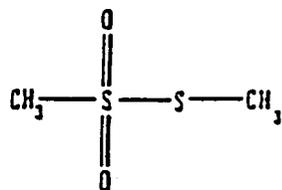
Produit de réaction de la cystéine avec la N-éthylmaleimide: S-(éthylsuccinimo)-cystéine.



iodoacétamide (IA)



N-alkylmaleimide



méthylméthanethiosulfonate (MMTS)

figure n° 7

QUELQUES REACTIFS SPECIFIQUES DES THIOLS

l'arsenite ne semble pas avoir d'effet d'inhibition de liaison sur les autres récepteurs nucléaires (RE, RP, RA, RM) (SIMONS *et al*, 1990).

e) D'autres auteurs comme DUNDERSKI *et al* (1992) ont étudié les effets du cadmium (Cd^{2+}) sur les propriétés fonctionnelles du RGC de foie de rat. Ce composé administré *in vivo* induit une réduction de 40 % de la capacité de liaison du RGC et une inhibition de la fixation des complexes glucocorticoïde-récepteur sur un fragment de l'ADN de MMTV ("Mouse Mammary Tumor Virus") contenant la séquence GRE consensus spécifique. Les effets du cadmium étant réversible en présence de DTT, on peut penser que celui-ci réagit avec des groupements thiols. Mais, l'interaction directe du métal avec les groupements thiols appartenant au récepteur n'a pas été démontrée.

Cette méthode des réactifs spécifiques n'apporte pas de preuve(s) directe(s) de l'implication d'une ou de plusieurs cystéines du site dans cette interaction mais, au vu des résultats énoncés ci-dessus, une ou plusieurs cystéine(s) semble(nt) y participer quand même plus ou moins directement.

Les acides aminés basiques comme la lysine (réactifs spécifiques: phosphate de pyridoxal et dérivés; CAKE *et al*, 1978; DI SORBO *et al*, 1980) et l'arginine (réactifs spécifiques: phénylglyoxal, 1,2-cyclohexanedione; DI SORBO *et al*, 1980) seraient aussi impliqués dans la liaison stéroïde-récepteur. Les réactifs spécifiques de ces deux résidus ont un effet inactivateur sur la liaison des glucocorticoïdes à leur récepteur dans le cytosol mais leur mécanisme d'action reste obscur. L'importance de ces acides aminés reste cependant moins clairement établie que celle de la cystéine.

Enfin, FORMSTECHEER *et al* (1984) ont émis l'hypothèse de la présence dans le site, globalement hydrophobe, d'une ou de plusieurs tyrosines, située(s) dans une zone un peu moins hydrophobe, intervenant dans la liaison H-R.

La méthode basée sur l'utilisation de réactifs spécifiques de tel ou tel groupe d'acides aminés peut apparaître archaïque à côté de la mutagenèse dirigée, méthode plus récente. Mais, il faut rappeler que l'utilisation de réactifs spécifiques a donné de très nombreux et intéressants résultats dans l'étude de l'interaction protéine-ligand (interaction enzyme-substrat ou récepteur-hormone). De plus, cette méthode continue d'être utilisée en première intention dans le cas de la découverte d'un nouvel enzyme ou récepteur pour déterminer l'importance d'un acide aminé dans l'interaction de ces nouvelles molécules avec leur ligand respectif. La mutagenèse dirigée est souvent utilisée ensuite pour confirmer les résultats trouvés par les réactifs spécifiques et identifier les résidus acides aminés impliqués (complémentarité des deux méthodes).

Par ailleurs, la méthode des réactifs spécifiques associée à des réactions de protection (post-incubation des réactifs par rapport au ligand) et des réactions d'échange peut apporter, contrairement à la mutagenèse dirigée, des indications sur le positionnement même du ligand à l'intérieur du site accepteur. Ceci est très intéressant car ce positionnement est décisif pour le développement de telle ou telle activité biologique (agoniste, antagoniste) de l'hormone. C'est ceci que nous avons essayé de mettre en évidence dans notre travail (voir partie Résultats et Discussion).

2) marquage d'affinité

Deux méthodes ont été employées pour le marquage du RGC avec des stéroïdes "marqueurs" variés:

-- **Le marquage d'affinité:** C'est une technique visant au marquage sélectif et covalent des sites d'interaction des macromolécules. Le marqueur possède le squelette hydrocarboné de base d'un stéroïde naturel ou synthétique modifié par l'addition d'une fonction chimique réactive permettant une liaison covalente avec un ou plusieurs acides aminés du domaine accepteur. Parmi ces stéroïdes modifiés, un dérivé de la dexaméthasone (agoniste de

référence du RGC), le 21 mésylate de dexaméthasone (EISEN *et al*, 1981), qui se comporte plutôt comme un antagoniste vis-à-vis du RGC, s'est révélé particulièrement intéressant. La fonction mésylate qu'il porte présente une réactivité particulière vis-à-vis des groupements thiols.

-- **Le marquage de photoaffinité:** La photoaffinité est en théorie une technique idéale puisqu'on peut réaliser d'abord la formation du complexe récepteur-ligand (non covalent) à l'abri de la lumière, puis éliminer l'excès de ligand libre avant d'irradier pour générer la fonction réactive par photoactivation, ce qui permet d'espérer un marquage très spécifique. La méthode présente cependant deux inconvénients. Le premier est le manque de sélectivité de la réaction covalente créée après photoactivation: il y a un risque de réaction avec beaucoup de groupements du voisinage selon des mécanismes réactionnels difficiles à élucider. Le second inconvénient est le rendement généralement très faible de marquage covalent obtenu. La réactivité à la lumière (par irradiation aux ultra-violetts par exemple) des cétones α insaturées de l'acétonide de triamcinolone (autre glucocorticoïde agoniste de référence) a cependant pu être mise à profit pour le marquage du RGC.

SIMONS *et al* (1981, 1987) ont identifié la cystéine 656 dans la séquence du RGC de rat comme point d'attache covalent du mésylate de dexaméthasone (figure n° 8) par formation vraisemblable d'une liaison thioéther entre le groupement thiol de la cystéine 656 et la fonction réactive du marqueur. Par ailleurs, en utilisant le même stéroïde modifié, SMITH *et al* (1988) ont identifié la cystéine 644 dans le site de liaison du RGC de souris. Cette cystéine 644 du RGC de souris correspond, dans la séquence peptidique du récepteur, à la cystéine 656 du RGC de rat.

Deux autres acides aminés, la méthionine 622 et la cystéine 754 ont été identifiées par photoaffinité utilisant l'acétonide de triamcinolone (RGC de rat; CARLSTEDT-DUKE *et al*, 1988; STRÖMSTEDT *et al*, 1990). Les trois acides aminés identifiés par marquage d'affinité sont tous situés dans des parties hydrophobes du domaine E et sont à priori

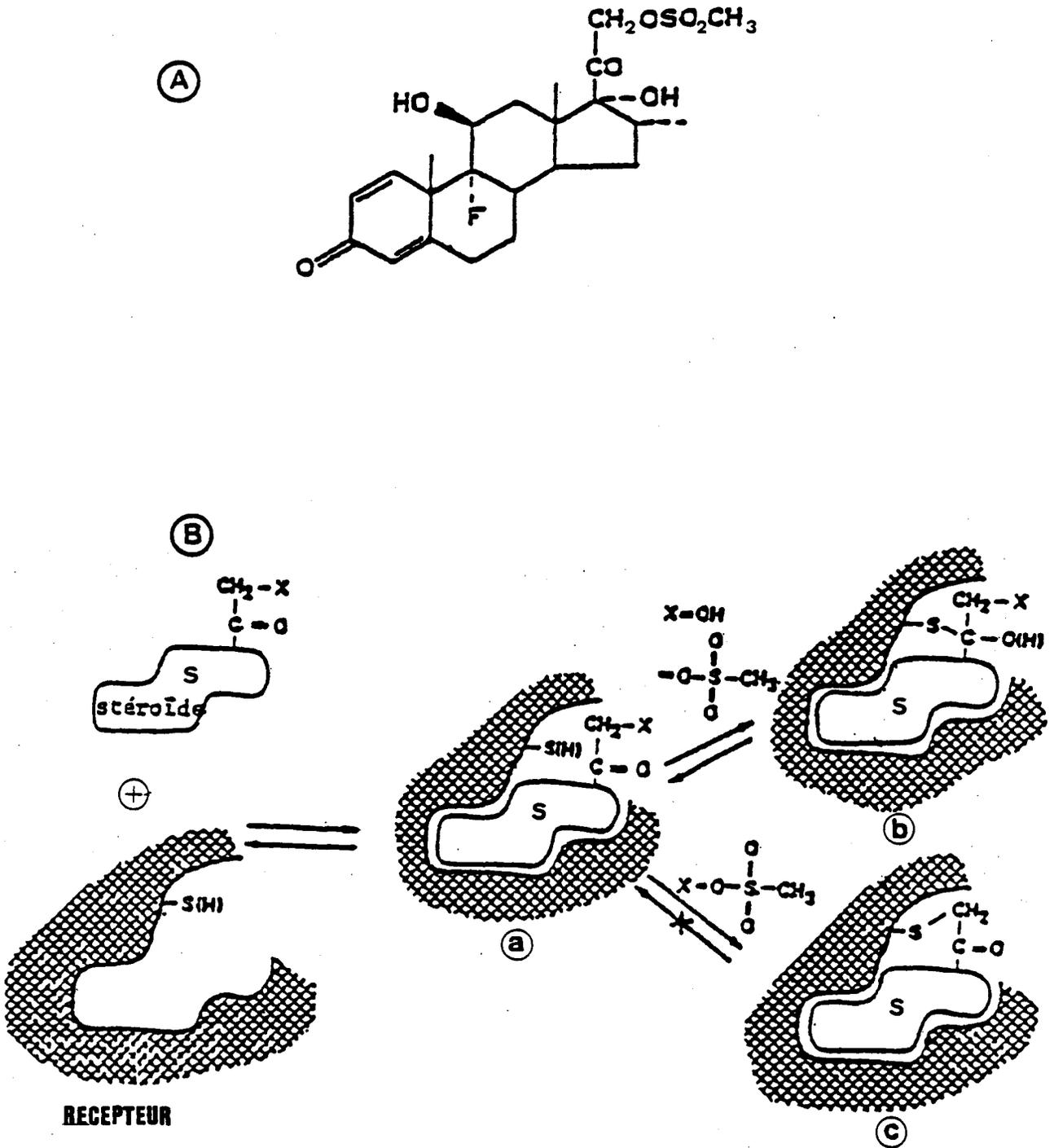


figure n°8

A/ STRUCTURE ET B/ MECANISME DE LIAISON DU MESYLATE DE DEXAMETHASONE SUR LE RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES (d'après SIMONS et al, 81).

supposés être impliqués dans la liaison du stéroïde au récepteur. Nous pouvons alors imaginer qu'ils soient essentiels à cette liaison. Cette hypothèse est séduisante dans le cas des cystéines dont le rôle était déjà fortement étayé par les expériences utilisant les réactifs chimiques spécifiques des thiols.

3) mutagénèse dirigée

Plusieurs travaux ont été réalisés au niveau de ce site de liaison et ont donné des résultats variés:

a) L'identification des ADN complémentaires codant pour le RGC humain a permis d'identifier deux isoformes différentes de ce récepteur: l'une comprenant 777 acides aminés (forme α prédominante) et l'autre 742 résidus (forme β minoritaire). Celles-ci diffèrent seulement au niveau de leur partie C-terminale (après l'acide aminé en position 728). L'expression *in vitro* des deux isoformes du RGC humain a donné des résultats inattendus: en effet, seule l'isoforme α lie l'acétonide de triamcinolone tritiée. De plus, des réactions de compétition peuvent être réalisées en présence d'un excès de cortisol ou de dexaméthasone non marqués.

Les résultats obtenus avec l'isoforme α sont identiques à ceux trouvés avec des récepteurs natifs (HOLLENBERG *et al*, 1985).

b) La délétion ou l'addition d'acides aminés (GIGUERE *et al*, 1986) dans la partie C-terminale (c'est-à-dire les 200 derniers résidus en moyenne) modifient immédiatement l'activité de liaison du récepteur au stéroïde en la diminuant le plus souvent. Ceci montre la sensibilité du domaine tout entier c'est-à-dire de chaque acide aminé le constituant aux mutations quelles qu'elles soient. Cette sensibilité particulière explique des résultats plus ou moins facilement interprétables. DANIELSEN *et al* (1986) ont réalisé des mutations ponctuelles dans les régions N- et C-terminales du domaine E du RGC de souris. Le remplacement de l'acide glutamique 546 par une glycine ou de la tyrosine 770 par une

asparagine altère les propriétés de liaison du récepteur. De leur côté, par mutagenèse dirigée, BENHAMOU *et al* (1992) ont montré que la substitution de la glycine en position 567 du RGC humain par une cystéine était responsable d'une perte sensible de la liaison de la dexaméthasone au récepteur.

c) Des cas de résistance aux traitements par les glucocorticoïdes ont été observés. HURLEY *et al* (1991) ont étudié la séquence en nucléotides de l'ADN complémentaire codant pour le RGC de certains patients. Celle-ci est normale à une exception près: la substitution de l'acide aspartique en position 641 par une valine. L'affinité de liaison de la dexaméthasone pour ces récepteurs mutés est inférieure à celle observée pour le récepteur normal. Ceci suggère que la résistance aux glucocorticoïdes de ces patients est due à cette mutation ponctuelle dans le domaine E et que l'acide aspartique en position 641 semble "essentiel" à la liaison du stéroïde.

d) BYRAVAN *et al* (1991) ont découvert dans une lignée de cellules cancéreuses de souris (lymphome) deux mutants différents du RGC concernant la modification dans la séquence peptidique d'un seul acide aminé. Le premier mutant (la proline 547 remplacée une alanine) reste encore fonctionnel comme activateur transcriptionnel mais seulement à des concentrations de glucocorticoïde 100 fois plus élevées que pour le récepteur normal. Le deuxième mutant (la cystéine 742, équivalente de la cystéine 754 de rat, remplacée par une glycine) est instable et presque totalement non fonctionnel.

e) L'implication des résidus cystéines dans l'interaction hormone-récepteur est décrite depuis fort longtemps et semblait bien acquise pour les cystéines 656 et 754 par exemple. De plus, de nouvelles cystéines supposées essentielles étaient récemment découvertes comme la cystéine 640 et la cystéine 661. Mais, des travaux tout récents remettent tout cela en question. CHAKRABORTI *et al* (1991, a; 1992) ont construit cinq mutants du RGC de rat modifiés ponctuellement au niveau de diverses cystéines et remplaçant: 1) la cystéine 640 par une sérine; 2) la cystéine 661 par une sérine; 3) la

cystéine 656 par une glycine; 4) la cystéine 656 par une sérine et 5) les deux cystéines 656 et 661 par une sérine. De façon inattendue, les quatre premiers mutants ponctuels lient encore le récepteur. De même, le double mutant lie le stéroïde (dexaméthasone) avec la même affinité que le récepteur naturel. Par ailleurs, de façon plus surprenante encore, certaines mutations de cette cystéine en position 656 causent au contraire une augmentation de l'affinité et de la spécificité du récepteur, créant par là-même, de "super-récepteurs". Ces trois cystéines (640, 656, 661) se retrouvent dans le fragment de 16 kDa (ou méro-récepteur) obtenu par protéolyse limitée par la trypsine. Ce fragment lie l'hormone avec une affinité 23 fois plus faible que le récepteur entier de 98 kDa tout en gardant une spécificité de liaison intacte. Cette séquence s'étendant de la thréonine 537 à l'arginine 673 constituerait le noyau de base de l'interaction ligand-récepteur (REICHMAN *et al*, 1984; SIMONS *et al*, 1989). Par ailleurs, ce fragment lie encore la protéine HSP 90. Il contiendrait donc aussi un des sites essentiels de liaison de cette protéine au RGC (CHAKRABORTI et SIMONS, 1991, b).

En conclusion, tous les résultats relatés ci-dessus montrent la complexité de l'étude de cette interaction. Les acides aminés identifiés, supposés essentiels, sont nombreux, de nature différente (acide, basique, neutre,...) et répartis sur toute la séquence du domaine E (figure n° 9). Mais, ces mêmes résultats ne montrent pas très bien si ces résidus agissent dans l'interaction ligand-récepteur d'une façon:

-- **directe** c'est-à-dire en développant des interactions (non covalentes) avec le stéroïde lui-même

-- ou **indirecte** de deux manières: soit en développant entre eux des interactions favorisant alors une certaine conformation du site facilitant l'entrée du stéroïde et sa liaison (hypothèse des cystéines); soit en évitant d'encombrer à certains endroits le site, de taille à peine supérieure au ligand, par un groupement R trop volumineux par exemple (explication vraisemblable dans le cas du remplacement de la glycine 567 par une cystéine).



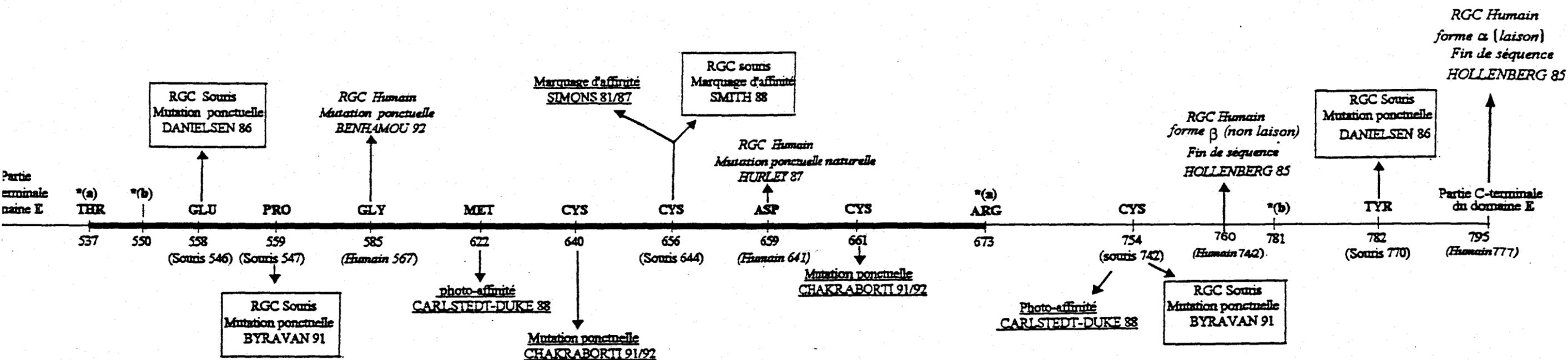


figure n°9
 Domaine de liaison du stéroïde ou Domaine(s) E/F

RGC = Récepteur des glucocorticoïdes. La séquence peptidique de base correspond au RGC de Rat.

Sur ce schéma, sont indiqués les méthodes utilisées, la source du récepteur (Souris, Rat, Humain) et la référence principale pour chaque acide aminé ou région supposés essentiels.

Textes : Souligné = RGC de Rat;

encadré = RGC de Souris;

italique = RGC Humain.

Méro-récepteur: * (a): Séquence THR 537 → ARG 673 [protéolyse enzymatique limitée (fragment de 16 Kda), RGC Rat, SIMONS 89.]

* (b): Séquence 550-781 [Déletion, RGC Rat, RUSCONI 87.]

Un problème à prendre en compte également (et déjà mentionné) est que l'affinité de la liaison ligand-récepteur est en fait la résultante d'une somme d'interactions (hydrophobes, liaisons hydrogènes), dans laquelle chaque acide aminé "essentiel" du site actif n'intervient que pour une part. L'importance relative de cette part détermine le caractère plus ou moins essentiel du résidu concerné et peut expliquer la discordance apparente des résultats des expériences de modification chimique et des données de la mutagenèse dirigée. Il ne faut pas oublier, en effet, que la modification chimique d'un résidu d'acide aminé du site actif peut entraîner non seulement la formation d'un autre type de liaison chimique avec le ligand, mais provoquer aussi un encombrement stérique de ce site pouvant empêcher la fixation de ce ligand. Ceci peut concerner des acides aminés du site actif qui ne sont normalement pas directement impliqués dans l'interaction physique avec le ligand. Les données des méthodes chimiques et de la mutagenèse dirigée doivent donc être considérées comme complémentaires et interprétées en tenant compte des limitations de chacune de ces méthodes.

V - IMPORTANCE ET ROLE DU LIGAND DANS LE FONCTIONNEMENT DES RECEPTEURS STEROIDIENS.

La réponse à ces deux questions est difficile à apporter et les résultats obtenus jusqu'à maintenant sont contradictoires. En effet, le ligand semble essentiel à première vue uniquement pour l'expression de l'activité transcriptionnelle pour tous les récepteurs nucléaires. Son rôle reste beaucoup plus controversé dans l'expression de toutes leurs autres propriétés comme la translocation nucléaire et la liaison spécifique aux séquences de type HRE. Plus précisément, le rôle des ligands semble s'exercer suivant des modalités particulières selon le récepteur observé. Ainsi, le ligand semble indispensable à l'expression de toutes les propriétés du récepteur des glucocorticoïdes. Après sa fixation, il induirait la translocation nucléaire caractéristique et la liaison de ce complexe à la séquence GRE. Si le récepteur est déjà nucléaire, le ligand ne servirait plus qu'à faciliter la reconnaissance de la séquence HRE correcte (spécifique) par le dimère (SCHAUER *et al*, 1989). Si le

récepteur est déjà fixé sur la séquence HRE spécifique en absence de ligand (récepteur des hormones thyroïdiennes par exemple), celui-ci ne servirait qu'à activer l'effet transcriptionnel de ceux-ci (BEATO, 1991).

L'utilisation d'antagonistes synthétiques peut nous aider à améliorer notre connaissance du rôle réel joué par le ligand dans le fonctionnement des récepteurs nucléaires (voir 2^{ème} partie de la revue générale).

Une chose semble sûre pour le récepteur des glucocorticoïdes qui nous intéresse plus particulièrement ici: celui-ci sous forme transformée ne lie presque plus le ligand (NEMOTO *et al*, 1990). Nous observons, en effet, une désactivation de sa fonction de liaison concomitante à l'activation de sa fonction transcriptionnelle (et peut-être aussi de sa liaison à l'ADN ?). Cette désactivation de la fonction de liaison du récepteur activé se traduit par le fait que seul le stéroïde lié au récepteur sous forme non transformée possède un caractère échangeable avec lui-même ou avec un autre ligand.

Les expériences d'échange de stéroïdes au niveau du domaine E/F du récepteur ont pour but de libérer le récepteur d'un premier ligand et de le remplacer par un deuxième ligand, identique ou non. Le premier ligand peut être d'origine endogène ou exogène. Dans le deuxième cas, les hormones endogènes peuvent être éliminées par surrénalectomie pour les corticoïdes par exemple ou par la mise en excès dans le milieu d'incubation du récepteur de l'hormone exogène étudiée. La réaction d'échange a plusieurs intérêts ou applications:

a) **un intérêt diagnostique:** en effet, cette réaction peut être considérée comme une méthode de dosage, de quantification plus précise des récepteurs totaux, libres et liés, d'un échantillon cytosolique par exemple. Mais, ce dosage sous-estime le taux réel de récepteur à cause de la présence de récepteurs activés qui n'échangent pas le stéroïde.

b) **un intérêt dans la recherche fondamentale** pour étudier la structure du site de liaison du stéroïde sur le récepteur et préciser alors la nature des interactions hormone-récepteur (voir ci-dessous). A ces réactions d'échange, nous pouvons associer des réactions de protection des acides aminés du site impliqués dans la liaison du stéroïde vis-à-vis de différents réactifs spécifiques. C'est ce deuxième aspect qui nous a intéressé plus particulièrement et que nous avons appliqué par la suite.

La mise au point technique de ces réactions d'échange a été réalisée dans le laboratoire. Deux points essentiels sont à signaler en particulier:

- l'introduction dans le milieu de 8 % d'acétonitrile, solvant organique, qui permet une accélération de la vitesse d'échange entre deux stéroïdes différents ou non. En effet, en l'absence de ce composé, le taux naturel d'échange entre deux stéroïdes est très faible et la réaction est très lente.

- la présence de 10 mM de molybdate de sodium utilisé comme stabilisateur des récepteurs sous forme non transformée, permettant ainsi de garder le même maximum (100 %) de liaison. En effet, aucun échange n'a pu être obtenu à partir de complexes transformés en absence ou en présence d'acétonitrile même après un temps de réaction suffisant (DANZE *et al*, 1990).

Avant d'exposer nos résultats et afin de mieux comprendre leur interprétation, un minimum de données concernant les relations structure-activité (RSA) des ligands du RGC méritent d'être rappelées.

2ème partie

"Les ligands naturels et synthétiques"

I - ROLE DES GLUCOCORTICOIDES A L'ECHELON PHYSIOLOGIQUE

Ces hormones comme le cortisol agissent sur le métabolisme des glucides, le phénomène inflammatoire et la différenciation des tissus (KAHN, 1990). Les effets sur le métabolisme glucidique, les plus apparents, leur ont valu ce nom de glucocorticoïdes. Le cortisol active la néoglucogénèse (formation de glucose à partir de molécules non glucidiques comme l'acide pyruvique ou les acides aminés) dans le foie. Il est hyperglycémiant. Il induit la synthèse protéique d'enzymes agissant dans le cadre du métabolisme des glucides. Il active aussi la synthèse de plusieurs enzymes dégradant les acides aminés comme la Tyrosine Amino-Transférase ou TAT.

Les glucocorticoïdes se comportent aussi comme des inhibiteurs de la prolifération de nombreuses cellules (utilisation "potentielle" des GC dans le traitement de certaines tumeurs "liquides") et comme de puissants anti-inflammatoires. Ils inhibent en effet la phospholipase A2 et donc la synthèse des intermédiaires de l'inflammation que sont les prostaglandines et les leucotriènes (ou eicosanoïdes).

II - CORRELATION STRUCTURE DU STEROIDE - ACTIVITE DE LIAISON AU RECEPTEUR

A - DEFINITION

Les méthodes de la chimie organique permettent de fabriquer en laboratoire des analogues structuraux des hormones corticosurréaliennes plus efficaces, plus spécifiques et présentant moins d'effets secondaires indésirables. On pourrait ainsi les utiliser en thérapeutique. Par exemple, on peut diminuer l'effet secondaire de type minéralo-corticoïde du cortisol qui, en plus de ses actions anti-inflammatoires et néoglucoformatrices, provoque en effet un certain degré de rétention d'eau et de sels minéraux indésirable.

Pour vérifier l'activité de ces stéroïdes de synthèse, il existe toute une série de tests pharmacologiques pouvant être effectués *in vivo* ou *in vitro*. A partir des résultats obtenus

lors de ces essais, des règles de RSA ou Relation-Structure-Activité peuvent être déduites et permettre d'orienter la synthèse chimique vers la création de nouveaux produits ou la modification de la structure de ceux préexistants. Le RSA est l'étude qualitative des relations existant entre la structure chimique et l'activité d'une molécule d'intérêt biologique. Ces corrélations mettent en évidence les facteurs d'ordre stérique, électronique ou hydrophobe en des positions précises du squelette stéroïdien de base intervenant dans la liaison des produits analysés (ligand ou substrat) avec leurs protéines spécifiques (récepteur ou enzyme).

B - MESURE DE L'ACTIVITE *IN VIVO*

L'activité pharmacologique des produits de synthèse sur l'animal entier (*in vivo*) est mesurée par leur pouvoir anti-inflammatoire.

Au niveau local, ces essais consistent à provoquer une réaction inflammatoire au niveau de l'oreille d'un rat. L'animal subit ensuite un traitement anti-inflammatoire à base du produit néosynthétisé. L'activité de ce produit est alors testée.

Au niveau général, on mesure le pouvoir hyperglycémiant de ces produits (quantité de sucres accumulés dans le foie).

C - MESURE DE L'ACTIVITE *IN VITRO*

L'activité pharmacologique des ligands synthétiques peut être mesurée aussi *in vitro* sur des modèles cellulaires. Plusieurs auteurs ont étudié les variations des paramètres de liaison des glucocorticoïdes à leur récepteur spécifique en fonction des modifications chimiques apportées au noyau stéroïdien de base. L'activité biologique est une conséquence de l'aptitude des glucocorticoïdes à se lier au récepteur. Elle est mesurée soit par le dosage de la Tyrosine amino-transférase (TAT) (paragraphe D ci-dessous) soit par l'incorporation d'uridine tritiée dans le RNA de thymocytes de souris (DAUSSE *et al*, 1977). La structure chimique des stéroïdes testés a été modifiée en de nombreuses positions sur le noyau

stéroïdien de base par différents moyens: déshydrogénation (apparition alors de nouvelles double-liaisons), substitutions d'atomes (introduction d'atomes halogènes comme le fluor), introduction de substituants de taille variable. Des corrélations entre les structures chimiques et l'activité biologique des produits testés ont été ensuite établies (voir paragraphe n° F, ci-dessous).

D - CLASSIFICATION DES STEROIDES

L'aptitude des stéroïdes à induire une activité biologique comme par exemple celle de la TAT dans les cellules d'hépatome de rat en culture (cellules HTC) et à inhiber ou non l'induction d'activité produite par un glucocorticoïde actif de référence ont amené à la classification suivante (ROUSSEAU *et al*, 1972):

Les agonistes purs: ce sont les stéroïdes capables d'induire la réponse à son taux maximum. Il s'agit par exemple de la corticostérone, du cortisol, de l'acétonide de triamcinolone et de la dexaméthasone.

Les antagonistes purs: ces composés ne présentent aucune activité agoniste mais peuvent inhiber totalement l'effet des stéroïdes actifs. La progestérone ("anti-glucocorticoïde naturel") et le RU 486 (antagoniste synthétique; MOGUILLEWSKY et PHILIBERT, 1984) sont les plus connus de ces produits. Les antagonistes sont aussi appelés anti-hormones.

Les agonistes/antagonistes partiels: ces stéroïdes peuvent induire la réponse glucocorticoïde mais à un taux inférieur au maximum donné par un agoniste pur. Ces produits ont également une certaine activité antagoniste inversement proportionnelle à leur activité agoniste. Ils peuvent inhiber partiellement l'effet des stéroïdes actifs. On peut citer le DXB, dérivé 17 β carboxamide de la dexaméthasone (FORMSTECHEER *et al*, 1980).

E - INTERET DES ANALOGUES STRUCTURAUX

La structure de certains glucocorticoïdes naturels ou synthétiques ainsi que leur activité biologique propre respective sont indiquées sur la figure n° 10.

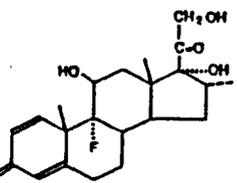
Les analogues de synthèse présentent un intérêt important aussi bien dans le domaine de la recherche fondamentale sur les récepteurs (voir figure n° 11) que dans le domaine médical. Les glucocorticoïdes sont utilisés en thérapeutique comme anti-inflammatoires et anti-allergiques (asthmes, urticaires, dermatites,...). Les anti-glucocorticoïdes ont quant à eux des cas d'utilisation très limités (stimulation des défenses immunitaires?). Dans les tumeurs surrénaliennes (hypercorticismes), on utilise surtout les inhibiteurs du métabolisme (synthèse) des hormones stéroïdes (BAULIEU et KELLY, 1990). Par contre, la mise au point d'anti-hormones des récepteurs des hormones sexuelles est un domaine de recherche très actif, du fait de leurs applications thérapeutiques notamment dans le contrôle de la fertilité (anti-progestérone et anti-oestrogènes; BAULIEU, 1989) et dans le traitement de certaines tumeurs hormono-dépendantes (anti-oestrogènes: cancers du sein et de l'utérus; anti-androgènes: cancer de la prostate; LABRIE *et al*, 1990) (voir tableau n° I).

F - PRINCIPALES CONCLUSIONS DES ETUDES DE R S A

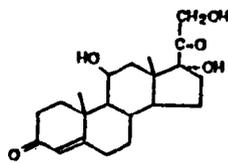
Comme nous l'avons vu ci-dessus, un certain nombre de travaux ont été consacrés à l'étude systématique de la corrélation entre la structure du stéroïde et activité de liaison au RGC.

Les stéroïdes utilisés ont, pour la plupart, comme structure de base, le noyau prégnane. Les résultats essentiels sont les suivants (ROUSSEAU et SCHMIT, 1977):

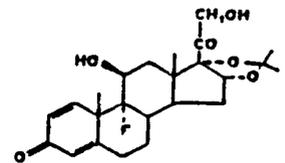
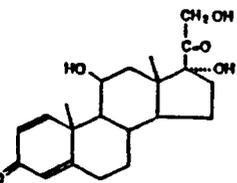
Une liaison correcte exige une structure de base pour un ligand agoniste généralement de type 3, 20-dioxo-4-prégnène, l'hydroxylation en 11 et en 21 augmentant cette affinité (structure du cortisol) ainsi que l'introduction d'une double-liaison en 1, 2 et la substitution du carbone 6 ou 9 par un halogène (du fluor le plus souvent). La présence de la double-liaison en 4-5 est indispensable à la liaison au RGC. De plus, la conformation



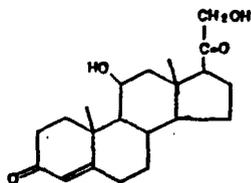
Dexaméthasone



Cortisol

Acetonide de
triamcinolone

Prednisolone



Corticostérone

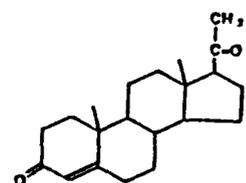
Progéstérone
(antagoniste)

figure n°10

**STRUCTURE DES PRINCIPAUX STEROIDES
(AGONISTES OU ANTAGONISTES) NATURELS OU SYNTHETIQUES**

Purification du récepteur: gels d'affinité
(meilleure affinité et meilleure stabilité du complexe)

Caractérisation du récepteur: ligands radioactifs

Corrélation Structure-Activité du ligand (RSA)

Etude structurale du site actif avec identification des acides aminés essentiels
(marqueurs d'affinité covalents)



Connaissance du mode d'action des hormones naturelles

Structure spatiale du site actif du récepteur avec les acides aminés essentiels
à l'interaction hormone-récepteur



Aide à la conception de nouveaux médicaments: agonistes/antagonistes

figure n°11

**INTERETS DES LIGANDS DE SYNTHESE DANS LE DOMAINE DE
L'ETUDE DES RECEPTEURS**

ANTI-HORMONES	APPLICATIONS
ANTI-GLUCOCORTICOIDES	hypercorticisme
ANTI-MINERALOCORTICOIDES	hypertension
ANTI-ANDROGENES	cancers de la prostate
ANTI-PROGESTATIFS	contrôle de la fertilité et de la grossesse
ANTI-OESTROGENES	tumeurs hormono-dépendantes (cancers du sein et de l'utérus)

tableau n°1
INTERET MEDICAL DES ANTI-HORMONES

spatiale globale du stéroïde influe sur l'affinité. La présence d'un atome de fluor en 9 α provoque une torsion de la molécule vers sa face α . Tous les corticoïdes 9 α fluorés possédant cette structure de base ont une efficacité anti-inflammatoire importante. Par contre, la présence d'un groupe méthyle ou d'un atome de brome en position 9 a une activité plutôt néfaste.

Les carbones particulièrement intéressants dans cette structure sont les carbones n° 3, 11 et 17. Les substituants de ces trois carbones c'est-à-dire la cétone en 3 incluse dans le cycle A, l'hydroxylation en 11 β et la chaîne latérale 17 β de type hydroxycétone (COCH₂OH) joueraient un rôle fondamental dans la liaison au récepteur des glucocorticoïdes. Le cortisol, la dexaméthasone et l'acétonide de triamcinolone, qui possèdent cette structure de base, sont les agonistes purs de référence du RGC.

Mais, cette structure de base et surtout l'importance des substituants portés par les carbones 3, 11 et 17 sont cependant remises en question par l'existence de stéroïdes ayant une bonne affinité pour le récepteur sans présenter toutefois toutes ces propriétés structurales considérées généralement comme fondamentales (figure n° 12).

1) carbone n°3

L'importance de la cétone en 3 peut être discutée. En effet, son absence dans la structure de certains stéroïdes comme les dérivés du cortivazole ("corticostéroïde hétérocyclique") (SIMONS *et al*, 1979) ne gêne en rien l'efficacité de ces produits *in vitro* sur des cellules en culture. Ces ligands sont très fortement encombrés au niveau du noyau aromatique A par un substituant de type phénylpyrazole. Ils figurent pourtant parmi les meilleurs ligands du récepteur des glucocorticoïdes et sont des agonistes très actifs *in vivo*. L'activité glucocorticoïde et anti-inflammatoire est même accrue. Pour développer leur activité biologique, vu la petite taille du site accepteur, ces dérivés ne se positionneraient pas dans le site de la même façon que les agonistes habituels possédant la structure de base décrite ci-dessus. En effet, au contraire du 21 mésylate de dexaméthasone (marqueur d'affinité), le dérivé 21 mésylate du cortivazole est incapable de se lier

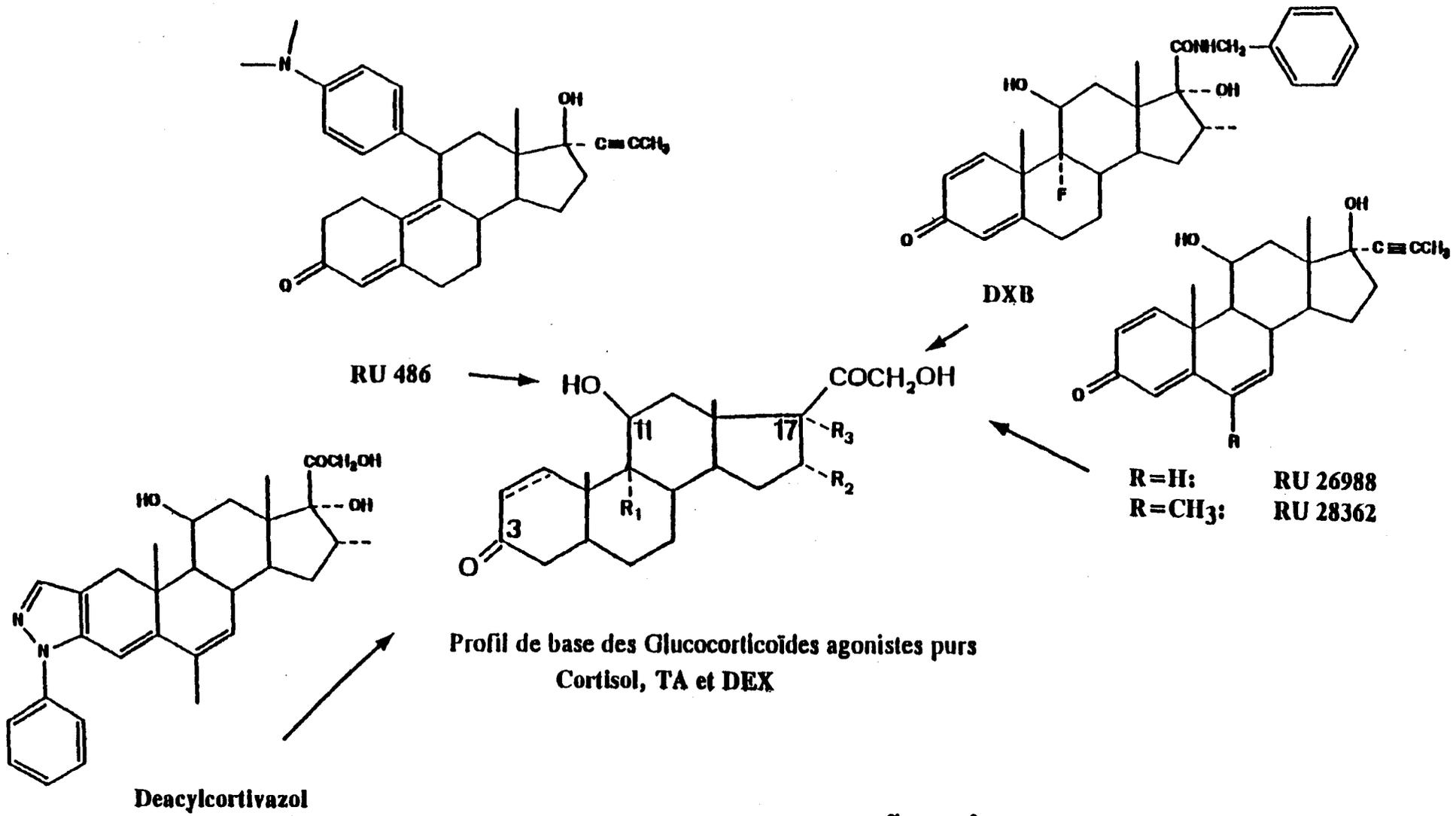


figure n°12

STRUCTURE DE DIVERS STEROIDES LIGANDS DU RGC

Ces ligands, agonistes ou antagonistes, possèdent une très bonne affinité pour le RGC. Cependant, ils ne présentent pas la structure de base jugée habituellement essentielle pour une bonne liaison au récepteur (substituants des carbones n°3, 11 et 17).

de manière covalente au récepteur (LAMONTAGNE *et al*, 1984). De plus, il ne se comporte pas comme un anti-glucocorticoïde.

2) carbone n°17

De la même façon, l'importance des deux autres substituants (l'hydroxylation en 11 β et la chaîne latérale en 17 β) peut être aussi remise en question. Plusieurs stéroïdes, en effet, bien que ne possédant pas un de ces deux substituants supposés indispensables, sont quand même de très bons ligands du RGC. Nous pouvons citer les dérivés 17 β carboxamides de la dexaméthasone. Bien que celle-ci soit un agoniste pur, ces dérivés quant à eux développent une activité biologique plutôt antagoniste bloquant l'induction de la TAT dans les cellules HTC. Les dérivés les plus performants au niveau de l'affinité vis-à-vis du récepteur et de l'activité possèdent à ce niveau une chaîne latérale aromatique comme le DXB, dérivé le plus efficace (ROUSSEAU et FORMSTECHE, 1979; FORMSTECHE *et al*, 1980). Toute modification à ce niveau même légère donne des dérivés à tendance antagoniste plus ou moins prononcée d'où l'importance de cette région du stéroïde.

L'absence totale de cette chaîne latérale 17 β (type hydroxycétone ou autre) dans la structure de certains ligands n'est pas préjudiciable pour l'affinité de ceux-ci vis-à-vis du récepteur. Au contraire, il semblerait même que l'affinité et la spécificité des ligands soient augmentées.

Le RU 26988, stéroïde possédant un hydroxyle en 11 β et surtout une chaîne latérale en 17 α de type propynyl (identique au RU 486) se lie avec la même affinité à peu près que la dexaméthasone avec le RGC. Ce dérivé se lierait même exclusivement à ce récepteur.

Le RU 28362, un autre stéroïde, possédant la même structure que le RU 26988 avec un groupement méthyle supplémentaire en position 6, a une affinité supérieure à la dexaméthasone et est considéré comme un outil remarquable pour caractériser le RGC et le

RM dans des tissus contenant ces deux récepteurs (PHILIBERT et MOGUILEWSKY, 1983). Ces deux derniers stéroïdes développent une activité agoniste remarquable (TEUTSCH et COSTEROUSSÉ, 1981).

3) carbone n°11

De même, le rôle fondamental de l'hydroxyle en 11 β dans la liaison du récepteur est à reconsidérer du fait de la très bonne affinité présentée par le RU 486 qui porte à la place de du groupe hydroxyle en 11 β un substituant très encombrant de type diméthylaminophényl sur cette position du noyau de base. Le RU 486 est un antagoniste du récepteur des glucocorticoïdes, du récepteur de la progestérone et, dans une moindre mesure, du récepteur des androgènes (affinité très faible du RU 486 pour ce dernier récepteur). Ce dérivé ne possède ni l'hydroxyle en 11 β , ni la chaîne latérale en 17 β de type hydroxycétone remplacée ici par une chaîne 17 α de type propynyl. Malgré cela, le RU 486 possède une affinité pour le RGC (KD de 3 à 6 10^{-9} M) supérieure ou égale à celle de la dexaméthasone (KD égal à 6 10^{-9} M) (MOGUILEWSKY et PHILIBERT, 1984). Certains auteurs ont cherché les conditions sur les caractéristiques de la substitution en position 11 β qui sont nécessaires pour conférer à la molécule son activité antagoniste. L'étude d'un grand nombre de stéroïdes se distinguant par leur substituant en 11 β a révélé que seuls ceux qui portaient un groupe phényle plus ou moins substitué sur cette position étaient effectivement antagonistes. Ceux, par contre, qui portaient une chaîne aliphatique se comportaient quant à eux comme des agonistes (TEUTSCH, 1984; BENHAMOU *et al*, 1992).

Le RU 486 a une double activité anti-glucocorticoïde et anti-progestérone ce qui peut être un inconvénient important pour son utilisation. L'encombrement de la région 17 du RU 486 en y ajoutant par exemple un cycle supplémentaire dissocie ces deux activités (PHILIBERT *et al*, 1989). Les dérivés obtenus comme l'Org 31710 et l'Org 31806 (figure n° 13) ont une spécificité de liaison au RP et une activité anti-RP supérieures à celles du RU 486 et sont considérés à ce titre comme des anti-progestérones purs.

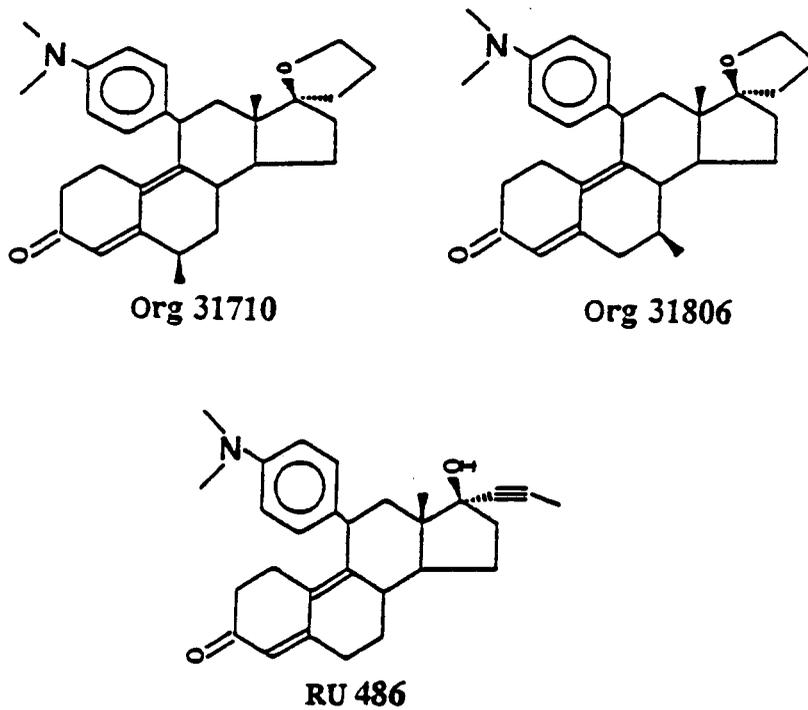


figure n° 13

STRUCTURE DU RU 486, DE L'Org 31710 ET DE L'Org 31806

Ces trois stéroïdes développent une activité biologique de type antagoniste vis-à-vis du récepteur de la progestérone (DECKERS et al, 90; MIZUTANI et al, 92).

Leur liaison au RGC ainsi que leur activité anti-glucocorticoïde sont extrêmement faibles par rapport au RU 486 (bien mis en évidence pour l'Org 31710; DECKERS *et al*, 1990; MIZUTANI *et al*, 1992). Ceci montre l'importance de cette région 17 dans la spécificité de liaison et/ou dans l'activité biologique du ligand.

En conclusion, la chaîne 17 α propynyl ne semble pas déterminer l'activité agoniste (RU 28362 et RU 26988) ou antagoniste (RU 486) vu qu'elle est présente chez les ligands des deux catégories. Par contre, l'hydroxyle en 11 β semble être un peu plus caractéristique des agonistes, car, à quelques exceptions près (les dérivés agonistes chlorés en 11 comme le dichlorisone par exemple; WOLFF *et al*, 1978), la plupart des ligands naturels ou synthétiques développant une activité agoniste possèdent ce substituant (ROUSSEAU, 1984). Au contraire, la plupart des stéroïdes ne le possédant pas développent une activité antagoniste. Nous pouvons citer, entre autres, la progestérone (antagoniste naturel du RGC) et ses dérivés synthétiques comme le R 5020 (ou promegestone) et certains dérivés corticoïdes comme le cortexolone (CHROUSOS *et al*, 1982; ROUSSEAU *et al*, 1983). Néanmoins, le 21 mésylate de dexaméthasone et les 17 β carboxamides dérivés de la dexaméthasone sont des antagonistes faibles portant un hydroxyle en 11 β .

III - MECANISME D'ACTION DES LIGANDS ANTAGONISTES

Le mécanisme d'action des hormones agonistes a été abondamment décrit dans la première partie de cette revue générale. Il reflète en effet fidèlement celui des hormones naturelles. De plus, tous les travaux relatés jusqu'à maintenant concernant l'interaction hormone-récepteur ne se rapportent qu'aux ligands agonistes. Tous les acides aminés essentiels mis en évidence à ce jour seraient impliqués essentiellement dans l'interaction agoniste-récepteur.

En effet, les détails du mécanisme d'action cellulaire et de l'interaction antagoniste-récepteur sont pratiquement inconnus. Différentes hypothèses sur le mécanisme d'action de

ces anti-hormones ont été émises et impliquent au moins une interférence possible de ce ligand au niveau d'une des différentes étapes du mécanisme décrit pour les hormones naturelles. Suivant le récepteur nucléaire étudié, les antagonistes pourraient intervenir au niveau des étapes de (GRONEMEYER et MEYER, 1991; GRONEMEYER *et al*, 1991) (voir figure n° 14):

- la transformation du récepteur c'est-à-dire la dissociation des HSP 90 du complexe hétéroooligomère (par inhibition ou retard à la transformation).

- la dimérisation (absence de celle-ci ou dimérisation anormale).

- la liaison à l'ADN au niveau de la séquence spécifique HRE (par empêchement ou modification de cette association).

- enfin, au niveau de facteurs (appelés TAFs) par lesquels le complexe hormone-récepteur module (stimulation ou inhibition) la machinerie transcriptionnelle (comme les facteurs TAF-1 et TAF-2 dont l'activité est spécifique du type cellulaire) (TORA *et al*, 1989).

Ces antagonistes présentent un mécanisme d'action distinct de celui des agonistes (figures n° 15 et 16). Ils peuvent en effet s'associer au récepteur au niveau du site de liaison (domaine E) sans toutefois provoquer de réponse biologique spécifique observable. Aucune activité transcriptionnelle finale du complexe antagoniste-récepteur n'est observée au contraire des agonistes. Comme pour les agonistes, l'effet des anti-hormones sur les diverses fonctions du récepteur dépendent de la nature du récepteur considéré. De plus, des antagonistes spécifiques d'un même récepteur peuvent présenter un mécanisme d'action différent (antagonistes de classe I ou de classe II) (voir exemples ci-dessous).

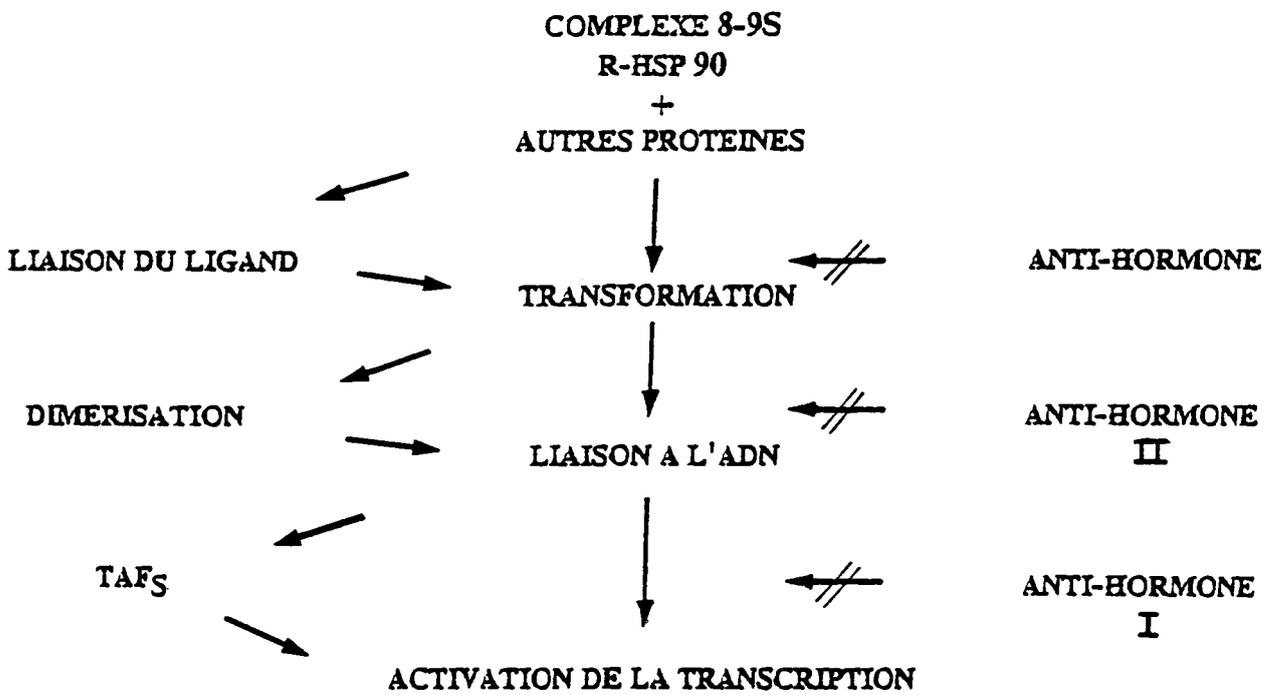


figure n°14

MECANISMES POSSIBLES D'ACTION DES ANTAGONISTES OU ANTI-HORMONES
(d'après GRONEMEYER et al, 92)

figure n° 15
MODE D'INTERVENTION DES ANTI-HORMONES

Perturbation de la cinétique de dissociation Ligand-Récepteur:

Anti-minéralocorticoïdes: Spironolactone (a).

Inhibition de la transformation (dissociation de l'hétérodimère):

Anti-glucocorticoïdes et anti-progestatifs: RU 486 (b)

Anti-androgènes: ICI 176,334 (c).

Inhibition de la liaison à l'ADN ou antagonistes de type II (*):

Anti-oestrogènes: ICI 164,384 (d)

Antagonistes de la progestérone: ZK 98299 (e).

Inhibition de l'activation de la transcription ou antagonistes de type I (*):

Anti-oestrogènes: ICI 164,384 (f)

Anti-oestrogènes: 4-OH-Tamoxifen (g)

Antagonistes de la progestérone: RU 486 (h).

- Légende:
- (*): d'après Gronemeyer *et al* (1992).
 - (a): d'après Couette *et al* (1992).
 - (b): d'après Gronemeyer *et al* (1991).
 - (c): d'après Veldscholte *et al* (1992).
 - (d): d'après King (1992).
 - (e): d'après Gronemeyer et Meyer (1991) et Takimoto *et al* (1992).
 - (f): d'après Gronemeyer *et al* (1992).
 - (g): d'après Fritsch *et al* (1992).
 - (h): d'après Meyer *et al* (1990).

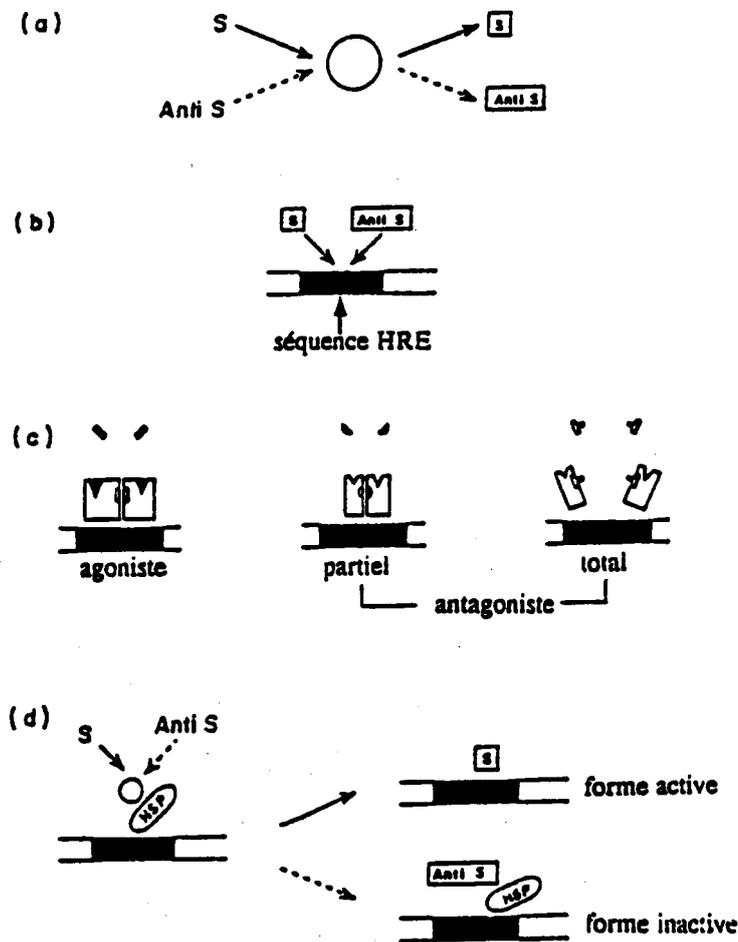


figure n°16

DIFFERENTS MODELES DE MECANISMES

D'ACTION DES ANTAGONISTES

(d'après KING, 92)

- a) Compétition entre les deux catégories de ligands au niveau du domaine de liaison sur le récepteur, donnant des complexes actifs ou inactifs différant entre eux par leur conformation.
- b) Les deux complexes se lient au niveau d'une séquence HRE identique mais seul le complexe formé par l'agoniste est actif.
- c) Absence totale ou partielle d'activation des régions du récepteur impliquées dans la transactivation transcriptionnelle (dimérisation ou non du récepteur après fixation du ligand).
- d) Après fixation du ligand, l'HSP 90 (HSP) reste (antagoniste) ou non (agoniste) liée au récepteur bloquant ou non la liaison du complexe à l'ADN.

S = Stéroïde, AntiS = Anti-Stéroïde

1) complexe RU 486-RGC

Le RU 486, antagoniste du récepteur des glucocorticoïdes et de celui de la progestérone, se lie avec une forte affinité à ces deux récepteurs (MOGUILLEWSKY et PHILIBERT, 1985; BAULIEU, 1989). Le mécanisme d'action du RU 486 semble différent selon le récepteur (RGC ou RP) étudié. Contrairement aux complexes RGC-agoniste, le RGC couplé au RU 486 est incapable de se lier et d'activer le promoteur de la TAT, qui contient pourtant une séquence GRE spécifique (BECKER *et al*, 1986). Il a été alors proposé que le RU 486 stabilisait le récepteur sous la forme non transformée (forme 8 S) avec les protéines HSP 90 toujours associées à lui-même. Ce complexe reste sous une forme non active et ne possède donc aucune affinité pour l'ADN. Par ailleurs, alors que le taux de transformation du complexe acétonide de triamcinolone-récepteur est élevé après chauffage à 25 °C pendant 30 minutes, le taux de transformation du complexe RU 486-récepteur, dans les mêmes conditions, reste extrêmement faible (inférieur ou égal à 12 %) *in vitro* (DANZE *et al*, 1990). Ceci est même observé en absence de molybdate de sodium, composé reconnu comme étant un stabilisateur du complexe hétérooligomère (LEFEBVRE *et al*, 1988, a). Le RU 486 inhibe la dissociation récepteur-HSP 90 qui constitue le préalable indispensable pour l'expression de l'activation transcriptionnelle finale du complexe ligand-récepteur. Ceci empêche par la suite l'expression de toutes les propriétés du récepteur (translocation, dimérisation, liaison à l'ADN et transcription des gènes spécifiques).

2) complexe RU 486-RP

Le RU 486 se comporte différemment avec le RP qui, en l'absence de l'hormone, se trouve dans le noyau non lié au PRE *in vivo* et *in vitro*. Le RP, lié au RU 486, s'associe à son élément de réponse (PRE) avec une affinité similaire à celle du complexe progestérone-RP (MEYER *et al*, 1990). Il s'y fixe aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* mais une fois fixé il n'active pas ou active d'une manière anormale la transcription. Un des mécanismes

possibles proposés est la capacité du complexe RU 486-RP à former *in vitro* des hétérodimères inactifs (hétérodimérisation: [R 5020-RP]-[RU 486-RP]). Mais, ce phénomène n'a pas encore été mis en évidence *in vivo* (De MARZO *et al*, 1992). Comme il n'empêche pas en tout cas la liaison du récepteur à l'ADN (induction identique de la liaison R-ADN *in vitro* et *in vivo*), il est classé dans les antagonistes de type I (GRONEMEYER *et al*, 1992). Le complexe RU 486-RP se lie à l'ADN mais, vu l'absence de transcription, on peut penser que cette interaction est différente de celle du complexe progestérone-RP. La conformation même du complexe RU 486-RP ou la conformation de l'ADN après la liaison de ce complexe n'est pas ou plus fonctionnelle.

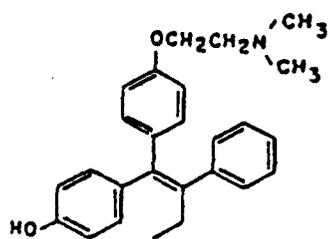
Des expériences *in vitro* et *in vivo* suggèrent que le complexe RU 486-RP humain a une conformation qui ne lui permet pas d'interagir avec certains facteurs intermédiaires de la transcription (TAFs ou TIFs) (GUIOCHON-MANTEL *et al*, 1988; EL-ASHRY *et al*, 1989; TURCOTTE *et al*, 1990). En effet, les antagonistes de classe I bloquent totalement ou n'induisent pas du tout l'activité du facteur TAF-2 (facteur inductible) en affectant plus ou moins l'activité du facteur TAF-1 (facteur constitutif). Il existerait une altération de la conformation de ce complexe ne permettant plus l'activation de la transcription (au niveau de TAF-2). En effet, la liaison de l'agoniste au récepteur rend l'extrémité C-terminale (et en particulier les 30 derniers acides aminés de la séquence) du récepteur sous forme transformée (dissociation des HSPs) complètement inaccessible aux protéases (protection) alors qu'au contraire, la fixation de l'antagoniste expose entièrement celle-ci à la protéolyse enzymatique (VEGETO *et al*, 1992). Cette distinction conformationnelle, qui intervient après la liaison du ligand, pourrait expliquer l'incapacité du complexe antiH-R à stimuler la transcription (ALLAN *et al*, 1992, a; WEIGEL *et al*, 1992, b).

Il existe aussi des antagonistes du RP qui, à l'inverse des antagonistes de type I, n'induisent pas *in vitro* l'association du récepteur avec l'ADN. On les appelle les antagonistes de type II. Dans ce cas, les facteurs TAF-1 et TAF-2 sont tous les deux totalement inactifs en présence d'un antagoniste appartenant à cette classe.

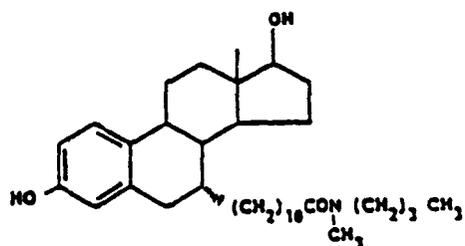
Nous pouvons citer le ZK 98,299 (ou ONAPRISTONE) (figure n° 17), antagoniste du RP, qui inhibe *in vitro* toute association RP-ADN et qui ne fait que réduire *in vivo* l'affinité du récepteur pour l'ADN. Ce dérivé agirait au niveau de la dimérisation du récepteur de la progestérone, dimérisation indispensable pour toute interaction avec l'ADN (absence de celle-ci ou instabilité des dimères néoformés) (KLEIN-HITPASS *et al*, 1990).

Le ZK 98,299 montre une activité anti-progestative inférieure à celle du RU 486. De plus, il ne présente pas d'activité anti-glucocorticoïde contrairement au RU 486. Le ZK 98,299 et le ZK 112,993 (figure n° 17), un autre antagoniste de la progestérone possédant un groupe 4-acétyl en lieu et place du substituant 4-diméthylamino présent sur le noyau phényl en 11 β du RU 486 ou du ZK 98,299, réduisent tous les deux le nombre de cellules cancéreuses en phase S du cycle cellulaire (observation d'une accumulation de cellules en phase G0, G1) (MICHNA *et al*, 1992, a). Ces deux produits possèdent donc un intérêt clinique significatif dans le traitement de certaines tumeurs cancéreuses (cancer du sein par exemple) (MICHNA *et al*, 1989; 1992, b).

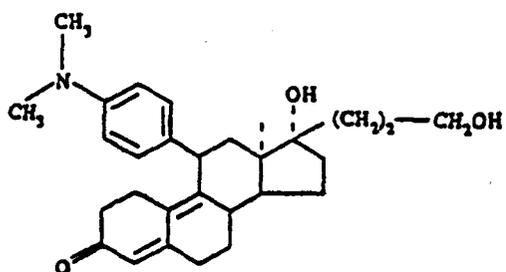
Après la liaison du ligand quel qu'il soit, le récepteur subirait une modification conformationnelle spécifique du domaine E nécessaire pour induire la dissociation des HSPs (transformation), la liaison à l'ADN après dimérisation et, pour tous les récepteurs nucléaires, l'activation transcriptionnelle. La conformation générale du récepteur semble, après fixation d'un agoniste ou d'un antagoniste, identique à l'exception de la conformation de l'extrémité C-terminale du domaine E (et en particulier les 30 derniers acides aminés de la séquence) (ALLAN *et al*, 1992, a). Par contre, aucune autre différence conformationnelle supplémentaire n'est observée selon cette fois-ci la classe de l'antagoniste fixé (classe I: RU 486; classe II: ZK 98,299) pouvant expliquer les divergences dans les propriétés de ceux-ci: le RU 486 contrairement au ZK 98,299 provoque la liaison du RP à l'ADN. On peut donc imaginer qu'il existe une différence subtile encore indéterminée dans



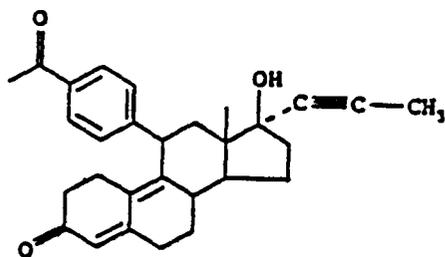
4-hydroxy-Tamoxifen



ICI 164,384



ZK 98,299



ZK 112,993

figure n° 17
STRUCTURE DE QUELQUES STEROIDES ANTAGONISTES

la conformation du domaine E ou d'un autre domaine après fixation d'un antagoniste de classe II expliquant l'absence de liaison du RP à l'ADN (ALLAN *et al*, 1992, b).

IV - ACIDES AMINES ESSENTIELS DANS L'INTERACTION ANTAGONISTE-RECEPTEUR

Très peu d'acides aminés essentiels à l'interaction antagoniste-récepteur ont été identifiés par les trois méthodes habituelles décrites précédemment (réactifs spécifiques, marquage d'affinité, mutagénèse dirigée). Les résultats publiés à ce jour concernent surtout l'interaction anti oestrogène-RE et antiprogestatif-RP.

A - REACTIFS SPECIFIQUES

MOUDGIL *et al* (1989) ont étudié la fixation du R 5020 (agoniste) et du RU 486 (antagoniste) sur le récepteur de la progestérone en présence de différents réactifs spécifiques des groupements thiols comme l'iodoacétamide (IA) et la NEM, réactifs covalents d'action irréversible. Ils ont remarqué que, alors que la liaison du R 5020 était totalement inhibée, la liaison du RU 486 au RP était pratiquement insensible à la présence initiale d'IA dans le milieu. Nous pouvons même noter une augmentation plus ou moins importante de l'affinité du RU 486 pour le RP en présence d'IA. Par contre, lorsque la NEM est mise initialement dans le milieu, ils remarquent que la fixation du RU 486 tritié baisse de 40 % alors que celle du R 5020 est totalement inhibée. De plus, les acides aminés spécifiques du domaine de liaison apparaissent plus protégés vis-à-vis de l'IA que de la NEM, une fois le site de liaison occupé par le R 5020 (post-incubation du complexe H-R avec l'IA ou la NEM). Ces deux marqueurs inhibent totalement la liaison du récepteur avec l'agoniste R 5020 indépendamment de la taille de leur groupement alkylant respectif (de structure cyclique pour la NEM ou de structure linéaire pour l'IA). Ces données montrent que les groupements thiols appartenant au site actif jouent un rôle plus ou moins important dans la liaison sélective du ligand selon son activité biologique (dans l'hypothèse d'un site unique pour ces deux ligands).

BORGNA et SCALI (1991), de leur côté, ont étudié les interactions d'oestrogènes et d'anti-oestrogènes (dérivés du 4-hydroxy-Tamoxifen) avec le RE en présence de DEPC (DiEthylPyroCarbonate), un autre marqueur d'acides aminés (histidines). Ils ont montré là-aussi une différence dans l'interaction de ces ligands avec le RE suivant l'état de celui-ci (incubation des ligands avec le RE natif ou traité avec le DEPC).

B - MARQUAGE D'AFFINITE ET MUTAGENESE DIRIGEE

B/1/ Récepteur des oestrogènes:

Les travaux les plus avancés dans ce domaine et les mieux documentés dans la littérature concernent l'interaction antagoniste-RE.

HARLOW *et al* (1989) ont réalisé des réactions de marquage d'affinité sur le RE. Ils ont identifié une cystéine en position 530 appartenant au domaine de liaison des oestrogènes. Ce résidu est lié de façon covalente à des dérivés contenant une fonction réactive de type aziridine (site électrophile faible spécifique des résidus nucléophiles présents dans la séquence d'une protéine) et développant une activité agoniste (Cétononestrol) ou antagoniste (Tamoxifen) (KATZENELLENBOGEN *et al*, 1983, 1987; HARLOW *et al*, 1989). Cet acide aminé semble donc indispensable pour la liaison de ligands des deux catégories.

C'est pourquoi, REESE et KATZENELLENBOGEN (1991), de leur côté, ont construit des mutants caractérisés chacun par une substitution ponctuelle soit de cette cystéine 530 supposée essentielle soit d'une autre cystéine (n°381 ou n°417 ou n°447) par un résidu alanine ou sérine. Ils ont constaté que:

*- tous ces mutants liaient encore l'estradiol avec une affinité similaire à celle du récepteur naturel (affinité réduite de 2 à 5 fois selon la substitution, ponctuelle ou multiple) et étaient capables d'activer totalement la transcription.

*- tous ces mutants étaient encore marqués de façon covalente avec les deux dérivés cités ci-dessus. Un autre acide aminé était donc marqué en absence de la cystéine 530. Par l'utilisation du MMTS, un réactif spécifique des groupements thiols, cet acide aminé pourrait être une autre cystéine appartenant au domaine de liaison et située à proximité de la cystéine 530 (la cystéine 381; REESE *et al*, 1992, a).

*- tous ces mutants ponctuels montraient un profil d'activation transcriptionnelle identique à celui du récepteur normal. Il existe toutefois un mutant caractérisé par la substitution de la cystéine n°447 par une alanine qui montre une réponse transcriptionnelle différente malgré une affinité pour l'estradiol identique au récepteur sauvage. Cette mutation entraîne pour le récepteur une dépendance vis-à-vis de la température au niveau de l'affinité de liaison au stéroïde et de la fixation du complexe H-R ainsi formé à l'ADN (REESE et KATZENELLENBOGEN, 1992, b).

Ces auteurs concluent que, si ces quatre cystéines appartenant au domaine E du RE ne sont pas essentielles à la liaison d'estrogènes ou d'anti-estrogènes à liaison réversible, leurs mutations (surtout pour la cystéine 530) peuvent affecter fortement le pouvoir de marquage covalent d'anti-estrogènes comme l'aziridine de Tamoxifen et surtout leur pouvoir antagoniste vis-à-vis du RE (REESE *et al*, 1992, a).

Par ailleurs, PAKDEL *et al* (1992) ont montré, par mutation directe, que les acides aminés situés à proximité de la cystéine 530 (c'est-à-dire la lysine 529, la lysine 531 et l'asparagine 532) étaient impliqués dans la discrimination au niveau du récepteur des ligands en fonction de leur activité biologique. Les résidus d'acides aminés en position 521, 522 et 525 seraient également impliqués dans cette discrimination (DANIELIAN *et al*, 1993).

D'autre part, WOOGÉ *et al* (1992) ont montré que le domaine de liaison au stéroïde du RE humain (séquence en acides aminés comprise entre 302 et 595) était suffisant à lui seul pour lier le stéroïde avec une bonne affinité (30 % environ par rapport au récepteur normal) et que celui-ci montrait une spécificité de liaison presque inchangée. Ils ont remarqué aussi qu'il n'y avait aucune interaction entre un peptide synthétique de 42 acides aminés (représentant la séquence comprise entre 511 et 551) et différents ligands comme l'estradiol et les marqueurs covalents à fonction aziridine. Ce peptide représente pourtant une portion du domaine de liaison considérée comme essentielle dans la liaison au stéroïde. En outre, il comprend la cystéine 530, acide aminé pourtant marqué par ces mêmes dérivés covalents dans le récepteur intact. Ceci voudrait dire que les autres acides aminés appartenant au site influencent directement ou indirectement la liaison du ligand ou du marqueur en maintenant par exemple cette séquence essentielle 511-551 dans une certaine conformation fonctionnelle.

Ces résultats sur l'importance de la cystéine 530 (RE humain) dans l'interaction H-R semblent aussi contradictoires que ceux rapportés sur la cystéine 656 (RGC de rat).

B/2/ Récepteur des glucocorticoïdes et celui de la progestérone:

Très peu d'acides aminés essentiels impliqués dans l'interaction antagoniste-RGC ont été identifiés. On peut citer les acides aminés identifiés par marquage d'affinité avec le mésylate de dexaméthasone, antagoniste faible du RGC (voir "revue générale"). Il en est de même pour l'interaction antagoniste-RP. Mais, une découverte surprenante est à l'origine récemment de travaux intéressants concernant l'interaction RU 486 avec ces deux récepteurs (BAULIEU, 1989; VEGETO *et al*, 1992). En effet, le RU 486 ne se lie pas aux récepteurs de la progestérone de certaines espèces naturelles comme le récepteur de poulet (GROYER *et al*, 1985; MOUDGIL *et al*, 1986) et celui de hamster (OKULICZ *et al*, 1987; GRAY et LEAWITT, 1987). Il a été montré que:

- tous les récepteurs liant le RU 486 possèdent une glycine à une position spécifique (n°722 pour le RP humain, n°567 pour le RGC humain). Le récepteur de la progestérone de poulet qui ne lie pas le RU 486 possède une cystéine correspondant à cette position (n°575).
- la substitution de cette cystéine 575 par une glycine dans le domaine de liaison génère un RP de poulet liant le RU 486 et sensible à l'activité biologique antagoniste de ce produit.
- l'inverse est aussi vrai. La substitution de la glycine 722 par une cystéine dans le domaine de liaison du RP humain inhibe cette fois-ci toute liaison du RU 486 mais en aucune façon celle d'un agoniste pur (progestérone) de ce récepteur.
- la mutation correspondante dans le RGC humain (substitution d'une glycine par une cystéine) provoque une absence totale de liaison de l'agoniste (dexaméthasone) et de l'antagoniste (RU 486) (BENHAMOU *et al*, 1992). Il semble donc que la glycine soit indispensable pour la liaison de certains ligands au RGC humain quelque soit leur activité biologique.

Il existerait donc en conclusion des différences assez nettes au niveau de l'interaction ligand-RGC et ligand-RP. De plus, l'activité antagoniste ne semble pas être une activité intrinsèque de l'anti-hormone car un antagoniste du RP humain sauvage peut se comporter comme un antagoniste partiel voire même comme un agoniste pur vis-à-vis du même récepteur mais muté en certaines positions de la séquence (au niveau principalement du domaine E/F) (GARCIA *et al*, 1992). Le plus important semble en fait être le positionnement final du substituant volumineux en 11 β du RU 486 au niveau du domaine de liaison (en particulier au niveau de la poche hydrophobe) pour générer une activité agoniste ou antagoniste. Ce positionnement peut être fonction de plusieurs paramètres dont par exemple:

a) l'encombrement stérique du site, donné par les chaînes latérales (R) des acides aminés d'où peut-être l'importance d'une glycine, qui n'en possède pas, à cette endroit (glycine 722) .

b) la substitution en 17 (α ou β , chaîne latérale de type propynyl ou autre) qui pourrait influencer le positionnement particulier du substituant en 11 β du ligand dans la poche 11 β hydrophobe du site et donc affecter l'activité antagoniste finale du composé (passage d'une activité d'antagoniste pur à une activité mixte ou d'agoniste pur) (KLOOSTERBOER *et al*, 1988). Par ailleurs, COOK *et al* (1993) ont montré qu'un composé (dérivé du RU 486) qui possède un groupe diméthylaminophényle en 11 β , une chaîne latérale 17 β acétyl et surtout un groupe éthyle en 16 α développe après liaison au RP une activité agoniste supérieure à celle de la progestérone sans aucune activité antagoniste détectable (influence non négligeable du substituant éthyl en 16 α sur le positionnement du groupe volumineux en 11 β à l'intérieur du site).

Ces anti-hormones comme les agonistes se lient bien au récepteur sans toutefois provoquer par la suite la même réponse cellulaire observée. Par ailleurs, nous avons déjà montré l'importance du site de liaison à l'hormone dans la transformation et donc dans l'activation biologique du récepteur (voir paragraphe n° V). Nous pouvons donc penser qu'à ce niveau c'est-à-dire lors de l'entrée dans le site de l'antagoniste et/ou de sa liaison ensuite au récepteur, il existe une ou plusieurs différences entraînant cette inhibition d'action du récepteur par la suite. C'est cela que nous avons cherché à mettre en évidence par nos travaux.

RESULTATS ET DISCUSSION

Nous avons étudié les modalités de l'interaction ligand-récepteur au niveau moléculaire et plus particulièrement l'interaction antagoniste-récepteur selon deux procédures différentes:

- premièrement par l'utilisation de plusieurs réactifs spécifiques des groupements thiols. Nous avons comparé la sensibilité à ces réactifs de la liaison de différents ligands au RGC. Les ligands utilisés diffèrent entre eux par leur activité biologique et par leur structure chimique avec, pour chacun, un seul substituant variant sur une des trois positions-clés définies précédemment (carbones n°3, 11 et 17). Nous pouvons distinguer parmi les ligands que nous avons étudiés des agonistes purs (TA, Dex, COR [position 3], RU 26988 et RU 28362 [position 17]), un anti-glucocorticoïde pur, le RU 486 [position 11] et un antagoniste partiel, le DXB [position 17].

- deuxièmement, en caractérisant des stéroïdes à caractère antagoniste, dérivés du RU 486, et marqueurs d'affinité potentiels du RGC.

1^{ère} partie

**"Sensibilité comparée aux réactifs des thiols de la liaison
de ligands agonistes ou antagonistes au RGC"**

1) Influence du traitement aux réactifs spécifiques des thiols sur la capacité de liaison du RGC.

Pour montrer que les groupements thiols décrits jusqu'à maintenant sont réellement impliqués dans la liaison du stéroïde au récepteur des glucocorticoïdes, nous avons réalisé une préincubation du cytosol (préparé à partir du thymus ou du foie de rat) avec différents réactifs (iodoacétamide ou IA, NEM, MMTS). Le récepteur est à l'état libre, non lié à l'hormone et sous une forme non transformée (cytosol préparé dans un tampon contenant du MoO_4Na_2). De plus, suivant le réactif utilisé, le tampon contient ou non du DTT. Ce cytosol est incubé avec chacun de ces trois réactifs à différentes concentrations pendant des temps variables. La réaction est arrêtée par addition de 20 mM de β -mercaptoéthanol avant l'incubation du récepteur en présence de ligands marqués (TA, Dex, RU 486) pendant une nuit à 4°C.

Nous observons que, quelque soit le temps de contact du récepteur avec la NEM (5 mM maximum pour éviter toute déstabilisation du récepteur ou du complexe hormone-récepteur), il n'existe plus de liaison entre le récepteur traité et la TA tritiée. Nous observons en effet une inhibition pratiquement totale de cette association (maximum inférieur ou égal à 10-15 % du contrôle) (figure n° 18). Par contre, le RU 486 présente une cinétique d'association ralentie avec le récepteur, comparée à un cytosol-témoin non traité par la NEM initialement. Le taux d'association observé entre le récepteur alkylé et le RU 486 atteint encore environ 50-60 % du contrôle (figure n° 18).

Une inactivation identique de la liaison de la TA est observée en présence d'IA utilisé à différentes concentrations pendant 30 minutes à 4°C. On obtient 70 % d'inhibition de la liaison TA-récepteur à partir d'une concentration de 5 mM d'IA. Par contre, là-aussi, la liaison RU 486-récepteur est beaucoup moins sensible à la présence initiale d'IA dans le milieu, la pente de la courbe d'inhibition étant moins forte (encore 60 à 65 % d'association

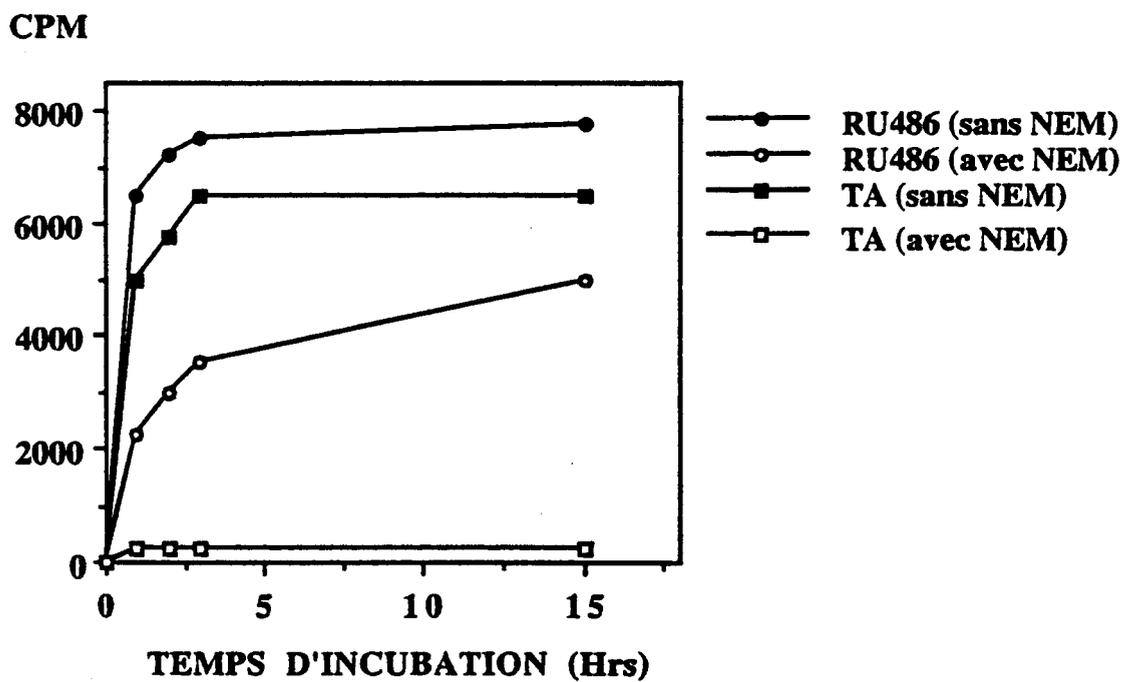


figure n° 18

PREINCUBATION DU CYTOSOL AVEC LA NEM

Le cytosol de foie de rat est mis en contact ou non avec la NEM avant d'être incubé avec le ligand tritié (15 nM). Aux temps indiqués, la fixation spécifique est déterminée par la méthode du DCC.

à 10 mM d'IA) (figure n° 19). Ces deux produits agissent de façon irréversible (liaison covalente de type thioéther) même en présence de réducteur. On ne peut donc pas savoir si l'absence de toute liaison TA-récepteur résulte bien de l'action de ces agents et non pas d'une dégradation ou d'une instabilité du récepteur ou du complexe vu que la liaison RU 486-RGC persiste encore plutôt bien.

C'est pourquoi, il nous a semblé intéressant d'utiliser le MMTS (30 minutes, 4°C) car, contrairement à l'IA et la NEM, le résultat de son action est réversible en présence de 10 mM de DTT. Le cytosol est préparé cette fois-ci dans un tampon ne contenant pas de DTT. Le récepteur, traité initialement au MMTS à différentes concentrations (figure n° 20), perd très rapidement et presque totalement toute capacité de liaison à la TA (taux d'association inférieur à 20 % dès une concentration de 1 mM de MMTS). L'association RU 486-RGC atteint encore un taux de 40 à 50 % à une concentration de 3 mM de MMTS par rapport à un témoin non traité initialement. Pour vérifier la réversibilité de l'action du MMTS, 10 mM de DTT sont ajoutés dans le milieu après l'action du réactif et avant l'incubation une nuit en présence de la TA tritiée. Nous remarquons que pour des concentrations faibles en MMTS, la réversibilité de la réaction est totale (100 % pour des concentrations en MMTS inférieures à 3 mM) ou presque (50 % pour des concentrations en MMTS comprises entre 3 et 6 mM). Par contre, nous avons du mal à restaurer l'association TA-RGC pour des concentrations élevées en MMTS (supérieures à 8 mM). Ceci prouve en tout cas que le récepteur reste sous une forme fonctionnelle pouvant encore lier le ligand en présence du réactif et que, même s'il y a quand même perte ou inhibition de liaison par la suite, ceci résulte bien de l'action de celui-ci.

De même, l'addition de 10 mM de DTT dans le milieu restaure complètement la liaison du RU 486 tritié au récepteur.

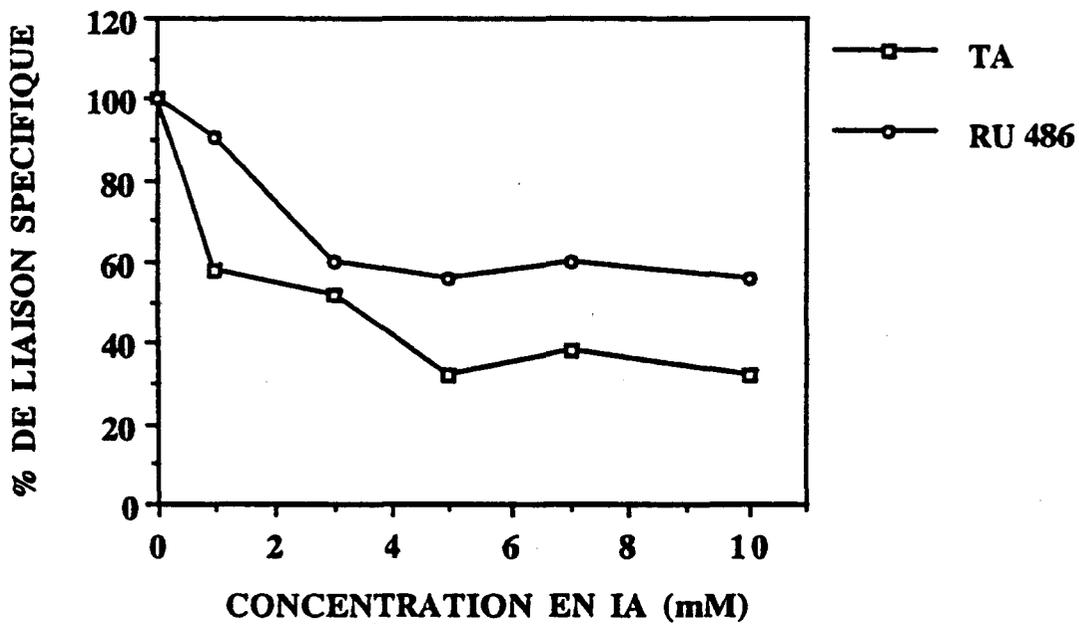


figure n°19

PREINCUBATION DU CYTOSOL AVEC L'IA

Le cytosol de foie de rat est mis en contact avec l'iodoacétamide à différentes concentrations (30 min, 4°C) avant d'être incubé avec le ligand tritié (TA ou RU 486: 10 nM, une nuit, 4°C). La fixation spécifique est ensuite déterminée par la méthode du DCC et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à un témoin non traité à l'iodoacétamide.

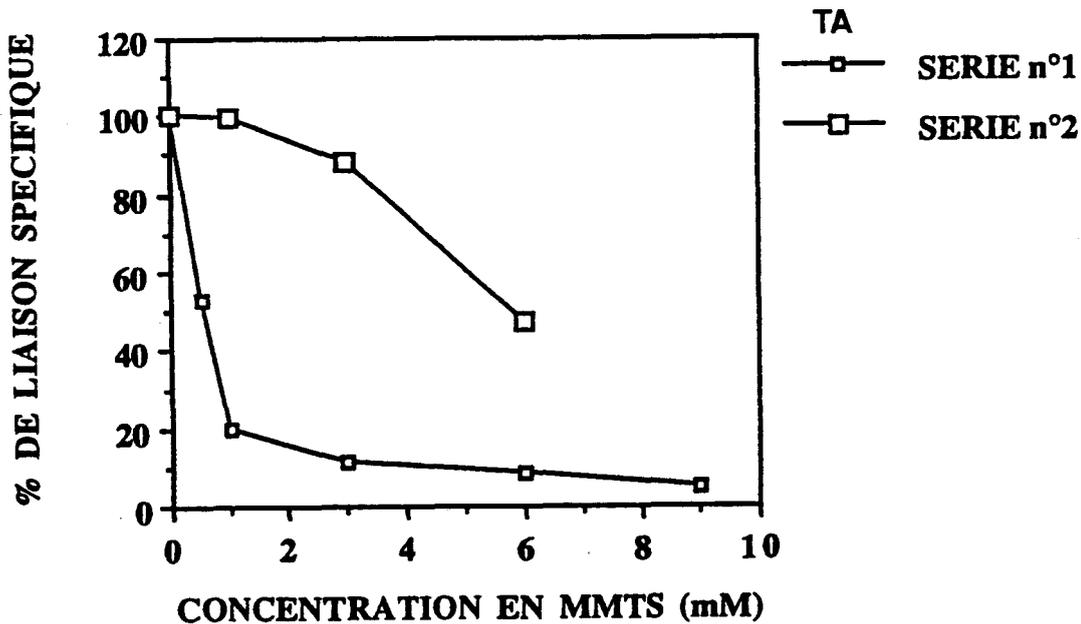


figure n° 20

PREINCUBATION DU CYTOSOL AVEC LE MMTS

Série 1: Le cytosol de foie de rat est mis en contact avec le MMTS à différentes concentrations pendant 30 min à 4°C avant d'être incubé avec le ligand tritié (TA, 10 nM), une nuit à 4°C. La fixation spécifique est ensuite déterminée par la méthode du DDC et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à un témoin non traité par le MMTS.

Série 2: Le mode opératoire est identique à celui de la série 1 mais avant l'incubation avec la TA, 10 mM de DTT sont ajoutés dans le milieu pour régénérer les groupements thiols alkylés par le MMTS (réversibilité de la réaction).

La dexaméthasone donne des résultats similaires à ceux obtenus avec la TA, quelque soit le réactif spécifique utilisé (NEM, IA, MMTS). La structure chimique très proche de ces deux composés explique cette similitude observée dans les résultats obtenus.

Ces résultats sont similaires à ceux déjà rapportés dans le laboratoire par BLICQ *et al* (1988) et FORMSTECHEER *et al* (1984) concernant la sensibilité de la liaison agoniste (TA ou Dex) au récepteur des glucocorticoïdes vis-à-vis de la NEM. Par ailleurs, nos résultats se rapprochent de ceux rapportés par MOUDGIL *et al* (1989) concernant la liaison du R 5020 ou du RU 486 au récepteur de la progestérone en présence d'IA ou de NEM. Pourtant, ces derniers auteurs trouvent une augmentation plus ou moins importante de l'affinité du RU 486 pour le RP en présence d'IA.

Ces deux dérivés (NEM et IA) sont des agents alkylants mais des différences peuvent apparaître dans leur mécanisme propre d'action à cause de:

- soit de leur structure chimique différente et en particulier de l'encombrement stérique plus ou moins important de leur groupement alkylant (de structure cyclique pour la NEM; de structure linéaire pour l'IA).

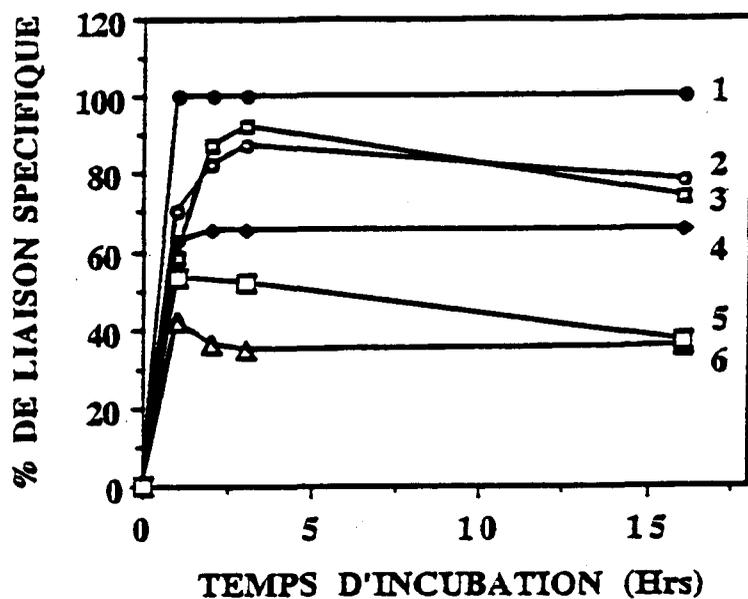
- soit de la différence d'accessibilité des groupements thiols de la protéine suivant le réactif utilisé. Ceci peut alors expliquer un meilleur rendement et/ou une vitesse d'action plus élevés d'un réactif par rapport à un autre.

La NEM inactive uniquement la liaison de la TA au RGC et n'a que peu d'effets sur celle du RU 486. Nous avons alors utilisé d'autres maléimides, synthétisées au laboratoire, de taille plus élevée que la NEM (différentes N-alkylmaléimides et la N-benzylmaléimide) à une concentration de 3 mM pendant cinq minutes à 4°C (conditions définies par FORMSTECHEER *et al*, 1984). Le cytosol, traité au préalable par ces différentes maléimides, perd totalement sa capacité de liaison de la TA ou de la Dex quelle que soit la

taille ("longueur de la chaîne carbonée") de la maléimide utilisée (figure n° 21, b). Par contre, la cinétique d'association RU 486-récepteur, faiblement affectée par la NEM, subit un ralentissement croissant et parallèle à l'augmentation de la taille de la maléimide. Les dérivés les plus efficaces à concentration égale sont la N-nonylmaléimide et la N-benzylmaléimide) (figure n° 21, a). Par ailleurs, la réaction d'alkylation est un phénomène dose-dépendant (voir tableau n° II). Elle est fonction de la concentration en thiols du cytosol, concentration déterminée au préalable par dosage au DTNB (voir "appendice technique").

En conclusion, on peut imaginer que dans le cas du RU 486, l'interaction du stéroïde avec le(s) thiol(s) essentiel(s) est moins forte que dans le cas de la TA ou de la Dex. Ceci peut provenir des différences de structure entre le RU 486 et la TA ou la Dex et/ou d'une différence du positionnement du stéroïde dans le site de liaison. Quoi qu'il en soit, l'alkylation de(s) thiol(s) essentiel(s) par des groupements maléimides N-substitués de plus en plus volumineux finit par compromettre la liaison du RU 486, sans doute par encombrement stérique.

Ⓐ



1: RU 486 (témoin 100 %)

2: NEM

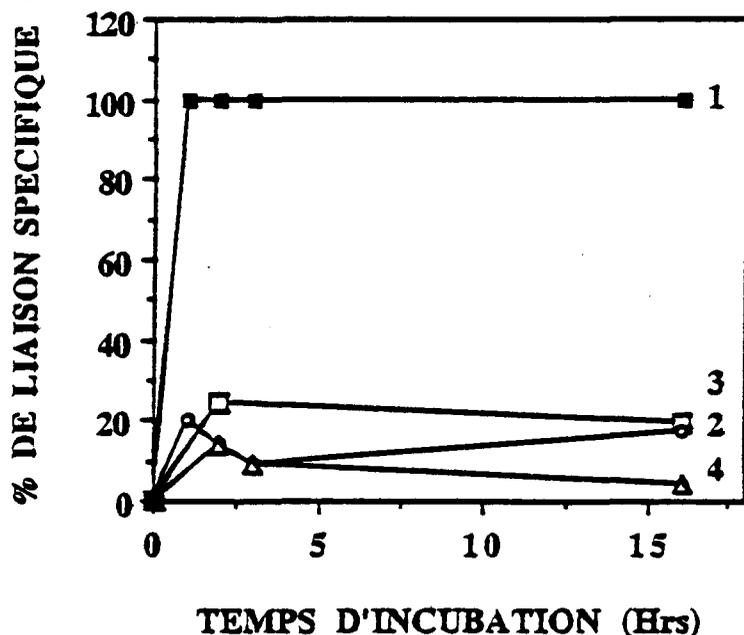
3: N-propyl-maléimide

4: N-hexyl-maléimide

5: N-nonyl-maléimide

6: N-benzyl-maléimide

Ⓑ



1: TA (témoin 100 %)

2: NEM

3: N-nonyl-maléimide

4: N-benzyl-maléimide

figure n° 21

CINETIQUE D'ASSOCIATION DU RGC, APRES TRAITEMENT AU PREALABLE PAR 3 mM DE DIFFERENTES MALEIMIDES, AVEC TA OU RU 486 TRITIÉS.

Le cytosol de foie de rat, traité initialement avec chaque maléimide (pendant 5 min, 3 mM), réaction arrêtée par 20 mM de β -mercaptoéthanol, est incubé à 4°C avec 10 nM de stéroïde marqué (*). Aux temps indiqués (heures), la radioactivité liée (CPM) est déterminée en double par la méthode du DCC. Une fraction du même cytosol, non traité par les maléimides, est incubée en parallèle avec le même ligand marqué pour servir de témoin. Les pourcentages sont calculés par rapport à ce témoin (100%).

- (*):

a) RU 486 tritié (résultats exprimés en pourcentages).

b) TA tritiée (résultats exprimés en pourcentages).

Ligand	Témoin	NEM	NEM	N-benzyl- mal.	N-benzyl- mal.
		2 mM	3 mM	2 mM	3 mM
RU 486	100	87,8	67,8	77,8	35,4
TA	100	83,3	17,4	54	4,5

Tableau n°II

**PREINCUBATION AVEC LA NEM OU LA N-BENZYL-MALEIMIDE
AVANT ADDITION DU RU 486 OU DE LA TA TRITIEE**

Le mode opératoire est identique à la figure n°21. Les pourcentages indiqués sont calculés par rapport au témoin (100 %) et correspondent au temps de 16 heures d'incubation.

2) Influence du traitement à la NEM sur les réactions de compétition.

Le fait que l'ensemble des stéroïdes utilisés ici, quelque soit leur activité biologique, se lient au RGC est bien documenté dans la littérature.

Nous avons cherché à connaître ici l'influence du traitement préalable du récepteur libre par la NEM sur les réactions de compétition vis-à-vis surtout du RU 486 tritié. En effet, contrairement à la TA et à la Dex, celui-ci continue à se fixer au récepteur en présence du réactif (voir paragraphe précédent). Nous avons utilisé le protocole classique des réactions de compétition (voir appendice technique). La figure n° 22 illustre les résultats que nous avons obtenus:

-- a) Si le compétiteur utilisé est le **RU 486**, une réaction de compétition est observée. La radioactivité associée au récepteur (liaison spécifique) observée diminue parallèlement à l'augmentation de la concentration en compétiteur. Ceci constitue la réaction-témoin.

-- b) Si le compétiteur utilisé est la **TA** ou la **Dex**, il n'y a pas de réaction de compétition observée (figure n° 22; courbe n°2). Ce résultat était attendu car ces deux stéroïdes ne peuvent pas se lier du fait de la présence de la NEM initialement dans le milieu (voir paragraphe précédent).

-- c) Si le compétiteur utilisé est le **DXB**, nous observons là-aussi une absence de compétition avec le RU 486 tritié (figure n° 22; courbe n°3). Toutefois, nous ne pouvons pas affirmer ici que le DXB ne se fixe pas au récepteur pour la même raison que la TA ou la Dex (alkylation de thiols essentiels). En effet, ce composé possède une chaîne latérale volumineuse en 17 β de type aromatique qui se positionnerait dans le site à proximité de la cystéine 656 comme la chaîne 17 β hydroxycétone des dérivés habituels. Nous pouvons

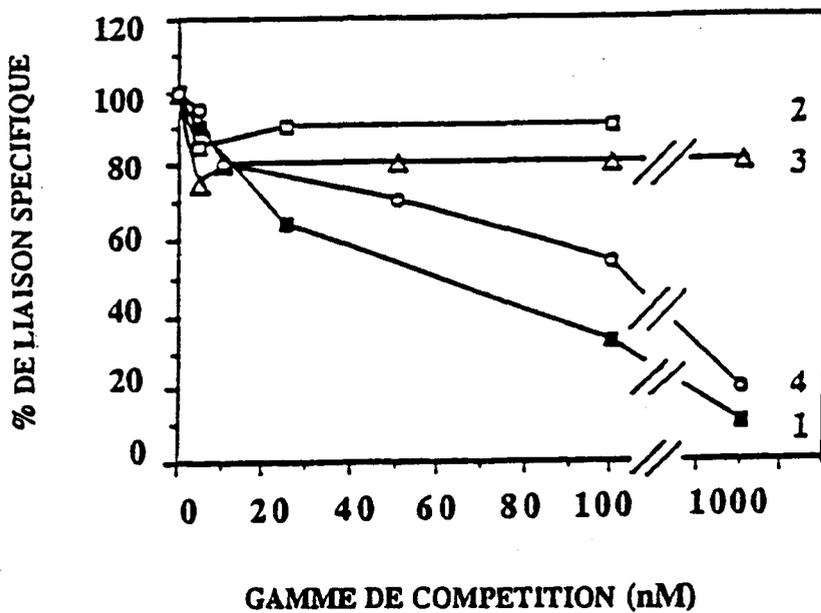


figure n° 22

REACTIONS DE COMPETITION (RU 486 tritié)

Le cytosol de foie de rat est traité préalablement ou non par la NEM avant d'être incubé pendant 16 heures à 4°C en présence d'une concentration fixe en ligand marqué (RU 486) et d'une concentration croissante en ligand froid de nature différente.

Courbe n°1: TA (sans NEM).

Courbe n°2: TA (avec NEM).

Courbe n°3: DXB (avec NEM).

Courbe n°4: COR (avec NEM).

L'activité de liaison spécifique est déterminée en double et est exprimée en pourcentage par rapport à un cytosol-témoin incubé dans les mêmes conditions avec le RU 486 tritié seul.

donc penser que c'est plutôt l'encombrement stérique apporté en plus au niveau de cette région du site par le groupement alkylant (structure cyclique) de la NEM qui est responsable de l'absence de compétition entre le DXB et le RU 486 marqué.

-- d) Si le compétiteur utilisé est le **COR**, nous observons une réaction de compétition (figure n° 22; courbe n°4) avec le RU 486 tritié. Il y a, en effet, une baisse de la radioactivité associée au récepteur comme dans le cas du RU 486 froid [voir a)] (positionnement particulier, différent ou non de celui du RU 486, du COR au niveau du site accepteur ?).

Pour confirmer les résultats obtenus avec le DXB, nous avons utilisé une gamme de concentration plus élevée s'échelonnant de 1 à 15 μM . Quelle que soit la concentration en DXB, nous n'avons jamais obtenu de compétition entre celui-ci et le RU 486.

3) Influence du traitement à la NEM sur les possibilités d'échange de ligand.

Pour vérifier la nature des groupements thiols impliqués dans la fixation de ces deux ligands, nous avons utilisé la technique d'échange entre stéroïdes au niveau du récepteur (DANZE *et al*, 1990). Le mode opératoire est décrit dans la partie "matériels et méthodes".

La figure n° 23 rappelle le principe de cette technique qui se décompose en trois réactions:

- a) Contrôle de stabilité (courbe n°1): le premier stéroïde marqué est échangé avec lui-même ou avec un autre stéroïde marqué.
- b) Réaction "d'association" (courbe n°2): le premier stéroïde non marqué est échangé avec un stéroïde marqué.
- c) Réaction de "dissociation" (courbe n°3): le premier stéroïde marqué est échangé avec un stéroïde non marqué.

Pour éviter des dégradations possibles du récepteur ou du complexe R-H en présence de 8 % d'acétonitrile, le temps de la réaction d'échange (correspondant en fait au temps d'incubation du deuxième ligand) utilisé dans nos manipulations n'excédait pas une à deux heures. Le choix de l'acétonitrile repose sur des travaux antérieurs réalisés dans le laboratoire. En effet, des tampons contenant ce solvant ont été utilisés avec succès pour améliorer l'élution d'anticorps anti-stéroïdes absorbés sur une matrice d'affinité (FORMSTECHE *et al*, 1986; BOUZERNA *et al*, 1988). La qualité des résultats obtenus au niveau de la vitesse d'élution et de la récupération des anticorps a encouragé l'utilisation de l'acétonitrile pour modifier les paramètres du complexe récepteur-ligand dans les réactions d'échange. Ce solvant organique dipolaire a un pouvoir dissociant probablement par modification des liaisons non covalentes (hydrogènes, van der Waals,...) existant entre les deux molécules.

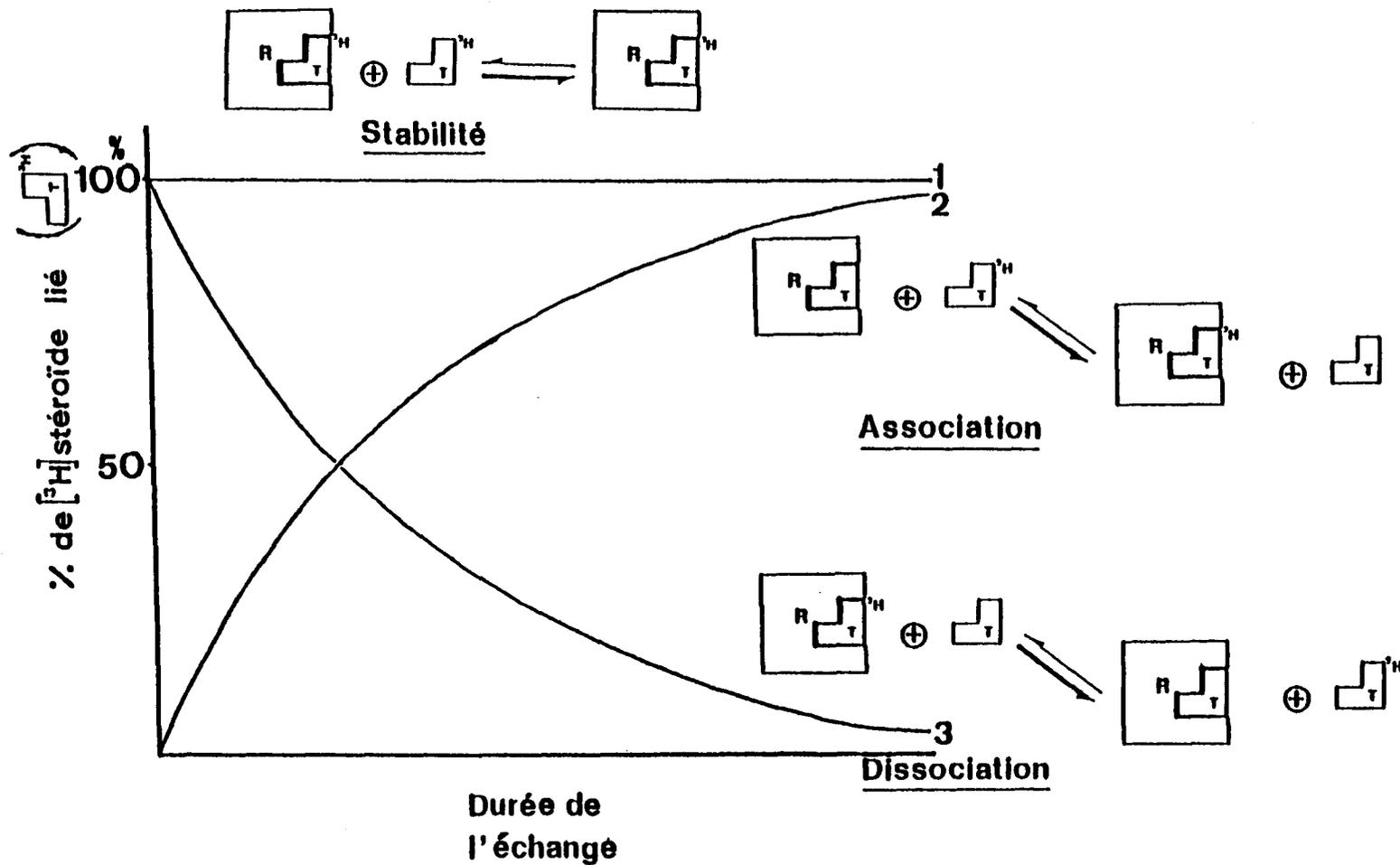


figure n° 23
ILLUSTRATION DES REACTIONS D'ECHANGE

Ce schéma illustre les trois types d'échange réalisés:

Courbe n°1: échange ligand marqué-ligand marqué (contrôle de stabilité).

Courbe n°2: échange ligand froid-ligand marqué (réaction "d'association").

Courbe n°3: échange ligand marqué-ligand froid (réaction de "dissociation").

R représente le récepteur et T l'acétonide de triamcinolone marquée ou non marquée selon l'échange étudié.

A) Réactions d'échange en l'absence de traitement par les réactifs des thiols:

Dans les conditions normales d'échange, en l'absence de tout agent modifiant les groupements thiols, la TA et le RU 486 sont auto-échangeables et mutuellement échangeables en présence de 8 % d'acétonitrile. La réaction d'association présente un taux maximum. Celui-ci semble atteint au bout de 30 à 40 minutes d'incubation. Nous observons environ 80-85 % de réassociation entre le récepteur libéré du premier ligand et le deuxième stéroïde marqué. La dexaméthasone donne des résultats similaires à ceux de la TA. Ces modifications de liaisons (R-ligand) correspondent bien à un échange puisque la courbe de dissociation (courbe n°3) est pratiquement en miroir avec la courbe d'association (courbe n°2) et que le nombre total de sites récepteurs reste constant tout au long de l'expérience (courbe n°1).

Nous remarquons que l'échange des stéroïdes n'est pas influencé par la nature du premier ligand. Quelque soit le premier ligand incubé (TA, Dex, RU 486), les réactions d'échange se déroulent d'une façon identique. De plus, nous notons que l'activité biologique du stéroïde (agoniste, antagoniste) n'influence pas non plus la réaction d'échange entre deux stéroïdes au niveau du site accepteur du récepteur (figures n° 24 et 25).

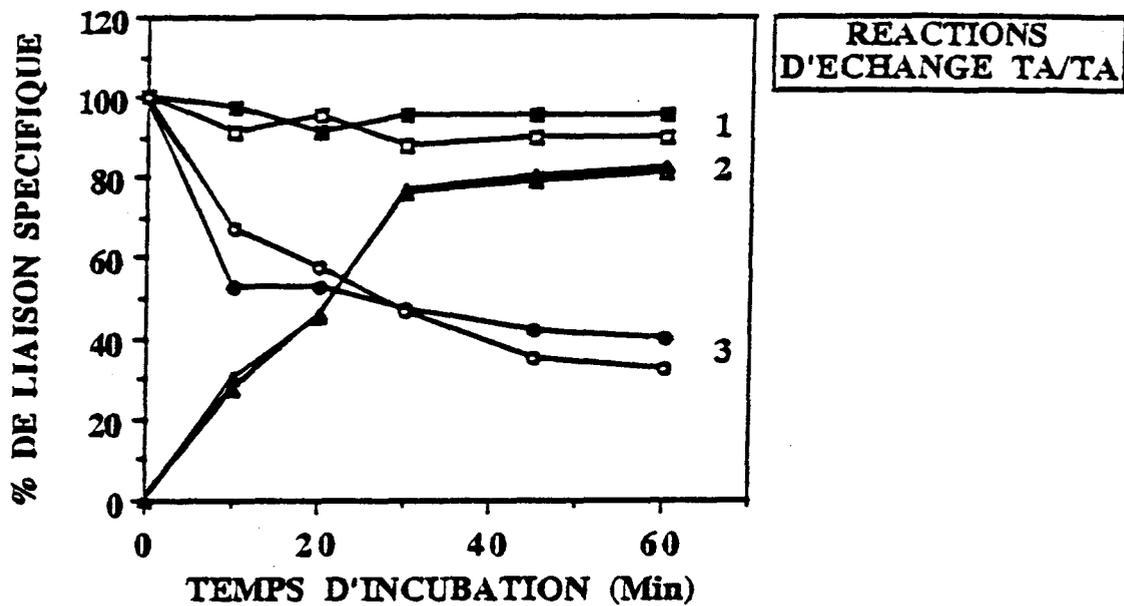
B) Influence des réactifs spécifiques d'acides aminés sur les échanges (post-incubation):

B-1) Influence de la NEM:

a) Incubation initiale avec la TA (figure n° 24):

Si le premier ligand incubé est la TA, quelque soit le deuxième stéroïde ajouté dans le milieu (TA, RU 486), les réactions d'échange ne sont pas affectées par la présence de la NEM. Les courbes, obtenues pour chaque réaction en présence ou en absence de NEM,

Ⓐ



Ⓑ

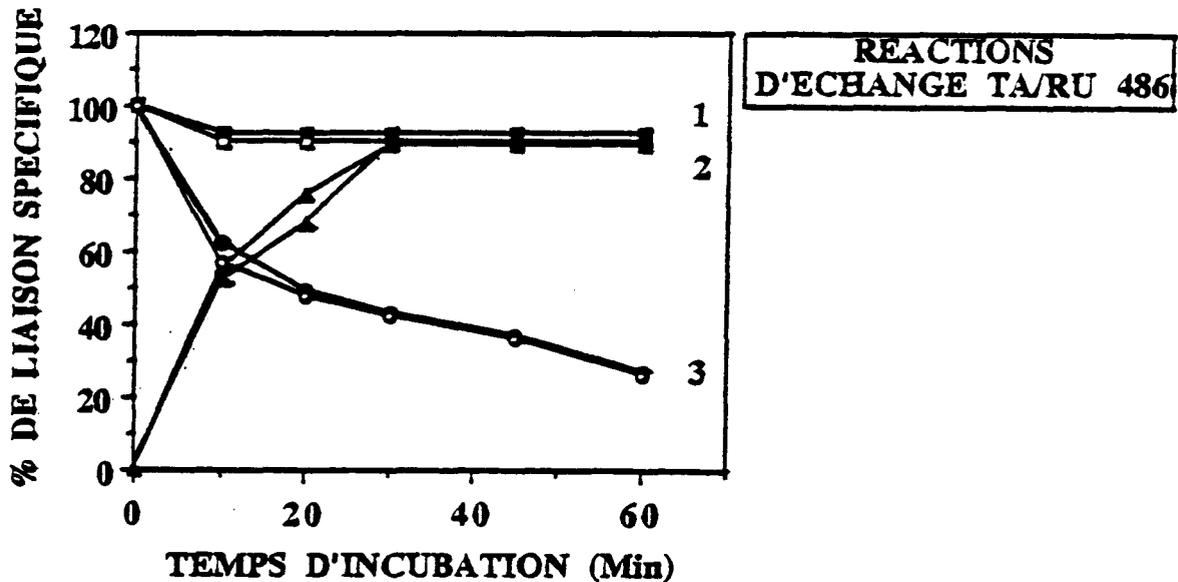


figure n°24

CINETIQUE D'ECHANGE DE LA TA

Après une première incubation du cytosol de foie de rat avec TA (10. nM), une nuit à 4°C, une réaction d'alkylation par la NEM est réalisée ($\square, \triangle, \circ$) ou non ($\blacksquare, \blacktriangle, \bullet$). La réaction est arrêtée par chromatographie de gel-filtration.

Les échantillons dessalés sont ensuite incubés avec un deuxième ligand (marqué ou non) à une concentration de 60 nM, en présence de 8% d'acétonitrile. Le deuxième ligand est soit la TA (panneau A), soit le RU 486 (panneau B). Aux temps indiqués, la fixation spécifique est déterminée en double par la méthode du DCC et les résultats finaux sont exprimés en pourcentage par rapport à la radioactivité initiale.

Courbe n°1: contrôle de stabilité.

Courbe n°2: échange ligand froid-ligand marqué.

Courbe n°3: échange ligand marqué-ligand froid.

sont pratiquement superposables entre elles (90 % de protection donnée par la TA vis-à-vis de la NEM).

Nous pouvons noter ici que la dexaméthasone donne encore des résultats similaires à ceux de la TA. Ces deux ligands (TA et Dex), liés au récepteur, protègent presque totalement les acides aminés essentiels du site rendant difficile voire impossible l'action de la NEM par la suite.

b) Incubation initiale avec le RU 486 (figure n° 25):

Si le premier ligand incubé est le RU 486, le résultat observé est fonction du deuxième ligand ajouté dans le milieu (TA ou RU 486):

α) Deuxième ligand ajouté: RU 486 (figure n° 25, a; panneaux A et B):

Nous observons dans ce cas un ralentissement de l'association spécifique entre le récepteur et le RU 486 marqué. L'échange se déroule, l'alkylation du ou des thiols par la NEM ne semble pas interrompre la liaison entre le récepteur et le RU 486. Ceci peut s'expliquer par l'existence d'un encombrement stérique provoqué par le groupement alkylant volumineux apporté par la NEM (structure cyclique) (voir les réactions de pré-incubation par la NEM et ses dérivés).

β) Deuxième ligand ajouté: la TA (figure n° 25, b; panneaux C et D):

Nous observons une absence presque totale de l'association spécifique entre le récepteur et la TA marquée. Il semble donc que le RU 486 n'a pas protégé (15-20 % maximum de protection donnés par RU 486 vis-à-vis de la NEM) le site actif de l'action de la NEM et que le deuxième ligand (TA) ne puisse alors remplacer le RU 486 quand celui-ci

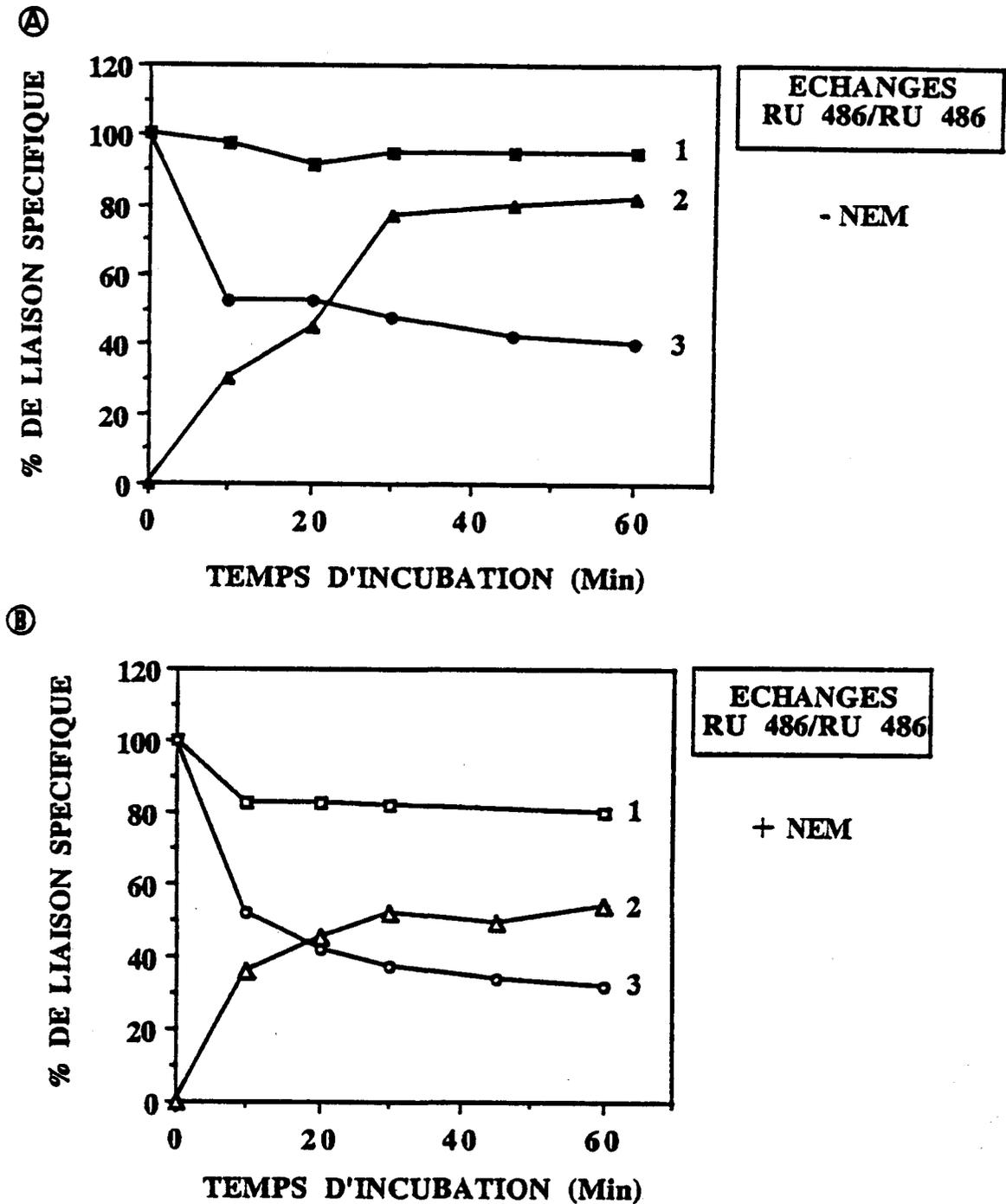
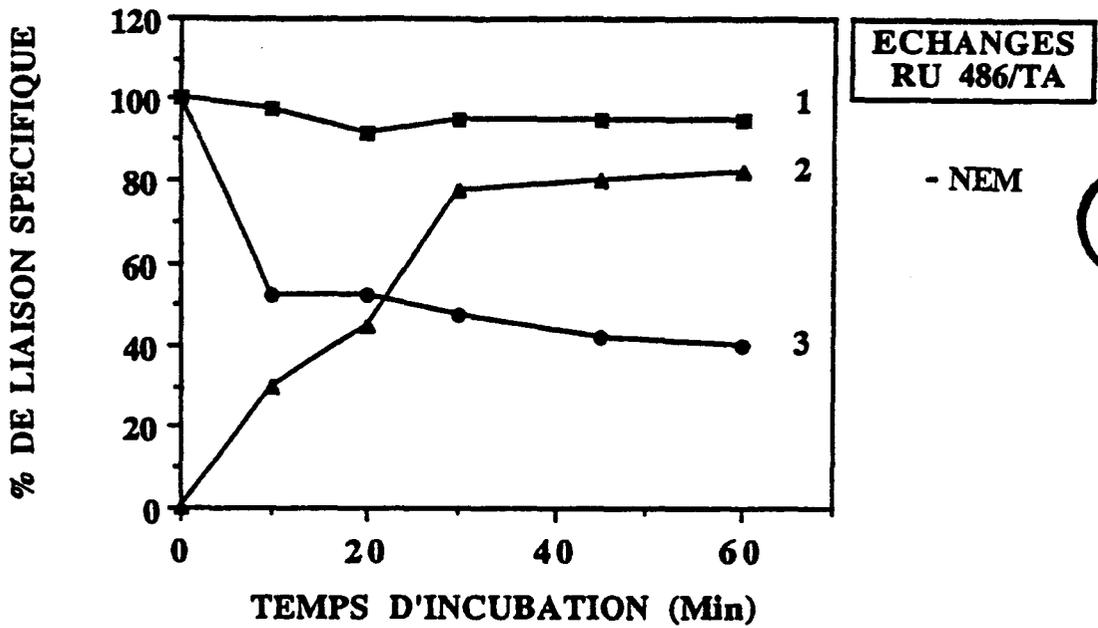


figure n° 25 a
CINETIQUE D'ECHANGE DU RU 486

Après une première incubation du cytosol de foie de rat avec RU 486 (10 nM), une nuit à 4°C, les échantillons sont traités comme décrit à la figure n° 24. L'échange est réalisé avec le RU 486 (panneaux A et B). La présentation des résultats distingue les échantillons traités par la NEM (panneau B) de ceux qui ne l'ont pas été (panneau A).

©



©

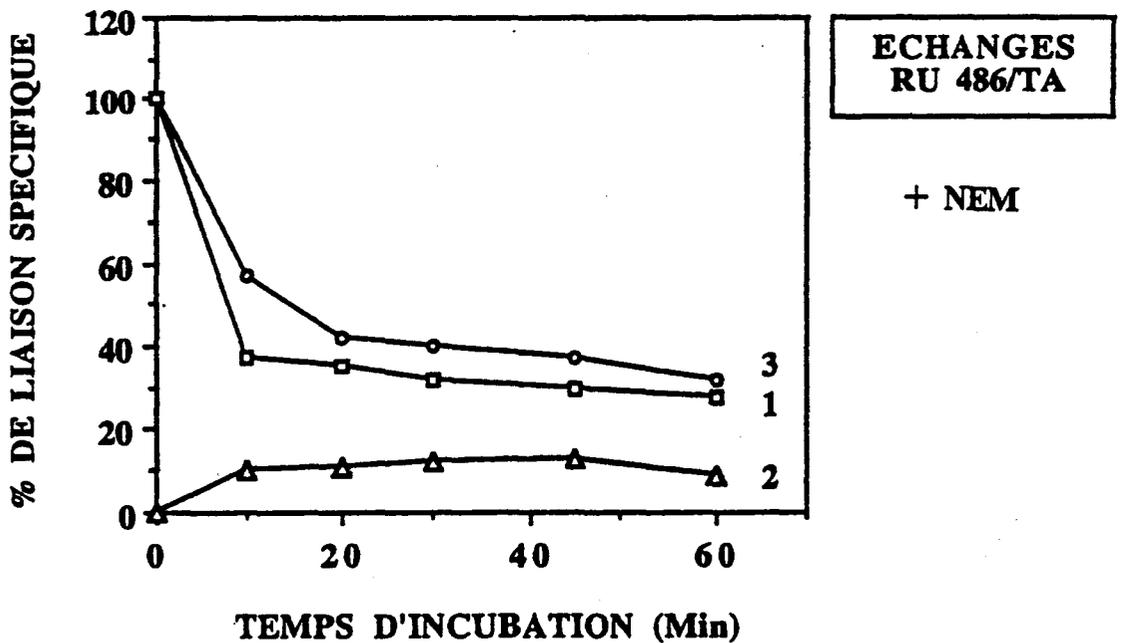


figure n° 25 b

CINETIQUE D'ECHANGE DU RU 486

Après une première incubation du cytosol de foie de rat avec RU 486 (10 nM), une nuit à 4°C, les échantillons sont traités comme décrit à la figure n° 24. L'échange est réalisé avec la TA (panneaux C et D). La présentation des résultats distingue les échantillons traités par la NEM (panneau D) de ceux qui ne l'ont pas été (panneau C).

est libéré du site. Ceci est d'ailleurs confirmé par l'absence de réassociation du récepteur, libéré du RU 486 marqué, avec la TA tritiée dans la réaction contrôle de stabilité.

B-2) Influence de l'IA:

Nous obtenons avec ce réactif des résultats identiques à ceux obtenus avec la NEM. La réassociation de la TA tritiée avec le récepteur libéré du RU 486 (échange RU 486/TA) non marqué est presque totalement inhibée (taux d'association observé inférieur ou égal à 20 %) alors que celle du RU 486 tritié est seulement ralentie (échange RU 486/RU 486). D'autre part, si le premier ligand incubé est la TA, quelque soit le deuxième ligand ajouté (échanges TA/TA et TA/RU 486), les réactions d'échange sont peu affectées par la présence de l'IA (figure n° 26). Les pourcentages obtenus en présence de l'IA sont pratiquement identiques à ceux obtenus en absence de ce réactif (non représentés sur la figure n° 26).

Il existerait bien un ou plusieurs groupement(s) thiol(s) au niveau du site actif, dont l'alkylation spécifique par la NEM ou l'IA, inhibe l'association entre le récepteur libéré et la TA et n'a, par contre, que très peu d'influence directe sur la fixation du RU 486 (figure n° 27).

Selon le premier stéroïde utilisé, les thiols essentiels sont protégés totalement ou partiellement vis-à-vis des réactifs spécifiques et sont donc alkylés ou non par la suite.

C'est pourquoi nous avons utilisé d'autres ligands connus du RGC, d'activité biologique et de structure chimique différentes, pour compléter ces résultats.

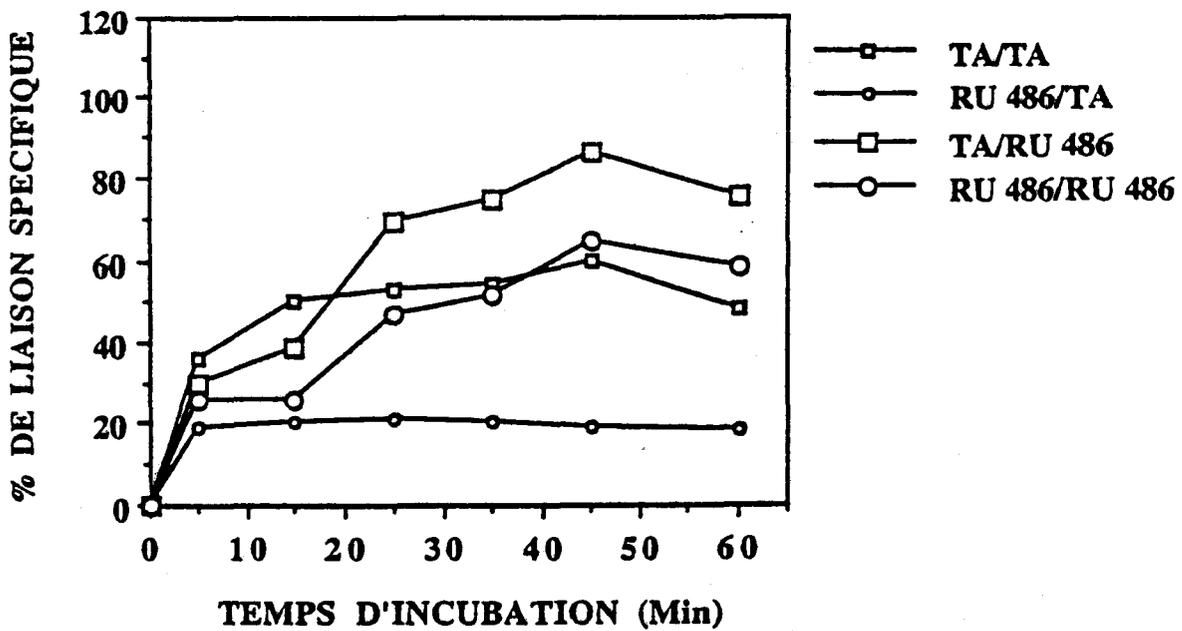


figure n°26

CINETIQUE D'ECHANGE DE STEROIDES APRES POST-INCUBATION AVEC L'IA
(échanges TA/TA, TA/RU 486, RU 486/RU 486, RU 486/TA)

Le cytosol de foie de rat est incubé une nuit à 4°C avec un premier ligand non marqué (10 nM). Une alkylation par l'IA est ensuite réalisée (6 mM, 30 minutes, 4°C) avant l'addition d'un deuxième ligand marqué (10 nM), de nature différente ou non, pour une réaction d'échange de stéroïdes en présence de 8% d'acétonitrile. Aux temps indiqués, la fixation spécifique est déterminée en double par la méthode du DCC et les résultats finaux sont exprimés en pourcentage par rapport à la radioactivité initiale.

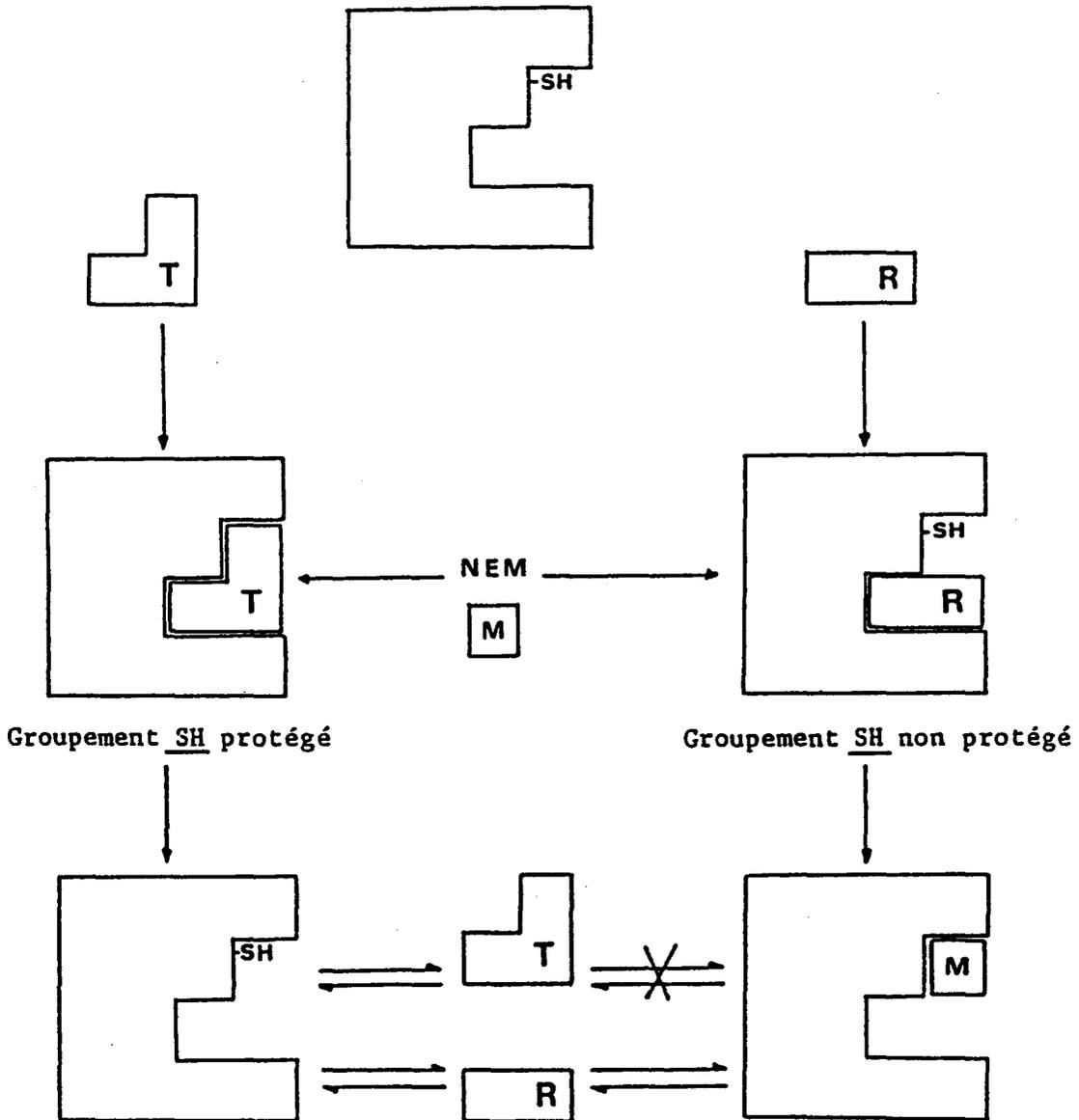


figure n°27

ILLUSTRATION DES RESULTATS
(ECHANGES TA ↔ RU 486)

L'accessibilité des groupements thiols par la NEM (M) à l'intérieur du domaine de liaison du stéroïde est différente selon le premier ligand utilisé (T: acétonide de triamcinolone ; R: RU 486). La liaison du deuxième ligand, en particulier celle de l'agoniste T, devient alors impossible dans certains cas. $\left[\begin{array}{c} \leftarrow \\ \rightarrow \end{array} \right]$

4) Réactions d'échange avec d'autres ligands du RGC.

Les ligands utilisés sont caractérisés par des substituants d'encombrement stérique variable sur les carbones n°3, 11 et 17, chacun ne différant des autres que par un seul substituant à la fois sur une même position considérée. Ces trois positions représentent des positions-clés dans la structure du stéroïde (rôle dans l'activité biologique et/ou dans la liaison du stéroïde au récepteur) (voir paragraphe n° F).

A) Influence du substituant en position 11 (RU 26988 et RU 28362):

Le RU 486, puissant antagoniste du RGC, diffère des agonistes habituels de ce récepteur (TA, Dex) sur deux points: une chaîne latérale de type propynyle en 17 α et surtout un groupement très volumineux en position 11. Deux stéroïdes, le RU 28362 et le RU 26988, ont été testés pour déterminer l'influence du substituant en position 11 sur la liaison du stéroïde. Ils sont caractérisés tous les deux par la présence d'un groupement hydroxyle en position 11 comme les glucocorticoïdes classiques et par la même chaîne latérale en 17 α que le RU 486. Le principal avantage de ces dérivés est leur capacité de se lier presque exclusivement au RGC avec une bonne affinité par rapport à celle d'un agoniste pur, la dexaméthasone. Par exemple, le dérivé RU 26988 a une affinité 1,5 fois supérieure à celle de la dexaméthasone pour le RGC de thymus de rat et une affinité pratiquement nulle pour tous les autres récepteurs stéroïdiens (RM, RA, RE et le récepteur de la progestérone).

En présence ou en absence de la NEM, ces deux ligands peuvent être mutuellement échangés avec par exemple un taux d'association de 50 % environ obtenu en trente minutes pour l'échange RU 26988 par la TA tritiée.

Ces deux dérivés semblent donc établir une protection partielle (50 % en moyenne)

des groupements thiols vis-à-vis de la NEM. Nous pouvons alors penser que la chaîne latérale en 17 α de type propynyl du RU 28362 et du RU 26988 joue donc le même rôle que celle en 17 β de type hydroxycétone (COCH₂OH) des agonistes purs du RGC. Du fait de l'absence du substituant volumineux en position 11 (remplacé par un hydroxyle) et de la présence du groupement carbonyle en 3, ces deux dérivés se positionneraient dans le site de la même manière ou presque que la TA ou la Dex pouvant alors développer une forte activité de type agoniste. Ils protégeraient alors plus ou moins les groupements thiols du site expliquant cette réassociation presque complète de la TA marquée avec le récepteur libéré. Mais, la question du mécanisme exact d'interaction entre la chaîne latérale de type propynyl de ces deux composés et les groupements thiols reste encore posée.

Par ailleurs, le groupement méthyl en position 6 du RU 28362 ne semble avoir aucune influence sur les résultats obtenus par rapport au RU 26988 qui n'en possède pas (résultats identiques pour les deux stéroïdes).

B) Influence du substituant en position 17 (le DXB):

D'autres ligands, dérivés de la dexaméthasone, possédant une chaîne latérale, aromatique ou non, en position 17 ont été testés. Parmi ceux-ci, se trouve le DXB, dérivé le plus actif. Celui-ci possède une bonne affinité (KD égal à 0,08-0,11 μ M) et une activité plutôt antagoniste partiel envers le RGC. C'est pourquoi l'existence de tyrosine(s) essentielle(s) proche des groupements thiols du site de liaison avait été évoquée ici pour expliquer cette bonne liaison du DXB (chaîne latérale aromatique) avec le RGC par rapport à tous les autres dérivés 17 β carboxamides de la dexaméthasone non aromatiques en position 17 (FORMSTECHE *et al*, 1984).

Si le premier ligand est le DXB (figure n° 28), la présence ou l'absence de la NEM modifie peu la réassociation du second ligand, de nature agoniste (TA) ou antagoniste (RU 486), avec le récepteur libéré.

Le DXB semble protéger le thiol essentiel du site (65 % de protection donnés par le DXB vis-à-vis de la NEM) et donc permettre la réassociation de la TA (deuxième ligand) avec le récepteur libéré, en présence de la NEM. Les résultats obtenus sont identiques à ceux observés avec la TA comme premier ligand.

C) Influence du substituant en position 3 (le COR):

La dernière position étudiée est le carbone n°3. Le déacylcortivazole (COR), un dérivé pyrazolo-corticoïde, est caractérisé par la présence d'un groupement très volumineux situé sur le carbone n°3 à la place du groupement carbonyle habituel. Ce composé est connu pour son activité glucocorticoïde agoniste remarquable et sa forte affinité pour le RGC (KD égal à 0,6 nM; SIMONS *et al*, 1979).

Si le premier ligand est le COR (figure n° 29), l'échange avec la TA ou le RU 486 est complet en l'absence de NEM.

Au contraire, seule la réassociation du RU 486 existe en présence de NEM, la réassociation de la TA étant pratiquement inhibée. Nous observons la même absence de réassociation de la TA avec le récepteur dans les échanges RU 486/TA et COR/TA en présence de NEM. Le COR ne semble donc pas protéger le thiol essentiel du site (15-20 % maximum de protection donnés par le COR vis-à-vis de la NEM) bien qu'il possède en 17 β la même chaîne latérale hydroxycétone que la TA ou la Dex.

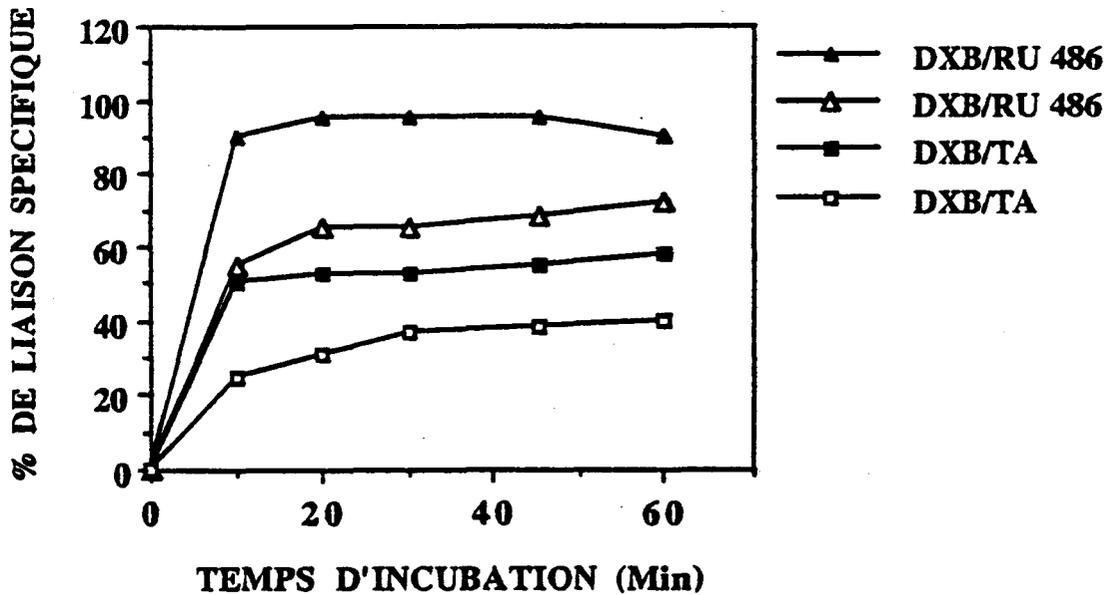


figure n°28

CINETIQUE D'ECHANGE DU DXB PAR TA OU PAR RU 486
(REACTION D'ASSOCIATION)

Après une première incubation du cytosol de foie de rat avec le DXB (100 nM et plus), une nuit à 4°C, les échantillons sont traités comme décrit à la figure n°24. L'échange est réalisé soit avec le RU 486 tritié soit avec la TA tritiée. La présentation des résultats distingue les échantillons traités par la NEM (△, □) de ceux qui ne l'ont pas été (▲, ■).

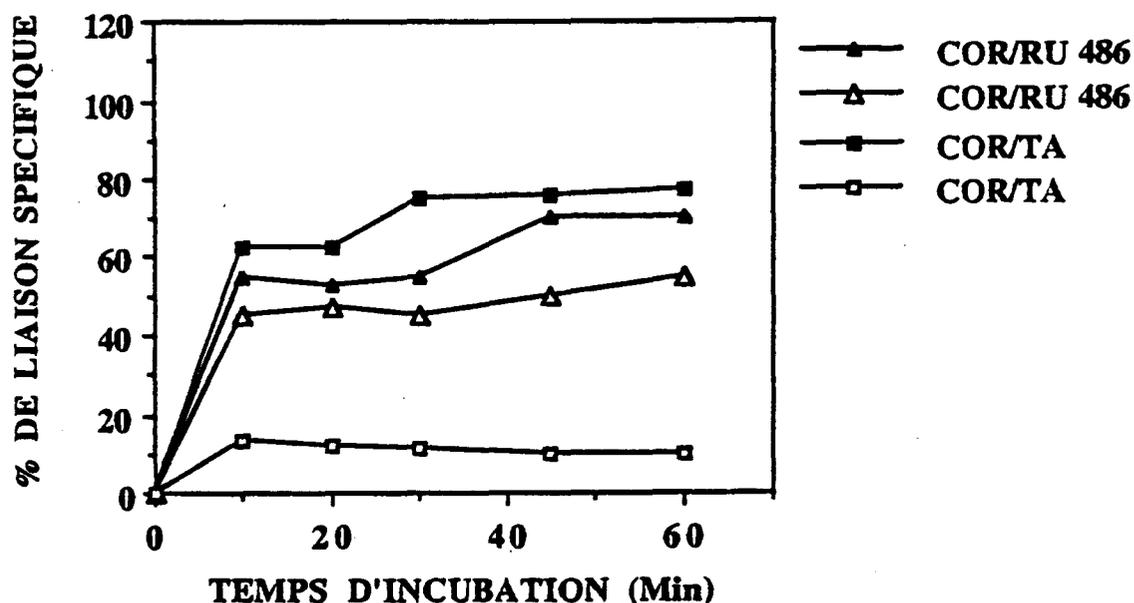


figure n°29

CINETIQUE D'ECHANGE DU COR PAR TA OU PAR RU 486

(REACTION D'ASSOCIATION)

Après une première incubation du cytosol de foie de rat avec le COR (15 nM), une nuit à 4°C, les échantillons sont traités comme décrit à la figure n°24. L'échange est réalisé soit avec le RU 486 tritié soit avec la TA tritiée. La présentation des résultats distingue les échantillons traités par la NEM (Δ, \square) de ceux qui ne l'ont pas été ($\blacktriangle, \blacksquare$).

Pour expliquer cette absence de protection, on peut penser que le COR se positionne d'une façon particulière dans le site du fait de la présence de ce groupement volumineux porté par le noyau aromatique A du squelette stéroïdien. Le positionnement final du COR est soit:

- similaire à celui du RU 486: ceci expliquerait la non-protection des groupements thiols mais pas l'activité biologique agoniste du COR par rapport à celle d'antagoniste du RU 486. Cette hypothèse est donc à rejeter.

- différent de celui du RU 486 et de celui de la TA ou de la Dex: d'une part, ceci expliquerait l'absence de protection des thiols du site. D'autre part, pour expliquer l'activité agoniste de ce composé, on peut penser que le COR se positionne d'une façon différente des agonistes habituels mais à proximité quand même d'une région du site indispensable à l'expression de cette activité agoniste.

A partir de ces résultats, nous pouvons penser que (tableau n° III):

a) La protection des thiols du site actif induite par le premier ligand est fonction de sa structure chimique (et surtout des substituants volumineux en position 3, 11 ou 17 du noyau stéroïdien) et/ou de son activité biologique. A première vue, la capacité d'un ligand à empêcher ou non l'action inhibitrice de la NEM sur la liaison de la TA n'est pas reliée à l'activité biologique agoniste ou antagoniste de celui-ci. En effet, nous avons obtenu une inhibition de la réassociation entre le récepteur libéré et la TA tritiée avec le COR (agoniste) ou le RU 486 (antagoniste) comme premier ligand (tableau n° III).

b) L'absence de la chaîne latérale en 17 β de type hydroxycétone (RU 486, RU 26988 et RU 28362) ne semble pas être responsable du manque de protection des groupes thiols par le RU 486 du fait de la protection partielle donnée par les deux autres dérivés. Il semble que c'est plutôt la présence du substituant volumineux en position 3 du COR ou en position 11 β du RU 486 qui serait responsable de cette absence de protection des thiols (tableau n° III).

Premier Ligand	Taux de Protection (%)
TA/DEX	90
RU 486	15-20
RU 28362	51
RU 26988	49
DXB	65
COR	15-20

Tableau n° III

**TAUX DE PROTECTION DES ACIDES AMINES ESSENTIELS DU SITE DONNE PAR LE
PREMIER LIGAND INCUBE VIS-A-VIS DE LA NEM**

Après une nuit d'incubation à 4°C en présence de 15 nM d'un ligand non marqué (**premier ligand**), le cytosol est traité par la NEM avant d'être soumis à une réaction d'échange en présence de 15 à 60 nM de la TA marquée (deuxième ligand) pendant 60 minutes.

La radioactivité liée spécifiquement est déterminée par DCC et le **taux de protection** (exprimé en pourcentage) des acides aminés essentiels du site donné par le premier ligand est calculé par rapport à l'échange-témoin correspondant (cytosol non traité par la NEM).

c) La taille d'un glucocorticoïde classique (TA, Dex) a été mesurée par radiocristallographie. Les distances C3-C17 et O3-O21 sont égales à 8.5 et 11 Å respectivement (DUAX *et al*, 1976). Par ailleurs, la distance entre les acides aminés situés en face du groupement carbonyle en position 3 et ceux vis-à-vis de la chaîne latérale 17 β est estimée à 13 Å environ. Le substituant volumineux en position 3 du COR augmente de 5 à 6 Å environ la taille de ce ligand à partir du noyau A du squelette stéroïdien de base. De plus, la profondeur de la poche hydrophobe 11 β a été explorée par l'utilisation d'analogues du RU 486 et estimée à environ 10-12 Å (TEUTSCH, 1984). D'autre part, des dérivés 17 β carboxamides de la Dex montrent que l'affinité de liaison au récepteur est affectée à partir d'une distance supérieure à 10 Å du carbone 17.

Dans l'hypothèse d'un site unique de structure rigide possédant des poches ou sous-sites bien définis, nous avons du mal à imaginer comment le DXB, le COR et le RU 486 pourraient se positionner de façon identique aux ligands classiques au niveau de celui-ci. En effet, les substituants en position 3, 11 et 17 augmentent parfois la taille totale du ligand de façon non négligeable. De plus, un positionnement similaire n'expliquerait pas le manque de protection des groupements thiols par le RU 486 ou le COR. D'autre part, toujours dans l'hypothèse d'un positionnement identique, on peut se demander comment un fragment de 16 kDa (méro-récepteur) obtenu par protéolyse limitée (de taille inférieure certainement à 20 Å) (WRANGE et GUSTAFSSON, 1978) pourrait encore fixer, avec une assez bonne affinité, le RU 486 et le COR. L'existence de deux sites pour le Cortivazole a été évoquée mais elle reste encore de nos jours très peu argumentée (SVEC *et al*, 1989; SRIVASTAVA et THOMPSON, 1990).

Pour expliquer nos résultats et la bonne conservation de la capacité et de la spécificité de liaison de ce fragment, deux hypothèses peuvent être avancées:

- soit les ligands se positionnent différemment au niveau d'un site unique de structure rigide en fonction de leurs substituants présents en position 3, 11 et 17.

- soit l'interaction ligand-récepteur possède un caractère plus dynamique. Le ligand, dans ce cas, lors de sa fixation, adapterait la conformation du site à sa structure chimique. Ceci suppose que le site possède une certaine capacité de flexibilité permettant de s'adapter au ligand fixé (CHAKRABORTI *et al*, 1992). Ce phénomène existe dans certains systèmes enzyme-substrat où ce dernier induit la conformation fonctionnel du site actif enzymatique lors de sa fixation ("moulage du site" à l'image du substrat).

La figure n° 30 illustre les résultats obtenus sur le positionnement supposé des ligands que nous avons utilisés à l'intérieur du domaine E/F.

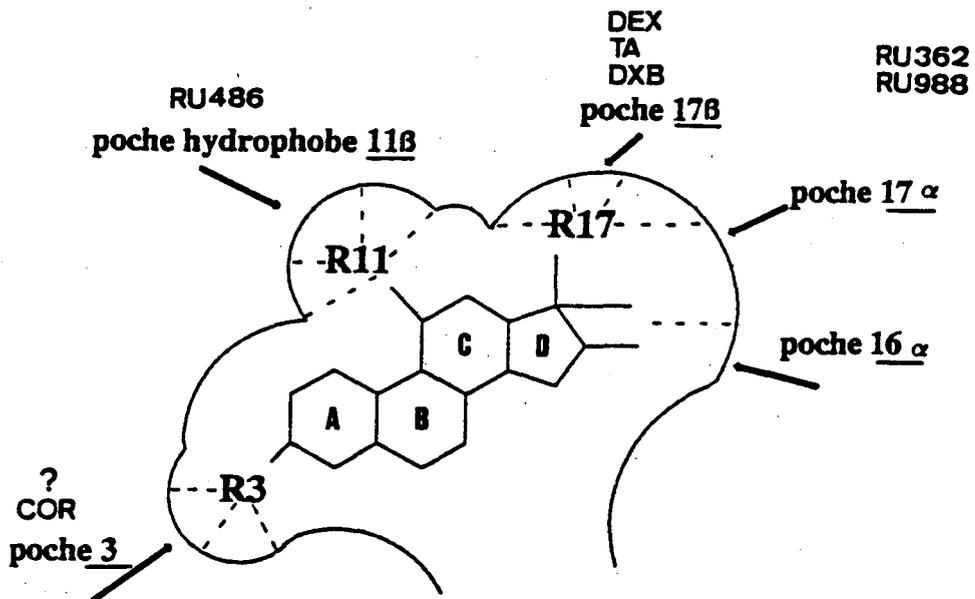


figure n°30

Positionnement hypothétique du ligand
à l'intérieur du site actif du RGC

5) Essai d'identification directe du ou des groupements thiol(s) concerné(s).

Pour poursuivre ce travail, nous avons tenté une identification directe du ou des résidus cystéine(s) concerné(s) par marquage covalent avec la NEM tritiée. Le mode opératoire utilisé est le suivant (figure n° 31): le récepteur, préparé sous forme non transformée (tampon contenant du molybdate de sodium) et purifié ensuite partiellement par précipitation sélective (précipitation double: d'abord avec le sulfate de streptomycine puis avec le sulfate de protamine) est incubé une nuit à 4°C avec un premier ligand non marqué de forte affinité (agoniste de référence), protégeant tous les acides aminés essentiels du site de liaison. Le complexe ainsi formé est mis en contact avec la NEM non marquée pour neutraliser tous les résidus de cystéines extérieures au site et supposées non essentielles. La réaction d'alkylation est arrêtée par addition de β -mercaptoéthanol. Après dessalage, nous avons ensuite réalisé deux réactions d'échange distinctes (figure n° 31) en présence de 8 % d'acétonitrile:

- La première réaction (1) est réalisée entre l'agoniste de référence et la NEM tritiée ("deuxième ligand"). Cette réaction a pour but de marquer tous les acides aminés du site essentiels pour la fixation de l'agoniste et donc protégés par celui-ci.

- Le deuxième échange (2) est réalisé entre l'agoniste de référence et un antagoniste (deuxième ligand) avant l'addition de la NEM tritiée. Cette réaction a pour but de marquer cette fois-ci les acides aminés non protégés et donc non essentiels pour la liaison de l'antagoniste.

L'excès des ligands et des réactifs est éliminé par gel-filtration. La radioactivité donnée par la NEM tritiée liée est mesurée sur un compteur à scintillation liquide. Par comparaison des deux réactions (1) et (2), nous espérons mettre en évidence les acides aminés propres, essentiels uniquement pour la liaison de l'agoniste.

Malheureusement, nous n'avons pu aboutir du fait de la trop faible quantité de récepteur présent dans le tissu utilisé (foie de rat), même après purification partielle par précipitation sélective. Le deuxième problème que nous avons rencontré est la concentration à utiliser en NEM tritiée (coût élevé), de l'ordre du mM, pour avoir une alkylation spécifique des groupements thiols. Le rendement de marquage covalent que nous avons obtenu a été très faible par rapport à la concentration initiale en NEM tritiée utilisée rendant impossible toute autre manipulation.

Quelques solutions peuvent être envisagées pour pallier les difficultés rencontrées. Concernant la quantité de récepteur, nous pouvons:

- soit utiliser un autre tissu contenant un taux en récepteur supérieur (cette solution semble peu envisageable),
- soit réaliser une surexpression du gène codant pour le récepteur en vue d'une production en masse de celui-ci dans un système eucaryote ou procaryote.

D'autre part, pour limiter le coût de la manipulation, on peut envisager un autre système de marquage (fluorescence,...) de la NEM plus sensible et facilement détectable (cette solution semble aussi peu envisageable).

Une autre solution serait de réaliser le marquage de la protéine étudiée par la NEM non marquée et de soumettre ensuite l'échantillon à une méthode capable de déterminer le ou les résidus d'acides aminés alkylés (Spectrométrie de masse en mode électrospray par comparaison des séquences et des masses des échantillons alkylés ou non [témoin]).

2^{ème} partie

"Stéroïdes marqueurs d'affinité"

Comme nous l'avons signalé précédemment, le marquage d'affinité est une des méthodes intéressantes pouvant être utilisée pour localiser et identifier des résidus d'acides aminés supposés cruciaux dans l'interaction d'un ligand quel qu'il soit avec une molécule réceptrice.

Très peu d'acides aminés appartenant au domaine de liaison au ligand du RGC ont été identifiés par cette méthode:

- la cystéine n° 656 du RGC de rat en utilisant le mésylate de dexaméthasone (antagoniste faible du RGC),
- la cystéine n°754 et la méthionine n°622 du RGC de rat et la cystéine n°644 du RGC de souris (équivalente à la Cys 656) en utilisant l'acétonide de triamcinolone marquée (agoniste pur du RGC) (par photoaffinité).

Mais, en regardant les résultats rapportés dans la première partie de ce travail, il serait plus intéressant de:

- disposer de marqueurs d'affinité covalents dérivés du COR pour connaître le positionnement de celui-ci au niveau du site accepteur et en particulier le positionnement du substituant volumineux porté par le noyau A (carbone n°3) du squelette de base. En effet, les premières tentatives réalisées avec le mésylate de COR furent un échec. Ce dérivé, d'activité agoniste, est incapable de se lier de manière covalente au RGC (LAMONTAGNE *et al*, 1984).

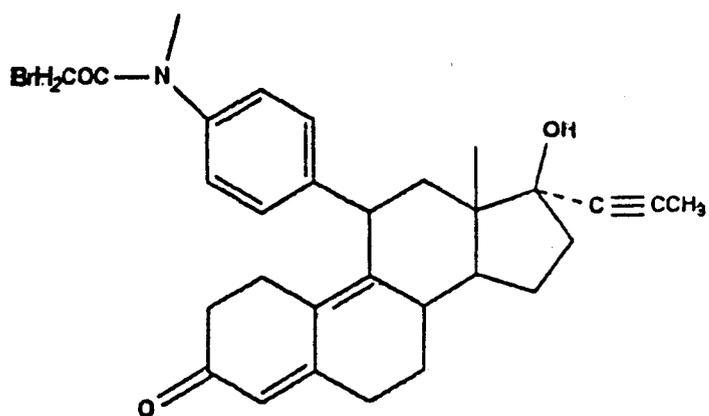
- disposer de marqueurs d'affinité covalents dérivés du RU 486, antagoniste caractérisé lui par un substituant volumineux en position 11, pour connaître le positionnement de ce ligand au niveau du site accepteur et en particulier le positionnement du substituant volumineux.

En effet, le positionnement final de ce substituant en position 11 β du RU 486 au niveau du domaine de liaison semble important pour générer l'activité agoniste ou antagoniste (TEUTSCH, 1984). De plus, la taille et la nature (linéaire ou aromatique) de ce substituant en position 11 β interviendraient aussi (BENHAMOU *et al*, 1992). Pour l'instant, un seul résidu, au niveau de cette poche, a été identifié par mutagénèse dirigée. Il s'agit d'un résidu glycine en position 722 pour le RP humain correspondant à la glycine 567 du RGC humain. La mutation de ce résidu inhibe aussi bien la liaison du RU 486 au RP humain qu'au RGC humain respectivement.

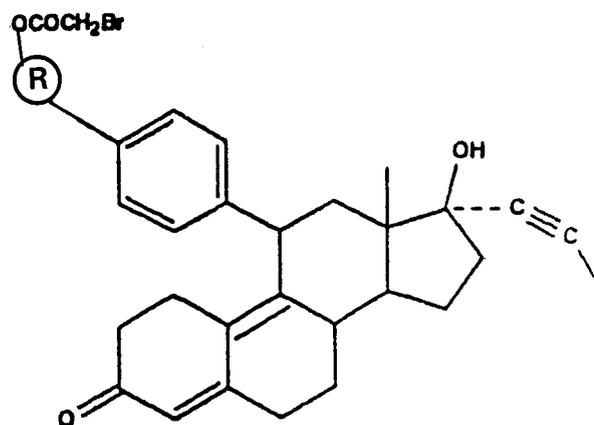
C'est pourquoi nous avons étudié six ligands antagonistes, dérivés du RU 486 (synthétisés par Roussel-Uclaf), dans le but de trouver parmi eux des marqueurs d'affinité potentiels. Tous ces ligands possèdent un groupement carbonyle en position 3. Pour les deux autres positions-clés (11 et 17), nous pouvons distinguer parmi ceux-ci (figure n° 32, a, b):

a) des ligands présentant un substituant en position 11 β de type aromatique substitué portant une fonction réactive halogénée (RU 44592, RU 57273) ou aziridine (RU 55876). De plus, leur chaîne latérale en position 17 est identique à celle du RU 486 (17 α propynyl).

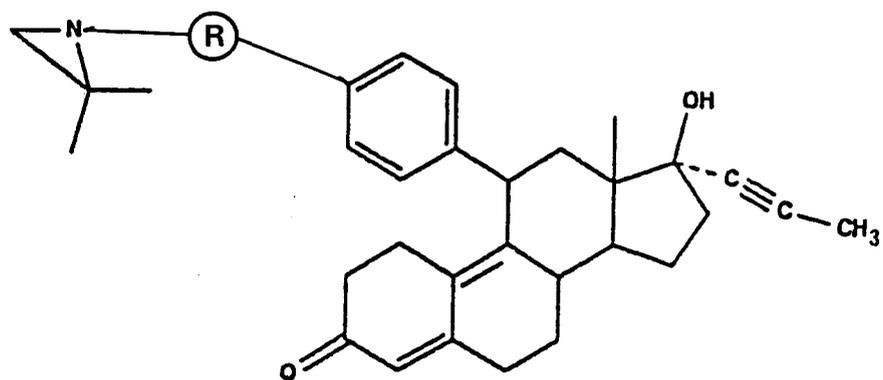
b) des ligands présentant un substituant type propynyl en position 17 portant une fonction réactive halogénée ($R^+ X^-$) en 17 α pour le RU 56894 et le RU 52585 ou en 17 β pour le RU 57198. De plus, leur substituant en position 11 β est identique (RU 56894) ou non (RU 57198, RU 52585) à celui du RU 486.



RU 44592



RU 57273



RU 55876

figure n° 32, a

STRUCTURE CHIMIQUE DES STEROIDES UTILISES

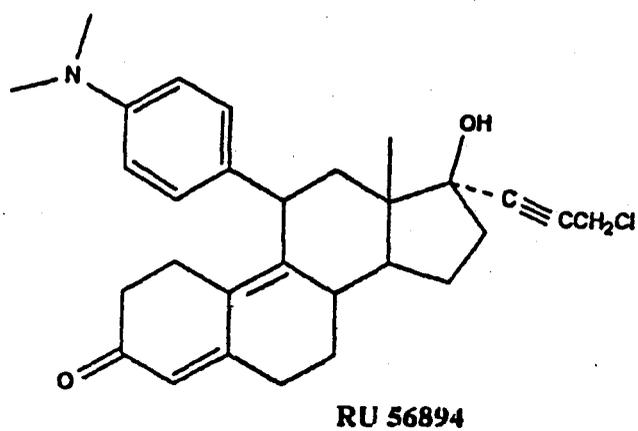
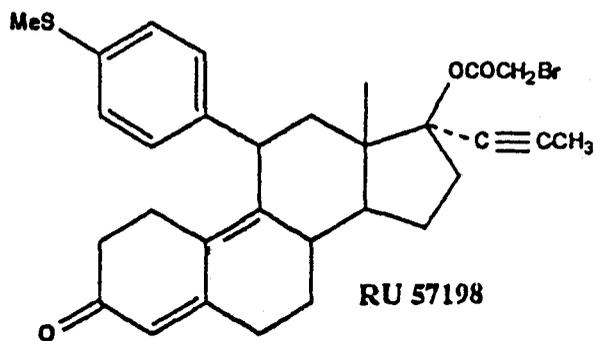
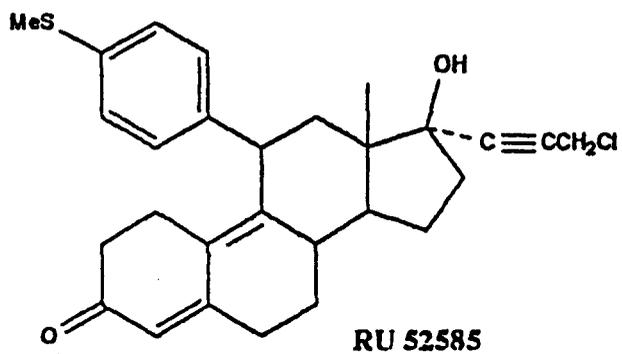


figure n° 32, b

STRUCTURE CHIMIQUE DES STEROIDES UTILISES

Nous avons caractérisé ces différents ligands sur deux aspects essentiels:

- a) Détermination des paramètres de liaison de ces stéroïdes au RGC:

- Mesure de leur affinité de liaison par réactions de compétition.

- Etude de leur caractère échangeable pour mettre en évidence l'existence ou non d'un marquage covalent. En effet, si le ligand est fixé de façon covalente au récepteur, celui-ci ne pourra être échangé.

-b) Détermination des paramètres physico-chimiques du complexe récepteur-ligand par chromatographie de gel-filtration haute performance.

1) Mesure de l'affinité de liaison des différents stéroïdes pour le RGC par réactions de compétition.

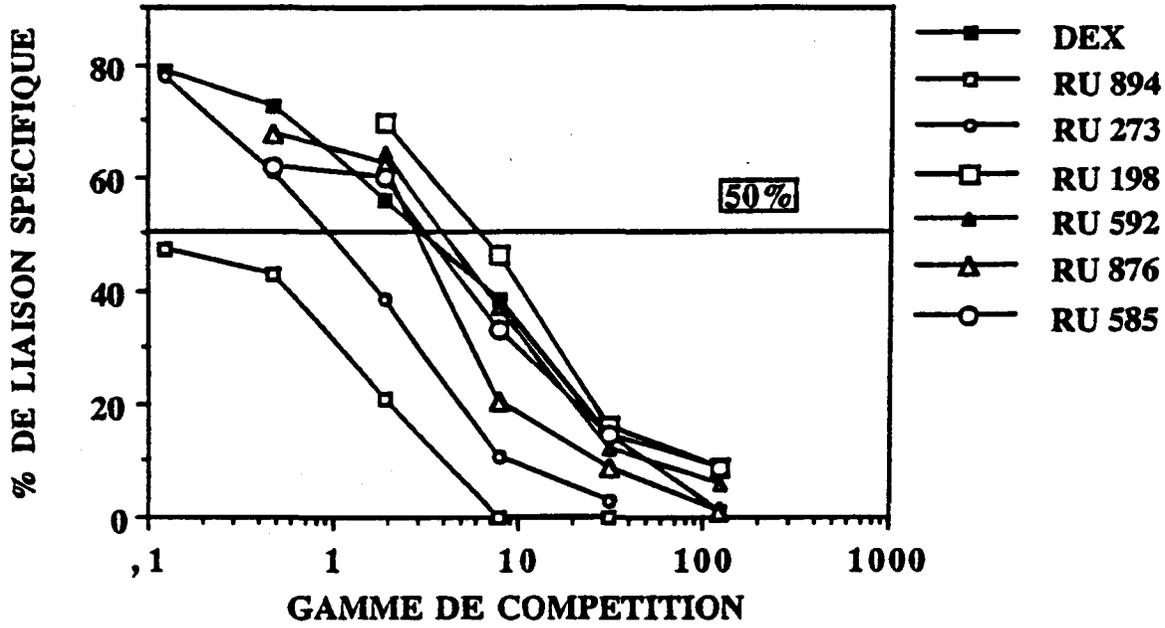
Celle-ci est déterminée par rapport à un agoniste pur de référence du RGC, l'acétonide de triamcinolone (TA) tritiée, par réactions de compétition.

Nous avons utilisé la méthode classique des réactions de compétition, méthode détaillée dans l'appendice technique. La constante d'affinité du ligand compétiteur (K_i) peut être calculée à partir de la formule indiquée ci-dessous:

$$K_i = \frac{K_D \times I_{50\%}}{F_{50\%} + K_D}$$

K_D représente la constante de dissociation de la (3H) TA à l'équilibre (de l'ordre de 0,12 à 1,6 nM). $F_{50\%}$ représente la concentration de (3H) TA libre, non liée au récepteur pour une concentration totale de compétiteur non marqué (I_t) égale à $I_{50\%}$. Ce facteur est calculé à partir de la concentration totale en récepteur qui est déterminée à partir des tubes T et B témoins (cpm obtenus) et de l'activité spécifique du ligand radioactif utilisé. $I_{50\%}$ représente la concentration de ligand compétiteur nécessaire pour obtenir 50 % d'inhibition de la liaison (3H) TA-récepteur. Le facteur $K_D/F_{50\%} + K_D$ représente un facteur de correction car, en simplifiant à l'extrême, K_i est de l'ordre de valeur de $I_{50\%}$. Les valeurs de $I_{50\%}$ (obtenues graphiquement) et celles de K_i (calculées à partir de la formule indiquée ci-dessus) sont indiquées sur la figure n° 33.

Le stéroïde compétiteur possédant la plus forte affinité pour le RGC est le RU 56894. Nous obtenons 50 % d'inhibition de la liaison de la TA tritiée au récepteur pour une concentration inférieure à 1,22 nM (courbe la plus à gauche sur le graphe). Ce résultat pouvait être attendu vu la similitude extrêmement élevée de la structure chimique de ce composé avec celle du RU 486. La seule différence structurale réside dans le remplacement



Stéroïde compétiteur	Valeurs de I 50 % (x 10 ⁻⁹ M)	Valeurs de Ki (x 10 ⁻⁹ M)
Dex	37,5	6
RU 57273	9,4	1,5
RU 56894	< à 1,22	0,21
RU 44592	37,5	6
RU 57198	63	10,1
RU 55876	44,6	7
RU 52585	50	10

figure n° 33

AFFINITE DE LIAISON DES DIFFERENTS STEROIDES POUR LE RCG

d'un atome d'hydrogène par un atome de chlore en position 17 α . Nous avons ensuite le RU 57273 qui possède une affinité légèrement plus faible que celle du RU 56894. Enfin, nous observons que les quatre derniers composés possèdent une affinité pratiquement semblable entre eux et extrêmement proche de celle de la dexaméthasone qui constitue notre ligand compétiteur de référence. Nous pouvons en déduire, au vu de ces résultats, que tous ces ligands dérivés du RU 486 (voir les structures chimiques correspondantes) possèdent une affinité dans l'ensemble élevée pour le RGC égale ou supérieure à celle de la dexaméthasone. Nous obtenons une inhibition presque totale de la liaison de la TA tritiée au récepteur pour la majorité de ces produits à partir d'une concentration égale à 0,3125 μM .

2) Réactions d'échange entre stéroïdes au niveau du domaine de liaison du ligand.

Nous avons effectué une réaction d'échange entre chacun de ces dérivés et la dexaméthasone marquée (cinétique d'association) par rapport à un témoin (cinétique d'association de l'échange Dex par Dex tritiée).

Il est évident que si le ligand étudié est bien un marqueur d'affinité covalent, l'échange de celui-ci avec la Dex marquée ne pourra se faire. Le taux d'association du deuxième ligand avec le récepteur libéré sera fonction du taux (pourcentage) de liaisons covalentes obtenues entre le récepteur et le premier ligand incubé.

Le cytosol de thymus de rat est mis en contact avec chacun de ces dérivés, deux heures à une nuit, à 4°C. Quatre de ces composés ainsi que la Dex non marquée (témoin) ont été utilisés à une concentration égale à 1,25 μM , concentration donnant 0 % de liaison entre la TA tritiée et le récepteur dans les réactions de compétition (voir paragraphe précédent). Les deux derniers dérivés c'est-à-dire le RU 56894 et le RU 57273, dérivés d'affinité plus élevée, ont été utilisés quant à eux à une concentration de 0,3125 μM . La réaction d'échange s'effectue en présence de 10 nM de Dex marquée (deuxième ligand) et de 8 % d'acétonitrile selon le mode opératoire décrit dans la partie "Appendice technique".

La figure n° 34 illustre toutes les réactions d'échange entre ces marqueurs et la dexaméthasone tritiée par rapport à la réaction-témoin Dex par Dex marquée. Nous remarquons que, dans les conditions décrites précédemment, un échange s'effectue bien entre les stéroïdes. En effet, nous observons une association entre la Dex tritiée et le récepteur libéré. Mais, et c'est le point le plus important, le taux maximum d'échange atteint (exprimé en pourcentages) varie selon le premier stéroïde utilisé.

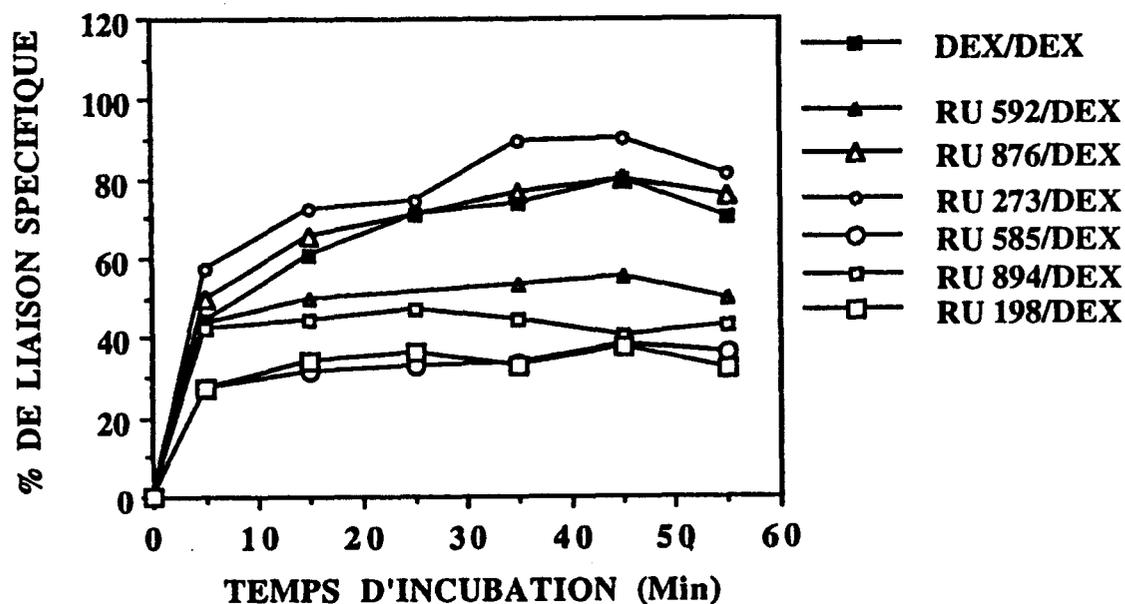


figure n°34
CINETIQUE D'ECHANGE DE STEROIDES

Le cytosol de thymus de rat est mis en contact une nuit à 4°C avec un premier ligand non marqué (voir ci-dessous). L'excès de celui-ci est ensuite éliminé par la méthode du DCC avant l'addition d'un deuxième ligand marqué (Dex: 15 nM) en vue d'une réaction d'échange de stéroïdes en présence de 8% d'acétonitrile. Aux temps indiqués, la fixation spécifique est déterminée en double par DCC et les résultats finaux sont exprimés en pourcentage par rapport à la radioactivité initiale.

Premiers ligands utilisés:

Dex, RU 592, RU 876, RU 198, RU 585, RU 894 et RU 273.

Les cinq premiers sont utilisés à la concentration de 1,25 μM , les deux derniers à 0,3125 μM .

En étudiant plus en détail cette figure n° 34, nous pouvons dire que:

- a) Le **RU 57273** et le **RU 55876** s'échangent de la même manière que la **Dex**. Le taux maximum d'association atteint entre la **Dex** marquée et le récepteur libéré de ces trois ligands est de 80 % en moyenne.
- b) Le **RU 44592** est échangé quant à lui à 55 % maximum en 45 minutes de réaction.
- c) Le taux maximum d'échange des trois derniers dérivés avec la **Dex** tritiée est inférieur ou égal à 45 %. Nous obtenons, en détaillant, 42,5 % en moyenne pour le **RU 56894** et 35 % pour le **RU 52585** et le **RU 57198**.

Nous obtenons les mêmes résultats dans les réactions d'échange avec le **RU 486** tritié comme deuxième ligand. La réaction d'échange se déroule de façon identique quelque soit le deuxième ligand utilisé (**Dex** ou **RU 486**). Le deuxième ligand utilisé n'a pas d'influence sur le déroulement de la réaction d'échange et n'a aucune conséquence sur le faible pourcentage de réassociation trouvé.

Par ailleurs, nous avons remarqué que l'augmentation du temps d'incubation (passant de deux heures à une nuit) du premier ligand n'avait que peu d'influence sur le déroulement de la réaction d'échange qui devait suivre.

Les deux dérivés qui nous semblent les plus intéressants dans l'objectif du marquage d'affinité sont le **RU 52585** et le **RU 56894** vu leur taux d'échange relativement faible par rapport aux échanges-témoins (**Dex/Dex tritiée**; **RU 486/RU 486 tritié**).

3) Détermination de l'état activé ou non des complexes RU 52585-RGC et RU 56894-RGC.

Pour expliquer le taux d'échange peu élevé de certains de ces dérivés avec la Dexaméthasone tritiée, deux hypothèses au moins peuvent être formulées:

- soit il y a vraiment formation d'une ou de plusieurs liaisons covalentes entre le premier ligand et un ou plusieurs résidus d'acides aminés appartenant au site de liaison.
- soit il y a transformation du récepteur secondaire à la fixation du ligand. Dans ce cas, le récepteur étant sous une forme activée, aucun échange ne peut être observé (voir paragraphe n° V, 1^{ère} partie de la revue générale). Cette hypothèse, à priori peu vraisemblable puisqu'on travaille en présence de molybdate de sodium, mérite pourtant d'être vérifiée.

C'est pourquoi nous avons réalisé une chromatographie de gel-filtration (HPSEC) pour avoir une idée de l'état du récepteur (forme transformée ou non transformée) après la liaison du RU 52585 et du RU 56894. Ceci a été fait en parallèle avec la Dex et le RU 486, ce dernier étant reconnu comme un stabilisateur du récepteur sous forme non transformée (voir paragraphe n° III, 1^{ère} partie de la revue générale).

La colonne utilisée est une TSK G 3000 SW analytique précalibrée (figure n° 35, partie B) et prééquilibrée dans un tampon à base de Tes (20 mM), pH 7,0.

Le cytosol de thymus de rat est incubé une nuit à 4°C en présence de la Dexaméthasone tritiée (15 nM), du RU 486 tritié (15 nM), du RU 52585 (1,25 μ M) ou du RU 56894 (0,3125 μ M) et injecté sur la colonne. Le débit de la colonne est de 0,5 ml/min. Les fractions sont collectées et analysées ensuite de trois façons différentes:

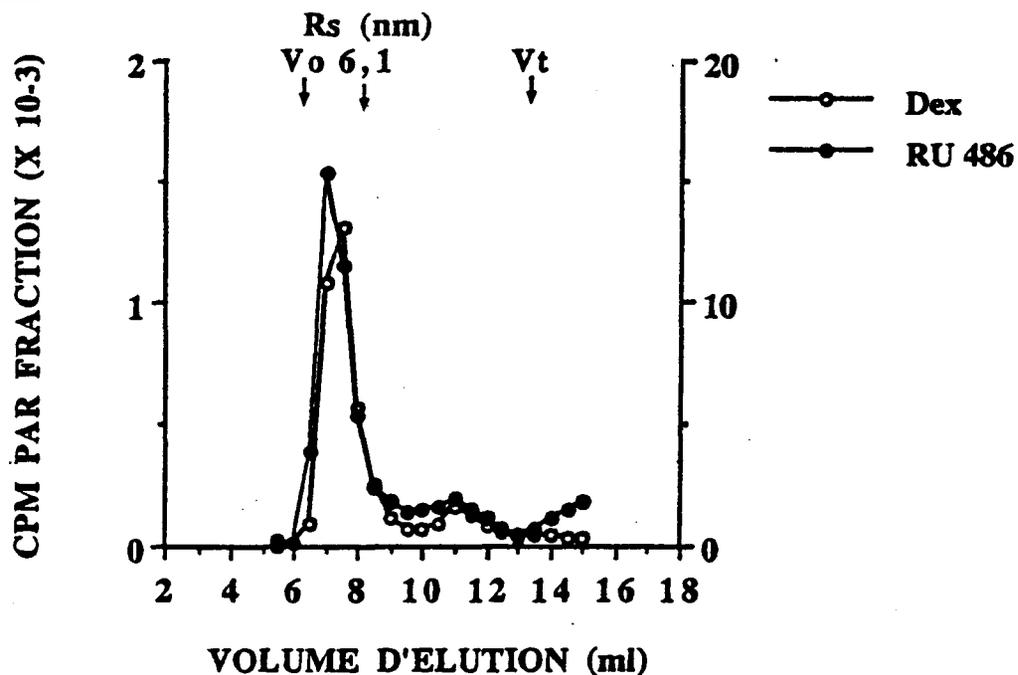
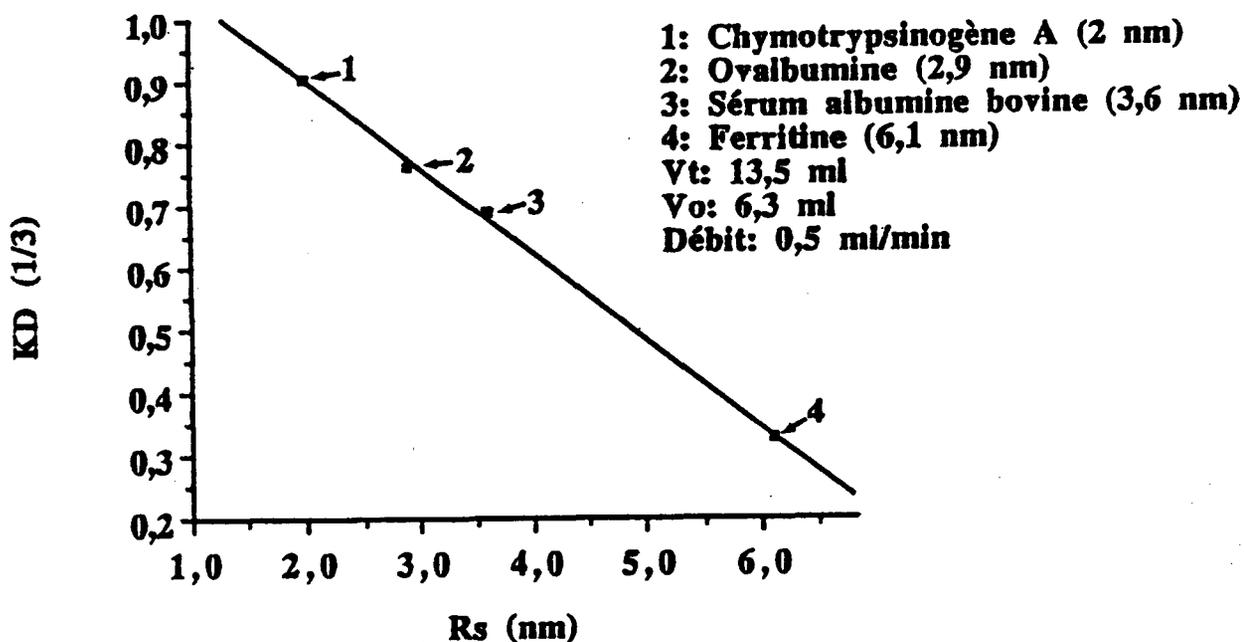
Partie A:**Partie B:****Calibration TSK G 3000**

Figure n° 35

MESURE DU RAYON DE STOKES DU RECEPTEUR SUR LA TSK G 3000 SW

Partie A: Un aliquote de chaque fraction récoltée est mesuré en radioactivité (cpm par fraction).

Partie B: Courbe de calibration obtenue à partir de protéines standards, dont les rayons de Stokes sont connus.

- a) Une aliquote est prélevée pour le comptage de la radioactivité uniquement pour les échantillons de cytosol incubés avec la Dex et le RU 486 qui nous servent de témoin d'élution. La figure n° 35, partie A, montre le pic d'élution de ces deux échantillons à travers cette colonne analytique. Celui-ci est obtenu dans les deux cas entre la 14^{ème} et la 15^{ème} minute ou entre 7 et 7,5 ml respectivement ce qui situe ce pic entre le volume mort (V_0) de la colonne (correspondant à un rayon de Stokes de 8 nm environ) et le volume d'élution de la ferritine de rayon de Stokes de 6,1 nm. Ce pic majeur d'un rayon de Stokes d'environ 7 nm représente logiquement la radioactivité liée, associée spécifiquement au récepteur (complexes non transformés Dex-RGC et RU 486-RGC).

- b) La présence du récepteur est également détectée dans les fractions éluées par la technique de dot-blot (figure n° 35, partie C). L'anticorps utilisé est un anticorps monoclonal anti-RGC produit par le groupe de GUSTAFSSON (OKRET *et al*, 1984 et 1985). Dans tous les échantillons, le récepteur est détecté majoritairement dans les fractions obtenues à un volume d'élution de 7 à 7,5 ml, c'est-à-dire à la position d'élution des complexes récepteurs non transformés déjà visualisés par le ligand radioactif. Ceci s'applique aussi aux complexes RU 52585-RGC et RU 56894-RGC qui ne se sont donc apparemment pas activés. Dans tous les cas, les complexes sont coélus avec la protéine de choc thermique HSP 90 ainsi que le montre le dot-blot révélé avec l'anticorps monoclonal Ac 88 du groupe de David TOFT (RIEHL *et al*, 1985). Les complexes RU 52585-RGC et RU 56894-RGC sont donc sous la forme non transformée théoriquement échangeable à 80-85 % en présence de 8 % d'acétonitrile. L'absence d'échange élevé pourrait donc provenir de la formation de liaisons covalentes irréversibles entre ces ligands et le récepteur. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait posséder ces ligands sous forme radioactive.

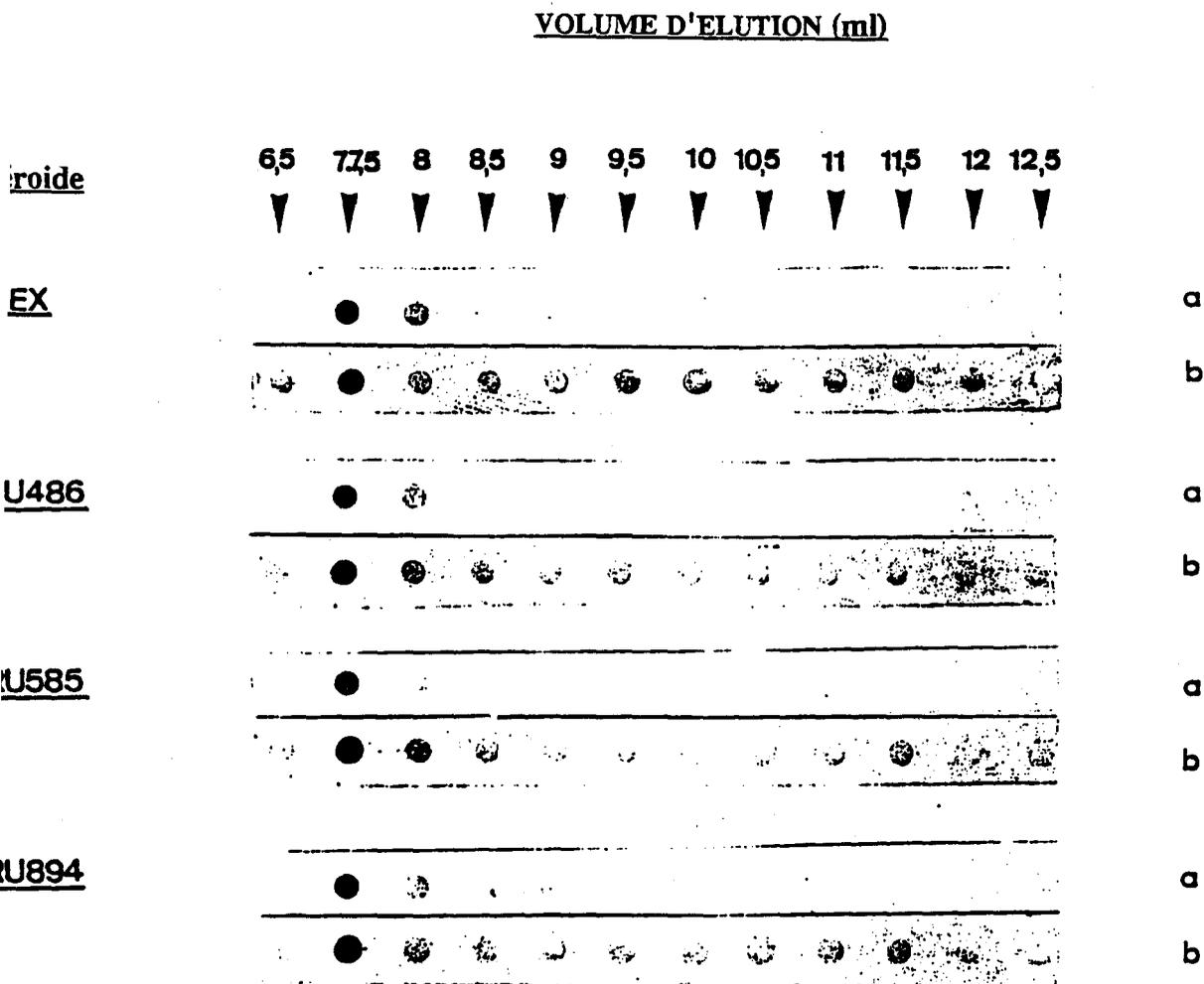


Figure n° 35
MESURE DU RAYON DE STOKES DU RECEPTEUR SUR LA TSK G 3000 SW

Partie C: Analyse par dot-blot des fractions obtenues avec les échantillons incubés avec les différents stéroïdes testés. Immunorévélation par l'anticorps anti-HSP 90 (Ac 88) de Toft (couloirs a) et par l'anticorps anti-RGC (Ac 7) d'Okret (couloirs b).

CONCLUSION
PERSPECTIVES

Les récepteurs nucléaires sont le lieu de la dernière interaction entre une hormone et une molécule protéique et, dans le même temps, cette interaction est la première étape d'une série d'événements vitaux pour une cellule en général.

Selon le récepteur nucléaire étudié, l'hormone est plus ou moins impliquée dans le contrôle des différentes propriétés fonctionnelles de ce récepteur. Celle-ci est soit indispensable pour l'expression de toutes les propriétés du récepteur (transformation, translocation, dimérisation et liaison à l'ADN), soit indispensable uniquement pour la dernière étape c'est-à-dire l'activation du complexe transcriptionnel (cas où le récepteur est déjà fixé sur la séquence HRE en absence de l'hormone). De plus, quel que soit le récepteur, l'hormone se lie à celui-ci au niveau du domaine de liaison localisé dans la partie C-terminale de la protéine. Dans tous les cas, il semble que les agonistes et les antagonistes se lient au niveau de ce domaine dans un site apparemment unique. En effet, il n'a pas été observé jusqu'à maintenant dans la structure du récepteur en général deux sites bien distincts l'un de l'autre pour fixer chacune des deux catégories de ligands. Pour expliquer malgré tout la réponse biologique finale différente (c'est-à-dire la présence ou non d'activation transcriptionnelle) selon l'activité du ligand, il faut donc bien imaginer que des différences existent dans les mécanismes physiques d'interaction de ces ligands avec le récepteur au niveau de ce site unique.

Tous les ligands agonistes ou antagonistes que nous avons utilisés se lient bien au RGC au niveau, semble-t-il, du même domaine E/F. Le foie de rat, tissu qui nous a servi à préparer le cytosol, ne contient pas de récepteur de la progestérone (STRAHLE *et al*, 1989). Ceci a évité toute liaison compétitive RU 486-RP gênante pour notre étude. Le site accepteur du RGC semble de petite taille sans doute "à peine supérieure" à celle du ligand. Il semble adapter parfaitement aux ligands d'origine naturelle (cortisol, corticostérone, progestérone) ou synthétique (TA, Dex) présentant la structure générale classique décrite au paragraphe n° F. Mais, comme nous l'avons vu, d'autres ligands ne possédant pas cette

structure se lie au récepteur avec, pour certains, une affinité supérieure aux ligands classiques. Nous pouvons citer le COR et le RU 486, caractérisés par un substituant volumineux en 3 ou en 11 β respectivement.

Le positionnement du ligand au niveau de ce site peut dépendre de son activité biologique et/ou de sa structure chimique. Le raisonnement le plus simple serait que tous les agonistes, quelle que soit leur structure chimique, se lient d'une certaine façon au niveau du site de sorte à activer par la suite la transcription. De même, tous les antagonistes, quelle que soit là-aussi leur structure chimique, se lieraient quant à eux d'une manière différente des agonistes, inhibant alors toute activation. Mais, si la liaison du RU 486, antagoniste pur, est insensible à la présence d'agents modifiant les groupements thiols, la liaison d'autres antigluco corticoïdes comme les dérivés 17 β carboxamides (DXB par exemple) de la Dex (agoniste) l'est de manière plus ou moins significative. De plus, le mésylate de dexaméthasone et le mésylate de COR, dérivés de deux agonistes purs du RGC, diffèrent sur le plan de leur activité biologique exprimée et de leur capacité à donner ou non une liaison covalente avec le récepteur. Le premier dérivé est antagoniste et donne une liaison covalente au contraire du deuxième qui est agoniste et non covalent. La seule différence entre ces deux dérivés est la présence (COR) ou non (Dex) en position 3 d'un substituant volumineux. Ceci tendrait à prouver que la structure chimique du COR ou en tout cas le substituant volumineux placé en position 3 influence le positionnement final de ce ligand lui donnant ces propriétés particulières observées. La structure chimique semble donc orienter le positionnement final du ligand au niveau du site. Ce positionnement final est ensuite à l'origine de l'expression de telle ou telle activité. En effet, en gardant le même substituant du RU 486 (antagoniste pur) en 11 β , le simple fait de modifier la chaîne latérale (passage de 17 α propynyle à 17 β hydroxycétone par exemple) confère une modification plus ou moins importante de l'activité biologique exprimée par le ligand (BENHAMOU *et al*, 1992). L'affinité de ces produits pour le RGC est, par ailleurs, 8 à 24 fois moindre que celle du RU 486 (KLOOSTERBOER *et al*, 1988). Ceci voudrait donc dire que l'activité antigluco corticoïde du RU 486 est donnée uniquement par le positionnement final du

substituant en position 11 dans la poche 11 β hydrophobe hypothétique (poche non impliquée dans la liaison des GC agonistes habituels; TEUTSCH, 1984). Le positionnement correct du substituant dans cette poche est favorisé (17 α propynyl) ou non (17 β hydroxycétone ou autre) par la nature de la chaîne latérale en position 17. En outre, il serait particulièrement intéressant de posséder ces différents dérivés du RU 486 sous la forme marquée pour étudier la sensibilité de leur liaison avec le RGC vis-à-vis des réactifs spécifiques des groupements thiols (pré- et post-incubation de ces réactifs). La question est de savoir si la chaîne latérale 17 β (type hydroxycétone ou autre) protège les thiols essentiels du fait de la présence du substituant en position 11.

Nos travaux montrent aussi que la protection des thiols essentiels ne dépend pas de l'activité biologique des stéroïdes mais bien des substituants (donc de la structure chimique) présents aux positions-clés (3, 11 et 17). En effet, le COR donne, comme le RU 486, la même absence de réassociation de la TA marquée avec le récepteur libéré.

Nous pouvons donc penser que:

- 1) Les agonistes classiques (TA, Dex) se lient au récepteur en réagissant avec toutes les régions du site, directement ou indirectement, indispensables pour l'expression de l'activité agoniste. Par contre, le COR, au vu de l'encombrement stérique apporté par le substituant en position 3, réagirait, quant à lui, avec d'autres régions du site mais aussi "au minimum" avec une région identique à celle reconnue par la TA et la Dex et indispensable pour l'activité agoniste. Cette région ne semble pas être celle située en face ou à proximité de la chaîne latérale 17 β du ligand.

- 2) Le DXB développe, après association au récepteur, une activité antagoniste partielle. Ceci peut être expliqué par la structure même de ce ligand. En effet, celui-ci possède les groupements habituels en position 3 et en position 11 (groupe carbonyle et groupe hydroxyle respectivement), mais est surtout caractérisé par une chaîne latérale 17 β

aromatique. Ce composé se positionnerait dans le site comme la TA ou la Dex excepté au niveau de cette région 17 β expliquant l'activité particulière exprimée par ce ligand et les résultats observés précédemment.

- 3) Le **RU 486**, quant à lui, du fait de la présence d'un substituant volumineux en position 11, se positionnerait dans le site d'une façon assez différente des autres ligands cités ci-dessus. La chaîne latérale type 17 α (groupe propynyle) favorise un bon positionnement du substituant volumineux au niveau de la poche hydrophobe donnant alors un ligand d'activité antagoniste pure.

- 4) Les deux autres dérivés (le **RU 28362** et le **RU 26988**) ne possédant pas de substituant volumineux en position 11 ne réagissent pas ou très peu avec cette poche hydrophobe. Et c'est pourquoi, malgré la présence d'une chaîne latérale identique à celle du RU 486, ces deux dérivés montrent une activité agoniste, et se positionnent probablement davantage comme la Dex ou la TA, puisqu'ils protègent les thiols du site actif.

Si le mécanisme d'action des agonistes est de plus en plus éclairci, celui des antagonistes reste toujours assez obscur. Même si, çà et là, quelques voiles sont levés, il reste néanmoins encore beaucoup de questions au niveau de l'interaction même antagoniste-récepteur. En effet, seule la glycine en position 722 de la séquence du récepteur de la progestérone humaine a été identifiée comme acide aminé essentiel à cette interaction. C'est pourquoi, nous avons étudié des stéroïdes dérivés du RU 486 supposés être des marqueurs d'affinité covalents potentiels. Deux de ces stéroïdes (le RU 52585 et le RU 56894) se sont révélés intéressants (affinité élevée pour le RGC et taux d'échange faible). Mais, malheureusement, ces produits ne se trouvent que sous une forme non radioactive ce qui limite les expériences directes de caractérisation. D'autre part, les produits possédant la fonction réactive (censée donner une liaison covalente avec le récepteur) au niveau du substituant en position 11 se sont tous révélés très peu ou pas du tout réactifs. Ceci est

regrettable vu l'importance de cette poche hydrophobe dans la liaison au récepteur et dans l'expression de l'activité antagoniste du RU 486.

Pour continuer ce travail, il serait particulièrement intéressant de posséder des dérivés radioactifs du RU 486 marqueurs d'affinité au niveau de la:

-- **position 17** pour savoir si ces derniers marqueraient aussi la cystéine 656 du RGC de rat comme le mésylate de dexaméthasone (antagoniste faible) ou un autre acide aminé plus ou moins éloigné de celle-ci selon l'influence du substituant volumineux en position 11 β sur le positionnement de la chaîne latérale en 17.

-- **position 11** pour explorer la poche hydrophobe du RP ou du RGC et déterminer si possible d'autres acides aminés différents de la glycine. Vu l'importance de cette poche, ces dérivés possèdent un intérêt majeur.

Il serait intéressant par ailleurs de posséder aussi des marqueurs d'affinité radioactifs dérivés du RU 28362 et du RU 26988 **en position 17**. La question est de savoir s'ils marqueraient les mêmes acides aminés que les dérivés du RU 486 au niveau de la région 17 vu l'absence du substituant volumineux en position 11 β .

La comparaison des acides aminés marqués par ces différents stéroïdes nous apporterait certainement de nombreuses informations sur leur positionnement général respectif au niveau du domaine de liaison au stéroïde et éclaircirait les modalités d'interaction agoniste/antagoniste-récepteur.

APPENDICE
TECHNIQUE

Réactifsa) *Ligands marqués:*

* [1,2,4(n)-³H] Acétonide de Triamcinolone (TA) (activité spécifique: 29 Ci/mmol) [Amersham Int. (Amersham, GB)].

* [6,7-³H] RU 486 (activité spécifique: 44 Ci/mmol):
[11 β -(4-N,N-diméthylaminophényl)-17 β -hydroxy-17 α -(1-propynyl)-estra-4,9-dien-3-one].

* [1,2,4-(³H)] Dexaméthasone (Dex) (activité spécifique: 37 Ci/mmol) [Amersham Int. (Amersham, GB)].

b) *Ligands non marqués:*

* Acétonide de triamcinolone [SERVA, Heidelberg, Allemagne], Dexaméthasone, RU 486.

* RU 28362: [6-méthyl-11 β ,17 β -dihydroxy-17 α -(1-propynyl)-androsta-1,4,6-triene-3-one].

* RU 26988: [11 β ,17 β -dihydroxy-17 α -(1-propynyl)-androsta-1,4,6-triene-3-one].

* Deacylcortivazole: [11 β ,17 α ,21-trihydroxy-6,16 α -diméthyl-2'-phényl-2'H-pregna-2,4,6-trieno [3,2-c] pyrazol-20-one].

* DXB: [N-benzyl-9 α -fluoro-16 α -méthyl-11 β ,17 α -dihydroxy-3-oxo-1,4-androstadiene-17 β -carboxamide] (procédé de synthèse selon FORMSTECHE *et al*, 80). Ce dérivé a été synthétisé au laboratoire.

La plupart des ligands que nous avons utilisés proviennent de ROUSSEL-UCLAF, Romainville, France, dans le cadre d'une collaboration entre les deux laboratoires.

c) *Solvants et réactifs:*

- * Acétonitrile [Farmitalia, Carol Erba, (Paris, France)].
- * Iodo Acétamide (IA) [MERCK].
- * Méthyl Méthane Thiol Sulfonate (MMTS) [SIGMA].
- * N-Ethyl-Maléimide (NEM) [Pierce chemical Co., (Rockford, IL, USA)].
- * Autres dérivés maléimides (N-alkylmaléimides) (voir figure n° 36): Ceux-ci ont été synthétisés à partir de l'anhydride maléique et de l'amine appropriée selon une procédure composée de deux étapes (COLEMAN *et al*, 1959). La N-benzylmaléimide a été synthétisée dans le laboratoire d'après CAVA *et al* (1961).

Tampons

Les tampons utilisés sont indiqués ci-dessous:

- * Tampon A: (pH: 7,4; 4°C)

20 mM Tes (acide N-Tris-hydroxyméthyl-Ethyl-2-aminoéthane Sulfonique)

60 mM NaCl

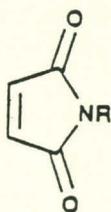
1 mM EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra acétique)

10 % (v/v) glycérol

10 mM Na₂MoO₄

- * Tampon B: Tampon A + 1 % (v/v) PMSF (Phényl Méthane Sulfonyl Fluoride) [SIGMA].

- * Tampon C: Tampon A + 0,5 à 1 mM DTT (DiThioThreitol) [MERCK].



→ R = H

→ Maléimide

→ R = C₂H₅

→ N-Ethylmaléimide

→ R = CH₂C₆H₅

→ N-Benzylmaléimide

figure n°36
STRUCTURE DE DIVERSES MALEIMIDES

Justification de la composition des tampons:

Cette composition a pour but de garantir une stabilité maximale de l'activité de liaison du récepteur à l'hormone en l'absence de celle-ci sans favoriser la transformation lors de l'incubation du récepteur avec l'hormone:

* L'EDTA séquestre les cations divalents indispensables pour l'activation de certaines protéases et limite donc la dégradation du récepteur.

* Le glycérol stabilise le récepteur libre, non lié à l'hormone, à basse température (ici 4°C).

* Le DTT, agent réducteur, stabilise le récepteur (REES et BELL, 1975).

* Le PMSF est un agent inhibiteur des protéases et limite donc la dégradation du récepteur.

* Le molybdate de sodium est utilisé comme stabilisateur des récepteurs sous la forme non transformée permettant par la suite les réactions d'échange (voir 1^{ère} partie de la revue générale).

Préparation du cytosol

Des rats mâles Wistars sont surrénalectomisés trois-quatre jours avant leur sacrifice. Durant cette période, ils sont maintenus en vie par addition de NaCl 0,9 % dans leur eau de boisson. Après le sacrifice (rats anesthésiés au chloroforme et décapités), les foies sont prélevés et perfusés successivement par du NaCl 0,9 % glacé et par du tampon A. Toutes les étapes suivantes sont réalisées dans la glace ou en chambre froide. Les foies sont repris dans le tampon B à raison d'un gramme de foie pour 1 à 1,5 ml de tampon B et

homogénéisés ensuite au Potter. La préparation obtenue est centrifugée sous vide, pendant une à deux heures, à 55000 tours/min sur Rotor Ti 70 ou SW 60 [BECKMAN]. Le surnageant de l'homogénat (ou cytosol) est recueilli par aspiration. Le pH est de nouveau ajusté à 7,4.

Mesure de l'activité de liaison à l'hormone

L'échantillon contenant le récepteur (cytosol) est incubé pendant une nuit (16 hrs) à 0-4°C en présence de l'hormone tritiée choisie (TA, Dex, RU 486), à une concentration de 15 nM (tube T: détermination de l'activité totale de liaison à l'hormone [activité spécifique + activité non spécifique] ou T). L'activité de liaison non spécifique à l'hormone ou (B) est mesurée par incubation en parallèle d'aliquotes du même échantillon (cytosol) avec un excès de 500 à 1000 fois de la même hormone (TA, Dex, RU 486) non radioactive (tube B). La différence (T-B) donne l'activité de la liaison spécifique du récepteur à l'hormone.

Cette activité de liaison est mesurée après élimination de l'hormone libre en excès par adsorption sur charbon-dextran (ROUSSEAU *et al*, 1972). Un volume d'échantillon préalablement incubé avec l'hormone radioactive est mélangé avec un demi volume d'une suspension contenant 3 % de charbon activé [Norit A] et 0,3 % de dextran T 70. Après quelques secondes d'agitation au Vortex, le mélange est laissé 15 minutes à 0-4°C, puis centrifugé 5 minutes à 4000 tours/min. Le surnageant débarrassé de l'excès d'hormone libre est alors directement utilisé pour une mesure de radioactivité. Toutes ces mesures sont réalisées en double.

Etude de l'action de différents réactifs spécifiques d'acides aminés

Il existe deux moyens différents pour étudier celle-ci:

* action des réactifs sur le récepteur libre, non lié à l'hormone (**Pré-incubation** des réactifs par rapport au ligand).

* action des réactifs sur le complexe hormone-récepteur après réaction de protection par le ligand (**Post-incubation** des réactifs par rapport au ligand).

a) Chaque maléimide est dissoute à température ambiante dans le solvant approprié à une concentration élevée (solution-mère préparée extemporanément) avant d'être ajoutée au cytosol à une concentration finale au maximum de 5 mM (3 à 5 mM) pour éviter une déstabilisation du récepteur libre ou du complexe H-R. Il a été vérifié que le solvant ajouté au cytosol ne modifiait pas les activités totales de liaison à l'hormone (BLICQ *et al*, 1988). Les N-alkylmaléimides (NEM,...) sont dissoutes dans l'éthanol absolu, la N-benzylmaléimide dans le 2-méthoxyéthanol. A part la NEM, toutes les autres maléimides seront utilisées à une concentration finale dans le milieu de 3 mM pendant 5 minutes. La concentration en NEM (3 à 5 mM) sera ajustée en fonction de la concentration totale en thiols du cytosol qui se situe entre 2,6 et 3,5 mM. Après avoir ajouté la maléimide dans le cytosol, la réaction est arrêtée par gel-filtration ("dessalage") ou par addition de β -mercaptoéthanol à une concentration finale de 20 mM. Une solution de β -mercaptoéthanol diluée au 1/8^e (eau) est préparée à partir de la solution-mère (PM = 78; d = 1,115) [MERCK] et ajoutée à raison de 12 μ l par ml de cytosol.

Les conditions expérimentales sont définies pour avoir une spécificité de réaction de la NEM vis-à-vis des groupements thiols des résidus cystéines d'un peptide ou d'une protéine (concentration de l'ordre du mM, en léger excès par rapport à la concentration endogène en thiols du cytosol et à un pH proche de la neutralité). La NEM agit par formation d'une

liaison thioéther par réaction d'addition entre le groupement thiol et la double-liaison éthylénique de son cycle (voir figure n° 7).

b) L'IA (action irréversible) est dissout dans de l'éthanol absolu (solution-mère préparée extemporanément) et sera utilisé à différentes concentrations pendant 30 minutes à 4°C.

c) Le MMTS (action réversible) sera utilisé dans les mêmes conditions que l'IA et son action est presque totalement réversible en présence de 10 mM de DTT.

Réaction d'échange

a) *Mode d'évaluation:*

Il se déroule selon trois procédures distinctes en fonction du paramètre qu'on veut observer au cours de l'échange:

* réaction d'Association: le premier stéroïde non marqué est échangé avec une deuxième hormone marquée.

* réaction de Dissociation: le premier stéroïde marqué est échangé avec une deuxième hormone non marquée.

* réaction de Stabilité: le premier stéroïde marqué est échangé avec lui-même ou avec un deuxième ligand marqué différent.

La réaction d'association (entre le récepteur libéré et le deuxième ligand) ainsi que la réaction de stabilité montrent que la réaction de dissociation correspond bien à un échange d'un ligand marqué par un ligand non marqué et non à une dégradation du récepteur au

cours de l'échange. La troisième réaction est un contrôle du nombre total de sites pendant toute la durée de l'échange (témoin 100 %).

Ces trois réactions doivent être réalisées avec le même cytosol (pour garder une concentration constante en protéines) et, si possible, en parallèle pour une meilleure interprétation des résultats.

b) *Mode opératoire:*

Ce mode est le suivant:

- Incubation du cytosol avec le premier ligand (marqué ou non) en excès (15 nM), pendant une nuit, à 4°C.
- Mise en incubation ou non ensuite de ce cytosol avec la NEM (Post-incubation du réactif).
- Elimination du premier ligand non lié au récepteur, par DCC ou par gel-filtration, avec ou non l'excès de la NEM libre.
- Incubation pendant une heure du cytosol dessalé avec le deuxième ligand en excès (15 à 60 nM) (marqué ou non) en présence de 8 % d'acétonitrile.
- Prélèvement à différents temps d'incubation (0 [témoin], 10, 20, 30, 45, 60 minutes) d'un aliquote et élimination de l'excès du deuxième ligand non lié et du premier ligand libéré par DCC.
- Comptage de la radioactivité associée au récepteur (complexes hormone-récepteur marqués).

Méthodes générales

a) La titration spectrophotométrique des groupements thiols dans le cytosol ou dans les tampons ayant servis à le préparer s'effectue à l'aide du réactif d'ELLMAN, le DTNB ou 5, 5'-DiThiobis (2-NitroBenzène) dont le coefficient d'extinction molaire est de $13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à la longueur d'onde 412 nm (ELLMAN, 1959).

Sur un spectrophotomètre UV à double faisceau, on a la mesure de la cuve échantillon par rapport à la cuve de référence. Le zéro optique s'effectue sur le tampon de perfusion.

Au temps zéro, on a en première lecture (témoin blanc):

- cuve de référence: tampon de perfusion (1 ml),
- cuve d'échantillon: tampon de perfusion (1 ml) plus tampon d'homogénéisation (20 μl) ou bien le cytosol (20 μl).

Après avoir mis dans chaque cuve 35 μl de DTNB (4 mg/ml) dissous dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 8, on laisse la coloration se développer à température ambiante pendant 15 minutes et on effectue une deuxième lecture.

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution-mère de cystéine pure (2 mM).

b) La méthode au Bleu Brillant de Coomassie (CBB G 250) a été utilisée pour le dosage des protéines du cytosol (READ et NORTHCOTE, 1981).

Réactif:

Bleu de Coomassie G 250 [MERCK]	15 mg
Ethanol absolu	4,7 ml
H ₃ PO ₄ 85 %	10 ml
H ₂ O	qsp 100 ml

- Filtration sur papier Whatman et conservation à l'abri de la lumière (réactif colorant stable pendant quelques jours).
- L'échantillon (prise de 45 μ l) est mis en contact avec le réactif colorant (volume de 855 μ l) pendant 5 minutes à température ambiante après agitation au Vortex.
- Lecture à la longueur d'onde de 595 nm sur un spectrophotomètre contre le blanc.

Une gamme étalon (0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 et 200 μ g/ml) est préparée à partir d'une solution-mère de SAB (sérum albumine bovine) [SIGMA] de 1 mg par ml de tampon servant à préparer le cytosol.

c) La radioactivité a été mesurée sur un compteur à scintillation liquide de type LKB WALLAC 1214 RACKBETA dans de l'Aqualyte [Baker Chemicals, Deventer, The Netherlands] avec une efficacité de comptage de 50 % pour le tritium.

d) Le dessalage des échantillons a été effectué sur une colonne d'Ultrogel ACA-202 [IBF] équilibrée dans le tampon A ou C. L'intérêt de la gel-filtration est l'élimination de toutes les petites molécules en une seule étape c'est-à-dire l'excès du premier ligand non lié avec, en plus, pour certains échanges, l'excès de la NEM n'ayant pas réagi avec les groupements thiols. Nous avons vérifié au préalable que le dessalage, qui remplace la méthode au charbon-dextran dans certains échanges, ne modifiait pas le déroulement de la réaction d'échange qui doit suivre.

Préparation du cytosol de thymus de rat

a) *Mode opératoire:*

Des rats mâles Wistar, surrénalectomisés trois jours minimum avant leur sacrifice, sont anesthésiés au chloroforme puis tués par décapitation. Les thymus sont prélevés et rincés par du tampon (pH 7,4) contenant du Tes (20 mM), de l'EDTA (1 mM), du DTT

(1 mM), du Na_2MoO_4 (10 mM) et du glycérol (10 %) à 4°C. Le tissu est séché, pesé, homogénéisé dans 1,5 volume (poids/volume) du tampon précédent (avec addition ou non de PMSF, 1 %) à l'aide d'un potter à piston téflon. L'homogénat est centrifugé à 55000 tours/min pendant une heure à 4°C. Le surnageant (ou cytosol) est prélevé par aspiration et le pH est de nouveau vérifié.

b) *Choix du tissu source de récepteur:*

Le thymus, contrairement au foie, ne contient pas de transcortine et n'est le siège apparemment d'aucun métabolisme des stéroïdes (absence d'enzymes du métabolisme des stéroïdes).

Réactions de compétition

Le cytosol de thymus de rat est incubé pendant 2 heures à 4°C en présence d'une concentration fixe en ligand marqué (TA, $10 \cdot 10^{-9}$ M) et d'une concentration croissante (de 0 à $125 \cdot 10^{-8}$ M) en ligand compétiteur froid de nature différente. Toutes les incubations sont effectuées en double (2 tubes T, 2 tubes B). La mesure du complexe récepteur-hormone est effectuée par DCC. Après incubation, on prélève 100 μl de chaque aliquot de cytosol (500 μl au total). Ces 100 μl sont mis en présence de 50 μl de charbon-dextran, agités quelques secondes au vortex et laissés au repos 15 minutes à 4°C. Après une centrifugation de 3 minutes à 3000 tours/min, 50 μl du surnageant sont pipetés pour la mesure de la radioactivité. Tout ce protocole est effectué en quadruple à 4°C. Les résultats finaux sont exprimés en pourcentage par rapport à des tubes T et B témoins incubés en parallèle dans les mêmes conditions en absence de tout compétiteur (témoin 100 %).

Chromatographie d'exclusion de taille à haute performance

a) *Matériel:*

Colonne TSK G4000 (ou G3000) SW analytique LKB (7.5 x 300 mm)

Précolonne TSK GSWP (7.5 x 75 mm)

Injecteur muni d'une boucle de 0.2 ml

Pompe LKB 2150

Collecteur programmable, modèle 201, (GILSON, FRANCE)

Enregistreur LKB

b) *Tampon (1):*

Tes	20 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Na ₂ MoO ₄	10 mM

Le tampon (pH égal à 7) est filtré sur membrane Millipore HATF (0,45 μ m) et dégazé sous ultrasons avant l'emploi.

c) *Elution:*

Volume des échantillons injectés (500 μ l) filtrés dès l'entrée de la précolonne par la mise en place d'un fritté métallique (pores de 1 μ m).

L'élution est réalisée avec le tampon (1) à un débit de 0.5 ml/minute (colonne analytique). Pendant toute la durée de l'analyse, la colonne et le réservoir de tampon sont

placés dans un bain de glace (0 à 4°C). Des fractions de 30 secondes (soit un volume de 250 μ l par fraction) sont collectées et analysées en DOT-BLOT (pour chaque fraction: une aliquote de 20 μ l pour l'Ac 88; le reste de la fraction pour l'Ac d'OKRET). Une aliquote de 50 μ l de chaque fraction est prélevée au préalable pour le comptage de la radioactivité (fractions analysées en DOT-BLOT ensuite de la 13^{ème} à la 26^{ème} minute).

d) *Calibration:*

Kit commercial [Pharmacia] contenant de la thyroglobuline ($R_s = 8.5$ nm), de la β -galactosidase d'E. Coli ($R_s = 6.9$ nm), de la ferritine ($R_s = 6.1$ nm), de la catalase ($R_s = 5.2$ nm), de l'aldolase ($R_s = 4.7$ nm), de la sérum albumine ($R_s = 3.6$ nm) et de la chymotrypsinogène ($R_s = 2$ nm).

Ces protéines standards sont utilisées à une concentration de 1 à 3 mg/ml et un volume de 0,1 ml est injecté sur la colonne. Leur volume d'élution (V_e) est détecté par absorbance UV à 280 nm. Le volume d'exclusion (V_o) de la colonne est mesuré par l'élution du Bleu Dextran 2000 ($M_r = 2.10^7$). Le volume total (V_t) de la colonne est mesuré par l'élution du bichromate de potassium. Les valeurs de V_o et de V_t sont égales à 6,3 et 13,5 ml respectivement. Connaissant les valeurs de V_o , V_t et des différents V_e , pour chaque calibrant, nous pouvons alors calculer le coefficient de distribution noté KD avec la formule indiquée ci-dessous:

$$KD = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

La courbe de calibration des valeurs calculées de $(KD)^{1/3}$ en fonction des valeurs de R_s connues correspondantes, courbe applicable pour les protéines globulaires, nous permet par la suite, d'une façon rapide et facile, la détermination du R_s d'une molécule donnée connaissant son KD calculé au préalable.

e) *Maintenance de la colonne:*

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

Technique du dot-blot

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

Techniques d'immunorévélation

a) *Réactifs et tampons:*

TBS:

Tris-HCl	10 mM
NaCl	150 mM
pH	7,4

TNT: (à préparer extemporanément)

TBS	1 litre
Tween 20 (0,1 %; p/v)	1 gramme

Révélateur: (à préparer extemporanément)

4-chloro-1-naphtol (SIGMA C8890) 50 mg
à dissoudre dans 17 ml de méthanol
avant de compléter le volume à 100 ml avec du TBS
et d'ajouter H₂O₂ à 30 % 60 µl

b) *Mode opératoire:*

Toutes les étapes énoncées ci-dessous sont réalisées sous agitation.

** La feuille de nitrocellulose est saturée dans une solution de TBS contenant 5 % (p/v) de lait écrémé en poudre, une heure à 37°C.

** Lavage 2 fois 15 minutes dans le TBS à température ambiante suivi d'une fois 15 minutes dans le TNT.

** Incubation avec un premier anticorps en solution dans le TNT contenant 1 % (p/v) de lait écrémé en poudre une à deux heures à température ambiante ou une nuit à 4°C.

** Lavage 3 fois 15 minutes dans le TNT.

** Incubation avec un deuxième anticorps marqué à la peroxydase (système lapin ou GAR; système souris ou GAM) à une dilution de 1/1000 ou de 1/500 respectivement dans le TNT contenant 1 % (p/v) de lait écrémé en poudre une heure à température ambiante.

** Lavage 2 fois 15 minutes dans le TNT.

** Lavage 1 fois 15 minutes dans le TBS.

** Révélation par la solution de 4-chloro-1-naphtol et de H₂O₂ (coloration violette des échantillons protéiques).

c) *Remarques:*

** Ce protocole général d'immunorévélation est valable pour tous les blots obtenus par DOT-BLOT ou par WESTERN-BLOT.

** Nous avons utilisé comme premier anticorps différents anticorps monoclonaux de souris:

- L'anticorps de TOFT ou Ac 88 (RIEHL *et al*, 1985): c'est une immunoglobuline de classe G1 (IgG1) dirigée contre une protéine de poids moléculaire de 88 kDa isolée d'un champignon aquatique (*Achlya Ambisexualis*). Cet anticorps reconnaît un épitope commun à plusieurs protéines de choc thermique de 90 kDa issues de différentes espèces. La dilution utilisée est égale à 1/2000.

- L'anticorps d'OKRET ou Ac 7 (OKRET *et al*, 1984, 1985): c'est une IgG2b de souris que nous avons utilisée à une dilution de 1/50 (solution initiale d'hybridomes dilués dans le milieu de culture).

** Le deuxième anticorps utilisé sera un anticorps anti-anticorps de souris (système GAM) marqué à la peroxydase.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Akner, G., Sundqvist, K. G., Denis, M., Wikstrom, A. C. and Gustafsson, J. Å.

Immunocytochemical localization of glucocorticoid receptor in human gingival fibroblasts and evidence for a colocalization of glucocorticoid receptor with cytoplasmic microtubules.

Eur. J. Cell Biol. **53** (1991) 390-401.

Alexis, M. N., Mavridou, I. and Mitsiou, D. J.

Subunit composition of the untransformed glucocorticoid receptor in the cytosol and in the cell.

Eur. J. Biochem. **204** (1992) 75-84.

Allan, G. F., Leng, X., Tsai, S. Y., Weigel, N. L., Edwards, D. P., Tsai, M. J. and OMalley, B. W.

Hormone and antihormone induce conformational changes which are central to steroid receptor activation.

J. Biol. Chem. **267** (1992, a) 19513-19520.

Allan, G. F., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and OMalley, B. W.

Ligand-dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89** (1992, b) 11750-11754.

Allera, A. and Wildt, L.

Glucocorticoid-recognizing and glucocorticoid-effector sites in rat liver plasma membrane- Kinetics of corticosterone uptake by isolated membrane vesicles.

1. Binding and transport.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **42** (1992) 737-756.

Allera, A. and Wildt, L.

Glucocorticoid-recognizing and glucocorticoid-effector sites in rat liver plasma membrane- Kinetics of corticosterone uptake by isolated membrane vesicles.

2. Comparative influx and efflux.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **42** (1992) 757-771.

Alroy, I. and Freedman, L. P.

DNA binding analysis of glucocorticoid receptor specificity mutants.

Nucleic Acids Research. **20** (1992) 1045-1052.

Baulieu, E. E.

Contraception and other clinical applications of RU 486, an antiprogestone at the receptor.

Science, N. Y. **245** (1989) 1351-1357.

Baulieu, E. E. and Kelly, P. A.

"Hormones from molecules to disease".

Hermann publishers in Arts and Sciences (1990).

Beato, M.

Gene regulation by steroid hormones.

Cell **56** (1989) 335-344.

Beato, M.

Transcriptional control by nuclear receptors.

FASEB J. **5** (1991) 2044-2051.

Becker, P. B., Gloss, B., Schmid, W., Strähle, U. and Schütz, G.

In vivo protein-DNA interactions in a glucocorticoid response element require the presence of hormone.

Nature **324** (1986) 686-691.

Benhamou, B., Garcia, T., Lerouge, T., Vergezac, A., Gofflo, D., Bigogne, C., Chambon, P. and Gronemeyer, H.

A single amino acid that determines the sensitivity of progesterone receptors to RU 486.

Science **255** (1992) 206-209.

Ben-Or, S. and Chrambach, A.

Heterogeneity of the glucocorticoid receptors: Molecular transformation during activation detected by electrofocusing.

Arch. Biochem. Biophys. **221** (1983) 343-353.

Blicq, S., Danze, P. M., Dumur, V., Formstecher, P. and Dautrevaux, M.

Inhibition of glucocorticoid receptor transformation, subunit dissociation and temperature dependant inactivation by various N-substituted alkylmaleimides.

Biochemistry **27** (1988) 8436-8442.

Bodwell, J. E., Holbrook, N. J. and Munck, A.

Evidence for distinct sulfhydryl groups associated with steroid and DNA-binding domains of rat thymus glucocorticoid receptors.

Biochemistry **23** (1984) 4237-4242.

Bodwell, J. E., Orti, E., Coull, J. M., Pappin, D. J. C., Smith, L. and Swift, F.

Identification of phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor.

J. Biol. Chem. **266** (1991) 7549-7555.

Borgna, J. L. and Scali, J.

Differential interactions of estrogens and antiestrogens at the 17 β -hydroxy or counterpart function with the estrogen receptor.

Eur. J. Biochem. **199** (1991) 575-585.

Bouzerna, N., Hammadi, H., Richard, C., Formstecher, P. and Dautrevaux, M.

Improvements in the purification of an antisteroid antiserum resistant to conventional immunoabsorption chromatography.

J. Immunol. Methods. **112** (1986) 251-259.

Bresnick, E. H., Sanchez, E. R., Harrison, R. W. and Pratt, W. B.

Hydrogen peroxide stabilizes the steroid-binding state of rat liver glucocorticoid receptors by promoting disulfide bond formation.

Biochemistry **27** (1988) 2866-2872.

Bresnick, E. H., Dalman, F. C., Sanchez, E. R. and Pratt, W. B.

Evidence that the 90-kDa Heat Shock Protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor.

J. Biol. Chem. **264** (1989) 4992-4997.

Brink, M., Humbel, B. M., Ron de Kloet, E. and Van Driel, R.

The unliganded glucocorticoid receptor is localized in the nucleus, not in the cytoplasm.

Endocrinology **130** (1992) 3575-3581.

Byravan, S., Milhon, J., Rabindran, S. K., Olinger, B., Garabedian, M. J., Danielsen, M. and Stallcup, M. R.

Two point mutations in the hormone-binding domain of the mouse glucocorticoid receptor that dramatically reduce its function.

Mol. Endocr. **5** (1991) 752-758.

Cake, M. H., Disorbo, D. M. and Litwack, G.

Effect of pyridoxal phosphate on the DNA binding site of activated hepatic glucocorticoid-receptor.

J. Biol. Chem. **253** (1978) 4886-4891.

Carlstedt-Duke, J., Strömstedt, P. E., Wrangé, Ö., Bergman, T., Gustafsson, J. Å. and Jörnvall, H.

Domain structure of the glucocorticoid receptor protein.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **84** (1987) 4437-4440.

Carlstedt-Duke, J., Strömstedt, P. E., Persson, B., Cederlund, E., Gustafsson, J. Å. and Jörnvall, H.

Identification of hormone-interacting amino acid residues within the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor in relation to other steroid hormone receptors.

J. Biol. Chem. **263** (1988) 6842-6846.

Carson-Jurica, M. A., Schrader, W. T. and O'Malley, B. W.

Steroid receptor family: Structure and functions.

Endocrine Reviews **11** (1990) 201-220.

Castoria, G., Migliaccio, A., Green, S., Didomenico, M., Chambon, P. and Auricchio, F.
Properties of a purified estradiol-dependent calf uterus tyrosine kinase.

Biochemistry **32** (1993) 1740-1750.

Cava, M. P., Deana, A. A., Muth, K. and Mitchell, M. J.

N-phenylmaleimide.

Org. Synth. **41** (1961) 93-95.

Chakraborti, P. K., Garabedian, M. J., Yamamoto, K. R. and Simons, S.S. Jr.

Creation of "super" glucocorticoid receptors by point mutations in the steroid binding domain.

J. Biol. Chem. **266** (1991, a) 22075-22078.

Chakraborti, P. K. and Simons, S.S. Jr.

Association of Heat Shock Protein 90 with the 16 kDa steroid binding core fragment of rat glucocorticoid receptors.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **176** (1991, b) 1338-1344.

- Chakraborti, P. K., Garabedian, M. J., Yamamoto, K. R. and Simons, S.S. Jr.
Role of cysteines 640, 656 and 661 in steroid binding to rat glucocorticoid receptors.
J. Biol. Chem. **267** (1992) 11366-11373.
- Chrousos, G. P., Saver, M. A., Loriaux, D. L. and Cutler, G. B.
Steroids **40** (1982) 425-431.
- Coleman, L. E., Bork, J. F. and Dunn, H.
Reaction of primary aliphatic amines with maleic anhydride.
J. Org. Chem. **24** (1959) 135-136.
- Cook, C. E., Wani, M. C., Lee, Y. W., Fail, P. A. and Petrow, V.
Reversal of activity profile in analogs of the antiprogesterin RU 486: Effect of the 16 a-substituent on progestational (agonist) activity.
Life Sciences **52** (1993) 155-162.
- Coty, W. A.
Reversible dissociation of steroid hormone-receptor complexes by mercurial reagents.
J. Biol. Chem. **255** (1980) 8035-8037.
- Couette, B., Lombes, M., Baulieu, E. E. and Rafestin-Oblin, M. E.
Aldosterone antagonists destabilize the mineralocorticoid receptor.
Biochem. J. **282** (1992) 697-702.
- Dahlman-Wright, K., Wright, A., Gustafsson, J. Å. and Carlstedt-Duke, J.
Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids.
J. Biol. Chem. **266** (1991) 3107-3112.
- Dahlman-Wright, K., Wright, A., Carlstedt-Duke, J. and Gustafsson, J. Å.
DNA-binding by the glucocorticoid receptor: A structural and functional analysis.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **41** (1992) 249-272.
- Dahmer, M. K., Housley, P. R. and Pratt, W. B.
Effects of molybdate and endogenous inhibitors on steroid receptors inactivation, transformation, translocation.
Ann. Rev. Physiol. **46** (1984) 67-81.

Dalman, F. C., Scherrer, L. C., Taylor, L. P., Akil, H. and Pratt, W. B.

Localization of the 90-kDa Heat Shock Protein-binding site within the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor by peptide competition.

J. Biol. Chem. **266** (1991) 3482-3490.

Danielian, P. S., White, R., Lees, J. A. and Parker, M. G.

Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors.

EMBO J. **11** (1992) 1025-1033.

Danielian, P. S., White, R., Hoare, S. A., Fawell, S. E. and Parker, M. G.

Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen.

Mol. Endocr. **7** (1993) 232-240.

Danze, P. M., Formstecher, P., Richard, C. and Dautrevaux, M.

Microheterogeneity of agonist and antagonist glucocorticoid receptor complexes detected by isoelectrofocusing and modification induced by receptor activation.

Biochim. Biophys. Acta. **927** (1987) 129-138.

Danze, P. M., Richard, C., Formstecher, P. and Dautrevaux, M.

Steroid receptor exchange assay in the presence of acetonitrile: Application to the study of glucocorticoid- and anti-glucocorticoid-receptor complexes.

Steroids **55** (1990) 10-16.

Danielsen, M., Northrop, J. P., Jonklaas, J. and Ringold, G. M.

Domains of the glucocorticoid receptor involved in specific and nonspecific deoxyribonucleic acid binding, hormone activation and transcriptional enhancement.

Mol. Endocr. **1** (1987) 816-822.

Dausse, J.P., Duval, D., Meyer, P., Gaignault, J. C., Marchandeu, C. and Raynaud, J.P.

Mol. Pharmacology. **13** (1977) 948.

Deckers, G. H. J., Geelen, J. A. A., Kloosterboer, H. J. and Van der Heuvel, M. J.

Endocrine profiles of two novel antiprogestagens org 31710 and org 31806.

Proc. Endocr. Soc., Atlanta, GA, June 20-23 (1990) Abstr. n°. 136.

DeMarzo, A. M., Onate, S. A., Nordeen, S. K. and Edwards, D. P.
Effects of the steroid antagonist RU 486 on dimerization of the human progesterone receptor.

Biochemistry **31** (1992) 10491-10501.

Denis, M., Wikström, A. C. and Gustafsson, J. Å.

The molybdate-stabilized nonactivated glucocorticoid receptor contains a dimer of Mr 90,000 non-hormone-binding protein.

J. Biol. Chem. **262** (1987) 11803-11806.

Denis, M., Gustafsson, J. Å. and Wikström, A. C.

Interaction of the Mr-90,000 Heat Shock Protein with the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor.

J. Biol. Chem. **263** (1988) 18520-18523.

Denis, M. and Gustafsson, J. Å.

Translation of glucocorticoid receptor mRNA *in vitro* yields a non activated protein.

J. Biol. Chem. **264** (1989) 6005-6008.

Disorbo, M. D., Phelps, D.S. and Litwack, G.

Chemical probes of aminoacid residues affect the active sites of the glucocorticoid receptor.

Endocrinology **106** (1980) 922-929.

Duax, W. L., Weeks, C. M. and Rohrer, D. C.

Crystal structure of steroids: Molecular conformation and biological function.

Rec. Prog. Horm. Res. **32** (1976) 81-116.

Dunderski, J., Stanosevic, J., Ristic, B., Trajkovic, D. and Matic, G.

In vivo effects of cadmium on rat liver glucocorticoid receptor functional properties.

Int. J. Biochem. **24** (1992) 1065-1072.

Economidis, I. and Rousseau G. G.

Association of the glucocorticoid receptor with ribonucleic acid.

FEBS Lett. **181** (1985) 47-53.

Eisen, H. J., Schleenbaker, R. E. and Simons, S. S. Jr.

Affinity labeling of the rat liver glucocorticoid receptor with dexamethasone 21-mesylate.

J. Biol. Chem. **256** (1981) 12920-12925.

El-Ashry, D., Onate, S. A., Nordeen, S. K. and Edwards, D. P.

Human progesterone receptor complexed with the antagonist RU 486 binds to hormone response elements in a structurally altered form.

Mol. Endocr. **3** (1989) 1545-1558.

Ellman, G. L.

Tissue sulfhydryl groups.

Arch. Biochem. Biophys. **82** (1959) 70-77.

Evans, R. M.

The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.

Science. N. Y. **240** (1988) 889-895.

Farman, N., Oblin, M. E., Lombes, M., Delahaye, F., Westphal, H. M., Bonvalet, J. P. and Gasc, J. M.

Immunolocalization of gluco- and mineralocorticoid receptors in rabbit kidney.

Am. J. Physiol. **260** (1991) C226-C233.

Formstecher, P., Lustenberger, P. and Dautrevaux, M.

Synthesis of steroidal 17 β -carboxamide derivatives.

Steroids. **35** (1980) 265-271.

Formstecher, P., Dumur, V., Idziorek, T., Danze, P. M., Sablonniere, B. and Dautrevaux, M.

Inactivation of unbound rat liver glucocorticoid receptor by N-alkylmaleimides at sub-zero temperatures.

Biochem. Biophys. Acta. **802** (1984) 306-313.

Formstecher, P., Hammadi, H., Bouzerna, N. and Dautrevaux, M.

Rapid purification of antisteroid antibodies by high performance liquid affinity chromatography.

J. Chromatogr. **369** (1986) 379-390.

Fritsch, M., Leary, C. M., Furlow, J. D., Ahrens, H., Schuh, T. J., Mueller, G. C. and Gorski, J.

A ligand-induced conformational change in the estrogen receptor is localized in the steroid binding domain.

Biochemistry **31** (1992) 5303-5311.

Garcia, T., Benhamou, B., Gofflo, D., Vergezac, A., Philibert, D., Chambon, P. and Gronemeyer, H.

Switching agonistic, antagonistic, and mixed transcriptional responses to 11 β -substituted progestins by mutation of the progesterone receptor.

Mol. Endocr. **6** (1992) 2071-2078.

Gehring, U. and Arndt, H.

Heteromeric nature of glucocorticoid hormone receptors.

FEBS Lett. **179** (1985) 138-142.

Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M.

Functional domains of the human glucocorticoid receptor.

Cell **46** (1986) 645-652.

Gray, G. O. and Leawitt, W. W.

RU 486 is not an antiprogestin in the hamster.

J. Steroid Biochem. **28** (1987) 493-497.

Green, S. and Chambon, P.

Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation.

Trends Genet. **4** (1988) 309-314.

Gronemeyer, H. and Meyer, M. E.

Récepteurs nucléaires.

Annales d'Endocrinologie (Paris) **54** (1991) 335-338.

Gronemeyer, H., Meyer, M. E., Bocquel, M. T., Kastner, P., Turcotte, B. and Chambon, P.

Progestin receptors: Isoforms and antihormone action.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **40** (1991) 271-278.

Gronemeyer, H., Benhamou, B., Berry, M., Bocquel, M. T., Gofflo, D., Garcia, T., Lerouge, T., Metzger, D., Meyer, M. E., Tora, L., Vergezac, A. and Chambon, P.
Mechanisms of antihormone action.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **41** (1992) 217-221.

Groyer, A., Lebouc, Y., Joab, I., Radanyi, C., Renoir, J. M. Robel, P. and Baulieu, E. E.
Chick oviduct glucocorticoid receptor - Specific binding of the synthetic steroid RU 486
and immunological studies with antibodies to chick oviduct progesterone receptor.

Eur. J. Biochem. **149** (1985) 445-451.

Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Ragot, T., Bailly, A., Atger, M., Misrahi, M.,
Perricaudet, M. and Milgrom, E.

Receptors bound to antiprogesterin form abortive complexes with hormone responsive
elements.

Nature **336** (1988) 695-698.

Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Lescop, P., Christin-Maitre, S., Perrot-Applanat, M.
and Milgrom, E.

Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor.

J. Steroid Biochem. Molec. Biol. **41** (1992) 209-215.

Gustafsson, J. Å., Wikström, A. C. and Denis, M.

The non-activated glucocorticoid receptor: Structure and activation.

J. Steroid Biochem. **34** (1989) 53-62.

Harlow, K. W., Smith, D.N., Katzenellenbogen, J. A., Greene, G. L. and
Katzenellenbogen, B. S.

Identification of cysteine 530 as the covalent attachment site of an affinity-labeling estrogen
(ketononestrol aziridine) and antiestrogen (tamoxifen aziridine) in the human estrogen
receptor.

J. Biol. Chem. **264** (1989) 17476-17485.

Harrison, R. W., Woodward, C. and Thompson, E.

Titrateable effects of p-chloromercuriphenyl sulfonate, a thiol-attacking reagent, on
glucocorticoid receptor binding.

Biochim. Biophys. Acta. **759** (1983) 1-6.

Holbrook, N. J., Bodwell, J. E. and Munck, A.

Nonactivated and activated glucocorticoid-receptor complexes in WEHI-7 and rat thymus cells.

J. Steroid Biochem. **20** (1984) 19-22.

Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E. S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, B., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M.

Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA.

Nature **318** (1985) 635-641.

Hollenberg, S. M., Giguere, V., Segui, P. and Evans, R. M.

Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor.

Cell **49** (1987) 39-46.

Hollenberg, S. M. and Evans, R. M.

Multiple and cooperative *trans*-activation domains of the human glucocorticoid receptor.

Cell **55** (1988) 899-906.

Housley, P. R., Sanchez, E. R., Danielsen, M., Ringold, G. M. and Pratt, W. B.
Evidence that the conserved region in the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor is required for both optimal binding of HSP 90 and protection from proteolytic cleavage.

J. Biol. Chem. **265** (1990) 12778-12781.

Howard, K. J., Holley, S. J., Yamamoto, K. R. and Distelhorst, C. W.

Mapping the HSP 90 binding region of the glucocorticoid receptor.

J. Biol. Chem. **265** (1990) 11928-11935.

Hurley, D. M., Accili, D., Stratakis, C. A., Karl, M., Vamvakopoulos, N., Rorer, E., Constantine, K., Taylor, S. I. and Chrousos, G. P.

Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance.

J. Clin. Invest. **87** (1991) 680-686.

Husmann, D. A., Wilson, C. M., McPhaul, M. J., Thilley, W. D. and Wilson, J. D. Antipeptide antibodies to two distinct regions of the androgen receptor localize the receptor protein to the nuclei of target cells in the rat and human prostate.

Endocrinology **126** (1990) 2359-2368.

Hutchison, K. A., Matic, G., Czar, M. J. and Pratt, W. B.

DNA-binding and non-DNA-binding forms of the transformed glucocorticoid receptor.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **41** (1992, a) 715-718.

Hutchison, K. A., Czar, M. J. and Pratt, W. B.

Evidence that the hormone-binding domain of the mouse glucocorticoid receptor directly represses DNA binding activity in a major portion of receptors that are "misfolded" after removal of HSP 90.

J. Biol. Chem. **267** (1992, b) 3190-3195.

Ibarrola, I., Alejandro, A., Marino, A., Sancho, M. J., Macarulla, J. M. and Trueba, M. Characterization by photoaffinity labeling of a steroid binding protein in rat liver plasma membrane.

J. Membrane. Biology. **125** (1992) 185-191.

Kahn, A.

Effets anti-prolifératif et anti-inflammatoire des glucocorticoïdes par inhibition des complexes Jun-Fos.

Médecine/Sciences **6** (1990) 1003-1005.

Katzenellenbogen, J. A., Carlson, K. E., Heiman, D. F., Robertson, D. W., Wei, L. L. and Katzenellenbogen, B. S.

Efficient and highly selective covalent labeling of the estrogen receptor with [³H] tamoxifen aziridine.

J. Biol. Chem. **258** (1983) 3487-3495.

Katzenellenbogen, B. S., Elliston, J. F., Monsma, F. J. Jr., Springer, P. A. and Ziegler, Y. S.

Structural analysis of covalently labeled estrogen receptors by limited proteolysis and monoclonal antibody reactivity.

Biochemistry **26** (1987) 2364-2373.

Kaufmann, S. H., Wright, W. W., Okret, S., Wikström, A. C., Gustafsson, J. Å., Shaper, N. L. and Shaper, J. H.

Evidence that rodent epididymal sperm contain the Mr-94,000 glucocorticoid receptor but lack the Mr-90,000 Heat Shock Protein.

Endocrinology **130** (1992) 3074-3084.

Kay, A. and Mitchell, P. C. H.

Molybdenum-cysteine complex.

Nature **219** (1968) 267-268.

King, W. J. and Greene, G. L.

Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells.

Nature, Lond. **307** (1984) 745-749.

King, R. J. B.

Effects of steroid hormones and related compounds on gene transcription.

Clinical Endocrinology **36** (1992) 1-14.

Klein-Hitpass, L., Tsai, S. Y., Weigel, N. L., Riley, D., Rodriguez, R., Schrader, W. T., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W.

Native progesterone receptor stimulates cell-free transcription of a target gene.

Cell **60** (1990) 247-257.

Kloosterboer, H. J., Deckers, G. H. J., van der Heuvel, M. J. and Loozen, H. J. J.

Screening of anti-progestagens by receptor studies and bioassays.

J. Steroid Biochem. **31** (1988) 567-571.

Koyasu, S., Nishida, E., Kodanaki, T. and Yahara, I.

Two mammalian Heat Shock Proteins, HSP 90 and HSP 100, are actin binding proteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83** (1986) 8054-8061.

Kumar, V. and Chambon, P.

The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer.

Cell **55** (1988) 145-156.

Ku Tai, P. K., Albers, M. W., Chang, H., Faber, L. E. and Schreiber, S. L.
Association of a 59-kilodalton immunophilin with the glucocorticoid receptor complex.
Science **256** (1992) 1315-1318.

Labrie, F., Belanger, A., Dupont, A., Pelletier, G., Luu-The, V., Simard, J., Cusan, L.,
Labrie, C., Lachance, Y., Poulin, R., Dupont, E., Zhao, H-F. and Martel, C.
Synthèse périphérique des androgènes chez l'homme (Génétique moléculaire du système et
sa prise en compte dans le traitement du cancer de la prostate).
Médecine/Sciences **6** (1990) 261-267.

Lamontagne, N., Mercier, L., Pons, M., Thompson, E. B. and Simons, S. S. Jr.
Glucocorticoid vs antiglucocorticoid activity: can a single functional group modification of
glucocorticoid steroids always convey antiglucocorticoid activity?.
Endocrinology **114** (1984) 2252-2263.

Lebeau, M. C., Massol, N., Herrick, J., Faber, L. E., Renoir, J. M., Radanyi, C. and
Baulieu, E. E.
P 59, an HSP 90-binding protein. Cloning and sequencing of its cDNA and preparation of a
peptide-directed polyclonal antibody.
J. Biol. Chem. **267** (1992) 4281-4284.

Lee, J. W., Gulick, T. and Moore, D. D.
Thyroid hormone receptor dimerization function maps to a conserved subregion of the
ligand binding domain.
Mol. Endocr. **6** (1992) 1867-1873.

Lefebvre, P., Formstecher, P., Richard, C. and Dautrevaux, M.
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** (1988, a) 1221-1229.

Lefebvre, P., Danze, P. M., Sablonniere, B., Richard, C., Formstecher, P. and
Dautrevaux, M.
Association of the glucocorticoid receptor binding subunit with the 90 K non-steroid
binding component is stabilized by both steroidal and non-steroidal antiglucocorticoids in
intact cells.
Biochemistry **27** (1988, b) 9186-9194.

Lombes, M., Farman, N., Oblin, M. E., Baulieu, E. E., Bonvalet, J. P., Erlanger, B. F. and Gasc, J. M.

Immunohistochemical localization of renal mineralocorticoid receptor by using an anti-idiotypic antibody that is an internal image of aldosterone.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87** (1990) 1086-1088.

Lopez, S., Miyashita, Y. and Simons, S. S. Jr.

Structurally based, selective interaction of arsenite with steroid receptors.

J. Biol. Chem. **265** (1990) 16039-16042.

Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R. and Sigler, P. B.

Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA.

Nature **352** (1991) 497-505.

Mader, S., Kumar, V., De Verneuil, H. and Chambon, P.

Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from glucocorticoid-responsive element.

Nature **338** (1989) 271-274.

Mendel, D. B., Bodwell, J. E., Gametchu, B., Harrison, R. W. and Munck, A.

Molybdate-stabilized nonactivated glucocorticoid-receptor complexes contain a 90-kDa non-steroid-binding phosphoprotein that is lost on activation.

J. Biol. Chem. **261** (1986) 3758-3763.

Meshinchi, S., Matic, G., Hutchison, K. A. and Pratt, W. B.

Selective molybdate-directed covalent modification of sulfhydryl groups in the steroid-binding *versus* the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor.

J. Biol. Chem. **265** (1990) 11643-11649.

Meyer, M. E., Pornon, A., Ji, J., Bocquel, M. T., Chambon, P. and Gronemeyer, H.

Agonistic and antagonistic activities of RU 486 on the functions of the human progesterone receptor.

EMBO J. **9** (1990) 3923-3932.

Michna, H., Schneider, M. R., Nishino, Y. and El Etreby, M. F.

The antitumor mechanism of progesterone antagonists is a receptor mediated antiproliferative effect by induction of terminal cell death.

J. Steroid Biochem. **34** (1989) 447-453.

Michna, H., Nishino, Y., Neef, G., McGuire, W. L. and Schneider, M. R.

Progesterone antagonists: Tumor-inhibiting potential and mechanism of action.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **41** (1992, a) 339-348.

Michna, H., Gehring, S., Kuhnel, W., Nishino, Y. and Schneider, M. R.

The antitumor potency of progesterone antagonists is due to their differentiation potential.

J. Steroid Biochem. Molec. Biol. **43** (1992, b) 203-210.

Miesfeld, R., Rusconi, S., Godowski, P. J., Maler, B. A., Okret, S., Wikstrom, A. C., Gustafsson, J. Å. and Yamamoto, K. R.

Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA.

Cell **46** (1986) 389-399.

Miller, N. R. and Simons, S. S. Jr.

Steroid binding to hepatoma tissue culture cell glucocorticoid receptors involves at least two sulfhydryl groups.

J. Biol. Chem. **263** (1988) 15217-15225.

Miyata, Y. and Yahara, I.

Cytoplasmic 8 S glucocorticoid receptor binds to actin filaments through the 90-kDa Heat Shock Protein moiety.

J. Biol. Chem. **266** (1991) 8779-8783.

Mizutani, T., Bhakta, A., Kloosterboer, H. J. and Moudgil, V. K.

Novel antiprogestins org 31806 and org 31710: Interaction with mammalian progesterone receptor and DNA binding of antisteroid receptor complexes.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **42** (1992) 695-704.

Moguilewsky, M. and Philibert, D.

RU 486 potent antiglucocorticoid activity correlated with strong binding to the cytosolic glucocorticoid receptor followed by an impaired activation.

J. Steroid Biochem. **20** (1984) 271-276.

Moguilewsky, M. and Philibert, D.

Biochemical profile of RU 486.

In *the Antiprogesterin Steroid RU 486 and Human Fertility Control* (Edited by E. E. Baulieu and S. J. Segal Segal). Plenum, New York (1985) 87-98.

Moudgil, V. K., Lombardo, G., Hurd, C., Eliezer, N. and Agarwal, M. K.

Evidence for separate binding sites for progesterone and RU 486 in the chick oviduct.

Biochem. Biophys. Acta. **889** (1986) 192-199.

Moudgil, V. K., Anter, M. J. and Hurd, C.

Mammalian progesterone receptor shows differential sensitivity to sulfhydryl group modifying agents when bound to agonist and antagonist ligands.

J. Biol. Chem. **264** (1989) 2203-2211.

Munck, A., Mendel, D. B., Smith, L. I. and Orti, E.

Glucocorticoid receptors and actions.

Am. Rev. Respir. Dis. **141** (1990) S2-S10.

Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y. and Gustafsson, J. Å.

The transformed glucocorticoid receptor has a lower steroid-binding affinity than the nontransformed receptor.

Biochemistry **29** (1990) 1880-1886.

Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y. and Ota, M.

Association of the 90-kDa Heat Shock Protein does not affect the ligand-binding ability of androgen receptor.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **42** (1992) 803-812.

Nervi, C., Grippo, J. F., Sherman, M. J., George, M. D. and Jetten, A. M.

Identification and characterization of nuclear retinoic acid-binding activity in human myeloblastic leukemia HL-60 cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **86** (1989) 5854-5858.

Okret, S., Wikström, A. C., Wrange, Ö., Andersson, B. and Gustafsson, J. Å.
Monoclonal antibodies against the rat liver glucocorticoid receptor.
Proc. Natl. Acad Sci. USA. **81** (1984) 1609-1613.

Okret, S., Wikström, A. C. and Gustafsson, J. Å.
Molybdate-stabilized glucocorticoid receptor: Evidence for a receptor heteromer.
Biochemistry **24** (1985) 6581-6586.

Okulicz, W. C.
Effect of the antiprogestin RU 486 on progesterone inhibition of occupied nuclear estrogen receptor in the uterus.
J. Steroid Biochem. **28** (1987) 117-122.

Onate, S. A., Estes, P. A., Welch, W. J., Nordeen, S. K. and Edwards, D. P.
Evidence that Heat Shock Protein-70 associated with progesterone receptors is not involved in receptor-DNA binding.
Mol. Endocr. **5** (1991) 1993-2004.

Pakdel, F. and Katzenellenbogen, B. S.
Human estrogen receptor mutants with altered estrogen and antiestrogen ligand discrimination.
J. Biol. Chem. **267** (1992) 3429-3437.

Peattie, D. A., Harding, M. W., Fleming, M. A., Decenzo, M. T., Lippke, J. A., Livingston, D. J. and Benasutti, M.
Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa Heat Shock Protein and is a component of steroid receptor complexes.
Proc. Natl. Acad Sci. USA. **89** (1992) 10974-10978.

Pekki, A., Koistinaho, J., Ylikomi, T., Vilja, P., Westphal, H. and Touhima, P.
Subcellular location of unoccupied and occupied glucocorticoid receptor by a new immunohistochemical technique.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **41** (1992) 753-756.

Perrot-Applanat, M., Logeat, F., Groyer-Picard, M. T. and Milgrom, E.: Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies.

Endocrinology **116** (1985) 1473-1484.

Perrot-Applanat, M., Lescop, P. and Milgrom, E.

The cytoskeleton and the cellular traffic of the progesterone receptor.

J. Cell Biol. **119** (1992) 337-348.

Philibert, D. and Moguilewsky, M.

RU 28362, a useful tool for the characterization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors.

65^e Annual Meeting the Endocrine Society (1983).

Abstract n° 1018 p. 335.

Philibert, D., Hardy, M., Gaillard-Moguilewsky, M., Nique, F., Tournemine, C. and Nédélec, L.

New analogues of Mifepristone with more dissociated antiprogestosterone activities.

J. Steroid Biochem. **34** (1989) 413-417.

Picard, D. and Yamamoto, K. R.

Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor.

EMBO J. **6** (1987) 3333-3340.

Picard, D., Kumar, V., Chambon, P. and Yamamoto, K. R.

Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors.

Cell Reg. **1** (1990) 291-299.

Pongratz, I., Mason, G. G. F. and Poellinger, L.

Dual roles of the 90-kDa Heat Shock Protein HSP 90 in modulating functional activities of the dioxin receptor- Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require HSP 90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity.

J. Biol. Chem. **267** (1992) 13728-13734.

Pratt, W. B.

Transformation of glucocorticoid and progesterone receptors to the DNA-binding state.

J. Cell. Biochem. **35** (1987) 51-58.

Pratt, W. B., Jolly, D. J., Pratt, D. V., Hollenberg, S. M., Giguere, V., Cadepond, F. M., Schweizer-Groyer, G., Catelli, M. G., Evans, R. M. and Baulieu, E. E.

A region in the steroid binding domain determines formation of the non-DNA binding, 9 S glucocorticoid receptor complex.

J. Biol. Chem. **263** (1988) 267-273.

Pratt, W. B;

Interaction of HSP 90 with steroid receptors: Organizing some diverse observations and presenting the newest concepts.

Mol. Cell. Endocrinol. **74** (1990) C69-C76.

Pratt, W. B., Scherrer, L. C., Hutchison, K. A. and Dalman, F. C.

A model of glucocorticoid receptor unfolding and stabilization by a Heat Shock Protein complex.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **41** (1992, a) 223-229.

Pratt, W. B., Hutchison, K. A. and Scherrer, L. C.

Steroid receptor folding by Heat-Shock Proteins and composition of the receptor heterocomplex.

Trends Endocr Metabolism **3** (1992, b) 326-333.

Read, S. M. and Northcote, D. M.

Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G Dye assay for proteins.

Anal. Biochem. **116** (1981) 53-64.

Reese, J. C. and Katzenellenbogen, B. S.

Mutagenesis of cysteines in the hormone binding domain of the human estrogen receptor.

J. Biol. Chem. **266** (1991) 10880-10887.

Reese, J. C., Wooge, C. H. and Katzenellenbogen, B. S.

Identification of 2 cysteines closely positioned in the ligand-binding pocket of the human estrogen receptor - Roles in ligand binding and transcriptional activation.

Mol. Endocr. **6** (1992, a) 2160-2166.

Reese, J. C. and Katzenellenbogen, B. S.

Characterization of a temperature-sensitive mutation in the hormone binding domain of the human estrogen receptor.

J. Biol. Chem. **267** (1992, b) 9868-9873.

Rees, A. M. and Bell, P. A.

The involvement of receptor sulfhydryl groups in the binding of steroids to the cytoplasmic glucocorticoid receptor from rat thymus.

Biochem. Biophys. Acta. **411** (1975) 121-132.

Reichman, M. E., Foster, C. M., Eisen, L. P., Eisen, H. J., Torain, B. F. and Simons, S. S. Jr.

Limited proteolysis of covalently labeled glucocorticoid receptors as a probe of receptor structure.

Biochemistry **23** (1984) 5376-5384.

Renoir, J. M., Radanyi, C., Faber, L. E. and Baulieu, E. E.

The non-DNA-binding heterooligomeric form of mammalian steroid hormone receptors contains a HSP 90-bound 59-kiloDalton protein.

J. Biol. Chem. **265** (1990) 10740-10745.

Renoir, J. M., Radanyi, C. and Baulieu, E. E.

Effect of the immunosuppressants FK 506 and rapamycin on progesterone receptor function-The Heat Shock Protein-binding P 59 immunophilin between immunological and hormonal activities.

Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Série III, Sciences de la Vie. **315** (1992) 421-428.

Rexin, M., Busch, W., Segnitz, B. and Gehring, U.

Subunit structure of the glucocorticoid receptor and activation to the DNA-binding state.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **40** (1991, a) 287-299.

Rexin, M., Busch, W. and Gehring, U.

Protein components of the nonactivated glucocorticoid receptor.

J. Biol. Chem. **266** (1991, b) 24601-24605.

Rexin, M., Busch, W., Segnitz, B. and Gehring, U.

Structure of the glucocorticoid receptor in intact cells in the absence of hormone.

J. Biol. Chem. **267** (1992) 9619-9621.

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

Immunological evidence that the nonhormone binding component of avian steroid receptors exists in a wide range of tissues and species.

Biochemistry **24** (1985) 6586-6591.

Rousseau, G.G., Baxter, J. D. and Tomkins, G. M.

Glucocorticoid receptors: Relation between steroid structure and biological effects.

J. Mol. Biol. **14** (1972) 99-105.

Rousseau, G. G. and Schmit, J. P.

Structure-activity relationships for glucocorticoids. (I) determination of receptor binding and biological activity.

J. Steroid Biochem. **8** (1977) 911-919.

Rousseau, G. G., Kirchhoff, J., Formstecher, P. and Lustenberger, P.

17 β -carboxamide steroids are a new class of glucocorticoid antagonists.

Nature **279** (1979) 158-160.

Rousseau, G. G., Cambron, P., Brasseur, N., Marcotte, L., Matton, P. and Schmit, J. P.

Glucocorticoid agonist and antagonist activity of 17,21-acetonide steroids.

J. Steroid Biochem. **18** (1983) 237-244.

Rousseau, G. G.

Structure and regulation of the glucocorticoid hormone receptor.

Mol. Cell. Endocrinol. **38** (1984) 1-11.

Rusconi, S. and Yamamoto, K. R.

Functional dissection of the hormone and DNA binding activities of the glucocorticoid receptor.

EMBO J. **6** (1987) 1309-1315.

Sablonniere, B., Economidis, J. V., Lefebvre, P., Place, M., Richard, C., Formstecher, P., Rousseau, G. G. and Dautrevaux, M.

RNA binding to the untransformed glucocorticoid receptor.

Eur. J. Biochem. **177** (1988) 371-382.

Sanchez, E. R., Redmond, T., Scherrer, L. C., Bresnick, E. H., Welsh, M. J. and Pratt, W. B.

Evidence that the 90-kilodalton Heat Shock Protein is associated with tubulin-containing complexes in L cell cytosol and in intact PtK cells.

Mol. Endocr. **2** (1988) 756-760.

Sanchez, E. R.

HSP 56: A novel Heat Shock Protein associated with untransformed steroid receptor complexes.

J. Biol. Chem. **265** (1990) 22067-22070.

Schauer, M., Chalepakis, G., Willmann, T. and Beato, M.

Binding of hormone accelerates the kinetics of glucocorticoid and progesterone receptor binding to DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **86** (1989) 1123-1127.

Scherrer, L. C., Hutchison, K. A., Sanchez, E. R., Randall, S. K. and Pratt, W. B.

A Heat Shock Protein complex isolated from rabbit reticulocyte lysate can reconstitute a functional glucocorticoid receptor-HSP 90 complex.

Biochemistry **31** (1992) 7325-7329.

Schreiber, V., De Murcia, G. and Ménéssier de Murcia, J.

Le transport des protéines dans le noyau: les signaux de localisation nucléaire et leurs récepteurs.

Médecine/Sciences **8** (1992) 134-139.

Simons, S. S. Jr., Thompson, E. B. and Johnson, D. F.

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

Biochem. Biophys. Res. Commun. **86** (1979) 793-800.

Simons, S. S. Jr. and Thompson, E. B.

Dexamethasone 21-mesylate: An affinity label of glucocorticoid receptors from rat hepatoma tissue culture cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **78** (1981) 3541-3545.

Simons, S. S. Jr., Pumphrey, J. G., Rudikoff, S. and Eisen, H. H.

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

J. Biol. Chem. **262** (1987) 9676-9680.

Simons, S. S. Jr., Sistare, F. D. and Chakraborti, P. K.

Steroid binding activity is retained in a 16-kDa fragment of the steroid binding domain of rat glucocorticoid receptors.

J. Biol. Chem. **264** (1989) 14493-14497.

Simons, S. S. Jr., Chakraborti, P. K. and Cavanaugh, A. H.

Arsenite and cadmium (II) as probes of glucocorticoid receptor structure and function.

J. Biol. Chem. **265** (1990) 1938-1945.

Smith, L. I., Bodwell, J. E., Mendel, D. B., Ciardelli, T., North, W. G. and Munck, A.

Identification of cysteine-644 as the covalent site of attachment of dexamethasone 21-mesylate to murine glucocorticoid receptors in WEHI-7 cells.

Biochemistry **27** (1988) 3747-3753.

Srivastava, D. and Thompson, E. B.

Two glucocorticoid binding sites on the human glucocorticoid receptor.

Endocrinology **127** (1990) 1770-1778.

Strähle, U., Boshart, M., Klock, G., Stewart, F. and Schütz, G.

Glucocorticoid and progesterone - Specific effects are determined by differential expression of the respective hormone receptors.

Nature **339** (1989) 629-632.

Strömstedt, P. E., Berkenstam, A., Jörnvall, H., Gustafsson, J. Å. and Carlstedt-Duke, J. Radiosequence analysis of the human progestin receptor charged with (³H) Promegestone. *J. Biol. Chem.* **265** (1990) 12973-12977.

Svec, F., Teubner, V. and Tate, D.

Location of the second steroid-binding site on the glucocorticoid receptor.

Endocrinology **125** (1989) 3103-3108.

Takimoto, G. S., Tasset, D. M., Eppert, A. C. and Horwitz, K. B.

Hormone-induced progesterone receptor phosphorylation consists of sequential DNA-independent and DNA-dependant stages: Analysis with zinc finger mutants and the progesterone antagonist ZK 98299.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89** (1992) 3050-3054.

Tashima, Y., Terui, M., Itoh, H., Mizunuma, H., Kobayashi, R. and Marumo, F.

Effect of selenite on glucocorticoid receptor.

J. Biochem. **105** (1989) 358-361.

Teutsch, G. and Costerousse, G.

17 α -alkynyl-11 β , 17-dihydroxyandrostane derivatives: a new class of potent glucocorticoids.

Steroids **38** (1981) 651-665.

Teutsch, G.

11 beta-substituted 19-norsteroids: At the crossroads between hormone agonists and antagonists.

In *Adrenal steroid antagonism*. (Edited by M. K. Agarwal). Walter de Gruyter and Co, Berlin, (1984), pp 43-75.

Tienrungroj, W., Meshinchi, S., Sanchez, E. R., Pratt, S. E., Grippo, J. F., Holmgren, A. and Pratt, W. B.

The role of sulfhydryl groups in permitting transformation and DNA binding of the glucocorticoid receptor.

J. Biol. Chem. **262** (1987) 6992-7000.

Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E. and Chambon, P.

The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions.

Cell **59** (1989) 477-487.

Turcotte, B., Meyer, M. E., Bocquel, M. T., Belanger, L. and Chambon, P.

Repression of the α -fetoprotein gene promoter by progesterone and chimeric receptors in the presence of hormones and antihormones.

Molec. Cell. Biol. **10** (1990) 5002-5006.

Vedeckis, V. W.

Subunit dissociation as a possible mechanism of glucocorticoid receptor activation.

Biochemistry **22** (1983) 1983-1989.

Vegeto, E., Allan, G. F., Schrader, W. T., Tsai, M. J., McDonnell, D. P. and

OMalley, B. W.

The mechanism of RU 486 antagonist is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor.

Cell **69** (1992) 703-713.

Veldscholte, J., Berrevoets, C. A., Brinkmann, A. O., Grootegoed, J. A. and Mulder, E.

Anti-androgens and the mutated androgen receptor of LNCaP cells: Differential effects on binding affinity, Heat-Shock Protein interaction, and transcription activation.

Biochemistry **31** (1992) 2393-2399.

Walters, M. R., Hunziker, W. and Norman, A. W.

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptors: intermediates between triiodothyronine and steroid hormone receptors.

Trends Biochem. Sci. **6** (1981) 268-271.

Weigel, N. L., Carter, T. H., Schrader, W. T. and O'Malley, B. W.

Chicken progesterone receptor is phosphorylated by a DNA-dependent protein kinase during in vitro transcription assays.

Mol. Endocr. **6** (1992, a) 8-14.

Weigel, N. L., Beck, C. A., Estes, P. A., Prendergast, P., Altmann, M., Christensen, K. and Edwards, D. P.

Ligands induce conformational changes in the carboxyl-terminus of progesterone receptors which are detected by a site-directed antipeptide monoclonal antibody.

Mol. Endocr. **6** (1992, b) 1585-1597.

Weinberger, C., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M.

Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the v-erb-A oncogene product.

Nature **318** (1985) 670.

Wikström, A. C., Bakke, O., Okret, S., Brönnegård, M. and Gustafsson, J.Å.

Intracellular localization of the glucocorticoid receptor: Evidence for cytoplasmic and nuclear localization.

Endocrinology **120** (1987) 1232-1242.

Wolff, M. E., Baxter, J. D., Kollman, P. A., Lee, D. L., Kuntz, I. D., Bloom, E., Matulich, D. T. and Morris, J.

Biochemistry **17** (1978) 3201-3208.

Wooge, C. H., Nilsson, G. M., Heierson, A., McDonnell, D. P. and Katzenellenbogen, B. S.

Structural requirements for high affinity ligand binding by estrogen receptors- A comparative analysis of truncated and full length estrogen receptors expressed in bacteria, yeast, and mammalian cells.

Mol. Endocr. **6** (1992) 861-869.

Wrange, O. and Gustafsson, J. Å.

Separation of the hormone- and DNA-binding sites of the hepatic glucocorticoid receptor by means of proteolysis.

J. Biol. Chem. **253** (1978) 856-865.

Young, H. A., Parks, W. P. and Scolnick, E. M.

Effect of chemical inactivating agents on glucocorticoid receptor proteins in mouse and hamster cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **72** (1975) 3060-3064.

Zilliacus, J., Dahlman-Wright, K., Wright, A., Gustafsson, J. Å. and Carlstedt-Duke, J. DNA binding specificity of mutant glucocorticoid receptor DNA-binding domains. *J. Biol. Chem.* **266** (1991) 3101-3106.

Zilliacus, J., Wright, A. P. H., Norinder, U., Gustafsson, J. Å. and Carlstedt-Duke, J. Determinants for DNA-binding site recognition by the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 24941-24947.

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX DE LA PARTIE**"INTRODUCTION"**

	PAGE
-- ILLUSTRATIONS	
* figure 1 : Mécanisme d'action des hormones glucocorticoïdes au niveau des cellules-cibles.	20
* figure 2 : Illustration du mécanisme d'action supposé du molybdate avec les résidus cystéines (d'après KAY et MITCHELL, 1968).	26
* figure 3 : Modèle structural du récepteur sous forme transformée (d'après le modèle de MUNCK <i>et al</i> , 1990).	28
* figure 4 : Modèle structural des récepteurs nucléaires.	29
* figure 5 : Organisation structure/fonction des récepteurs nucléaires.	31
* figure 6 : Domaine de liaison à l'ADN ou domaine C.	33
* figure 7 : Quelques réactifs spécifiques des thiols.	39
* figure 8 : Structure et mécanisme de liaison du mésylate de dexaméthasone sur le récepteur des glucocorticoïdes (d'après SIMONS <i>et al</i> , 1981).	43
* figure 9 : Domaine de liaison du stéroïde ou domaine(s) E/F.	46*
* figure 10 : Structure des principaux stéroïdes (agonistes ou antagonistes) naturels ou synthétiques.	55
* figure 11 : Intérêts des ligands de synthèse dans le domaine de le recherche.	56
* figure 12 : Structure de divers stéroïdes ligands du RGC.	59
* figure 13 : Structure du RU 486, de l'Org 31710 et de l'Org 31806.	62
* figure 14 : Mécanismes possibles d'action des antagonistes ou anti-hormones (d'après GRONEMEYER <i>et al</i> , 1992).	65
* figure 15 : Mode d'intervention des anti-hormones.	66
* figure 16 : Différents modèles d'action des antagonistes (d'après KING, 1992).	67
* figure 17 : Structure de quelques stéroïdes antagonistes.	71

-- TABLEAUX

- * tableau I : Intérêt médical des anti-hormones. 57

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX DE LA PARTIE**"RESULTATS ET DISCUSSION"****-- ILLUSTRATIONS**

- * figure 18 : Pré-incubation du cytosol avec la NEM avant addition de la TA ou de RU 486 tritiés. 82
- * figure 19 : Pré-incubation du cytosol avec l'IA avant addition de la TA ou de RU 486 tritiés. 84
- * figure 20 : Pré-incubation du cytosol avec le MMTS avant addition de la TA tritiée. 85
- * figure 21 : Cinétique d'association du RGC, après traitement au préalable par différentes maléimides, avec:
- a) le RU 486 tritié (résultats exprimés en pourcentages).
- b) la TA tritiée (résultats exprimés en pourcentages). 88
- * figure 22 : Réactions de compétition (RU 486 tritié). 91
- * figure 23 : Illustration des réactions d'échange (mode d'évaluation). 94
- * figure 24 : Cinétique d'échange de la TA.
- A) Echanges TA/TA.
- B) Echanges TA/RU 486. 96
- * figure 25 a : Cinétique d'échange du RU 486 (Echanges RU 486/RU 486). 98
- * figure 25 b : Cinétique d'échange du RU 486 (Echanges RU 486/TA). 99

* figure 26 : Cinétique d'échange de stéroïdes (la TA ou RU 486 tritiés) après post-incubation avec l'IA (6.10^{-3} M, 30 minutes, 4°C).	101
* figure 27 : Illustration des résultats des réactions d'échanges TA-RU 486.	102
* figure 28 : Cinétique d'échange (réaction d'association) du DXB par la TA ou par RU 486 tritiés (post-incubation ou non du cytosol avec la NEM).	106
* figure 29 : Cinétique d'échange (réaction d'association) du COR par la TA ou par RU 486 tritiés (post-incubation ou non du cytosol avec la NEM).	107
* figure 30 : Positionnement hypothétique du ligand à l'intérieur du site actif du RGC.	112
* figure 31 : Identification des acides aminés essentiels (mode opératoire).	114
* figure 32 (a; b) : Structure chimique des stéroïdes utilisés.	119-120
* figure 33 : Affinité de liaison des différents stéroïdes pour le RGC (courbes de compétition et calcul des K_i).	123
* figure 34 : Cinétique d'échange de stéroïdes (2 ^{ème} ligand: Dex tritiée).	126
* figure 35 : Mesure du rayon de Stokes du récepteur sur la TSK G 3000 SW.	
- Partie A : Un aliquote de chaque fraction récoltée est mesuré en radioactivité (cpm par fraction).	129
- Partie B : Courbe de calibration obtenue à partir de protéines standards, dont les rayons de Stokes sont connus.	129
- Partie C : Analyse par Dot-Blot des fractions obtenues avec les échantillons incubés avec les différents stéroïdes testés. Immunorévélation par l'anticorps anti-HSP 90 (Ac 88) de Toft (couloirs a) et par l'anticorps anti-RGC (AC 7) d'Okret (couloirs b).	131

-- TABLEAUX

* tableau II : Préincubation avec la NEM ou la N-benzylmaléimide avant addition de RU 486 ou de la TA tritiés.	89
--	----

* tableau III : Taux de protection des acides aminés essentiels du site donné par le premier ligand incubé vis-à-vis de la NEM.

109

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX DE LA PARTIE

"MATERIELS ET METHODES"

-- ILLUSTRATIONS

* figure 36 : Structure de diverses maléimides.

141

