

50376  
1985  
137

50376  
1985  
137

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

Année 1985

N° d'ordre : 652

**THESE**

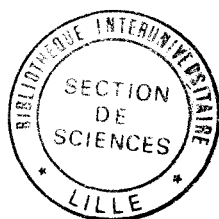
présentée à l'Université de Lille I  
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES  
OPTION PHYSIOLOGIE

par

**JEAN . PHILIPPE PEYRAT**

**LA RECEPTIVITE AUX HORMONES POLYPEPTIDIQUES  
en situation physiologique et en pathologie tumorale**



présentée le 29 Mai 1985 devant la Commission d'Examen

**JURY**

Président : Professeur J-P. ROUSSEAU  
Rapporteurs : Professeur J. LEFEBVRE  
Docteur S. SAEZ  
Docteur J. DJIANE  
Examineurs : Professeur J. KREMBEL  
Professeur R. OZON

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT  
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, COR-  
DONNIER, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN,  
GLACET, GONTIER, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG,  
LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU,  
ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET  
TECHNIQUES DE LILLE

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

#### PROFESSEURS - 2ème Classe

M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

M. BRUYELLE Pierre  
 M. CAPURON Alfred  
 M. CARREZ Christian  
 M. CAYATTE Jean-Louis  
 M. CHAPOTON Alain  
 M. COQUERY Jean-Marie  
 Mme CORSIN Paule  
 M. CORTOIS Jean  
 M. COUTURIER Daniel  
 M. CROSNIER Yves  
 M. CURGY Jean-Jacques  
 Mlle DACHARRY Monique  
 M. DAUCHET Max  
 M. DEBRABANT Pierre  
 M. DEGAUQUE Pierre  
 M. DELORME Pierre  
 M. DELORME Robert  
 M. DE MASSON D'AUTUME Antoine  
 M. DEMUNTER Paul  
 M. DENEL Jacques  
 M. DE PARIS Jean-Claude  
 Mlle DESSAUX Odile  
 M. DEVRAINNE Pierre  
 M. DHAINAUT André  
 Mme DHAINAUT Nicole  
 M. DORMARD Serge  
 M. DOUKHAN Jean-Claude  
 M. DUBOIS Henri  
 M. DUBRULLE Alain  
 M. DUBUS Jean-Paul  
 M. DUPONT Christophe  
 M. FAKIR Sabah  
 M. FONTAINE Hubert  
 M. FOUQUART Yves  
 M. FRONTIER Serge  
 M. GAMBLIN André  
 M. GLORIEUX Pierre

M. GOBLOT Rémi  
 M. GOSSELIN Gabriel  
 M. GOUDMAND Pierre  
 M. GREGORY Pierre  
 M. GREMY Jean-Paul  
 M. GREVET Patrick  
 M. GUILBAULT Pierre  
 M. HENRY Jean-Pierre  
 M. HERMAN Maurice  
 M. JACOB Gérard  
 M. JACOB Pierre  
 M. JACQUILLAT Bertrand  
 M. JEAN Raymond  
 M. JOFFRE Patrick  
 M. JOURNEL Gérard

Géographie  
 Biologie animale  
 Informatique  
 Sciences économiques  
 Electronique  
 Psychophysiologie  
 Paléontologie  
 Physique nucléaire et corpusculaire  
 Chimie organique  
 Electronique  
 Biologie  
 Géographie  
 Informatique  
 Géologie appliquée  
 Electronique  
 Physiologie animale  
 Sciences économiques  
 Sciences économiques  
 Sociologie  
 Informatique  
 Analyse  
 Spectroscopie de la réactivité chimique  
 Chimie minérale  
 Biologie animale  
 Biologie animale  
 Sciences économiques  
 Physique du solide  
 Spectroscopie hertzienne  
 Spectroscopie hertzienne  
 Spectrométrie des solides  
 Vie de la firme (I.P.A.)  
 Algèbre  
 Dynamique des cristaux  
 Optique atmosphérique  
 Ecologie numérique  
 Géographie urbaine, industrielle et démographi-  
 Physique moléculaire et rayonnements atmosphé-  
 riques

Algèbre  
 Sociologie  
 Chimie physique  
 I.P.A.  
 Sociologie  
 Sciences économiques  
 Physiologie animale  
 Génie mécanique  
 Physique spatiale  
 Informatique  
 Probabilités et statistiques  
 Gestion  
 Biologie des populations végétales  
 Vie de la firme (I.P.A.)  
 Spectroscopie hertzienne



M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MONTEL Marc	Physique du solide
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean-Claude	E.U.D.I.L.
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
Mme ZINN Justin Nicole	Algèbre

# SOMMAIRE

-----

*Ce mémoire a été réalisé au Centre de Lutte Contre le Cancer de la région Nord (Centre Oscar LAMBRET).*

*J'exprime ma gratitude à tous ceux qui y ont contribué.*

*Qu'il me soit permis, tout d'abord, de remercier Monsieur le Professeur A. DEMAILLE, Directeur du Centre Oscar LAMBRET, de la bienveillance qu'il m'a toujours témoignée et des conditions incomparables dans lesquelles il m'a permis de travailler.*

*Je suis reconnaissant au Professeur ROUSSEAU d'avoir bien voulu analyser ce travail et me faire part de ses judicieuses critiques.*

*Je prie Monsieur le Professeur LEFEBVRE, qui m'a accueilli à LILLE et a toujours porté un grand intérêt à mes recherches, de trouver ici l'expression de ma gratitude.*

*Je remercie le Docteur Simone SAEZ, le Professeur OZON et le Professeur KREMBEL d'avoir accepté de juger ce mémoire.*

*La réalisation de mes projets n'aurait pas été possible sans la collaboration de Jean DJIANE ; j'ai usé abondamment de sa disponibilité, de ses conseils et de sa grande expérience. Qu'il soit assuré de ma reconnaissance et de mon amitié.*

*Tout au long de ce travail, j'ai bénéficié des conseils et des encouragements de Bernard HECQUET, qu'il trouve ici l'expression de mon amitié.*

*Ma gratitude va également à Brigitte VANDEWALLE ; notre collaboration a été, je crois, enrichissante.*

*Une collaboration fructueuse et amicale avec l'équipe médicale du Centre Oscar LAMBRET a été déterminante dans la réalisation de ce travail. Je remercie chaleureusement les Docteurs Jacques BONNETERRE et Philippe VENNIN qui ont su me communiquer leur enthousiasme pour la cancérologie et qui m'ont fait bénéficier de leurs connaissances étendues.*

*Je n'oublie pas Monsieur le Professeur THIBAUT qui, à mes débuts, m'a donné le goût de la recherche et témoigné sa confiance.*

*La compétence technique et la gentillesse de Madame Marie-Michèle LOUCHEZ ont été indispensables à la réalisation des expérimentations. Qu'elle soit ici remerciée et trouve l'assurance de mon amitié.*

*Madame Yvette VENDEL a réalisé avec méticulosité la dactylographie et la présentation de ce mémoire. Je la remercie très cordialement.*

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CARACTÉRISTIQUES DES RÉCEPTEURS AUX HORMONES POLYPEPTIDIQUES.....	7
2.1. GENERALITES, CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES ESSENTIELLES....	8
2.1.1. Interaction hormone-récepteur.....	8
2.1.2. Calcul de la constante d'affinité et du nombre de sites.....	10
2.1.3. Etudes cinétiques.....	13
2.2. CARACTERISTIQUES DES RECEPTEURS DE LA LH DANS LE TESTICULE DE PORC.....	13
2.2.1. Préparation de suspensions de membranes.....	13
2.2.2. Hormones marquées.....	15
2.2.3. Interaction entre oLH et récepteur testiculaire.....	19
2.3. CARACTERISTIQUES DES RECEPTEURS DE LA PRL DANS LES CANCERS DU SEIN.....	21
2.3.1. Préparation de suspensions de membranes. Localisation subcellulaire des récepteurs.....	21
2.3.2. Hormone marquée.....	21
2.3.3. Interaction entre hPRL et récepteurs des cancers du sein.....	24
2.4. DISCUSSION - CONCLUSION.....	30
RÔLE DES RÉCEPTEURS DE LA LH DANS LA MATURATION DU TESTICULE DE PORC.....	33
3.1. INTRODUCTION.....	35
3.1.1. Contrôle hormonal du fonctionnement testiculaire....	35
3.1.2. Mécanisme d'action de la LH.....	36
3.1.3. Modulation de l'action de la LH.....	38
3.2. EVOLUTION DU NOMBRE ET DE L'AFFINITE DES RECEPTEURS DE LA LH DANS LE TESTICULE DE PORC AU COURS DU DEVELOPPEMENT POST-NATAL.....	39
3.2.1. Histologie quantitative.....	39
3.2.2. Contenu en récepteurs du testicule.....	41
3.3. DISCUSSION - CONCLUSION.....	41
LES RÉCEPTEURS AUX HORMONES LACTOGÈNES DANS LES CANCERS DU SEIN.....	44
4.1. INTRODUCTION.....	46

4.1.1. Contrôle hormonal de la glande mammaire normale.....	46
4.1.2. Contrôle hormonal des tumeurs mammaires.....	49
4.1.3. Récepteurs et dépendance hormonale de la glande mammaire tumorale.....	52
4.2. LES RECEPTEURS DE LA PRL DANS LES TUMEURS INDIVIDUELLES....	53
4.3. MODULATION DU CONTENU EN RECEPTEURS DE LA PRL.....	54
4.3.1. Modulation in vivo.....	54
4.3.2. Modulation in vitro.....	54
4.4. EFFETS CELLULAIRES DE LA PRL APRES LIAISON AUX RECEPTEURS..	57
4.4.1. Stimulation par la PRL de la synthèse de DNA.....	57
4.4.2. Stimulation par la PRL de la synthèse d'alpha- lactalbumine.....	58
4.4.3. Corrélations entre récepteurs de la PRL et récepteurs des hormones stéroïdes.....	58
4.5. POSSIBLE APPLICATION PRATIQUE : CIBLAGE DES CELLULES CONTENANT DES RECEPTEURS DE LA PRL PAR DES AGENTS ANTIMITOTIQUES.....	59
4.6. DISCUSSION - CONCLUSION.....	60
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	68
RÉFÉRENCES.....	74

ARTICLE I : (page 32)

CHARACTERIZATION OF PROLACTIN RECEPTORS IN HUMAN BREAST CANCER

J-P. PEYRAT, J. DJIANE, PA. KELLY, B. VANDEWALLE, J. BONNETERRE, A. DEMAILLE

Breast Cancer Res. Treat., 1984, 4, 275-281.

ARTICLE II : (page 43)

CHANGES IN LEYDIG CELLS AND LUTEINIZING HORMONE RECEPTORS IN PORCINE TESTIS DURING POSTNATAL DEVELOPMENT

J-P. PEYRAT, MEUSY-DESSOLLE N., GARNIER J.

Endocrinology, 1981, 108, 625-631.

ARTICLE III : (page 62)

TOTAL PROLACTIN BINDING SITES IN HUMAN BREAST CANCER BIOPSIES.

J-P. PEYRAT, D. DEWAILLY, J. DJIANE, PA. KELLY, B. VANDEWALLE, J. BONNETERRE, J. LEFEBVRE

Breast Cancer Res. Treat., 1981, 1, 369-373.

ARTICLE IV : (page 63)

EFFECT OF BROMOCRIPTIN TREATMENT ON PROLACTIN AND STEROID RECEPTOR LEVELS IN HUMAN BREAST CANCER

J-P. PEYRAT, Ph. VENNIN, J. BONNETERRE, B. HECQUET, B. VANDEWALLE, PA. KELLY, J. DJIANE

Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 1984, 20, 1363-1367.

ARTICLE V : (page 64)

STIMULATION OF DNA SYNTHESIS BY PROLACTIN IN HUMAN BREAST TUMOR EXPLANTS. RELATION TO PROLACTIN RECEPTORS

J-P. PEYRAT, J. DJIANE, J. BONNETERRE, B. VANDEWALLE, Ph. VENNIN, A. DELOBELLE, G. DEPADT, J. LEFEBVRE

Anticancer Research, 1984, 4, 257-262.

ARTICLE VI : (page 65)

PROLACTIN RECEPTORS AND LACTALBUMIN PLASMA LEVEL PRODUCTION IN HUMAN BREAST CANCERS.

J-P. PEYRAT, J. BONNETERRE, B. VANDEWALLE, Ph. VENNIN, A. LESOIN, J. LEFEBVRE

Ann. N.Y., Acad. Sci, 1985 (in press)

ARTICLE VII : (page 66)

PROLACTIN RECEPTORS IN HUMAN BREAST CANCER

J. BONNETERRE, J-P. PEYRAT, B. VANDEWALLE, R. BEUSCART, MC. VIE, P. CAPPELAERE

Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 1982, 18, 1157-1162.

ARTICLE VIII : (page 67)

CIS-PLATINUM COMPLEX WITH RETAINED PROLACTIN RECEPTOR SPECIFIC BINDING

B. HECQUET, J-P. PEYRAT, J. BONNETERRE, A. DEMAILLE

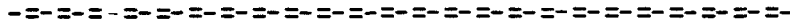
Biomedicine & Pharmacotherapy, 1983, 37, 236-239.

## ABREVIATIONS USUELLES

-----

<i>LH</i>	<i>Luteinizing Hormone, hormone lutéinisante ou lutropine</i>
<i>hCG</i>	<i>human Chorionic Gonadotrophin, hormone chorionique gonadotrophique humaine</i>
<i>PRL</i>	<i>Prolactine</i>
<i>h</i>	<i>humaine</i>
<i>o</i>	<i>ovine</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosine triphosphate</i>
<i>AMPc</i>	<i>Adenosine monophosphate cyclique</i>
<i>GTP</i>	<i>Guanosine triphosphate</i>
<i>GDP</i>	<i>Guanosine diphosphate</i>

# I- INTRODUCTION GENERALE





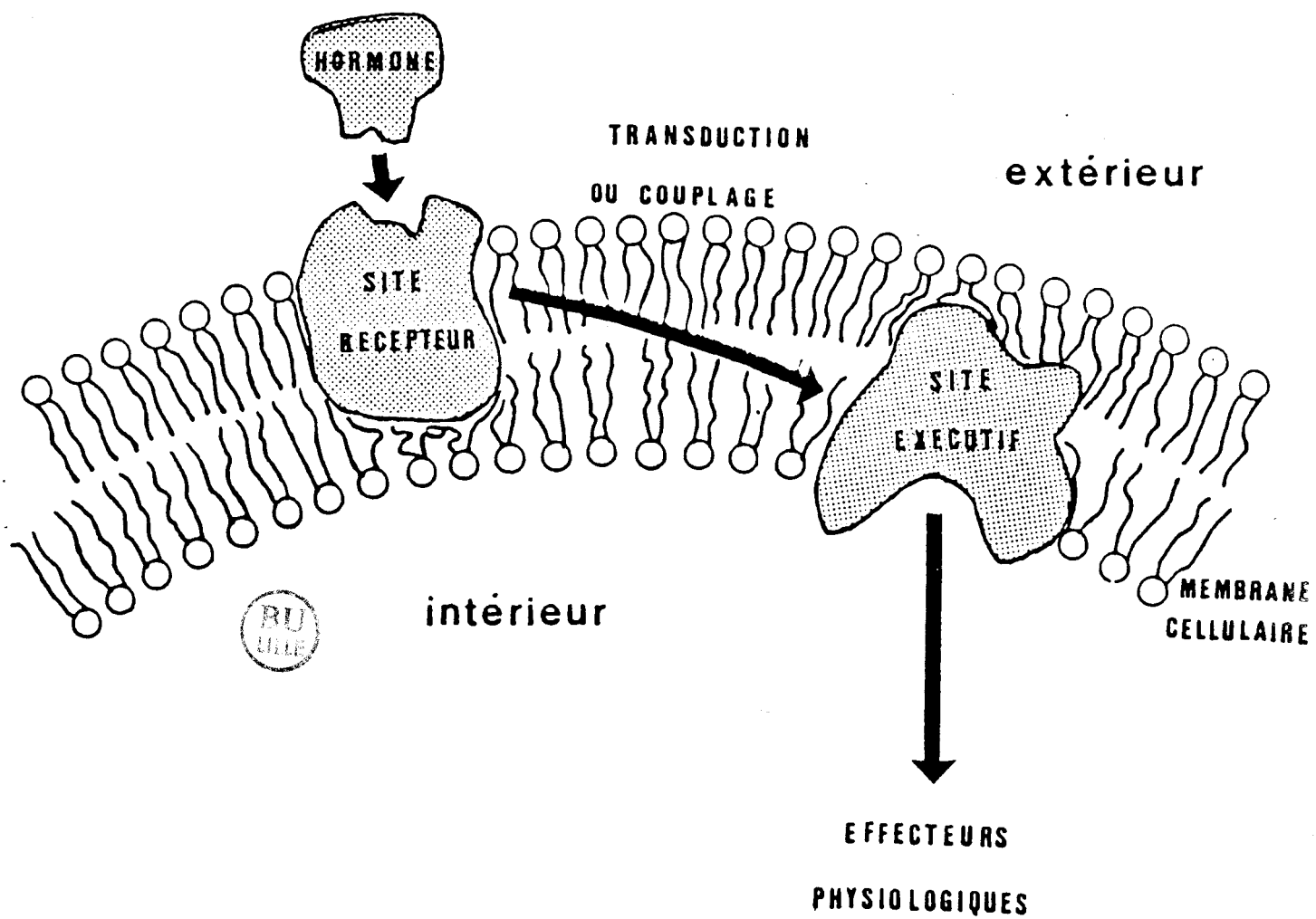


FIGURE 1.1. - SCHEMA ILLUSTRANT LE MECANISME D'ACTION D'UNE HORMONE POLYPEPTIDIQUE

Les hormones polypeptidiques exercent leur action en se fixant sur des récepteurs situés au niveau de la membrane plasmique, à la surface des cellules cibles (fig 1.1). Ces récepteurs ont trois fonctions : ils assurent, grâce à une haute affinité et une grande spécificité, la reconnaissance de l'hormone ; ils sont capables de moduler par leur nombre ou leur affinité l'intensité de la réponse cellulaire. D'autre part, le récepteur participe d'une façon indispensable au transfert de l'information hormonale.

Du point de vue fonctionnel, le récepteur comporte au moins deux éléments fondamentaux, un site receveur ou de reconnaissance auquel se lie l'hormone et un site exécutif qui peut interagir avec un élément cellulaire distinct : l'effecteur. C'est au niveau de ce dernier que se produit la première réponse entraînant la modification du fonctionnement de la cellule. Entre le site de reconnaissance et le site exécutif, doit exister nécessairement un mécanisme de couplage. L'interaction de l'hormone et du récepteur se traduit par la formation d'un "deuxième messenger" intracellulaire dont l'effet peut se produire à différents niveaux cellulaires : effets sur la membrane, activation ou inhibition enzymatique, synthèse de protéines. De nombreuses hormones peptidiques et polypeptidiques -c'est le cas des hormones gonadotropes- exercent leurs effets physiologiques en augmentant la concentration intra-cellulaire d'AMPc dans les cellules cibles. Les premiers travaux de SUTHERLAND entre 1956 et 1962 montrèrent que la production d'AMPc était due à un enzyme capable d'hydrolyser l'ATP en AMPc : l'adénylate cyclase (SUTHERLAND et coll., 1956). Le système adénylate cyclase est en fait constitué par plusieurs protéines (fig 1.2). RODBELL et coll. (1971, 1975, 1980) montrèrent que le GTP est essentiel pour le transfert du signal hormonal ; le GTP exerce trois actions : 1) il stimule l'activité basale de l'adénylate cyclase en absence de l'hormone, 2) il augmente les vitesses de liaison et de dissociation de l'hormone et de son récepteur ce qui provoque une augmentation du  $K_d$  apparent des sites de liaison, 3) il réalise le couplage entre le récepteur et l'adénylate cyclase. Une protéine membranaire liant le GTP est impliquée dans la liaison de l'hormone et est responsable de l'activation de l'adénylate cyclase (SPIEGEL et DOWNS, 1981). La connaissance de cette protéine régulatrice a été très approfondie lors de l'étude des récepteurs adrénergiques (SCHRAM et SELINGER, 1984 ; LEFKOWITZ et coll., 1984 ; GELMAN, 1984) : elle serait composée de plusieurs sous-unités.

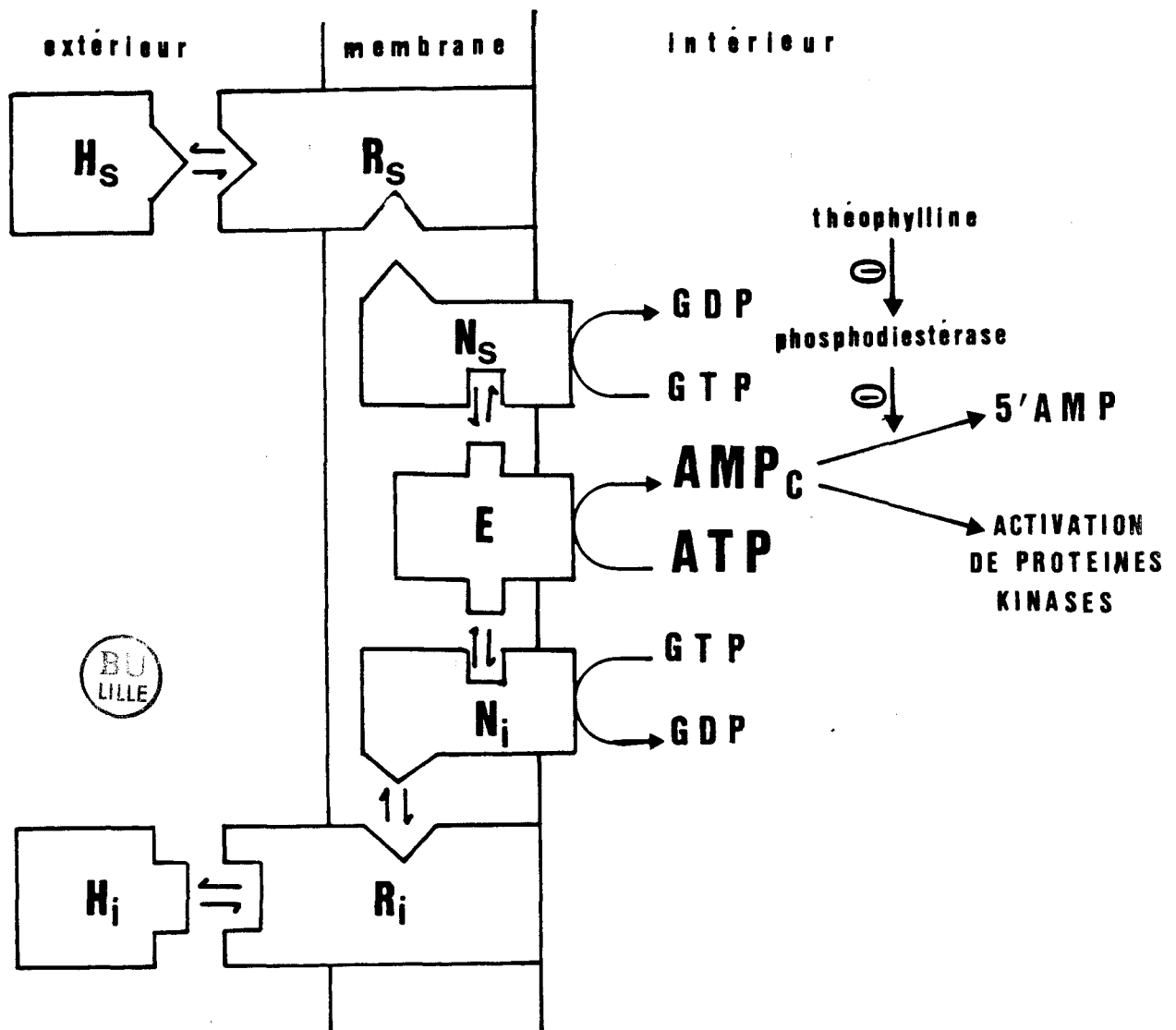


FIGURE 1.2. - SCHEMA ILLUSTRANT LE MECANISME DE TRANSMISSION DU MESSAGE HORMONAL AU NIVEAU DE LA MEMBRANE PLASMIQUE PAR LE SYSTEME ADENYLATE CYCLASE

L'hormone (H) extra-cellulaire en se liant au récepteur (R) provoque l'activation de la sous-unité catalytique (E) qui, à partir de l'ATP (adénosine triphosphate) produit l'AMP<sub>c</sub> (adénosine monophosphate cyclique). Une protéine (N) assure le couplage entre (R) et (E) ; elle est régulée par le GTP (guanosine triphosphate) qu'elle hydrolyse en GDP (guanosine diphosphate). Dans le système des récepteurs adrénergiques, il existe 2 formes (N<sub>s</sub>) et (N<sub>i</sub>), de structures voisines, qui couplent respectivement les récepteurs stimulateurs (R<sub>s</sub>) et les récepteurs inhibiteurs (R<sub>i</sub>) à la sous-unité catalytique.

L'AMP<sub>c</sub> "second messager de l'action hormonale" est dégradé en 5' AMP par la phosphodiesterase qui est inhibée par la théophylline. La production d'AMP<sub>c</sub>, en augmentant l'activité de certaines kinases, conduit à l'effet hormonal (ROBISON et coll., 1968).

La sous-unité alpha, la plus grande, lie étroitement le GTP. La sous-unité bêta, plus petite, est impliquée dans la dissociation du GTP et donc dans l'inactivation du système. Deux processus d'inactivation supplémentaires sont actuellement connus : 1) l'occupation continue du récepteur par l'hormone provoque une désensibilisation du système adénylate cyclase, 2) des récepteurs inhibiteurs inactiveraient l'adénylate cyclase au moyen d'une autre protéine spécifique de liaison du GTP (CODINA et coll., 1984). Inversement, les analogues hydrolysables du GTP comme le Gpp (NHp) activent lentement l'enzyme de façon irréversible (LONDOS et coll., 1974). Une activation irréversible est également obtenue par la toxine cholérique ; ce phénomène serait dû à l'inhibition de l'enzyme GTPase qui hydrolyse le GTP en GDP (LIN et coll., 1978).

Toutes les hormones peptidiques et polypeptidiques n'ont pas pour messager intra-cellulaire l'AMPc. L'inositol triphosphate pourrait être le messager des facteurs de croissance et de la vasopressine (MARX, 1984). De récentes données montrent que la phosphorylation et la déphosphorylation de protéines jouent un rôle important dans l'action de ces hormones. L'activité protéine kinase du récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) (CARPENTER, 1983) et du récepteur de l'insuline (KAHN et coll., 1983) a été démontrée. L'insuline serait aussi capable de provoquer, après activation d'une protéase membranaire, l'émission d'un relais soluble de nature peptidique. Ce relais activerait, par déphosphorylation, des enzymes comme la glycogène synthétase ou la pyruvate déshydrogénase, jouant un rôle opposé à celui de l'AMPc (LARNER et coll., 1979). La PRL pourrait agir par un mécanisme semblable à celui de l'insuline.

Le récepteur est indispensable à la médiation du message hormonal mais sa présence n'est pas suffisante pour promouvoir une réponse cellulaire. Il se produit dans la cellule une cascade d'événements biochimiques qui conduit à l'effet hormonal. Dans une situation pathologique, une modification d'un des maillons de la chaîne qui relie le récepteur aux effecteurs cellulaires, pourrait être responsable de l'absence de réponse cellulaire.

Dans ce travail, nous rapportons les études effectuées d'une part sur la réceptivité des cellules de Leydig à la LH chez le porc au cours de la vie post-natale et d'autre part, sur la réceptivité à la PRL des cellules épithé-

liales du cancer du sein. Dans la première partie, nous évoquerons les problèmes méthodologiques communs à la mesure des récepteurs membranaires des hormones polypeptidiques et nous décrirons les caractéristiques spécifiques des récepteurs de la LH et de la PRL. Dans la seconde partie, nous envisagerons la régulation des récepteurs de la LH dans le testicule de porc au cours de la vie post-natale en relation avec les niveaux de LH et du produit de l'action de cette hormone : la testostérone. Enfin, nous rapporterons les résultats obtenus sur la présence, la régulation et l'activité des récepteurs de la PRL dans les cancers du sein.

## **II- CARACTERISTIQUES DES RECEPTEURS AUX HORMONES POLYPEPTIDIQUES**

-----

## 2.1. GENERALITES, CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES ESSENTIELLES

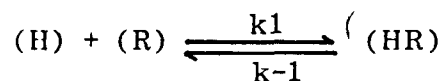
La présence de récepteurs au niveau des organes cibles a été soupçonnée dès le début de notre siècle mais ce n'est que dans les 15 dernières années que les récepteurs ont été étudiés directement comme des macromolécules cellulaires distinctes. Le développement d'une technique, remarquablement simple, de liaison d'un ligand radioactif a ouvert de nouveaux champs de recherche. Le dosage des récepteurs, sur la cellule entière aussi bien que sur des membranes plasmiques préparées à partir de tissus normaux ou pathologiques, est devenu possible.

L'expérimentation de base pour mesurer les récepteurs consiste à incuber des concentrations croissantes d'hormone, marquée par un isotope radioactif, avec une préparation de récepteurs. Après un certain temps d'incubation, le complexe hormone-récepteur est séparé de l'hormone libre. De nombreuses revues détaillées ont été publiées sur les récepteurs membranaires (CUATRECASAS, 1974 ; KAHN, 1975 ; HOLLENBERG, 1979).

Dans ce paragraphe, nous rapportons les méthodes d'analyse de la liaison hormone-récepteur en soulignant les différentes difficultés méthodologiques qui peuvent être rencontrées. Les illustrations de ces problèmes figureront aux paragraphes suivants.

### 2.1.1. INTERACTION HORMONE-RECEPTEUR

Le modèle le plus simple pour l'étude de l'interaction hormone-récepteur est représenté par une réaction à une seule étape, bimoléculaire et réversible :



où :

(H) = concentration de l'hormone libre (hormone marquée)

(R) = concentration de récepteurs libres spécifiques

(HR) = concentration de l'hormone liée aux récepteurs

k1 = constante de vitesse d'association ( $M^{-1} \text{ sec}^{-1}$ )

k-1 = constante de vitesse de dissociation ( $\text{sec}^{-1}$ )

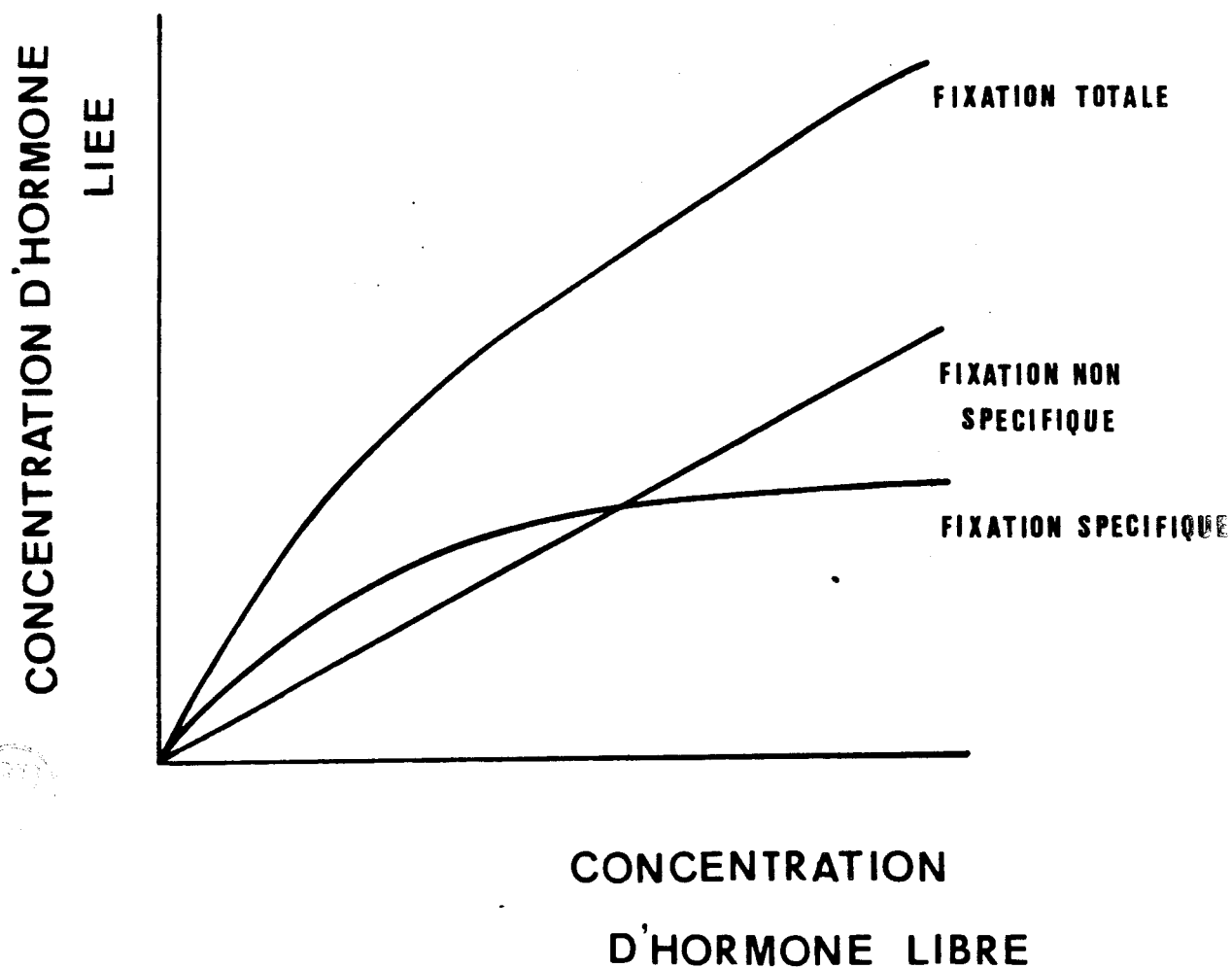


FIGURE 2.1. - REPRESENTATION GRAPHIQUE D'UNE LIAISON TOTALE, D'UNE LIAISON SPECIFIQUE ET D'UNE LIAISON NON SPECIFIQUE

La mesure de la liaison non spécifique peut être obtenue aisément par dilution isotopique de l'hormone marquée. Cette dilution entraîne la disparition du marquage des sites de haute affinité.



La constante apparente d'affinité est définie à l'équilibre par la loi d'action de masse :

$$K_a = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{(HR)}{(H) (R)}$$

Dans la plupart des extraits biologiques, les sites récepteurs ne sont pas les seuls à lier l'hormone. Celle-ci entre en interaction à des degrés divers avec toutes les autres molécules du milieu : ces interactions sont appelées "non spécifiques" (fig 2.1.)

Pratiquement, la concentration d'hormone fixée spécifiquement (HR), est mesurée par différence entre la concentration totale d'hormone fixée et la concentration d'hormone fixée non spécifiquement. La fixation non spécifique augmentant proportionnellement avec la quantité d'hormone marquée introduite dans le milieu, ce n'est que pour de faibles concentrations d'hormone marquée que la différence entre fixation totale et fixation non spécifique pourra être mesurée avec assez de précision.

La concentration d'hormone libre, (H), se déduit par différence entre la concentration d'hormone totale ajoutée ( $H_T$ ) et la concentration d'hormone liée (HR). Ceci est une approximation raisonnable lorsque l'on travaille à des concentrations d'hormone radioactive où la fixation non spécifique est faible.

On remarquera que, dans les calculs de (HR) et de (H), obtenus par différence, les erreurs absolues des différentes mesures sont additives.

#### 2.1.2. CALCUL DE LA CONSTANTE D'AFFINITE ET DU NOMBRE DE SITES

Les caractéristiques de la liaison hormone-récepteur, constante d'affinité et nombre de sites, s'obtiennent en saturant une quantité déterminée de récepteurs par des concentrations croissantes d'hormone marquée (SCHAFER, 1983).

La transformation de Scatchard (SCATCHARD et coll., 1949 ; WEDER et coll, 1974) qui exprime le rapport hormone liée (HR) sur hormone libre (H) en fonction de l'hormone liée est la méthode d'analyse la plus couramment utilisée.

Soit  $(R_0)$ , la concentration totale de récepteurs mis en contact avec l'hormone :

$$(R_0) = (R) + (HR)$$

L'équation d'équilibre peut alors s'écrire :

$$K_a = \frac{(HR)}{(H)((R_0) - (HR))}$$

d'où on tire l'équation de Scatchard :

$$\frac{(HR)}{(H)} = K_a (R_0) - K_a (HR)$$

En traçant  $(HR)/(H)$  en fonction de  $(HR)$ , on doit obtenir une droite dont la pente est  $-K_a$  et l'intersection avec l'axe des abscisses  $R_0$ .

Un certain nombre de problèmes méthodologiques peuvent compliquer l'analyse de Scatchard. Beaucoup de ces complications proviennent de l'estimation de la concentration vraie d'hormone libre. Avec de fortes concentrations de ligand marqué, où seulement 2 à 5 % de l'hormone totale est liée, les erreurs sur l'estimation de la concentration de l'hormone liée sont grandes. D'un autre côté, si la concentration en sites de liaison est très élevée, de telle manière qu'une grande quantité d'hormone marquée soit liée, une estimation précise d'un petit changement dans la concentration de l'hormone libre est souvent difficile. La présence fréquente d'une quantité de ligand marqué altéré, incapable de se lier, complique encore le problème (REIMAN et coll., 1978) et une attention particulière doit être portée à la qualité du ligand marqué utilisé. Dans les deux cas, les erreurs sont amplifiées par la représentation de Scatchard.

Dans un grand nombre d'études, des représentations de Scatchard non linéaires ont été décrites ; ce phénomène est très connu dans le cas des récepteurs insuliniques. Ceci peut être le résultat de plusieurs situations et tout d'abord de l'existence de plusieurs sites indépendants (WEDER et coll., 1974). L'interaction entre récepteurs peut aussi conduire à une telle situation

(DE MEYTS, 1976). Dans le cas d'une coopérativité positive, la pente de la droite d'équation :

$$\text{Log} \frac{(HR)}{(Ro) - (HR)} = f(\log(H)), \text{ représentation de Hill,}$$

donne une indication sur le nombre de sites mis en jeu.

Bien que l'interprétation des modifications de forme de la représentation de Scatchard en terme de coopérativité soit attrayante, de grandes précautions doivent être prises avant d'affirmer qu'on est en présence d'un comportement allostérique des récepteurs. Les possibilités d'interaction entre plusieurs molécules de ligand, et de modification, d'inactivation ou d'hétérogénéité de ce ligand doivent être écartées (BECK et coll., 1983). Enfin, dans le cas des récepteurs membranaires, il est maintenant connu qu'une coopérativité négative peut apparaître en raison de la mobilité des récepteurs dans la membrane (SINGER, 1976).

Les difficultés d'interprétation de l'analyse de Scatchard sont donc parfois sérieuses (KLOTZ, 1980 ; MUNSON et coll., 1983 ; FELDMAN et coll., 1983) et il semble que la méthode de loin la plus valable (KETESLEGERS et coll., 1975) consiste en un ajustement non linéaire et pondéré des valeurs expérimentales non transformées et en particulier de la courbe de saturation  $(HR) = f(H)$  obtenue à partir de la loi d'action de masse :

$$(HR) = K_a (H) (R) \text{ où } (R) = (Ro) - (HR)$$

$$\text{alors } (HR) = K_a (H) ((Ro) - (HR))$$

$$\text{soit } (HR) (1 + K_a (H)) = K_a (H) (Ro)$$

$$\text{et } (HR) = \frac{K_a (H) (Ro)}{1 + K_a (H)}$$

La fonction  $(HR) = f(H)$  est une parabole. Les valeurs de  $(Ro)$  et  $K_a$  sont alors directement obtenues sur cette courbe :

- lorsque  $(H)$  est grand, alors  $(HR) = (Ro)$  (limite de la parabole)

- lorsque  $(HR) = \frac{Ro}{2}$ ,  $K_a = \frac{1}{(H \ 1/2)}$

où  $(H \ 1/2)$  est la concentration d'hormone radioactive libre nécessaire pour que la moitié des sites soit saturée. La constante d'affinité est l'inverse de la concentration d'hormone chaude libre nécessaire pour que la moitié des récepteurs soit occupée.

### 2.1.3. ETUDES CINETIQUES

L'hormone et son récepteur s'associent selon une cinétique obéissant à une loi du second ordre :

$$k_1 = \frac{2,303}{t} \left( \frac{1}{(H)-(R)} \right) \log \left( \frac{(R) ((H) - (HR))}{(H) ((R) - (HR))} \right)$$

La réaction de dissociation suit, elle, un processus de premier ordre :

$$k_{-1} = \frac{2,303}{t} \log \left( \frac{(R_o) ((R_o) - (R))}{(R_o)} \right)$$

D'une manière générale, pour les récepteurs aux hormones polypeptidiques, la valeur  $k_{-1}$  est extrêmement faible par rapport à  $k_1$ , autrement dit la réaction s'effectue surtout dans le sens de formation du complexe. Ceci a pratiquement deux conséquences lors de l'étude de l'interaction hormone-récepteur : (1) il est nécessaire d'ajouter en même temps l'hormone chaude et l'hormone froide pour obtenir la fixation non spécifique, c'est-à-dire de procéder à une dilution isotopique ; (2) on considère que l'équilibre n'est pas déplacé lorsqu'on sépare le complexe hormone-récepteur de l'hormone libre.

## 2.2. CARACTERISTIQUES DES RECEPTEURS DE LA LH DANS LE TESTICULE DU PORC

### 2.2.1. PREPARATION DE SUSPENSIONS DE MEMBRANES

Les récepteurs de la LH sont situés dans les membranes plasmiques des cellules de Leydig. Les testicules de porc sont prélevés à l'abattage, disséqués immédiatement pour enlever la tunique albuginée et l'épididyme, puis coupés en morceaux congelés à  $-18^{\circ}$  C pour être conservés.

Par la suite, un homogénat est préparé. Un morceau de tissu testiculaire est pesé, puis broyé pendant 2 minutes dans du tampon Tris 0.05 M HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M saccharose, pH 7.4. Après filtration sur laine de verre pour éliminer les morceaux de conjonctif, le broyat est homogénéisé manuellement par 10 coups de "potter", puis dilué dans le même tampon pour obtenir une concentration finale de 50 mg de tissu frais par ml de tampon.

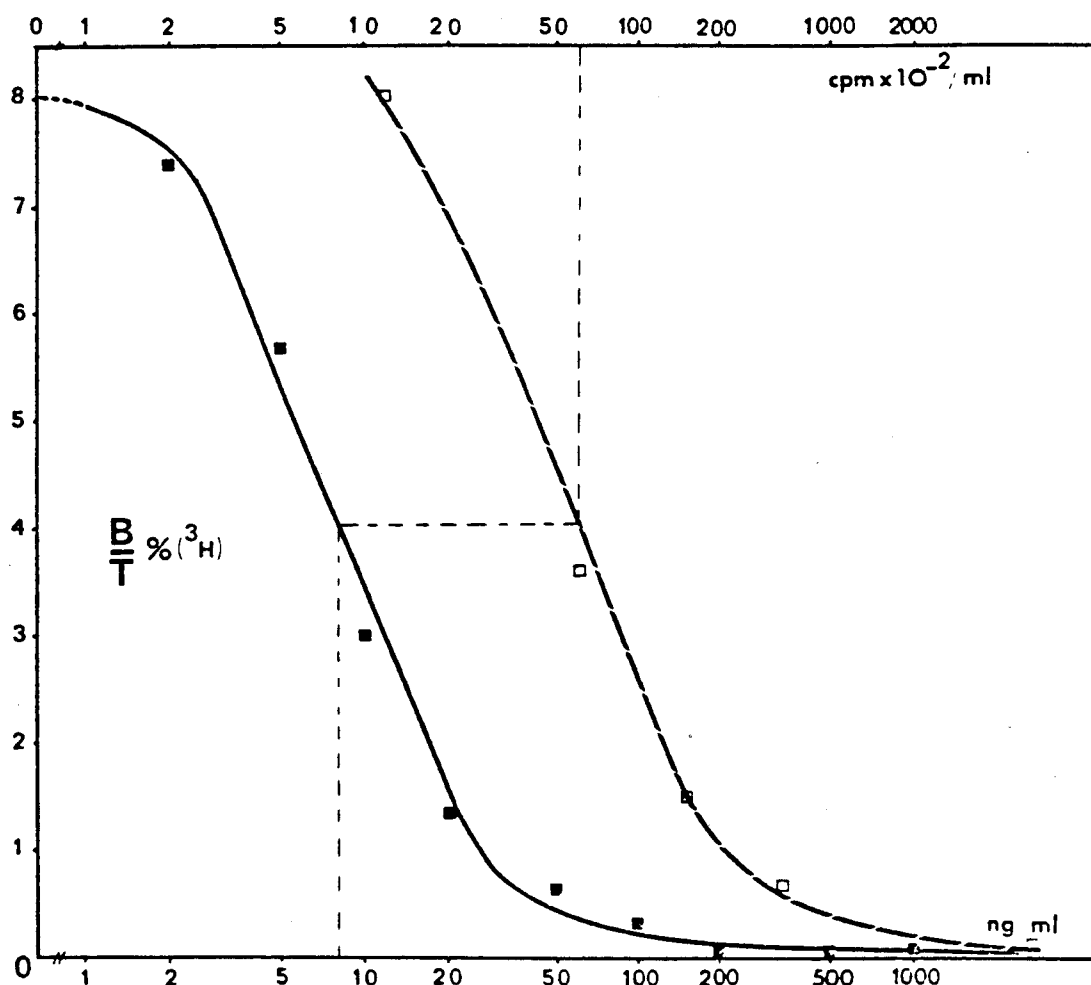


FIGURE 2.2 - DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE SPECIFIQUE DE LA LH TRITIEE

Détermination par la méthode d'autocompétition.

Abscisse du bas : courbe de déplacement (■—■) : 100 µl de dilutions croissantes d'hormone froide sont ajoutés à 50 µl de traceur tritié et 100 µl d'une dilution de fraction membranaire. Incubation 2 h à 37°C.

Abscisse du haut (□—□) : 100 µl de dilutions croissantes d'hormone marquée sont ajoutés à 50 µl de concentrations croissantes d'hormone tritiée et 100 µl d'une dilution de fraction membranaire. L'hormone marquée est considérée pour une part comme traceur, et pour le reste comme échantillon capable de rentrer en compétition avec le traceur. Tampon d'incubation Tris 0.05 M HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M saccharose, pH 7.4, BSA 1 mg/ml. Incubation 2 h à 37° C.

La radioactivité spécifique est calculée au 1/2 déplacement.

## 2.2.2. HORMONES MARQUEES

### 2.2.2.1. Nature des hormones

La LH d'origine ovine nous a été fournie par le Laboratoire des hormones polypeptidiques du CNRS (lot P89b, activité biologique 1.4 à 2.8 LH NIH S11).

Le ligand marqué est de la LH tritiée. Cette hormone nous a été confiée par le Docteur DE LA LLOSA. L'hormone est marquée par méthylation réductrice des résidus lysine en présence de borohydrure de sodium tritié ( $\text{NaBH}_4^3$ ). La méthylation de la LH ovine native affecte 50 % des résidus lysine en position 20 de la sous-unité bêta et 90 % des résidus en position 42 de la même sous-unité. Le taux de méthylation des résidus lysine de la sous-unité alpha n'est pas connu. L'hormone méthylée est biologiquement plus active, dans le test de Parlow, que l'hormone native (DE LA LLOSA et coll., 1974a).

La LH méthylée a été étudiée également par dosages radiohormone-récepteur en présence soit d'homogénats de corps jaune de vaches, soit d'homogénats de testicule de rats. L'activité de liaison trouvée ne diffère pas de celle de l'hormone native (DE LA LLOSA-HERMIER et coll., 1977). Le marquage par le tritium (75 % des résidus lysine sont marqués au moins une fois) n'affecte pas les propriétés de l'hormone méthylée. La radioactivité spécifique est obtenue en comptant la radioactivité d'une masse de LH marquée, mesurée par pesée ou par absorbance (DE LA LLOSA et coll., 1974b). L'hormone utilisée avait, lors de son obtention, une radioactivité spécifique de 19  $\mu\text{Ci/nmole}$ . L'hormone marquée conservée en solution dans l'azote liquide est radioactivement stable (demi-vie de 12.35 ans), et il y a peu de radiolyse. La concentration de la solution mère est de 16 mg/ml.

Nous avons également utilisé de la LH porcine (HENNEN et coll., 1971). Son marquage à l'iode 125 est réalisé par la méthode utilisant la lactopéroxydase ; la radioactivité spécifique est d'environ 1 mCi/nmole.

### 2.2.2.2. Détermination de la radioactivité spécifique de l'hormone tritiée

Nous avons pris soin de contrôler la radioactivité spécifique de l'hormone tritiée de manière à tenir compte d'une éventuelle inactivation due au marquage. Les deux méthodes utilisées donnent une radioactivité spécifique

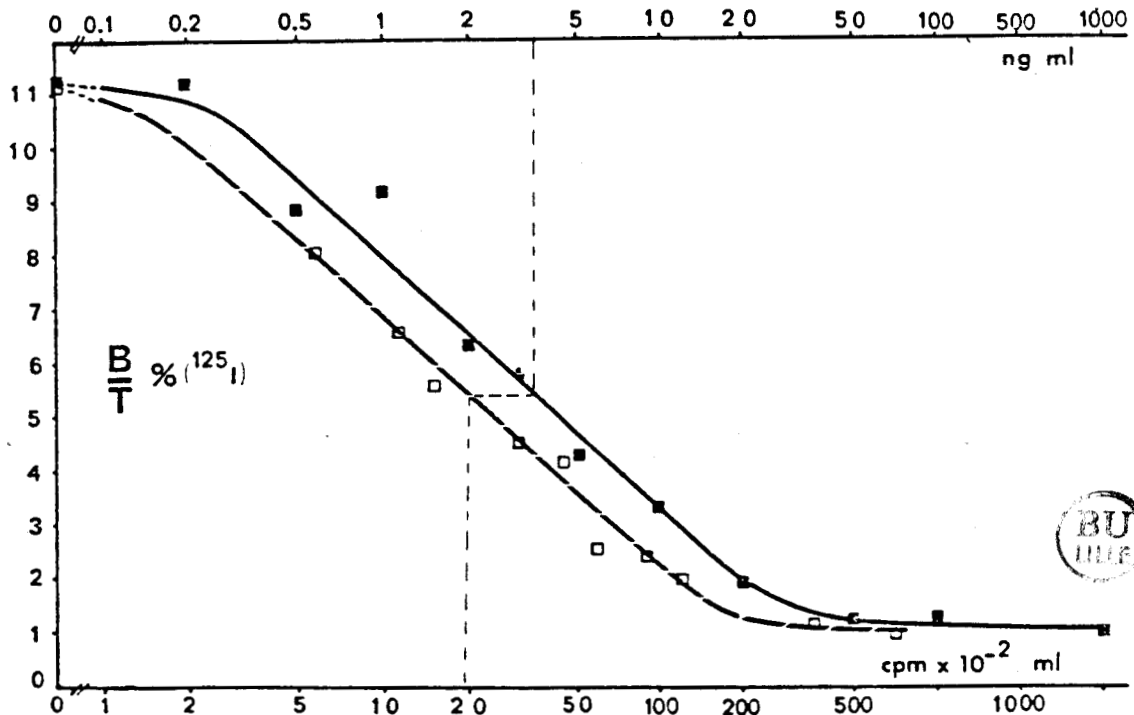
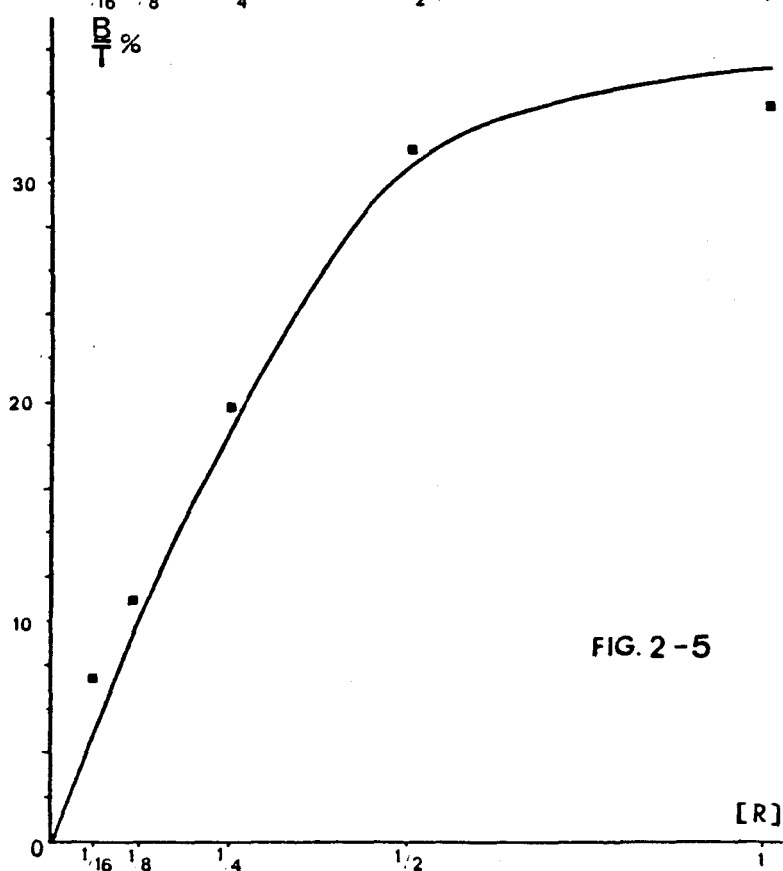
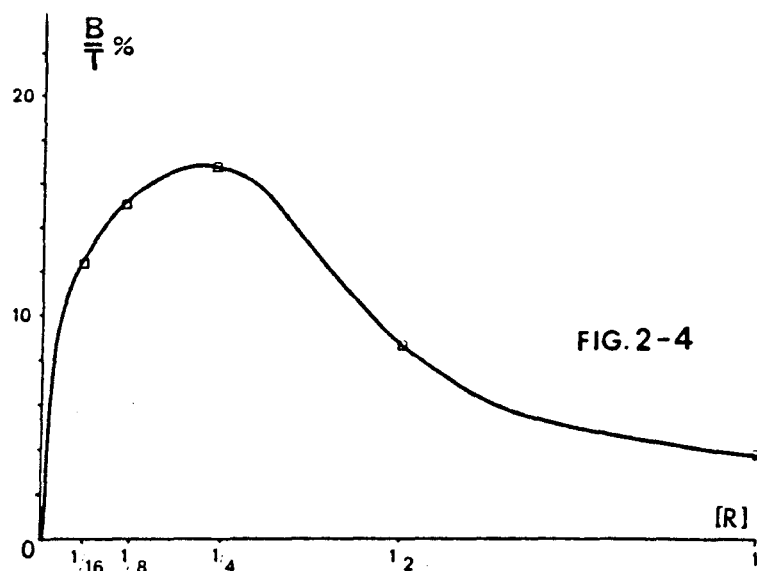


FIGURE 2.3 - DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE SPECIFIQUE DE LA LH TRITIEE (suite)

Compétition entre la  $^{125}\text{I}$  pLH et la  $^3\text{H}$  oLH (□—□ abscisse du bas) ou la oLH froide (■—■ abscisse du haut). 100  $\mu\text{l}$  de concentrations croissantes de traceur tritié ou d'hormone froide sont ajoutés à 50  $\mu\text{l}$  de traceur iodé et 100  $\mu\text{l}$  d'une dilution de fraction membranaire. Tampon d'incubation Tris 0.05 M HCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 M saccharose, pH 7.4, BSA 1 mg/ml. Incubation 2 h à 37° C.

La radioactivité spécifique est calculée au 1/2 déplacement.

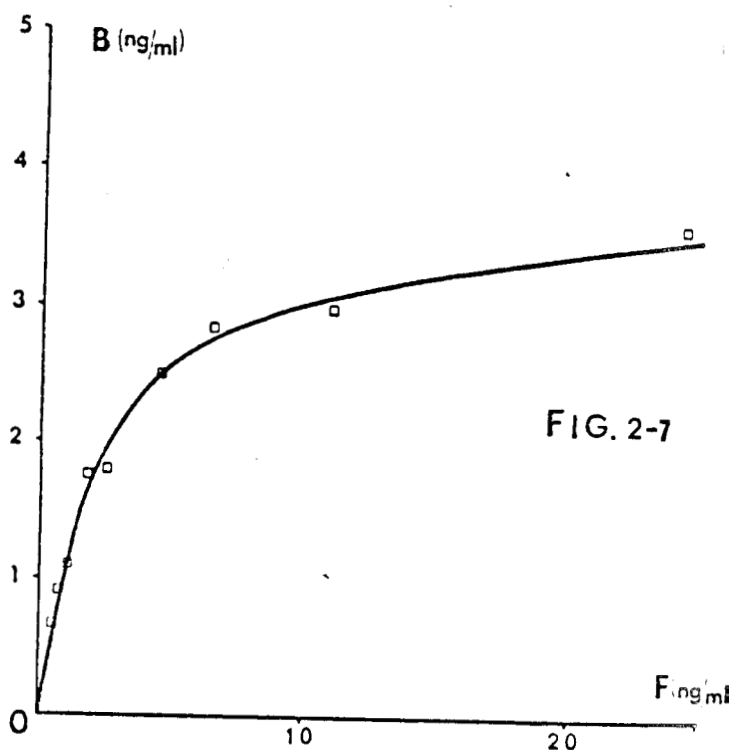
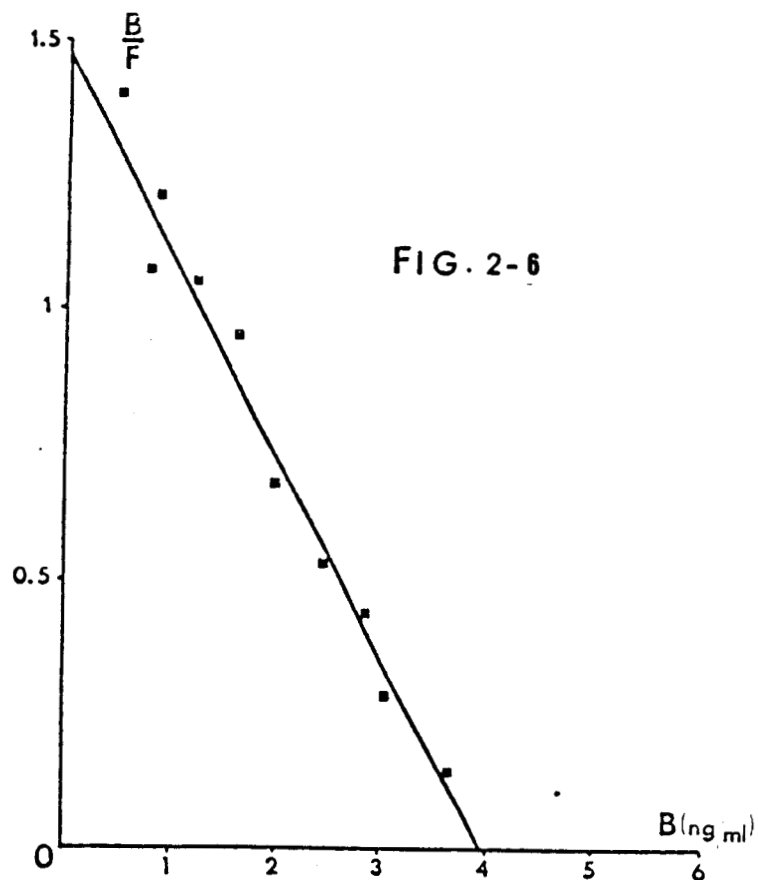


FIGURES 2.4 et 2.5 - DETERMINATION DU MAXIMUM DE CAPACITE DE LIAISON DE LA LH TRITIEE

Figure 2.4 : 100  $\mu$ l de tampon Tris 0.05 M HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M saccharose, pH 7.4, BSA 1 mg/ml sont ajoutés à 10  $\mu$ l d'une solution d'hormone tritiée et 900  $\mu$ l d'homogénat à concentrations croissantes et incubés 2 h à 37° C en présence ou en absence d'un excès de LH froide.

Figure 2.5 : 100  $\mu$ l de tampon Tris 0,05 M HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M saccharose, pH 7.4, BSA sont ajoutés à 50  $\mu$ l d'hormone tritiée et 100  $\mu$ l de préparation membranaire à concentrations croissantes et incubés 2 h à 37°C en présence ou en absence d'un excès d' oLH froide. La préparation membranaire est obtenue après centrifugation de l'homogénat 20 minutes à 150 g, le surnageant est centrifugé 30 minutes à 10 000 g puis lavé 2 fois avec du tampon Tris.





FIGURES 2.6 et 2.7 - INTERACTION DE LA LH OVINE AVEC SON RECEPTEUR TESTICULAIRE CHEZ LE PORC

Figure 2.6 : Représentation de Scatchard

$$K_a = 0.37 \pm 0.08 \text{ ng}^{-1} \cdot \text{ml} \text{ soit } 10.2 \pm 2.2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$$

$$R_o = 3.96 \pm 0.05 \text{ ng ml}^{-1} \text{ soit } 1.43 \pm 0.02 \cdot 10^{-10} \text{ M}$$

Figure 2.7 : Courbe de saturation

$$K_a = 0.38 \pm 0.02 \text{ ng}^{-1} \cdot \text{ml} \text{ soit } 10.5 \pm 0.55 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$$

$$R_o = 3.88 \pm 0.08 \text{ ng ml}^{-1} \text{ soit } 1.40 \pm 0.03 \cdot 10^{-10} \text{ M}$$

B concentration d'hormone liée spécifiquement.

F concentration d'hormone libre

Conditions expérimentales : température 37° C, incubation 2 h, tampon Tris 0.05 M HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M saccharose

de 19  $\mu\text{Ci/nmole}$ , équivalente à celle donnée par DE LA LLOSA (fig 2.2 et 2.3).

#### 2.2.2.3. Détermination du maximum de capacité de liaison de la LH tritiée

Le but est de déterminer la fraction de radioactivité qui est effectivement capable de se lier à un excès de récepteurs. En présence d'homogénat (fig 2.4), la fixation spécifique qui croît pour les faibles concentrations, diminue ensuite lorsque les concentrations augmentent, vraisemblablement en raison de la présence d'enzymes protéolytiques ou d'inhibiteurs plus spécifiques, actifs à ces concentrations, (LEDWITZ-RIGBY et coll., 1977) puisque ce phénomène n'est pas observé lorsqu'on utilise une préparation membranaire plusieurs fois lavée (fig 2.5). Environ 40 % de l'hormone est effectivement capable de se lier aux récepteurs.

### 2.2.3. INTERACTION ENTRE $\alpha\text{LH}$ ET RECEPTEUR TESTICULAIRE

#### 2.2.3.1. Détermination du nombre et de l'affinité des récepteurs

La figure 2.6 montre une représentation de Scatchard de la fixation de LH sur son récepteur. La courbe de saturation correspondante est indiquée sur la figure 2.7. La constante d'affinité du système est de  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  à  $37^\circ \text{ C}$  et la concentration des récepteurs  $7 \times 10^{-13}$  mole par gramme de testicule frais.

Nous avons rencontré des cas où, aux faibles concentrations d'hormone liée, les points de la représentation de Scatchard s'incurvaient vers le bas. La représentation de HILL donne une droite de pente voisine de l'unité, ce qui indique une absence de coopérativité positive. Ceci met bien en évidence l'intérêt de l'analyse des résultats à l'aide des courbes de saturation qui donne un poids supérieur aux points proches de la saturation.

#### 2.2.3.2. Cinétique de fixation et de dissociation de la LH

A  $37^\circ \text{ C}$  la fixation maximale de l'hormone est obtenue au bout de 10 minutes. La dissociation, réalisée par adjonction de LH froide, est lente : elle est totale au bout de 48 heures. Nous avons obtenu une constante de vitesse d'association de  $0.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ . La dissociation est réalisée par dilution et donne une valeur très faible pour la constante de vitesse de dissociation :  $1.5 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ . Le rapport des constantes de vitesse d'association et de dissociation est de  $5.3 \times 10^{11}$ , soit 100 à 150 fois plus que la constante d'association mesurée à l'équilibre.

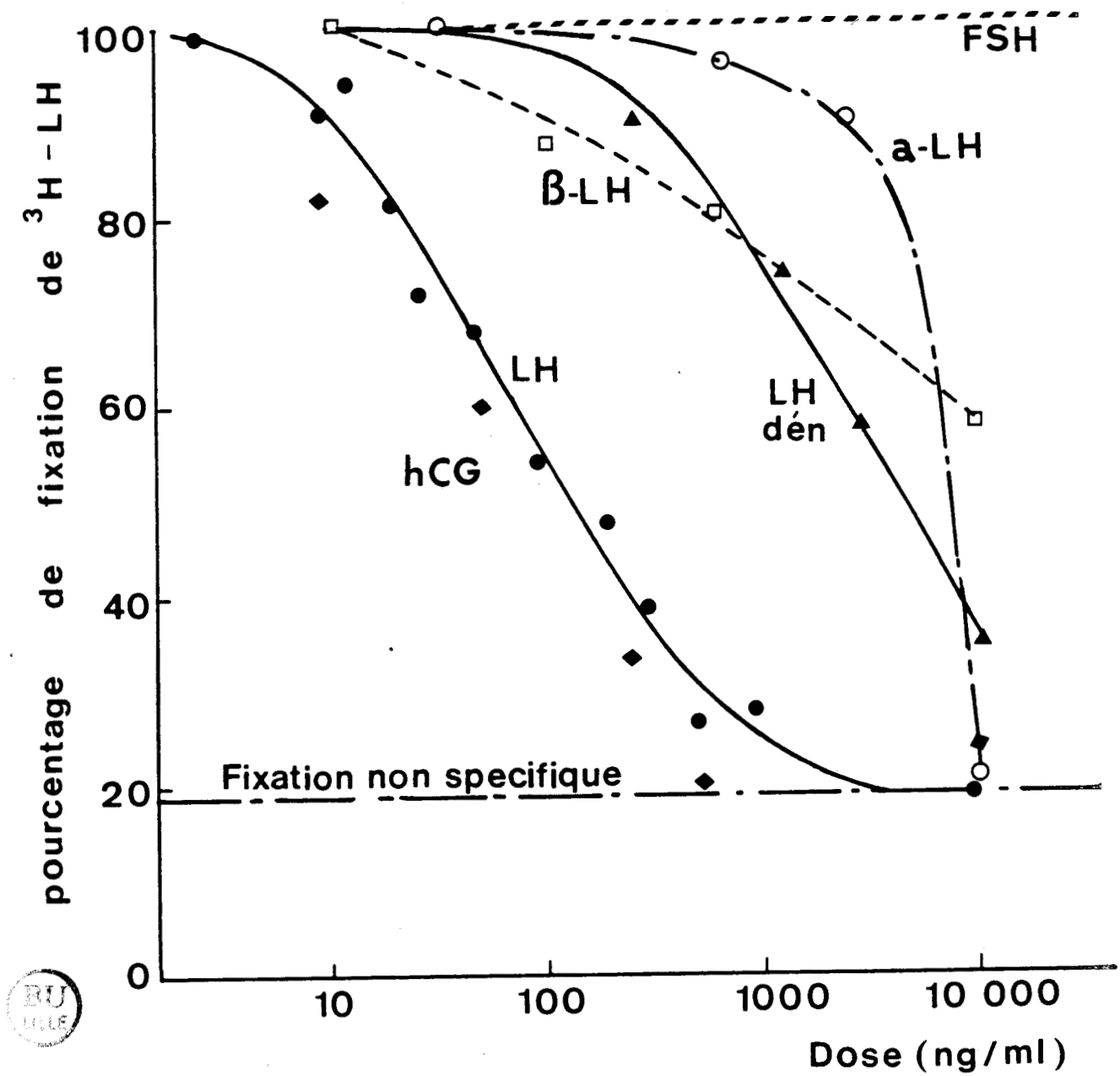


FIGURE 2.8 - SPECIFICITE HORMONALE DU RECEPTEUR DE LA LH  
DES CELLULES DE LEYDIG DU TESTICULE DE PORC

### 2.2.3.3. Spécificité des récepteurs

La spécificité de fixation est présentée sur la figure 2.8. L'affinité non nulle de la LH dénaturée et de ses sous-unités est explicable par la possibilité de contamination des préparations utilisées par la LH native. L'hCG a une affinité légèrement supérieure à celle de la LH.

## 2.3. CARACTERISTIQUES DES RECEPTEURS DE LA PRL DANS LES CANCERS DU SEIN

L'article I rend compte dans le détail des résultats concernant la localisation sub-cellulaire, les cinétiques de liaison de la PRL, l'affinité et le nombre des récepteurs de la PRL dans les cancers du sein. Nous rapportons dans ce paragraphe les caractéristiques essentielles de ces récepteurs en complétant, lorsque cela est nécessaire, les données de l'article I.

### 2.3.1. PREPARATION DE SUSPENSIONS DE MEMBRANES. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES RECEPTEURS

Les récepteurs de la PRL sont localisés en périphérie et aussi dans les membranes internes de la cellule (DJIANE et coll., 1981). Les niveaux de récepteurs ont été déterminés dans des préparations subcellulaires enrichies en différents types de membranes. Celles-ci ont été obtenues en utilisant un gradient discontinu de sucrose permettant de sélectionner des fractions plus ou moins riches en membranes plasmiques (fig 2.9). Les résultats montrent que les fractions membranaires, les plus légères, c'est-à-dire celles dont la densité est inférieure à 1,17, contiennent le plus grand nombre de récepteurs. Les caractéristiques des récepteurs de la PRL ont été déterminées sur les fractions subcellulaires les plus riches en récepteurs.

### 2.3.2. HORMONE MARQUEE

La hPRL a été marquée par  $^{125}\text{I}$  en utilisant la chloramine T. Les concentrations d'hormone et de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  sont équimolaires, la concentration de chloramine T est très faible de manière à éviter toute dégradation de l'hormone. Malgré ces précautions, seulement 0,5 % de l'hormone totale est capable de se lier aux récepteurs préparés à partir de cancer du sein. Une étape de purification de l'hormone marquée sur récepteurs membranaires de lapin améliore considérablement sa capacité de liaison puisqu'alors 3 % de l'hormone est capable de se lier.

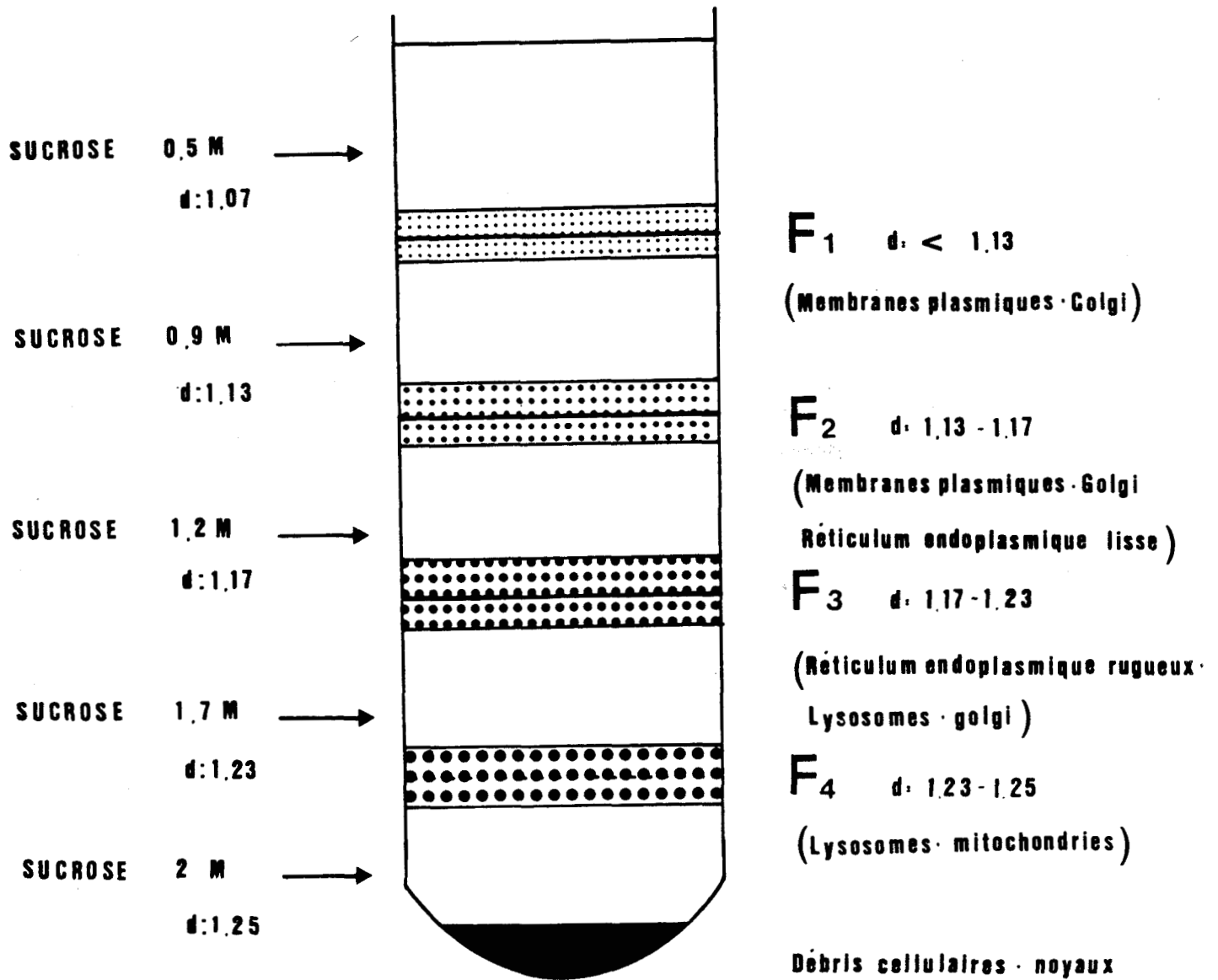
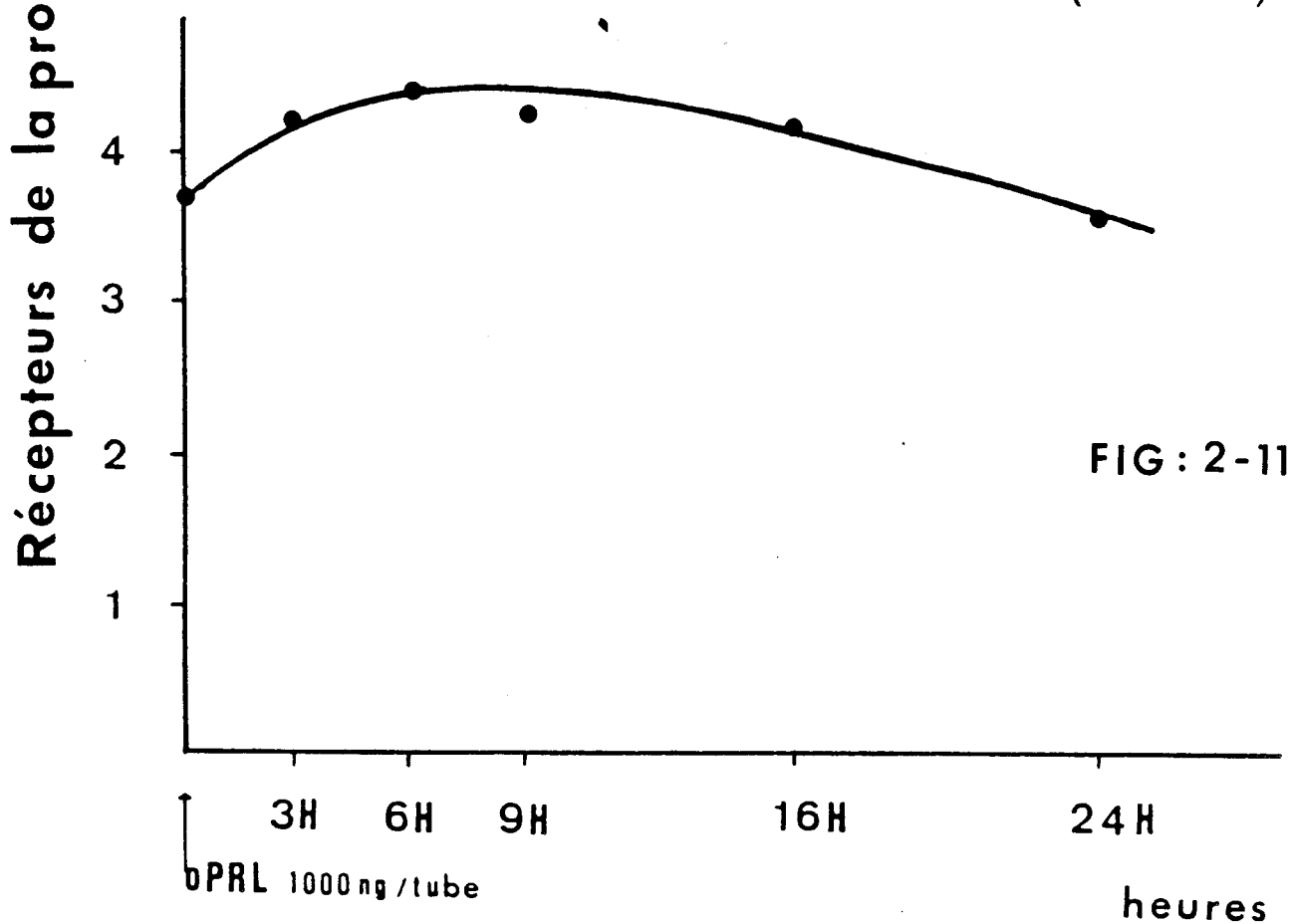
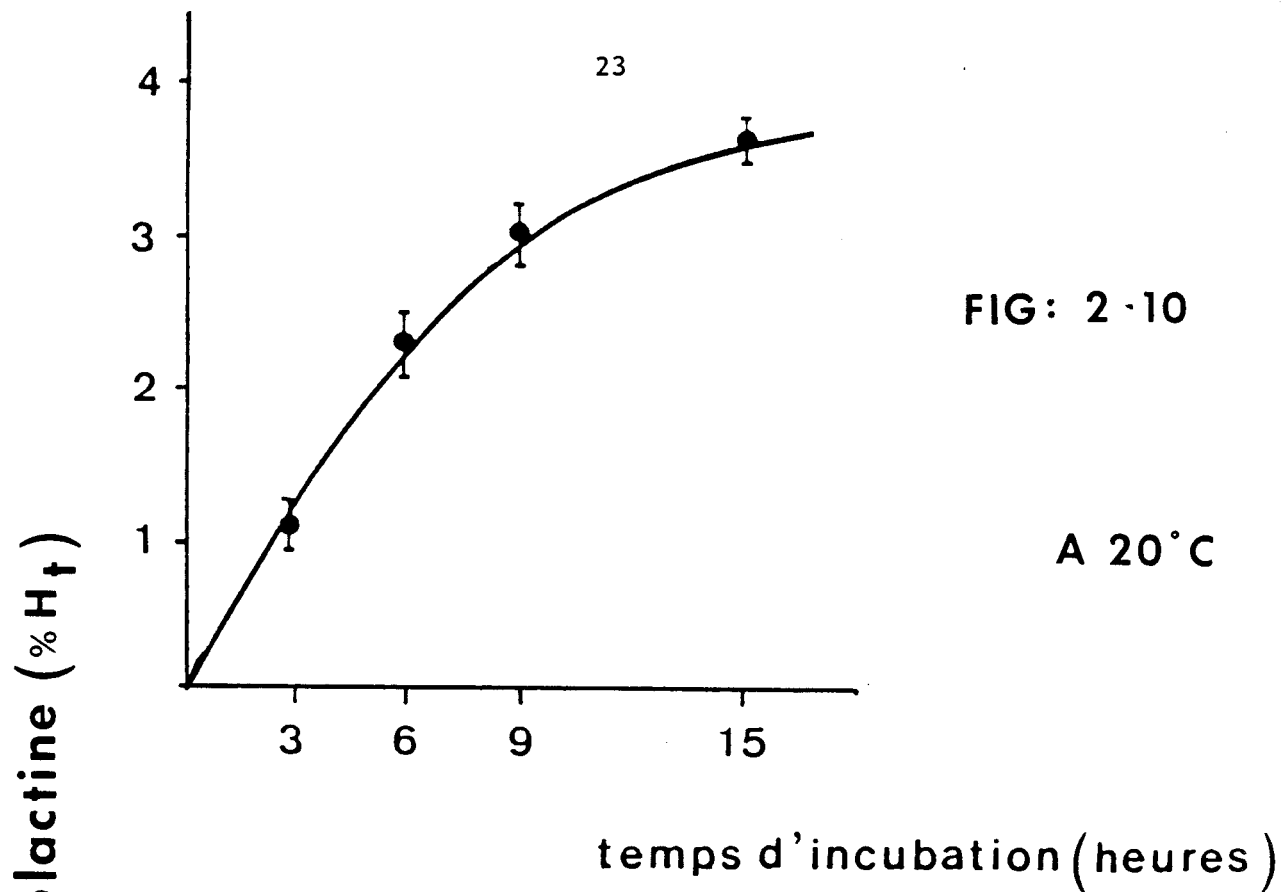


FIGURE 2.9. - SCHEMA DU FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE  
DES CELLULES EPITHELIALES DE CANCER DU SEIN A L'AIDE D'UN GRADIENT  
DISCONTINU DE SUCROSE



FIGURES 2.10. et 2.11. - CINETIQUES D'ASSOCIATION ET DE DISSOCIATION DE LA (<sup>125</sup>I) hPRL

Incubation à température ambiante en tampon Tris 25 mM HCl, pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Hormone iodée. Volume d'incubation 500 µl.

### 2.3.3. INTERACTION ENTRE hPRL ET RECEPTEURS DES CANCERS DU SEIN

#### 2.3.3.1. Détermination du nombre et de l'affinité des récepteurs

L'affinité de la PRL pour son récepteur, déterminée à partir de la linéarisation de Scatchard d'une courbe de saturation, est de  $3.4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ . Le nombre de sites récepteurs est de 12,5 fmoles par mg de protéines membranaires.

#### 2.3.3.2. Cinétique de fixation et de dissociation de la PRL

A  $20^\circ \text{ C}$ , la fixation maximale de l'hormone est obtenue au bout de 10 heures. A  $37^\circ \text{ C}$ , l'équilibre est atteint après bout de 6 heures, mais la fixation décroît en l'absence d'azide de sodium (fig 2.10).

La cinétique de dissociation de la PRL est présentée sur la figure 2.11. La dissociation est réalisée par adjonction d'un excès de oPRL au milieu d'incubation. La dissociation est très lente puisqu'au bout de 24 heures, 70 % des récepteurs sont encore liés à l'hormone marquée.

#### 2.3.3.3. Désaturation des récepteurs avant titrage

En raison de la faible dissociabilité de la PRL, lors du dosage, des récepteurs peuvent encore être occupés par l'hormone endogène. Nous avons donc recherché des méthodes de désaturation in vitro des sites récepteurs.

Après formation du complexe hormone marquée - récepteur, des modifications de pH permettent sa dissociation (fig 2.12). Une partie des récepteurs semble altérée puisqu'une deuxième incubation avec l'hormone radioactive ne permet de détecter qu'une quantité plus faible de récepteurs.

Des agents comme le chlorure de magnésium, en modifiant la force ionique du milieu d'incubation, conduisent à la dissociation des complexes hormone-récepteur. L'action est maximale pour une concentration en  $\text{MgCl}_2$  de 3 M. Cette dissociation est réversible puisque après retrait de chlorure de magnésium, les capacités de liaison de l'hormone par le récepteur sont, quasiment complètement, récupérées (fig 2.13). L'action du chlorure de magnésium est rapide puisqu'un traitement d'une minute donne un effet maximal (fig 2.14).

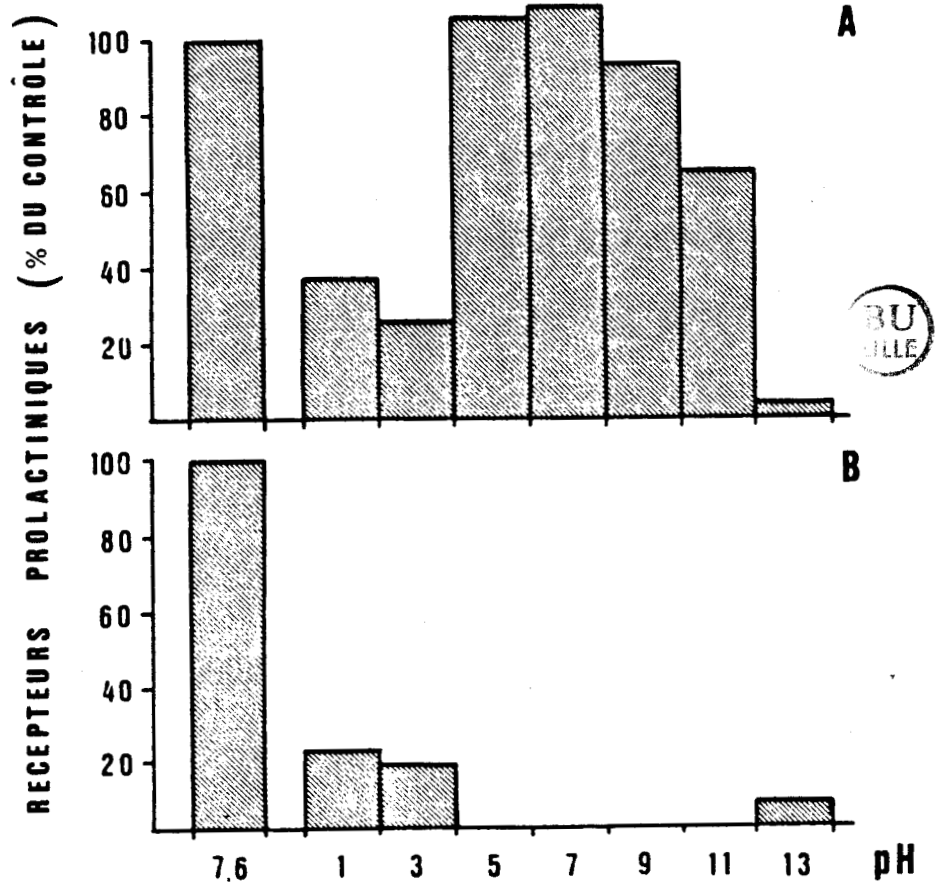


FIGURE 2.12. - EFFET DE LA MODIFICATION DU pH du milieu d'incubation sur la dissociation (A) de la ( $^{125}\text{I}$ ) hPRL préalablement liée aux récepteurs de cancers du sein, et sur la réassociation ultérieure (B) de la PRL marquée

La liaison est exprimée en pourcentage du témoin traité à l'eau distillée.



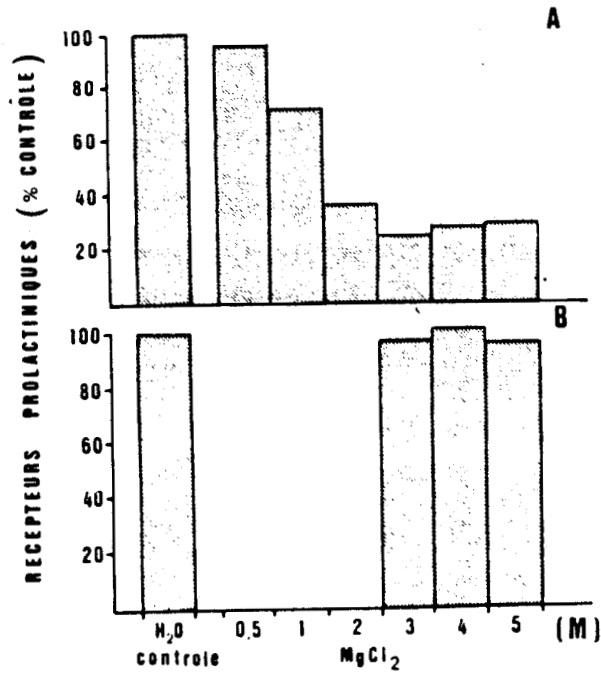


FIGURE 2.13. - EFFET DE LA MODIFICATION DE LA CONCENTRATION EN  $MgCl_2$  sur la dissociation (A) de la ( $^{125}I$ ) hPRL préalablement liée et sur la réassociation (B) ultérieure de la hPRL iodée

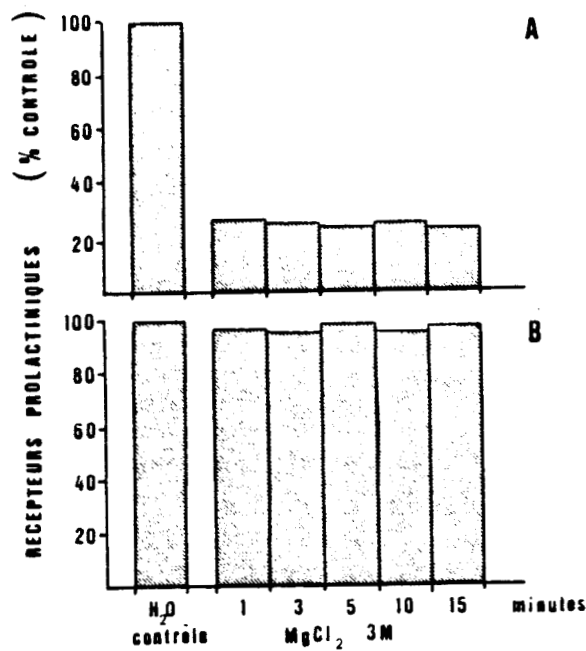


FIGURE 2.14. - CINETIQUE D'ACTION DE  $MgCl_2$  3 M sur la dissociation (A) de la ( $^{125}I$ ) hPRL préalablement liée et sur la réassociation (B) ultérieure de la hPRL marquée

La liaison est exprimée en pourcentage du contrôle traité à l'eau distillée.

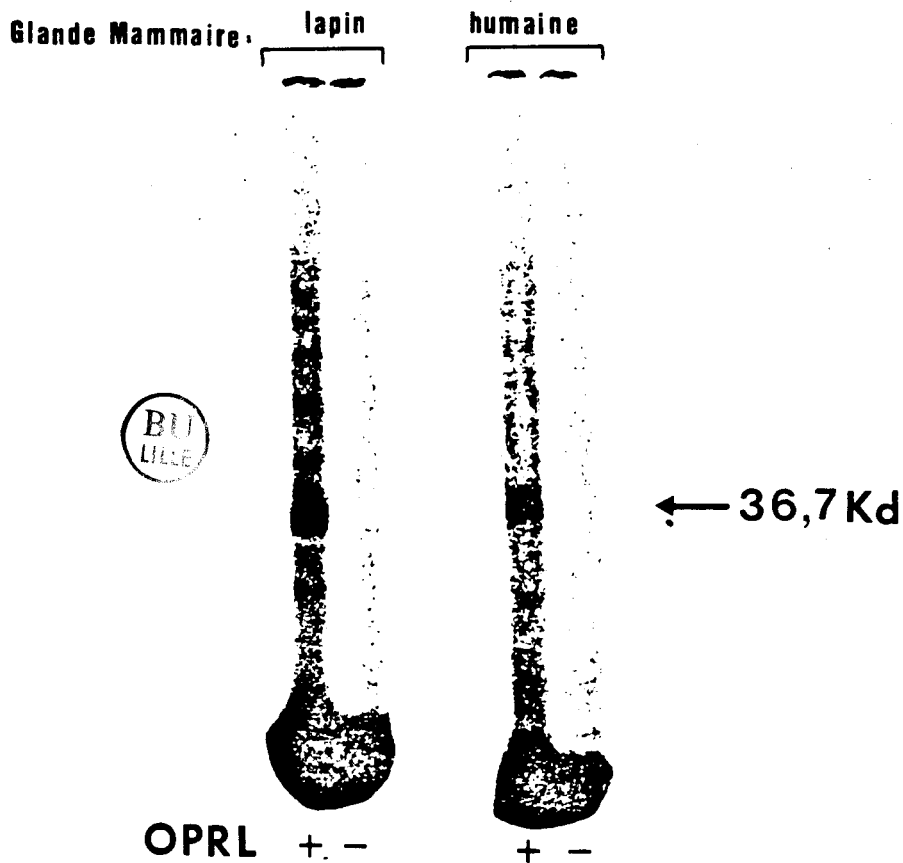


FIGURE 2.15. - AUTORADIOGRAMME comparant les unités qui lient la PRL dans les microsomes de cellules épithéliales mammaires de lapin et dans les microsomes de cellules épithéliales de cancer du sein humain

Les récepteurs membranaires sont liés de manière covalente à la ( $^{125}\text{I}$ ) hGH à l'aide d'un agent photo-activable bifonctionnel (HSAB 500  $\mu\text{M}$ ) et analysés par électrophorèse sur gradient de gel de polyacrylamide (5-15 %).

#### 2.3.3.4. Spécificité hormonale des récepteurs

Les hormones à activité lactogène, c'est-à-dire la PRL, l'hormone de croissance (hGH) et aussi l'hormone placentaire humaine (hPL) sont capables d'entrer en compétition avec la PRL marquée pour la liaison aux récepteurs des cancers du sein. L'hormone de croissance humaine est, à poids égal, la plus active.

#### 2.3.3.5. Détermination des caractéristiques moléculaires et solubilisation des récepteurs de la PRL

Des récepteurs de la PRL ont été détectés et caractérisés dans des cellules épithéliales de cancer du sein cultivées en lignée (SHIU, 1979 ; MURPHY et coll., 1984b). Afin de déterminer les caractéristiques moléculaires du récepteur de la PRL, nous avons utilisé la lignée de cellule la plus riche en récepteurs : T47-D. Une liaison covalente est établie entre le récepteur et la PRL radioactive en utilisant des agents bifonctionnels photo-activables. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide du complexe, lié de manière covalente est effectuée. Le poids moléculaire de l'unité liante est de 36 700 daltons (fig 2.15). Ceci suggère que le récepteur, comme cela a été montré chez d'autres espèces, pourrait être constitué d'une architecture moléculaire comprenant obligatoirement une ou plusieurs unités de poids moléculaire 36 700, c'est-à-dire de petite taille.

Il est possible de solubiliser les récepteurs membranaires de la PRL en utilisant un détergent comme le triton X 100 ou comme le CHAPS (3-((3-cholaminopropyl)diméthylammonia)-1-propane-sulfonate  $2 \text{ H}_2\text{O}$ ) qui est un zwitterion. L'inconvénient de l'utilisation du triton est qu'il provoque, contrairement au CHAPS, l'agrégation de la  $^{125}\text{I}$  PRL au cours des études de liaison : ce détergent oblige donc, lors de ces études, à l'emploi de  $^{125}\text{I}$  hGH (LISCIA et coll., 1982 ; GAVISH et coll., 1983 ; RAE-VENTER et DAO, 1983). Afin de définir les meilleures conditions de solubilisation, des fractions membranaires préparées à partir des cellules T47-D ont été traitées avec des concentrations croissantes de triton X 100 (0,25 à 2 %) ou de CHAPS (1 à 20 mM) (table 2.1). Le meilleur résultat est obtenu pour la concentration de triton de 0,5 %. Dans de telles conditions, 67 % des protéines membranaires sont solubilisées. Une augmentation de la concentration du triton X 100 n'augmente pas le rendement de solubilisation des protéines membranaires. La liaison de l'hormone à son récepteur est inhibée par une forte concentration de triton. L'efficacité du CHAPS est moins grande que

TABLE 2.1. - EFFICACITE DU TRITON X 100 ET DU CHAPS  
sur la solubilisation des protéines et des récepteurs de la PRL contenus dans les  
membranes de cellules épithéliales de cancer du sein (T47-D)

Détergent	Concentration	% de solubilisation des protéines	Liaison spécifique cpm/mg protéines solubilisées
Triton	0,25 %	53 %	40 740
	0,5 %	67 %	37 030
	1 %	68 %	32 960
	2 %	67 %	26 290
CHAPS	1 mM	27 %	7 407
	2,5 mM	41 %	14 440
	5 mM	43 %	28 880
	10 mM	42,5 %	26 290
	20 mM	44 %	29 380



Des préparations membranaires de cellules T47-D sont incubées 2 heures à température ambiante en présence de détergent (2,5 mg de protéines membranaires/ml de milieu). Après centrifugation 30 minutes à 5000 g, on détermine la fixation spécifique dans les surnageants en utilisant 200 000 cpm d'<sup>125</sup>I hGH en présence ou en absence de 1 µg/ml d'oPRL non marquée. Les liaisons sont effectuées dans du tampon Tris-HCL 25 mM, pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 0.1 % BSA. Le volume final d'incubation est de 500 µl.

celle du triton. Un allongement du temps d'action de ce détergent, jusqu'à 4 heures, n'améliore pas l'extraction des récepteurs. L'efficacité du CHAPS n'est pas constante et sur d'autres préparations membranaires, le rendement de solubilisation protéique ne dépassait pas 31 %. Enfin, nous avons constaté, en accord avec LISCIA (1982), que la liaison spécifique de l'hormone marquée dépendait de la concentration de CHAPS dans le milieu, et était maximale à 4 mM (concentration finale).

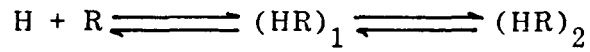
La solubilisation du récepteur est une étape indispensable dans sa purification. L'utilisation de chromatographies d'affinité utilisant la oPRL et le récepteur solubilisé au CHAPS ou la hGH et le récepteur solubilisé au triton devrait conduire à des préparations considérablement enrichies en récepteurs.

#### 2.4. DISCUSSION - CONCLUSION

La spécificité des récepteurs est très étroite et ne s'exerce que vis-à-vis des hormones à activité lutéinisante (LH, hCG) pour les récepteurs des cellules de Leydig et vis-à-vis des hormones à activité lactogène (PRL humaine et ovine, hormone de croissance humaine et hormone placentaire lactogène humaine) pour les cellules épithéliomateuses de cancer du sein.

L'affinité de ces récepteurs pour leur hormone, mesurée à l'équilibre, est élevée ( $K_d = 10^{-9}$  M) ; elle est ajustée aux concentrations circulantes et tissulaires des hormones. La vitesse d'association des hormones est rapide, mais en général inférieure à celle impliquant une diffusion simple. La vitesse de dissociation indique que la demi-vie du complexe est beaucoup plus lente ; on peut concevoir que cette demi-vie prolongée permette de moduler l'action de l'hormone en limitant la disponibilité en récepteurs. Le rapport des constantes de vitesse d'association et de dissociation doit, par définition, donner une valeur de  $K_d$  égale à celle mesurée à l'équilibre. En réalité, la constante mesurée à l'équilibre est plus grande que celle mesurée cinétiquement, on sous-estime donc l'affinité du récepteur pour l'hormone. Une hypothèse est que le modèle d'interaction simple, avec une catégorie des sites et selon la loi d'action de masse, ne peut représenter la relation étudiée. On peut imaginer un processus d'interaction à plusieurs étapes tendant à aug-

menter la cohésion du complexe au cours du temps d'association. Schématiquement, l'interaction pourrait avoir la forme suivante :



Le nombre de sites récepteurs est limité. L'amplitude de la réponse à une hormone dépend de la concentration plasmatique de l'hormone et des capacités de la cellule à répondre à cette hormone. Un paramètre important de cette capacité de réponse est constitué par le nombre de récepteurs ; il est facile de concevoir que, dans le cas d'un nombre fini de sites récepteurs, des variations dans le taux de récepteurs modulent l'action hormonale.

## **Article I**



## Report

# Characterization of prolactin receptors in human breast cancer

Jean-Philippe Peyrat,<sup>a</sup> Jean Djiane,<sup>b</sup> Paul A Kelly,<sup>c</sup> Brigitte Vandewalle,<sup>a</sup> Jacques Bonnetterre,<sup>a</sup> and Alain Demaille<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale, Centre de Lutte Contre le Cancer de la Région Nord, Centre Oscar Lambret, BP 307 - 59020 Lille Cedex, France;* <sup>b</sup> *Laboratoire de Physiologie de la Lactation CNRZ-INRA, 78350 Jouy-en-Josas, France;* <sup>c</sup> *Laboratory of Molecular Endocrinology, Royal Victoria Hospital, 687 Pine Avenue, West Montreal, Quebec, H3A/A1 Canada*

**Keywords:** breast cancer, membranes, prolactin, receptors

## Summary

In order to perform measurement of PRL binding and to improve the knowledge of pathophysiological variations in human mammary cancers, we have investigated in detail the binding characteristics of PRL in membranes prepared from these tumors. The optimization of the assay requires the selection of membranous components of light density ( $<1.17$ ); the tracer could be either  $^{125}\text{I}$ -PRL after affinity purification on PRL receptors or  $^{125}\text{I}$ -hGH without a purification step. It is favorable to utilize a high amount of protein and 200 000 cpm (2 ng) of tracer. Demonstration of the presence of receptors for PRL with a high affinity ( $K_d = 3 \times 10^{-10} \text{ M}$ ) in breast cancer is presented. The hormonal specificity of these receptors is studied: only lactogenic hormones (hGH, oPRL, hPRL, and hPL) are able to compete for binding of  $^{125}\text{I}$ -hPRL whereas bGH or insulin are without effect. Considering the known effect of PRL on cell multiplication, it is tempting to suggest that this hormone could have a crucial role in the development of breast tumor in humans and that therapies which would suppress secretion of PRL and GH could be beneficial.

## Abbreviations

PRL, prolactin; PRL R, prolactin receptors; GH, growth hormone; hPRL, human prolactin; oPRL, ovine prolactin; hGH, human growth hormone; bGH, bovine growth hormone; hPL, human placental lactogen.

## Introduction

Prolactin (PRL) is an important hormone in controlling mammary cell functions which correspond to the biosynthesis of milk products (24) and, at

least in several animal species, to the stimulation of DNA synthesis (8). These actions are mediated by specific membrane receptors, which have been characterized and partially purified in animal species (6, 22, 23). The concentration of receptor molecules in membranes has been correlated to the amplitude of the hormonal effects (8).

It has been established that PRL is involved in induction and promotion of many experimental mammary cancers. It stimulates the appearance and growth of spontaneous DMBA- or NMU-induced tumors in rats; in mice, however, PRL induces only preneoplastic lesions and has no effect on the growth of the adenocarcinomas (17, 27).

*Address for offprints:* Dr Jean-Philippe Peyrat, Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale, Centre de Lutte Contre le Cancer de la Région Nord, BP 307, 59020 Lille Cedex, France.



In humans, we have recently demonstrated that PRL binding is detectable in seventy percent of breast cancer biopsies, suggesting a potential role of this hormone in tumorigenesis (2, 19). Nevertheless the properties of this PRL receptor in human tissues are poorly documented (4, 12, 18, 25). The aim of the present study was therefore to analyze in detail the characteristics of the hormone-receptor interaction in order to establish an accurate method of measurement and to tentatively compare physiological and pathological states of mammary tissue.

## Materials and methods

### *Collection of tumors*

Tumor specimens, only adenocarcinomas, were obtained from the Center Oscar Lambret (Centre Anticancéreux de Lille). At the time of collection, fat was removed and samples were divided into two pieces; one was submitted for histological studies, and the other was frozen in liquid nitrogen.

### *Membrane preparation*

We have prepared 10 membrane preparations. Tumors have been selected for their PRL R positivity as described in a previous work (19). For each preparation about 25 different pieces corresponding to 20 g of tissue were homogenized in 0.3 M sucrose solution in water utilizing a Polytron homogenizer during four periods of 15 sec. After filtration through cheesecloth, the homogenate was applied to 10 ml of 1.2 M sucrose in a 22 ml (maximal fill volume) centrifuge tube. This technique allows the separation of light membrane components (density below 1.17) from other cell components of higher densities. In some experiments the tissue homogenate was applied to a discontinuous gradient of sucrose as detailed in the legend of Fig. 2. After overnight centrifugation at 105 000 g the layers of light membranes were collected and diluted in Tris HCl buffer (Tris 25 mM, pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM) and centrifuged once more

at 105 000 g for 1 hr. The pellet was resuspended in Tris HCl buffer, the protein content was assayed according to the method of Lowry (15), and the suspension was frozen (-20°C) until the binding assay was performed.

### *Prolactin iodination*

Human PRL (NPA batch 5 AFP 1582 C) was iodinated using Na <sup>125</sup>I and chloramine T at low concentration (11, 13) which resulted in a specific activity of approximately 80 µCi/µg. The labeled hormone was purified by incubation with microsomal fractions of rabbit mammary gland rich in PRL receptors and elution by 4 M MgCl<sub>2</sub> as detailed in the legend of Fig. 1.

### *Receptor assay*

Four hundred microgram samples of membrane proteins were incubated for 15 hr with labeled hormone at different concentrations in presence or absence of varied concentrations of lactogenic hormone (hPRL NIH AFP 1582 C; oPRL NIH P-S-15, 30.5 IU/mg; hGH NIH HS 2160 E, 2 IU/mg; hPL NIH) or nonlactogenic hormone (bGH NIH 0743 B 1 IU/mg). The final incubation volume was adjusted to 0.5 ml with Tris MgCl<sub>2</sub> buffer (pH 7.6) containing 0.1% bovine serum albumin.

### *In vitro dissociation*

In some experiments, membrane fractions were incubated with high concentrations of magnesium chloride, which allows the dissociation of PRL previously bound in vivo and the measurement of the level of total receptor sites. Crude membrane proteins normally used in the assay were preincubated five minutes with 0.5 ml MgCl<sub>2</sub> (1 to 5 M) and 4 ml of cold Tris HCl buffer (pH 7.6) containing 0.1% BSA were added to each tube. Following centrifugation at 2200 g, the pellets were resuspended in Tris HCl buffer and binding of the labeled hormone was assayed as described above.



## Results

### Purification of $^{125}\text{I}$ -hPRL on receptors

Figure 1 shows the increase in binding ability of iodinated human PRL following the purification of the labeled hormone on rabbit mammary PRL receptors. Specific binding of  $^{125}\text{I}$ -hPRL was approximately 7% in rabbit mammary gland membrane when incubated directly and increased 5-fold after the purification step. Binding to human breast tumor membrane was extremely low before purification (0.5%) but became easily detectable with the tracer previously purified on rabbit mammary gland membranes. This purified tracer was utilized in further studies for the determination of binding parameters. The specific binding of purified  $^{125}\text{I}$ -hPRL on the different membrane preparations ranged from 2.5 to 11%. The nonspecific binding never exceeded 70% of the total binding.

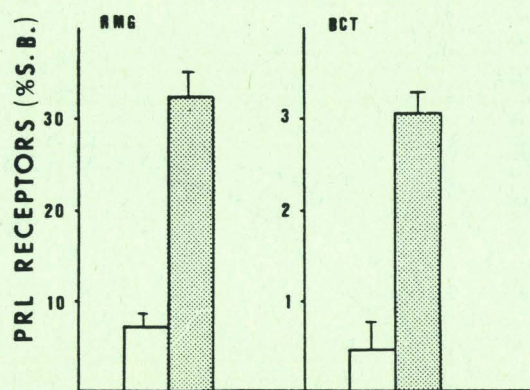


Fig. 1. Purification of  $^{125}\text{I}$ -hPRL tracer on rabbit mammary gland membranes. 600  $\mu\text{Ci}$  of labeled hPRL (80  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) were incubated overnight at 20°C with rabbit mammary gland membranes (500 000 cpm  $^{125}\text{I}$ -hPRL and 500  $\mu\text{g}$  membranes in 500  $\mu\text{l}$  of incubation buffer). Membranes were then centrifuged 30 min at 10 000 g. The supernatant was eliminated and the pellet was treated with  $\text{MgCl}_2$  4 M and recentrifuged one hr at 105 000 g; the  $\text{MgCl}_2$  contained in the supernatant was eliminated by filtration on a G-25 fine column. 100 000 cpm  $^{125}\text{I}$ -hPRL before  $\square$  and after  $\blacksquare$  purification were incubated under standard conditions with rabbit mammary gland (RMG - left panel) and breast cancer tissue (BCT - right panel).

### Localization of PRL binding activity

A one-step discontinuous sucrose gradient has been previously utilized to better establish the differential subcellular localization of PRL binding in rabbit mammary gland (7). The same technique was utilized in the present study. As shown in Fig. 2, the binding activity of human breast cancer homogenate was mainly recovered in fractions F1 and F2 of this discontinuous sucrose gradient, corresponding to density lower than 1.17, while the majority of cellular protein is found in fractions of higher density. We recovered 28% in F1, 46% in F2, 10% in F3 and 16% in F4 of the total PRL binding in the homogenate. For this reason we routinely selected membranous components rich in PRL receptors by ultracentrifugation of breast cancer homogenates on a sucrose cushion of 1.2 M ( $D = 1.17$ ).

### In vitro desaturation of PRL receptors

Figure 3A shows the in vitro desaturation of receptors previously bound with 100 000 cpm hPRL by increasing molarities of  $\text{MgCl}_2$  (0 to 5 M). Maximal dissociation was observed at concentrations of  $\text{MgCl}_2$  equal to or greater than 3 M for an incubation period of five minutes at 20°C. Figure 3B shows that reincubation of the desaturated membrane under the same conditions and with identical amounts of labeled lactogenic hormone as used in the first binding study (Fig. 3A) resulted in essentially the same amounts of hormone binding at equilibrium, indicating that the desaturated specific binding sites remain accessible to the ligand.

### Binding characteristics of $^{125}\text{I}$ -hPRL to its receptors

Figure 4 shows the time and temperature dependence of specific binding of  $^{125}\text{I}$ -hPRL to its receptors in presence or absence of sodium azide (0.02%). At 20°C (Fig. 4A), the equilibrium was obtained rather slowly. The binding was maximal around 10 hr and remained stable until 15 hr, after which a little decrease was observed, which was



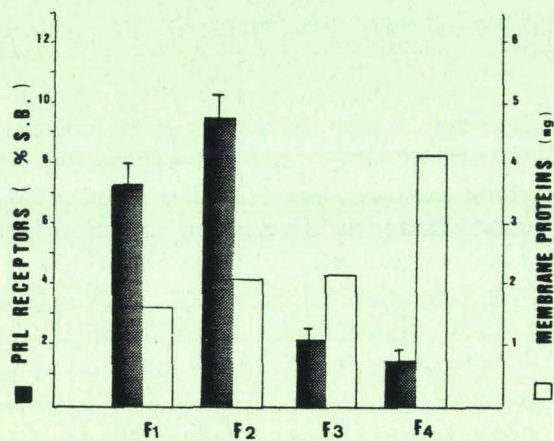


Fig. 2. Prolactin receptor (% specific binding for 400  $\mu$ g) levels and total membrane protein quantity in the four fractions prepared by discontinuous sucrose gradient ultracentrifugation. The homogenate was applied at the top of a discontinuous density gradient consisting of four densities of 7 ml each at the following sucrose molarities 0.9, 1.3, 1.7 and 2 M (representing densities of 1.13, 1.17, 1.23 and 1.25). Tubes were centrifuged in a SW 27 rotor overnight at 105 000 g at 4°C. The cellular components which formed at the interfaces of densities 1.07 and 1.13 was fraction 1 (F1), 1.13–1.17 (F2), 1.17–1.23 (F3), and 1.23–1.25 (F4).

due to an increase in the nonspecific binding. At 37°C maximal binding was obtained earlier (6 hr) but rapidly decreased if the incubation was performed in absence of sodium azide. In presence of this inhibitor, binding at equilibrium was maintained for a long period, probably due to less degradation of the tracer.

The effect of increasing amounts of membrane protein in the incubation is shown in Fig. 5, which demonstrates that the binding is roughly linear up to 500  $\mu$ g of protein.

Saturation of  $^{125}$ I-hPRL binding is shown in Fig. 6, in the presence of increasing concentrations of the labeled hormone and a constant amount of membrane protein (400  $\mu$ g). Panel A shows the specific binding and Panel B the transformation of these data by Scatchard analysis (21). Treatment of human breast cancer membranes with 3 M  $\text{MgCl}_2$  did not affect the affinity of the receptors ( $K_d = 0.32 \pm 0.11$  nM after and  $0.29 \pm 0.10$  nM before desaturation). When the 30% loss of proteins which occurs during the dissociation process (13) is

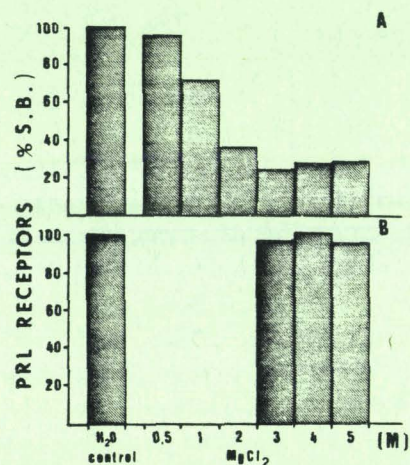


Fig. 3. Effect of increasing molar concentrations of  $\text{MgCl}_2$  on dissociation (A) of  $^{125}$ I-hPRL previously bound on human breast cancer receptor, and subsequent specific rebinding of fresh labeled hPRL to receptors within the same tubes (B). Binding is represented as a percentage of values observed for control ( $\text{H}_2\text{O}$  treated) membranes which specifically bound 3 500 of the 100 000 cpm added to each tube.

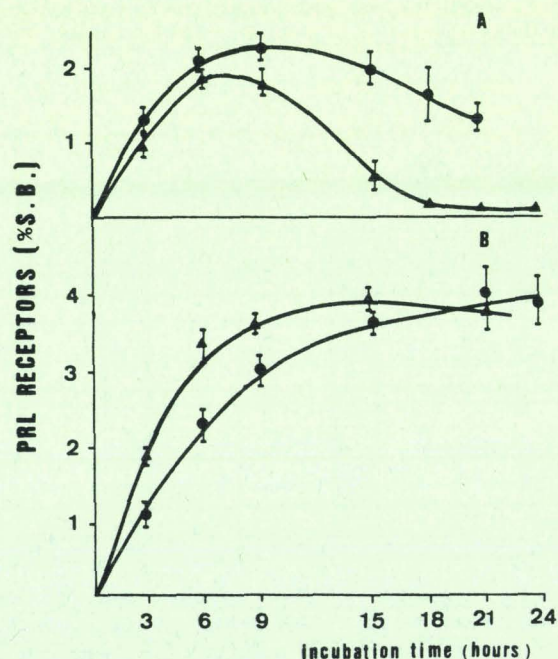


Fig. 4. Panel A: effect of time and temperature on specific binding of  $^{125}$ I-labeled human prolactin on breast cancer membranes. Membranes were incubated with  $^{125}$ I-hPRL in absence or in presence of an excess of unlabeled lactogenic hormone. Results are expressed as a percentage of the total  $^{125}$ I-hPRL specifically bound per 400  $\mu$ g of membrane protein (●—● 20°C ▲—▲ 37°C). Each point is the mean of three determinations ( $\pm$  SD). Panel B: the same study in the presence of azide 0.02% (a different pool of membranes was utilized).



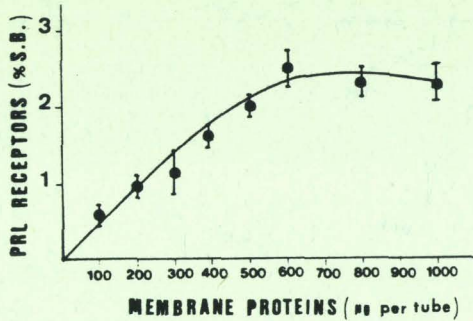


Fig. 5. Effect of increasing the amount of membrane protein on binding of  $^{125}\text{I}$ -hPRL to breast cancer membranes. Each point is the mean of three determinations ( $\pm$  SD).

taken into account, the number of available receptors per microgram of membrane proteins is increased more than two-fold by the  $\text{MgCl}_2$  treatment.

Figure 7 illustrates the hormonal specificity of the binding of  $^{125}\text{I}$ -hPRL to its receptors in breast cancer membranes. Only lactogenic hormones (hGH, oPRL, hPRL) were able to compete for binding, whereas bGH or insulin were without effect. It is interesting to note that hPL has only a moderate effect, suggesting a minor biological effect of this hormone in this tissue. If the two lactogenic hormones hPRL and hGH have the

same biological activity, then on the basis of the weight of hormone, hGH would be the most potent.

## Discussion

The results outlined above confirm earlier studies on the binding of lactogenic hormones to breast cancer membranes (12, 18) and raise several points of specific interest.

The hPRL binding sites in breast cancer membranes are specific for lactogenic hormones. hGH is potent for the inhibition of binding, which confirms its lactogenic effect in the human species. bGH, which is not a lactogenic hormone, cannot displace the binding. This study leads to two conclusions. First, human breast cancer PRL receptors can be assayed either with hGH or with hPRL or oPRL. The binding capacity depends on the quality and purity of the hormonal preparation. Second, the disappointing results obtained after antiprolactinic treatment (1, 9, 10) of patients with breast cancer could be attributed to the presence of circulating hGH which may still occupy the receptors.

The utilization of 3 M  $\text{MgCl}_2$  to dissociate endogenously bound PRL receptors allowed a greater

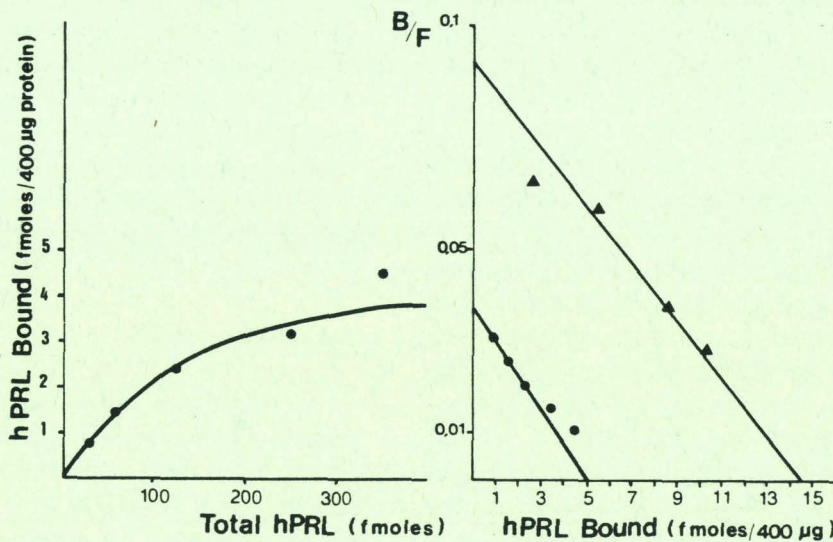


Fig. 6. Panel A: specific prolactin binding as a function of increasing amounts of  $^{125}\text{I}$ -hPRL. Panel B: Scatchard plot of the specific binding obtained in A (●—●) and of specific binding obtained after treatment by 3 M  $\text{MgCl}_2$  (▲—▲).



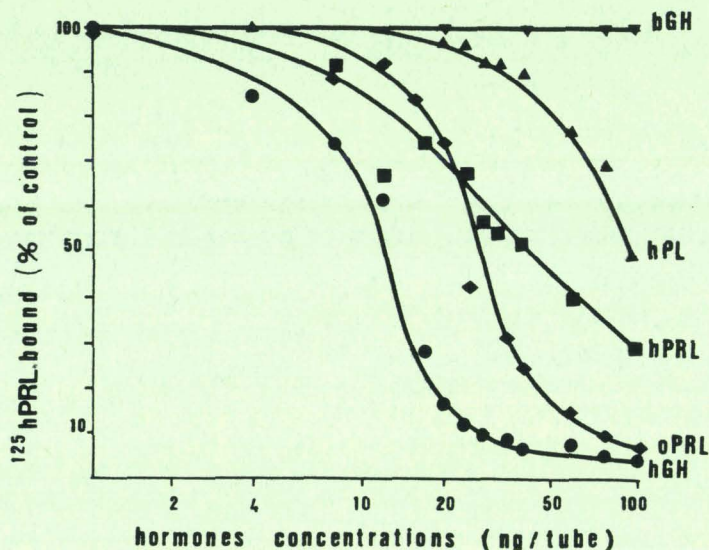


Fig. 7. Hormonal specificity of binding of purified hPRL to breast cancer membranes. Competition for binding of  $^{125}\text{I}$ -hPRL (100% = binding in the absence of unlabeled hormone) in the presence of increasing amounts of unlabeled hormones.

number of tumors to be considered PRL receptor-positive while increasing the average level of PRL binding in the PRL receptor-positive tumors from 1.95 to 3.17% (19). It is established by the experiments outlined above that high  $\text{MgCl}_2$  concentrations (up to 3 M) constitute a good technique for depleting endogenously saturated receptors of lactogenic hormones. The dissociation constant obtained from the Scatchard plots ( $K_d = 310^{-10}$  M) is of the same order of magnitude as the  $K_d$  found in animals under different physiological conditions. This  $K_d$  is not modified after  $\text{MgCl}_2$  treatment.

Association kinetics reach a plateau in about 15 hr at 20° or 37°C in the presence of sodium azide. The binding is linearly related to the amount of membrane up to 500  $\mu\text{g}$ .

The main difficulty in assaying PRL receptors in breast cancer membranes involves the detection of the very low concentrations of the receptors. The optimization of the assay as suggested by the present work, requires first the selection of membranous components of light density (<1.17), which may consist of smooth membranes (Golgi and plasma membranes) (7). Second, the tracer could be either  $^{125}\text{I}$ -hPRL after affinity purification on PRL receptors (thus selecting only the molecules able to bind to the receptors), or  $^{125}\text{I}$ -hPRL

without a purification step. Finally, it is favorable to utilize a high amount of membrane protein (400  $\mu\text{g}$ ) and more cpm of tracer (200 000 cpm) than usually used (100 000 cpm).

The main contribution provided by the present work consists of a clear characterization of the receptors for PRL or human GH in human breast cancer. Only fragmentary data have been published previously (12, 18). Considering several reports that have demonstrated a growth effect of PRL on normal human breast (3, 5, 14) as well as some breast carcinomas (14, 16, 26), it is tempting to suggest that this hormone could have a crucial role in the development of breast tumors in humans and that therapies which would suppress the secretion of hPRL and hGH could be beneficial.

#### Acknowledgements

These studies were supported by the 'Association pour le Développement de la Recherche sur le Cancer'. The oPRL, hGH and hPRL were kindly supplied by the NIADDK Pituitary Hormone Distribution Program. The expert technical assistance of Marie-Michèle Delepierre and Joelle Fournier is gratefully acknowledged.



# References

1. Barrett A, Morgan L, Ragatt PR, Hobbs JR: Bromocriptine in the treatment of advanced breast cancer. *Clin Oncol* 2:373-377, 1976
2. Bonnetterre J, Peyrat JP, Vandewalle B, Beuscart R, Vie MC, Cappelaere P: Prolactin receptors in human breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 18:1152-1162, 1982
3. Ceriani RL, Contesso GP, Nataf BM: Hormone requirement for growth and differentiation of the human mammary gland in organ culture. *Cancer Res* 32:2190-2196, 1972
4. Di Carlo R, Muccioli G: Prolactin receptor in human mammary carcinoma. *Tumori* 65:695-792, 1979
5. Dilley WG, Kister SJ: In vitro stimulation of human breast tissue by human PRL. *J Natl Cancer Inst* 55:35-36, 1975
6. Djiane J, Durand P, Kelly PA: Evolution of prolactin-receptors in rabbit mammary gland during pregnancy and lactation. *Endocrinology* 100:1348-1356, 1977
7. Djiane J, Houdebine LM, Kelly PA: Down-regulation of prolactin receptors in rabbit mammary gland: differential subcellular localization. *Proc Soc Exp Biol Med* 168:378-381, 1981
8. Djiane J, Houdebine LM, Kelly PA: Correlation between prolactin-receptor interaction, down-regulation of receptors, and stimulation of casein and deoxyribonucleic acid biosynthesis in rabbit mammary gland explants. *Endocrinology* 110:791-795, 1982
9. European Breast Cancer Group: Clinical trial of 2-bromocriptine (CB 154) in advanced breast cancer. *Eur J Cancer* 8:155-156, 1972
10. European Breast Cancer Group: Clinical trial of the cyclic imide 1-(morpholinomethyl)-4-phytalimido-piperidine-dione-2.6 (CG 603) in advanced breast cancer. *Eur J Cancer* 8:157-158, 1972
11. Greenwood FG, Hunter WH, Glover JS: The preparation of <sup>125</sup>I-labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* 89:114-123, 1963
12. Holdaway JM, Friesen HG: Hormone binding by human mammary carcinoma. *Cancer Res* 37:1946-1952, 1977
13. Kelly PA, Leblanc G, Djiane J: Estimation of total prolactin binding sites after in vitro desaturation. *Endocrinology* 104:1631-1638, 1979
14. Kleejer-Anderson P, Buehring G: Effect of hormones on growth rates of malignant and nonmalignant human mammary epithelia in cell culture. *In Vitro* 16:491-501, 1980
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951
16. Malarkey WB, Kennedy M, Allred LE, Milo G: Physiological concentrations of prolactin can promote the growth of human breast tumor cells in cultures. *J Clin Endocrinol Metab* 56:673-677, 1983
17. Meites J: Relation of the neuro-endocrine system to the development and growth of experimental mammary tumors. *J Neural Transmission* 48:25-42, 1980
18. Partridge RK, Hahnel R: Prolactin receptors in human breast carcinoma. *Cancer* 43:643-646, 1979
19. Peyrat JPh, Dewailly D, Djiane J, Kelly PA, Vandewalle B, Bonnetterre J, Lefebvre J: Total prolactin binding sites in human breast cancer biopsies. *Breast Cancer Res Treat* 1:369-373, 1981
20. Rae-Venter B, Nemoto T, Schneider SL, Dao TL: Prolactin binding by human mammary carcinoma: relationship to estrogen receptor protein concentration and patient age. *Breast Cancer Res Treat* 1:233-243, 1981
21. Scatchard G: An attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51:660-673, 1949
22. Shiu RPC, Friesen HG: Properties of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland. *Biochem J* 140:301-311, 1974
23. Shiu RPC, Friesen HG: Solubilization and purification of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland. *J Biol Chem* 249:7902-7911, 1974
24. Topper YJ, Freeman CS: Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev* 60:1049-1106, 1980
25. Turcot-Lemay L, Kelly PA: Prolactin receptors in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 68:381-383, 1982
26. Welsch CW, De Itturi GC, Brennan HJ: DNA synthesis of human, mouse, and rat mammary carcinomas in vitro. Influence of insulin and prolactin. *Cancer* 38:1272-1281, 1976
27. Welsch CW, Nagasawa H: Prolactin and murine mammary tumorigenesis. A review. *Cancer Res* 37:951-963, 1977

**III- RÔLE DES RÉCEPTEURS DE LA LH  
DANS LA MATURATION  
DU TESTICULE  
DE PORC**

-----

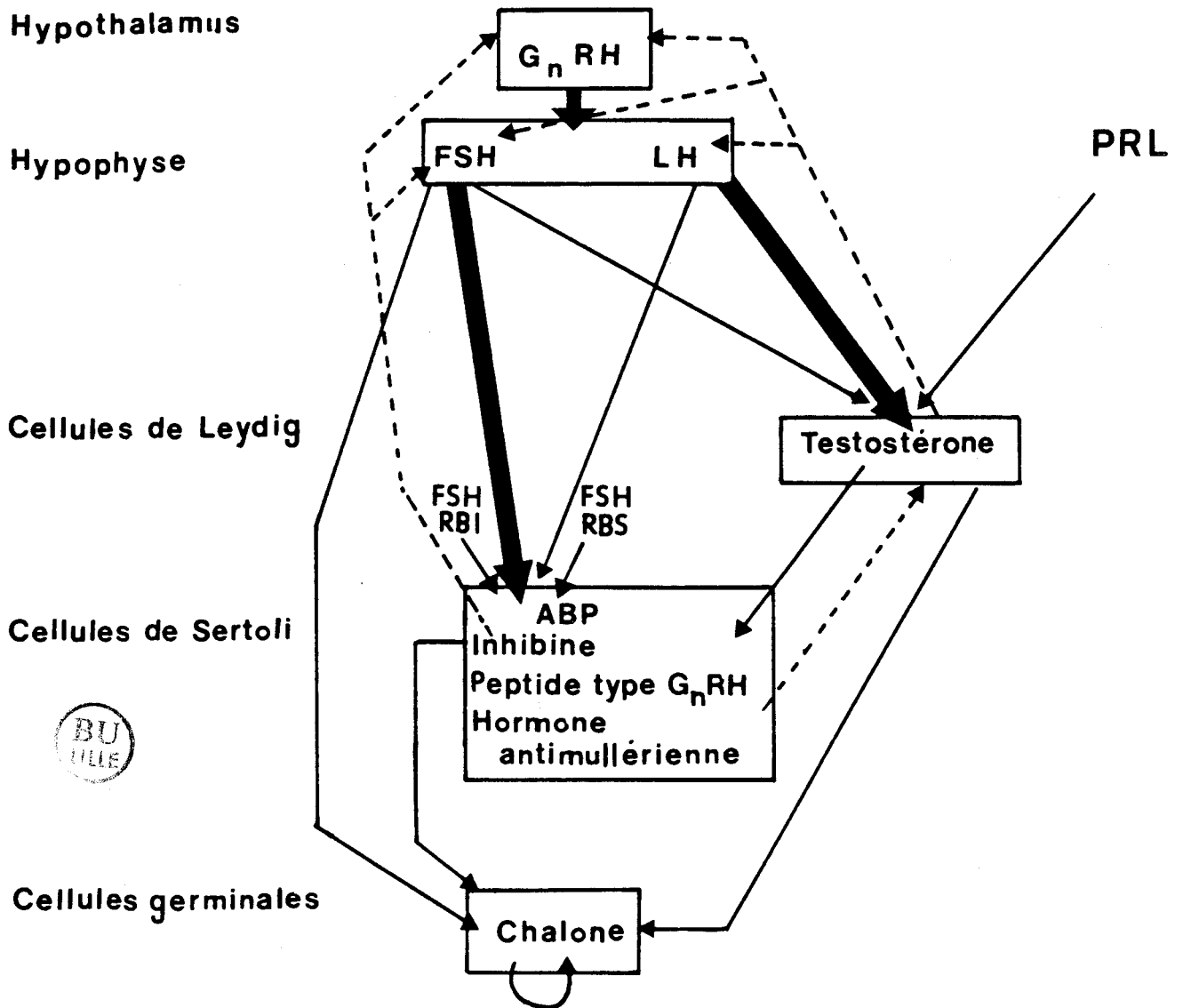


FIGURE 3.1 - CONTROLE HORMONAL DU TESTICULE

- ABP : Androgen Binding Protein, protéine porteuse d'androgènes
- GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone
- FSH : Follicle Stimulating Hormone, hormone folliculaire
- LH : Luteinizing Hormone, hormone lutéinisante
- FSH RBI : FSH Receptor Binding Inhibitor
- FSH RBS : FSH Receptor Binding Stimulator
- inhibiteur et stimulateur de la fixation de FSH à son récepteur



### 3.1. INTRODUCTION

#### 3.1.1. CONTROLE HORMONAL DU FONCTIONNEMENT TESTICULAIRE (fig 3.1)

Le testicule est un organe doué d'une double fonction glandulaire : endocrine et exocrine. On y trouve deux lignées cellulaires : la lignée germinale qui aboutit à la formation des spermatozoïdes et une lignée d'origine mésoblastique de laquelle dérivent les autres types cellulaires dont les cellules de Leydig et de Sertoli qui possèdent une activité de synthèse hormonale.

Les cellules de Leydig sont des cellules de type endocrine rassemblées en amas entre les tubules séminifères, dans le tissu interstitiel, et en contact étroit avec d'une part les capillaires sanguins et, d'autre part, les tubules. Leur rôle principal est de synthétiser, sous l'influence de la LH hypophysaire, puis de libérer la testostérone et secondairement des oestrogènes. Cette synthèse, à partir du cholestérol, se déroule dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries. Différentes étapes dans le clivage des chaînes accessoires du cholestérol sont sous la dépendance de la LH. La testostérone sécrétée agit à 3 niveaux. Elle va à la périphérie entretenir les caractères sexuels secondaires de type masculin. Au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire, elle entraîne un rétrocontrôle négatif sur la synthèse et la sécrétion de LH. Elle agit enfin au sein de son organe de production où elle contrôle certaines étapes de la spermatogénèse et l'activité de synthèse hormonale de la cellule de Sertoli.

Les cellules de Sertoli, intratubulaires, sont en contact intime avec les cellules de la lignée germinale. Ces cellules jouent un rôle dans la maturation et la migration des cellules germinales ; elles possèdent également d'autres fonctions : 1) les cellules de Sertoli sont capables de phagocyter les cellules germinales qui dégénèrent, 2) elles sont capables de synthétiser de la testostérone et de l'oestradiol à partir de précurseurs stéroïdiens, mais leur capacité à utiliser le cholestérol pour ces synthèses fait toujours l'objet de controverse, 3) récemment, l'aptitude de la cellule de Sertoli à synthétiser

des protéines a été mise en évidence, tant in vivo qu'in vitro. Certaines sont libérées dans la circulation et possèdent une activité hormonale, d'autres agissent au sein même du testicule et sont appelées cybernines (GUILLEMIN, 1981). La régression des canaux de Müller chez le fœtus mâle est secondaire à la présence d'une hormone sécrétée par les cellules de Sertoli fœtales et néonatales : l'hormone anti-müllérienne (JOSSO et coll., 1977). Une autre hormone, de nature protéique, a été trouvée : l'inhibine ; elle inhibe la synthèse et la libération de la FSH (FRANCHIMONT et coll., 1979 ; STEINBERGER et STEINBERGER, 1976 ; STEINBERGER, 1981). La protéine porteuse d'androgène (ABP) est synthétisée sous le contrôle de la FSH par la cellule de Sertoli ; elle est libérée dans la lumière tubulaire et se lie à la testostérone et à la dihydrotestostérone avec une très grande affinité ; elle permet d'obtenir une accumulation des androgènes indispensable aux étapes hormonodépendantes de la spermatogénèse et de la spermiogénèse (HANSSON et coll., 1975). Cette protéine n'a pas encore été décrite chez le porc. Une substance de type GnRH, stimulée par l'hCG, également d'origine sertolienne a été détectée dans le testicule de rat (SHARPE, 1980 ; SHARPE et FRASER, 1980) ; ce peptide agirait comme une cybernine, il diminuerait le nombre des récepteurs leydigiens à la LH. D'autres substances testiculaires ont été isolées. Une chalone, c'est-à-dire une substance qui agit sur une cellule au sein de l'organe qui la produit en inhibant la synthèse d'ADN, est sécrétée par les spermatogonies et contrôle la spermatogénèse (CLERMONT et MAUGER, 1976 ; THUMANN et BUSTOS-OBREGON, 1978).

Des substances dont l'origine n'est pas encore précisée ont enfin été détectées : la FSH RBS et la FSH RBI qui, respectivement, stimule et inhibe la fixation de FSH à son récepteur (REICHERT et coll., 1981), un facteur de nature indéterminée qui inhibe la libération de PRL (DEMOULIN et FRANCHIMONT, 1978) et une protéine dont le rôle au niveau du testicule n'est pas connu : la relaxine (ESSIG et coll., 1982 ; LOUMAYE et coll., 1980).

### 3.1.2. MECANISME D'ACTION DE LA LH

La LH est une hormone glycoprotéique (PM 29 100 daltons) qui, comme l'hCG, est capable de stimuler la fonction endocrine du testicule et, en particulier, la sécrétion de testostérone. Elle exerce son action sans qu'il y ait nécessité de pénétrer dans la cellule (ROBISON et coll., 1968). Elle se lie spécifiquement sur une autre molécule de nature protéique : le récepteur, situé sur la face externe de la membrane plasmique des cellules de Leydig.

La localisation de ces récepteurs a été mise en évidence in vivo pour la première fois par fluorescence et autoradiographie chez le rat (MANCINI et coll., 1967 ; DE KRETZER et coll., 1969). In vitro, la fixation spécifique de la LH ou de l'hCG chez le rat mâle adulte a été montrée sur des cultures primaires de cellules de Leydig et sur des homogénats ou des préparations membranaires de testicule (CATT et coll., 1971 ; LEIDENBERGER et REICHERT, 1972 ; CATT et coll., 1976). Les études de centrifugation différentielle des homogénats testiculaires permettent d'affirmer que les récepteurs de LH/hCG sont situés sur les membranes plasmiques (CATT et coll., 1976). Ces récepteurs sont caractérisés par leur constante d'affinité élevée pour la LH et l'hCG ( $K_a = 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ) et leur faible concentration ( $10^{-12}$  mole par gramme de tissu frais). Leurs caractéristiques permettent d'expliquer que la LH à ses faibles concentrations circulantes ( $10^{-10}$  à  $10^{-12}$  M) puisse exercer son action (cf chapitre II).

Les hormones lutéinisantes après leur liaison au récepteur de la LH stimulent in vivo comme in vitro la synthèse d'AMPc (ROMMERTS et coll., 1972, 1973 ; MENDELSON et coll., 1975), puis l'activation de protéines kinases et la synthèse de protéines impliquées dans la stéroïdogénèse (HALL et coll., 1962 ; LAWRENCE et DAVIES, 1977 ; COOKE et coll., 1979). Les nucléotides guanidiques sont impliqués dans l'activation de l'adénylate cyclase (DUFAU et coll., 1980).

Les hormones lutéinisantes sont indispensables à la production de testostérone in vivo (HALL, 1966) et in vitro (DUFAU et coll., 1971 ; ROMMERT et coll., 1973). La voie de l'adénylate cyclase pourrait ne pas être la seule conduisant à la biosynthèse des androgènes (MENDELSON et coll., 1975). La sécrétion de testostérone suit très rapidement (15 minutes) in vivo comme in vitro, l'augmentation d'hormone lutéinisante. L'occupation de moins de 1 % des récepteurs produit une stimulation maximale (CATT et coll., 1973). Cette sécrétion est due en majeure partie à l'accélération de l'étape de conversion du cholestérol en prégnénolone. Mais les hormones lutéinisantes sont aussi responsables à plus long terme de la différenciation des ultrastructures stéroïdogènes des cellules de Leydig. Ainsi, l'administration prolongée d'hCG à des cellules de Leydig normales ou cancéreuses provoque une prolifération du réticulum endoplasmique lisse qui contient les enzymes nécessaires à la synthèse de testostérone circulante (AOKI, 1970 ; NEAVES,

1973 ; DE KRETZER, 1967). Après suppression de la LH, on observe, in vivo comme in vitro, une régression, une dédifférenciation presque totale des cellules (MORAT, 1977). Cette régression est réversible par administration d'hormone lutéinisante (WOODS et coll., 1961 ; DUFAURE et coll., 1974 ; MORAT, 1977b).

### 3.1.3. MODULATION DE L'ACTION DE LA LH

La fixation de la LH à des récepteurs spécifiques situés dans les membranes plasmiques des cellules de Leydig est l'événement initial de la chaîne conduisant à l'action biologique de cette hormone. La modification des caractéristiques des récepteurs pourrait être un facteur de contrôle de la différenciation et de l'activité stéroïdogène des cellules de Leydig. Ainsi une stimulation hormonale aiguë par la LH provoque, à court terme, in vivo comme in vitro, une régulation négative des récepteurs de la LH qui correspond à une accélération de la dégradation des récepteurs après leur internalisation dans la cellule de Leydig (HSUEH et coll., 1977 ; TELL et coll., 1978). La régulation négative est précédée par un découplage entre récepteurs et adénylate cyclase ; ce découplage provoque le blocage de la stéroïdogénèse (HAOUR et coll., 1982). L'ensemble de ces phénomènes correspond à une période de désensibilisation pendant laquelle la cellule de Leydig est réfractaire à toute nouvelle stimulation (HAOUR et coll., 1978). La durée, de plusieurs jours, et l'intensité de la désensibilisation sont reliées à la quantité de LH qui a agi. La diminution des récepteurs débute pour des concentrations physiologiques de LH. La régulation à long terme des récepteurs de la LH est peu connue. Une situation physiologique appropriée pour l'étudier est le développement post-natal (GREENSTEIN, 1978 ; KETELSLEGERS et coll., 1978).

Le travail que nous présentons au paragraphe suivant montre un exemple de régulation des récepteurs de la LH dans le testicule de porc. La maturation sexuelle chez le porc mâle est caractérisée par une série complexe d'événements qui inclut une augmentation de la sécrétion des hormones gonadotropes et de testostérone, des changements dans la réponse pituitaire au GnRH et des modifications dans la sensibilité de l'hypophyse et de l'hypothalamus aux mécanismes de rétrocontrôle. Les modifications de la capacité de réponse du testicule à la LH au cours de la maturation sexuelle sont peu connues. La première étape d'action de la LH sur le testicule étant sa liaison

à des récepteurs spécifiques, des modulations de l'affinité ou du nombre des récepteurs de la LH pourraient modifier la réponse testiculaire à cette hormone.

### 3.2. EVOLUTION DU NOMBRE ET DE L'AFFINITE DES RECEPTEURS DE LA LH DANS LE TESTICULE DE PORC AU COURS DU DEVELOPPEMENT POST-NATAL

L'évolution des récepteurs a été étudiée, au cours du développement, en tenant compte des modifications importantes, du nombre et de la part occupée par les cellules de Leydig dans le testicule (article II).

#### 3.2.1. HISTOLOGIE QUANTITATIVE

La méthode des numérations ponctuelles, qui consiste à superposer un réseau de points fixes sur coupe histologique, a permis de déterminer la composition cellulaire du testicule. Le tissu interstitiel occupe 70 % du testicule chez le porc nouveau-né de 30 jours alors qu'il n'occupe plus que 25 % du testicule chez le porc pubère de 150 jours. La part occupée par les cellules de Leydig dans le tissu interstitiel est constante.

Le nombre de cellules de Leydig par  $\text{cm}^3$  de testicule varie considérablement au cours de la vie post-natale du porc. Ces variations rendent compte à la fois de celles du nombre de cellules par  $\text{cm}^3$  de tissu interstitiel et de la part occupée par le tissu interstitiel dans le testicule. La densité de cellules de Leydig entre 20 et 30 jours est d'environ 80 000, elle augmente et atteint 300 000 cellules par  $\text{cm}^3$  à 90 jours ; elle diminue ensuite jusqu'à 120 jours pour rester à 80 000 cellules par  $\text{cm}^3$  au-delà de cette période. On assiste également à une évolution de la morphologie des cellules. Le diamètre des cellules de Leydig est le plus élevé à 30 jours (20  $\mu\text{m}$ ), diminue pendant l'enfance jusqu'à 90 jours (10  $\mu\text{m}$ ), puis réaugmente pendant la période pré-pubertaire pour se stabiliser ensuite (15  $\mu\text{m}$ ).

Le nombre total de cellules de Leydig augmente d'une manière continue jusqu'à 90 jours, en relation avec l'augmentation du nombre de cellules par unité de volume testiculaire, puis au-delà de 90 jours avec la croissance du testicule.

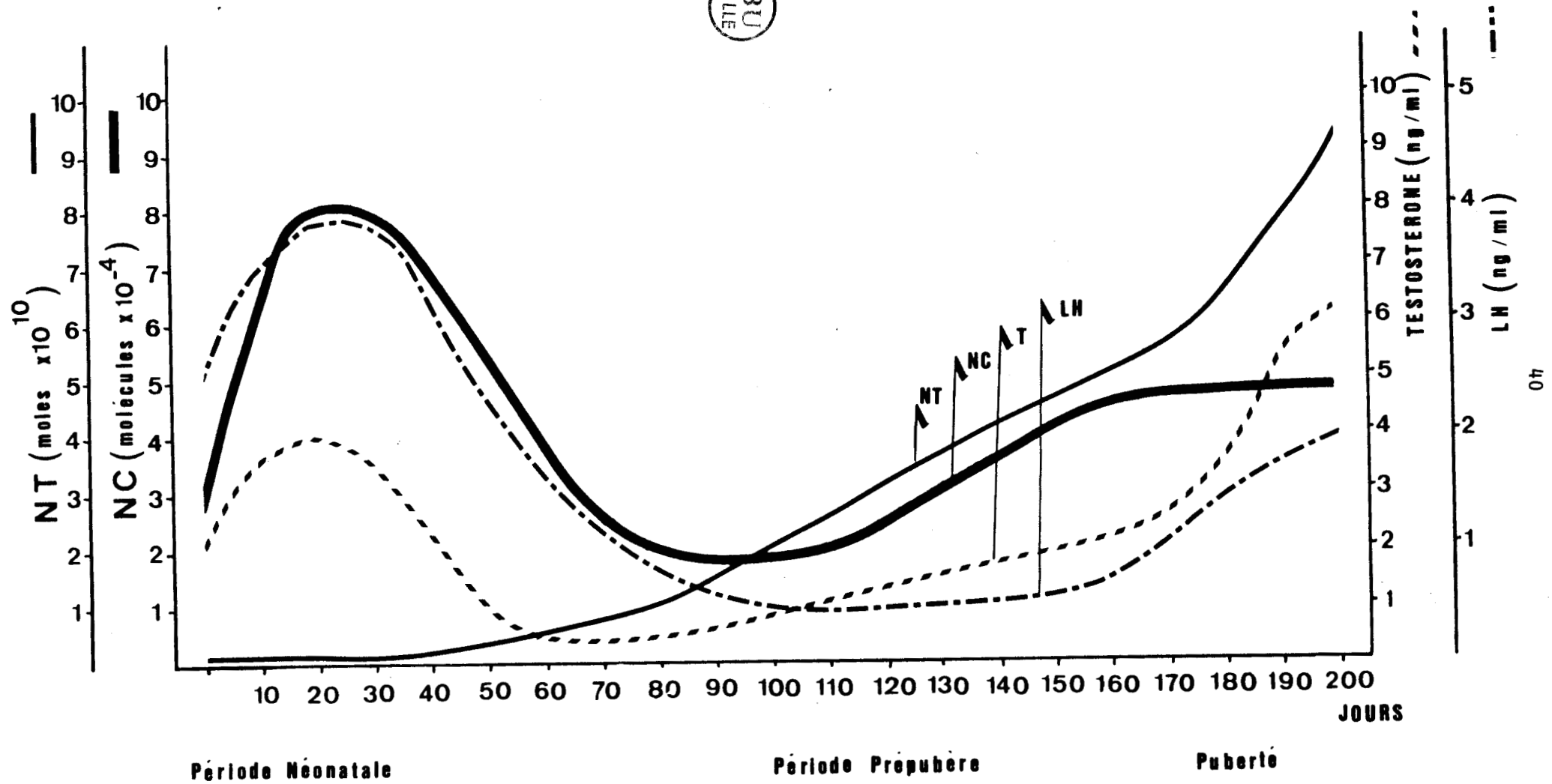


FIGURE 3.2. - EVOLUTION DU NOMBRE DE SITES de la LH par cellules de Leydig (NC), par testicule (NT) et des taux sériques de testostérone (MEUSY-DESSOLLE, 1975) et de LH (MEUSY-DESSOLLE, communication personnelle)

### 3.2.2. CONTENU EN RECEPTEURS DU TESTICULE

Au cours de la vie post-natale du porc, nous n'avons pas observé de variation de la constante d'affinité de la LH pour ses récepteurs ( $K_a = 7 \pm 6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ ).

La concentration de récepteurs spécifiques de la LH atteint  $9 \times 10^{-12}$  mole par gramme de testicule entre 20 et 70 jours. Elle diminue jusqu'à 110 jours, âge auquel s'établit la puberté, pour atteindre la valeur stable de  $3 \cdot 10^{-12}$  mole par gramme de testicule. Le nombre total de récepteurs par testicule augmente à partir de 30 jours ; l'augmentation accentuée du nombre total de récepteurs par testicule à la puberté est due à la croissance testiculaire.

En rapportant le nombre total de récepteurs par testicule au nombre total de cellules de Leydig par testicule, on obtient le nombre de récepteurs par cellule :

$$N_c = \frac{\text{nombre total de récepteurs par testicule (moles)}}{\text{nombre total de cellules de Leydig}}$$

En tenant compte de la constante d'Avogadro ( $1 \text{ mole} = 6,022 \cdot 10^{23}$  molécules), il est possible d'exprimer  $N_c$  en nombre de molécules réceptrices par cellule. Le nombre de molécules réceptrices par cellule est élevé de 10 à 40 jours avec un maximum de 80 000 à 30 jours. A 60 jours, ce nombre n'est plus que de 35 000 ; il diminue légèrement jusqu'à 100 jours. Au-delà de 100 jours, le nombre de molécules réceptrices par cellule de Leydig est de 30 000.

### 3.3. DISCUSSION - CONCLUSION

Le contenu testiculaire en récepteurs de la LH varie largement au cours du développement post-natal chez le porc (fig 3.2). Le nombre de récepteurs de LH par cellule augmente jusqu'à 30 jours. C'est le moment où se produit une forte augmentation de la testostérone (MEUSY-DESSOLLE, 1975 ; COLENBRANDER et coll., 1977). Ces phénomènes sont concomitants d'une augmentation de LH (MEUSY-DESSOLLE, communication personnelle). En raison de la courte durée de la période d'observation (10 à 30 jours) et des variations individuelles dans le développement, il est difficile de mettre en évidence clairement une chronologie dans l'apparition des différents événements. Il est logique de penser que durant cette période, la LH a une action trophique sur les cellules de Leydig : elle favorise la différenciation cellulaire, l'ap-

parition des structures stéroïdogènes, l'augmentation des activités enzymatiques liées à la stéroïdogénèse (DIERICHS et coll., 1973 ; VAN STRAATEN et coll., 1978) et la synthèse de ses propres récepteurs.

Au-delà du 30ème jour, on observe une diminution du nombre de récepteurs par cellule, qui est concomitante d'une involution des cellules de Leydig. La LH diminue, en raison, au moins en partie, du rétrocontrôle exercé par la testostérone sur l'hypothalamus et l'hypophyse (ELSAESSER et coll., 1978), et secondairement on observe la diminution de la concentration de testostérone plasmatique. Comme pour la période néonatale, il y a un lien direct entre les taux de LH circulante et le niveau des récepteurs de la cellule.

Après 100 jours, on observe une augmentation du nombre de récepteurs de la LH par cellule de Leydig. La concentration de testostérone circulante augmente faiblement, la taille des cellules augmente à nouveau et, pendant cette période, la multiplication des mitochondries et le développement du réticulum endoplasmique lisse ont été observés (DIERICHS et coll., 1973). Contrairement à la première augmentation de testostérone post-natale (10 à 30 jours), celle observée jusqu'à 150 jours ne peut être due à la concentration de LH circulante qui ne varie pas pendant cette période. A taux de LH bas et constant, l'augmentation de testostérone s'expliquerait par 1) l'augmentation du nombre de récepteurs à LH, ce qui suggère que cette augmentation puisse être modulée par d'autres hormones (DEMOULIN et coll., 1984) 2) la multiplication intense des cellules de Leydig qui accompagne le développement en poids du testicule. Après 150 jours, la concentration de testostérone sérique augmente fortement : ceci est réellement le résultat de l'augmentation combinée de la LH circulante et de la croissance testiculaire qui entraîne une augmentation du nombre total de récepteurs de la LH.



## **Article II**

# Changes in Leydig Cells and Luteinizing Hormone Receptors in Porcine Testis during Postnatal Development\*

JEAN-PHILIPPE PEYRAT,† NICOLE MEUSY-DESSOLLE, AND JEAN GARNIER

Laboratoire de Biochimie Physique, I.N.R.A. Université Paris-Sud, 91405 Orsay, and Laboratoire de Physiologie de la Reproduction, I.N.R.A., 78350 Jouy-en-Josas, France

**ABSTRACT.** LH receptors have been characterized in porcine testis (*Sus crofa* L.) from birth to 220 days of age and have been related to interstitial tissue development (especially Leydig cells). The mean association constant ( $K_a$ ) of ovine [ $^3\text{H}$ ]LH, was  $7 \pm 6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , with no apparent age-dependent variation but with some significant individual variations. The concentration of specific LH receptor sites reached a maximum of  $9 \times 10^{-12} \text{ M/g}$  testis between days 20–70, decreased to  $3 \times 10^{-12} \text{ M/g}$  testis at the onset of puberty (up to 110 days), and remained stable at the same level in the adult. The total number of sites per testis essentially reflected the growth of the testis. Interstitial tissue occupied up to 80% of the volume of the whole testis during the first 30 neonatal days. It decreased to about 25% after 120 days. The Leydig cells in this tissue occupied the same proportion

(70% of the volume of the whole testis) regardless of the age of the animals.

The mean Leydig cell diameter reached a maximum of  $20 \mu\text{m}$  at 30 days of neonatal life, decreased to a minimum of  $10 \mu\text{m}$  at 90 days, and then increased to a stable value of  $15 \mu\text{m}$  after puberty. The number of Leydig cells per unit volume varied with age, with a maximum of  $3 \times 10^6$  cells/ml testis at 90 days, reaching a constant value of  $6 \times 10^7$  cells/ml testis after puberty.

These data suggest that each Leydig cell contains 80,000 specific LH-binding sites/cell 30 days after birth and 35,000 in the adult, with no observed periods without receptor sites.

The number of receptors per cell is correlated to cell size rather than stage of sexual maturation. (*Endocrinology* 108: 625, 1981)

**T**HE BINDING of a polypeptide hormone to a specific receptor of a target cell has been regarded as the primary event initiating the biological response to that hormone. It is also well established that one of the biological functions of LH in the testis is to stimulate synthesis and release of testosterone by the Leydig cells of the interstitial tissue by specifically binding to these cells and increasing cAMP production (1–8). Therefore, it seems of primary importance to follow the fate of the hormone-specific receptors in relation to the development of the target cells during sexual maturation. Various attempts to do this have been made in species other than pigs, namely rats, humans, and primates (9–16), but with only limited data for receptor number, hormone binding affinities, or for Leydig cell number per unit weight or per testis. Due to these limitations, the number and variation of receptor sites per Leydig cell have not been

determined *in vivo*.

It would seem of considerable importance to compare the number of receptor sites and LH levels in serum. This is because a hormone dose-related control of LH receptors was found in the rat (17–19A), with complete clearance of receptor sites from the cellular surface resulting in total desensitization of the Leydig cells to hormone stimulation. This phenomenon is often called down-regulation. Moreover, the effect of age or sexual maturation on hormone-binding affinity was also considered worthy of study.

Porcine testes were chosen because of their high number of LH receptor sites per unit weight (20) and because porcine testes are also known to have a high proportion of interstitial tissue (21).

## Materials and Methods

### Testes

Testes were obtained by castration or just after slaughter by electrocution of boars (Large White breed; *Sus crofa* L.), ranging in age from immediately after birth to 220 days of age. After removal of the epididyma, the testis was weighed, the total volume was measured with a pycnometer, and part of the testis was then cut into small pieces (width, 2–3 mm) for histological

Received December 17, 1979.

Address requests for reprints to: Dr. Jean Garnier, Laboratoire de Biochimie Physique, I.N.R.A., Bât. 433, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, 91405 Orsay, France.

\* This work was supported in part by the Biology of Reproduction Committee (DGRST Grant 75-7-0091-01) and the Fondation de la Recherche Médicale Française.

† Present address: Pasteur Institute, Centre de Biologie Clinique 20, boulevard Louis XIV, 59 Lille, France.



studies. When possible, the rest of the testis was divided into 15-g pieces and stored in liquid nitrogen until binding studies were performed.

### Hormones

Ovine LH (oLH; batch P89b), obtained through the courtesy of Dr. M. Jutisz (Laboratoire des Hormones Polypeptidiques, C.N.R.S. Gif-sur-Yvette, France), had a biological activity of 1.4–2.8 NIH SII, as assayed by the Parlow test.

[<sup>3</sup>H]oLH, obtained through the courtesy of Dr. de la Llosa (22), contained a specific radioactivity of 19 Ci/mmol, as measured by the self-displacement method (8). The specific radioactivity was similar to that measured with another tracer, porcine [<sup>125</sup>I]LH, which was generously provided by Dr. Y. Combarnous. Concentrations of radiolabeled hormone were computed after correction for maximum binding ability with increasing concentrations of a receptor preparation. The maximum binding capacity for the tritiated hormone preparation was 40%.

### Assay of oLH binding

As previously described (23), the testis pieces were homogenized to a final concentration of 50 mg fresh testis/ml solvent (0.1 M sucrose, 0.005 M MgCl<sub>2</sub>, and 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.4). Pieces were taken from the testis at the level of the epididymal body. In each assay tube (glass), 0.9 ml testis homogenate was added to 0.1 ml 0.1 M sucrose, 0.005 M MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml bovine serum albumin, and 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10  $\mu$ l of 10 different concentrations of [<sup>3</sup>H]oLH, 1–60 ng for total binding and 10  $\mu$ l (10,000 ng) of unlabeled oLH for nonspecific binding. After equilibration at 37 C for 2 h, bound [<sup>3</sup>H]oLH was recovered by centrifugation (5,000  $\times$  g for 15 min at 4 C). The pellets were resuspended with 1 ml of the above buffer with bovine serum albumin and centrifuged under the same conditions as described above, the supernatant was removed, and the pellets were dissolved in 0.2 ml solubilizer (soluene 350, Packard, Downers Grove, IL) for 12 h at room temperature. After dissolution, the tubes were washed with 12 ml (three times with 4 ml) of the scintillator solution into plastic counting vials. A solution of 2,5-diphenyloxazole (4 g/liter) and dimethyl 1,4-bis-[2-(5-phenyloxazolyl)]benzene (0.1 g/liter) in toluene (scintillation grade) was used as scintillant. Counting was performed by a liquid scintillation counter (Intertechnique CG 2,000).

Using external standardization, the results were converted into disintegrations per min and the actual quantities of bound and free labeled hormone. For each amount of labeled hormone, the nonspecific binding was subtracted from the total binding. The nonspecific binding increased with increasing concentrations of radiolabeled hormone; it was less than 10% in the earlier parts of the saturation curves and reached 30% or less of the total binding at the saturation plateau.

Binding specificity was also checked with pH 2-treated oLH or oLH subunits. These did not compete with [<sup>3</sup>H]oLH for specific binding within the expected amount of native oLH contamination (<1%) (20).

### Analysis of binding data

The binding data for each gonadal homogenate were corrected for specific activity, maximum binding activity, and

nonspecific binding. The concentration of hormone-binding sites per g fresh testis (*r*) and the equilibrium association constant (*K<sub>a</sub>*) of the gonadotropin receptors were determined by computer analysis on a 9830 Hewlett-Packard calculator (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA) with a program of curve fitting (least squares method) directly from the saturation curves.

### Histological preparations

Testis pieces were fixed by immersion in Bouin-Holland acetic solution, dehydrated in alcohol, and then embedded in paraplast. Tissue retraction performed in separate experiments was estimated to be 9%. Sections for light microscopy were cut at 5  $\mu$ m and stained with Regaud's ferric hematoxylin (at 57 C) and eosin. Only polyhedral cells with pink-stained cytoplasm and round eccentric nuclei limited at their periphery by heavily stained heterochromatin were counted as Leydig cells. All fibroblastic type cells were excluded.

Relative volumes occupied either by the interstitial tissue in the whole testis or by the Leydig cells in interstitial tissue were determined with a light microscope by the point-counting method (24, 25) on 5- $\mu$ m thick sections and with 25- or 100-point Henning's reticles from Zeiss (no. 474130-1 and 474130-2, respectively; Carl Reiss, New York, NY). This method assumes that the ratio of points covering the observed component (Leydig cells or interstitial tissue) to the total points of the reticle is equal to the ratio of the volume occupied by the component (Leydig cell or interstitial tissue) to the volume of the interstitial tissue or testis in the section covered by the reticle, respectively. This measurement was done on 30 microscopic fields.

Leydig cell numbers were estimated from Abercrombie's formula (26, 27), in which a correction is made for the size of the cells or the average diameter (*D*). We used the simplified formula:  $N_v = N_A / (T + D)$ , where *N<sub>v</sub>* stands for the number of Leydig cells per unit volume, *N<sub>A</sub>* stands for the number of Leydig cells per unit surface, and *T* stands for the section thickness (5  $\mu$ m). The average diameters were computed assuming spherical cells and from the measurements of *N<sub>A</sub>* and the relative volume occupied by the Leydig cells obtained with the point-counting method.

### Data analysis

Whenever possible, individual testis measurements are shown in the figures, and age-dependent variations are represented by the best polynomial curve up to the third degree.

This representation mode has the advantage over histograms of displaying individual measurements but does not, of course, present analytical modeling of the physiological process. Variability of individual measurements or 95% confidence intervals were taken as twice the *SD* of all experimental points from the best fitted curve, with the same statistical weight for each individual measurement.

## Results

### Binding of LH to porcine testis

Up to 80% of all of the saturation curves could be fitted to the binding equation for a single class of gonadotropin receptors (Fig. 1). Twenty percent of the saturation



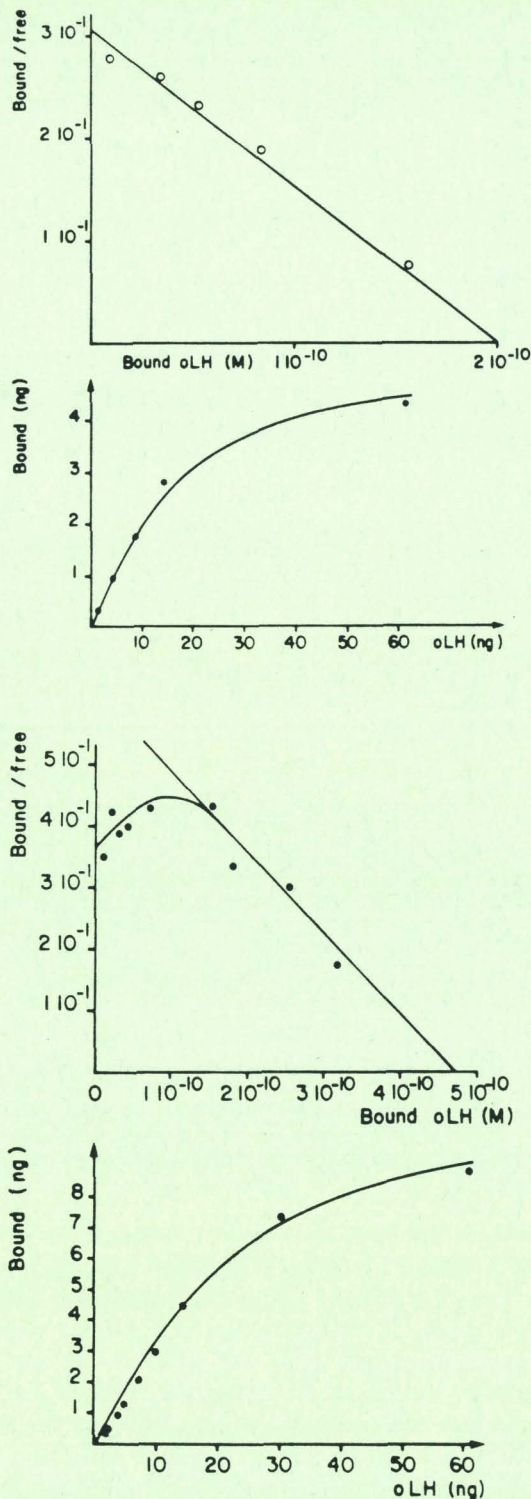


FIG. 1. Saturation curves and corresponding Scatchard plots of LH binding to testis homogenates from pigs. *Top panel*, A one-site type of binding with no cooperativity for a 70-day-old boar. The equilibrium association constant of LH to its specific receptors was  $1.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  (SD of  $0.42 \times 10^9$ ), with a binding capacity of  $10^{-11} \text{ M/g testis}$  (SD of  $0.13 \times 10^{-11}$ ). The same means were obtained from the saturation curve fitting and the Scatchard analysis. *Bottom panel*, A one-site type of binding with an apparent positive cooperativity (360-day-old boar).

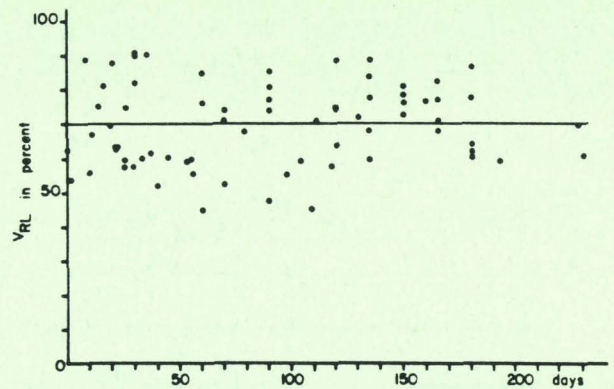


FIG. 2. Variation of the  $K_a$  in porcine testis with age. The 95% confidence limits were  $\pm 6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  from the best curve fitting (—).

curves exhibited some evidence of an apparent positive cooperativity for a free hormone concentration below 5 ng/ml (Fig. 1). There was no relationship with the age of the animal. At this level of  $[^3\text{H}]\text{oLH}$ , nonspecific binding was less than 8% of the total binding. The average Hill coefficient was 1.3, with a SD of 0.12, from 10 Scatchard plots exhibiting the cooperativity.

The  $K_a$  was  $7 \pm 6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  (95% confidence limits), with no apparent age-dependent variation (Fig. 2). Association constant variability was relatively high. Two thirds of the variability derived from experimental errors estimated from binding constant determination; one third derived from other factors, including variations between individuals. This was found for all of the ages studied. We observed no correlation between low  $K_a$  values and the number of LH receptors, (correlation coefficient,  $-0.13$ ), *i.e.* individual with relatively low association constants for LH did not tend to show either a high or a low capacity for hormone binding.

#### Number of LH receptors; effect of age

When expressed per g testis, all testes examined had specific LH receptor sites ( $r$ ). We observed a maximum of  $9 \times 10^{-12} \text{ M/g}$  between 20–70 days after birth, reaching a stable concentration of  $3 \times 10^{-12} \text{ M/g}$  after 110 days (Fig. 3). Variability was less than that for the apparent association constants. One fourth of the variability derived from the determination of  $r$  itself, and the rest derived from age-dependent variation. The variability was particularly high between 110–135 days, corresponding to different stages of testicular maturation. However, the total number of sites per testis continuously increased, reflecting testicular growth (Fig. 4). The initial slow increase in testis weight from birth until 70–110 days was followed through puberty by a phase of rapid

The association constant calculated from the saturation curve was  $1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  (SD of  $0.18 \times 10^9$ ) with a binding capacity of  $0.5 \times 10^{-11} \text{ M/g testis}$  (SD of  $0.036 \times 10^{-11}$ ).



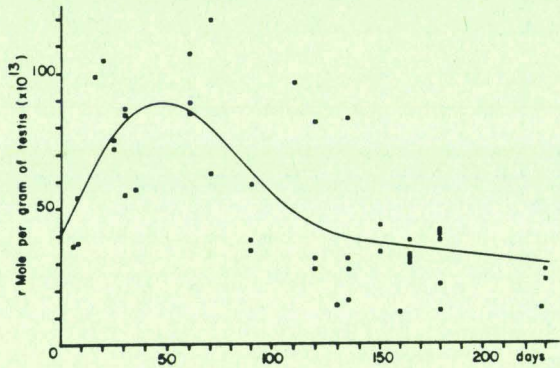


FIG. 3. Variation of the number of LH receptors (r) per unit weight of porcine testis with age. The 95% confidence limits were  $\pm 20 \times 10^{-13}$  mol/g testis from the best curve fitting (—).

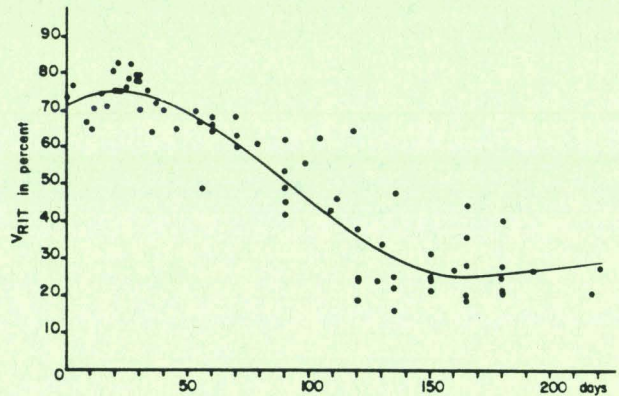


FIG. 5. Percentage of porcine testis interstitial tissue volume ( $V_{RIT}$ ) with age. The 95% confidence limits were  $\pm 16\%$  from the best curve fitting (—).

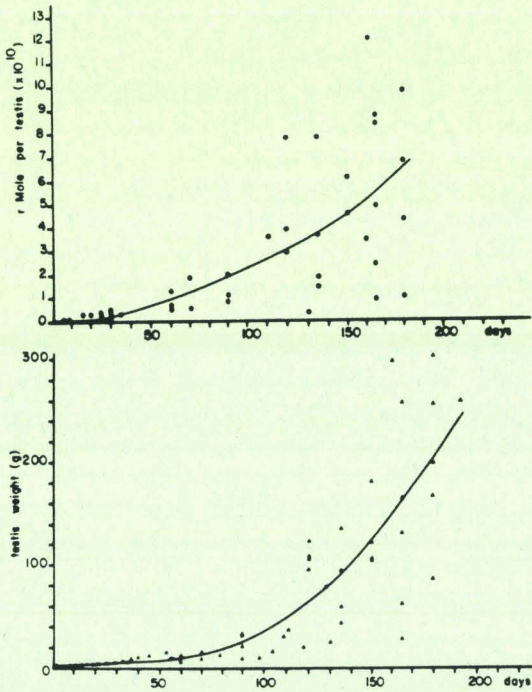


FIG. 4. Total number of LH receptors (r) per testis (top panel) and testis weight (bottom panel) expressed as a function of age during sexual maturation in swine. The 95% confidence limits were  $\pm 2.1 \times 10^{-10}$  mol receptor/testis.

growth until 200 days. Thereafter, testis weight reached adult levels.

*Interstitial tissue and Leydig cell development during sexual maturation*

Interstitial tissue occupied up to 80% of the volume of the whole testis during the first 30 neonatal days. It decreased to about 25% after the 120th day (Fig. 5). The Leydig cells in this tissue occupied the same proportion (70%) regardless of the age of the animal (data not shown). Thus, the variation in Leydig cell relative volume

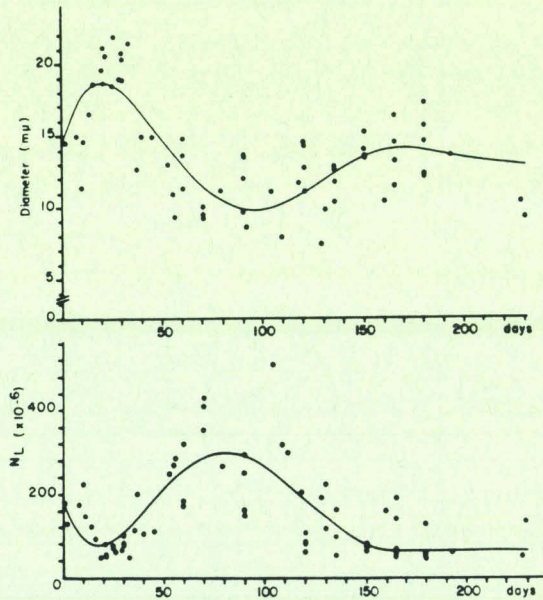


FIG. 6. Developmental changes of Leydig cell population in size (top panel) and number ( $N_L$ ) per ml testis (bottom panel) in the boar. The 95% confidence limits were  $\pm 3 \mu m$  for diameter and  $\pm 14 \times 10^7$  cells/ml for Leydig cells.

in relation to the whole testis depended on interstitial tissue variation; it decreased from 50% at 30 days to approximately 15% of the whole testis after puberty at 120–180 days. Nevertheless, the total Leydig cell volume per testis increased with age because the increase in testis size counterbalanced the variation in Leydig cell volume (per unit weight of volume). The same effect was also found for the total number of LH receptors (Fig. 4). A similar break in growth was observed around the 110th day. Mean Leydig cell diameter reached a maximum of 20  $\mu m$  at 30 days, decreased to a minimum of 10  $\mu m$  at 90 days, then increased again to a stable value of 15  $\mu m$  after 110 days (Fig. 6).

The number of Leydig cells per unit volume in relation to age varied in opposition to cell diameter, reaching a



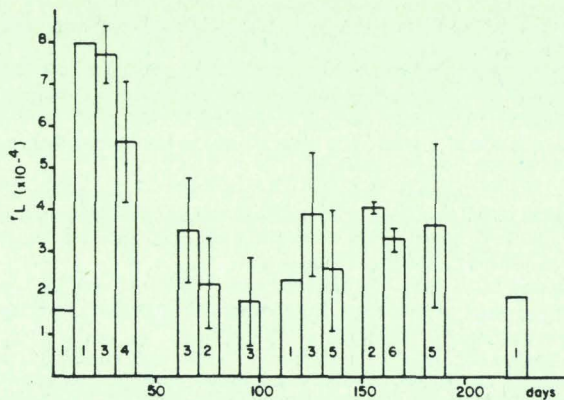


FIG. 7. Histograms of LH receptors numbers ( $r_L$ ) per Leydig cell in porcine testis with age. Bars show the 95% confidence limits, and numbers refer to the number of animals selected for each age class.

minimum at 20 days and a maximum at about 90 days. It then decreased to a constant value of about  $6 \times 10^7$  cells/ml testis (Fig. 6), or  $2.5 \times 10^8$  cells/ml interstitial tissue.

However, the total number of Leydig cells per testis did not follow this pattern, since testis growth damped the variation, and a continuous age-dependent increase in the total number of Leydig cells was observed. This was also the case for the total number of LH receptors, which was  $10^9$  cells/testis until 30–40 days, then rose steadily during sexual maturation to reach a value of  $2\text{--}4 \times 10^{10}$  cells/testis in the adult.

From these data, the mean number of LH receptors per Leydig cell was evaluated, assuming that it was the only cell type presenting these specific sites (28). This mean number is shown in Fig. 7 for the different age classes. The sites, although determined in testis homogenates, were mostly located on the plasma membranes of the cell surface. This was checked by using a suspension of mechanically disrupted cells containing mainly intact cells. No difference in specific LH binding was found in such a suspension or after Potter homogenization.

The number of LH receptors per cell reached a maximum of 80,000 receptors/cell at 30 days, then decreased to a constant number of about 35,000 receptors/cell in the adult.

### Discussion

The value obtained for the apparent association constant of LH to its receptor sites in porcine testis is very similar to the values already reported for other species (2, 3, 13–16). This value is constant from birth until adult life, as also reported for other species (16, 29). It suggests a constant synthesis of the same molecular receptor type all through the life of the individual, with no apparent age modulation of its hormonal affinity. The variability between individuals might suggest individual variations

in receptor site affinity with no obvious physiological consequences.

The number of LH receptors per cell is much higher than that found in Leydig cells from other species, i.e. 6000 receptors/cell in isolated rat Leydig cells (7) or 1000–2000 in a Leydig tumor cell line (30). This high number of receptors is also found in isolated Leydig cells from porcine testis (Peyrat, J.-P., N. Meusy-Dessolle, and J. Garnier, unpublished results) and might indicate a species difference. When we speak of the number of sites, we are referring to free receptors, not those receptor sites occupied by endogenous hormone. All attempts (high salt concentrations or pH) to release *in vitro* bound labeled hormone from the receptor membrane preparation failed to restore significantly more than the initial number of receptors. This might suggest that the number of occupied receptors in porcine testis is small compared to the total number of free LH receptor sites. This number per unit volume of testis was fairly high ( $30\text{--}90 \times 10^{-10}$  M; i.e. 30- to 90-fold greater than the dissociation constant for the hormone).

The variation of LH receptor concentration with age is at variance with the continuous increase observed in rat testis, but a similar age dependency was also found for FSH receptor concentration in the latter species (16). The day 30 high receptor concentration is partly due to the high number of receptor sites per cell. This high number of sites can be related to cell size and, consequently, to cell surface (which is 1.8 times greater than that in adults when there are 2.2 times more sites per cell than in adults).

At 30 days, when Leydig cell size is maximal, an increase in LH secretion *in vivo* has been observed [4 ng/ml (31) and 20 ng/ml (Meusy-Dessolle, N., unpublished)] with a concomitant rise in testosterone secretion [4 ng/ml (32)]. In parallel, the ultrastructure of the Leydig cells during this period is well developed (33), with large-sized nuclei (34, 35) having high enzymatic activities of  $\Delta^5$ ,  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (36),  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, and  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (34). This confirms that during the first 3 neonatal weeks, the Leydig cells of the porcine testis are fully differentiated.

The smaller size of the Leydig cells at 90 days can also be correlated with a regression of the steroidogenic structure (33), a lower level of LH concentration in plasma ( $<1$  ng/ml), and a lower level of circulating testosterone (1 ng/ml) (32). The increase in the number of Leydig cells per unit volume in this period (4 times greater than that at 30 days) could be related to the cell population increase and active divisions around seminiferous tubules observed by Van Straaten and Wensing (34). The total number of Leydig cells per testis increased by about 20-fold from day 30 until day 180. A very similar increase



during sexual maturation was also found in rats (37).

At the onset of puberty, *i.e.* 110 days, the structural features of the testis resemble those of the adult with respect to relative volume of interstitial tissue, Leydig cell size, and number of LH-specific receptor sites per cell. Thus, the total number of cells follows the growth of the testis, and this could also account for the continuous increase in the testosterone level rather than a difference in the state of secretion of the cells.

From these data, it can be concluded that during testis development until adulthood and in the time basis of our sampling, the Leydig cells are permanently equipped with a large number of specific receptors for LH having the same apparent affinity for the hormone. However, we observed a remarkable decrease in the number of receptor sites per cell from birth to adulthood. The physiological significance of this decrease is not yet known. It could signify a decrease in cell sensitivity to the hormone, if spare receptors were present in pig Leydig cells, as Mendelson *et al.* (7) found for rat Leydig cells. This interesting possibility is currently under investigation.

### Acknowledgment

We are grateful to Dr. Aline Solari for her suggestions for the statistical treatment of histological studies and her constant interest in this work.

### References

- De Kretser DM, Catt KJ, Paulsen CA 1971 Studies on the *in vitro* testicular binding of iodinated luteinizing hormone in rats. *Endocrinology* 88:332
- Catt KJ, Tsuruhara T, Dufau ML 1972 Gonadotropin binding sites of the rat testis. *Biochim Biophys Acta* 279:194
- Leidenberger F, Reichert Jr LE 1972 Studies on the uptake of human chorionic gonadotropin and its subunits by rat testicular homogenates and interstitial tissue. *Endocrinology* 92:135
- Dufau ML, Catt KJ, Tsuruhara T 1971 Gonadotropin stimulation of testosterone production by the rat testis *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 252:574
- Dufau ML, Watanabe K, Catt KJ 1973 Stimulation of cyclic AMP production by the rat testis during incubation with hCG *in vitro*. *Endocrinology* 92:6
- Rommerts FFL, Cooke BA, Van Der Kemp JWCM, Van Der Molen HJ 1972 Stimulation of 3'-5'-cyclic AMP and testosterone production in rat testis *in vitro*. *FEBS Lett* 24:251
- Mendelson C, Dufau ML, Catt KJ 1975 Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cell. *J Biol Chem* 250:8818
- Catt KJ, Ketelslegers JM, Dufau ML 1976 Receptors for gonadotropic hormones. In: Blecher M (ed) *Methods in Molecular Biology*, part 1. Marcel Dekker, New York, vol 9:175
- Sharpe RM, Hartog M, Ellwood MG, Brown PS 1972 Age-dependent differences in the binding of [<sup>125</sup>I]LH by rat testis homogenates. *J Reprod Fertil* 35:529
- Frowein J, Engel W, Weise HC 1973 hCG-receptor present in the gonadotropin insensitive Leydig cell of the immature rat. *Nature [New Biol]* 246:148
- Pahnke VG, Leidenberger FA, Künzig HJ 1975 Correlation between hCG (LH)-binding capacity, Leydig cell number and secretory activity of rat testis throughout pubescence. *Acta Endocrinol (Copenh)* 79:610
- Thanki KH, Steinberger A 1976 <sup>125</sup>I-LH binding to rat testis at various ages and posthypophysectomy. *Endocr Res Commun* 3:49
- Huhtaniemi IT, Korenbrot CC, Jaffe RB 1977 hCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis *J Clin Endocrinol Metab* 44:963
- Hsu AF, Stratico D, Hosaka M, Troen P 1978 Studies of the human testis. X. Properties of human chorionic gonadotropin receptor in adult testis and relation to intratesticular testosterone concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 47:529
- Davies TF, Walsh PC, Characterization of the human LH receptor and its species specificity, 60th Annual Meeting of the Endocrine Society, Miami FL, 1978 (Abstract 578)
- Ketelslegers JM, Hetzel WD, Sherins RJ, Catt KJ 1978 Developmental changes in testicular gonadotropin receptors: plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat. *Endocrinology* 103:212
- Hsueh AJW, Dufau ML, Catt KJ 1976 Regulation of luteinizing hormone receptors in testicular interstitial cells by gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun* 72:1145
- Sharpe RM 1976 hCG-induced decrease in availability of rat testis receptors. *Nature* 264:644
- Tsuruhara T, Dufau ML, Cigorruga S, Catt KJ 1977 Hormonal regulation of testicular luteinizing hormone receptors. Effects on cyclic AMP and testosterone responses in isolated Leydig cells. *J Biol. Chem* 252:9002
- Haour F, Saez JM 1977 hCG-dependent regulation of gonadotropin receptor sites: negative control in testicular Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 7:17
- Garnier J, Pernollet J-C, Salesse R, Specific interaction of <sup>3</sup>H-LH with porcine testicular homogenates. Development of a radio-ligand receptor assay of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. 10th International Congress FEBS, Paris, France 1975 (Abstract 1336)
- Bascom KF, Osterud ML 1927 Quantitative studies of the testis. III. A numerical treatment of the development of the pig testis. *Anat Rec* 37:63
- De La Llosa P, Marche P, Morgat JL, De La Llosa-Hermier MP 1974 A new procedure for labeling luteinizing hormone with tritium. *FEBS Lett* 45:162
- Pernollet J-C., Garnier J, Pierce JG, Salesse R 1976 *In vitro* activation of glycoprotein hormones. Hybridization of subunits from thyrotropin, lutropin and human choriogonadotropin. *Biochim Biophys Acta* 446:262
- Glagolev AA 1934 Quantitative analysis with the microscope by the point method. *Engineering and Mining Journal* 135:399
- Solari A 1973 Etude quantitative d'organes ou de tissus. I. Méthodes d'estimation des volumes. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 13:247
- Abercrombie M 1946 Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 94:239
- Solari A 1977 Etude quantitative d'organes ou de tissus. III. Méthodes d'estimation du nombre de particules. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 17:309
- De Kretser DM, Catt KJ, Burger HG, Smith GC 1969 Radioautographic studies on the localization of <sup>125</sup>I-labelled human luteinizing and growth hormones in immature male rats. *J Endocrinol* 43:105
- Catt KJ, Dufau ML, Neaves WB, Walsh PC, Wilson JD 1975 LH-hCG receptors and testosterone content during differentiation of the testis in the rabbit embryo. *Endocrinology* 97:1157
- Ascoli M, Puett D 1978 Gonadotropin binding and stimulation of steroidogenesis in Leydig tumor cells. (Choriogonadotropin/hormone action/testicular tumor). *Proc Natl Acad Sci USA* 75:99
- Colenbrander B, Krup TAM, Dieleman SJ, Wensing CJG 1977 Changes in serum LH concentrations during normal and abnormal sexual development in the pig. *Biol Reprod* 17:506
- Meusy-Dessolle N 1975 Variations quantitatives de la testosterone plasmique chez le porc mâle, de la naissance à l'âge adulte. *C R Acad Sci [D] (Paris)* 281:1875
- Dierichs R, Wrobel KH, Schilling E 1973 Licht-und-elektronenmikroskopisch Untersuchungen an den Leydigzellen des Schweines während der postnatalen Entwicklung. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 143:207



34. Van Straaten HWM, Wensing CJG 1978 Leydig cell development in the testis of the pig. *Biol Reprod* 18:86
35. Van Straaten HWM, Wensing CJG 1977 Histomorphometric aspects of testicular morphogenesis in the pig. *Biol Reprod* 17:467
36. Wrobel KH, Schilling E, Dierichs R 1973 Enzymhistochemische Untersuchungen an den Leydigzellen des Schweines während der postnatalen Ontogenese. *Histochemie* 36:321
37. Knorr DW, Vanha-Perttulat T, Lipsett MB 1970 Structure and function of rat testis through pubescence. *Endocrinology* 86:1298



**IV- LES RECEPTEURS  
AUX HORMONES LACTOGENES  
DANS LES CANCERS DU SEIN**

-----

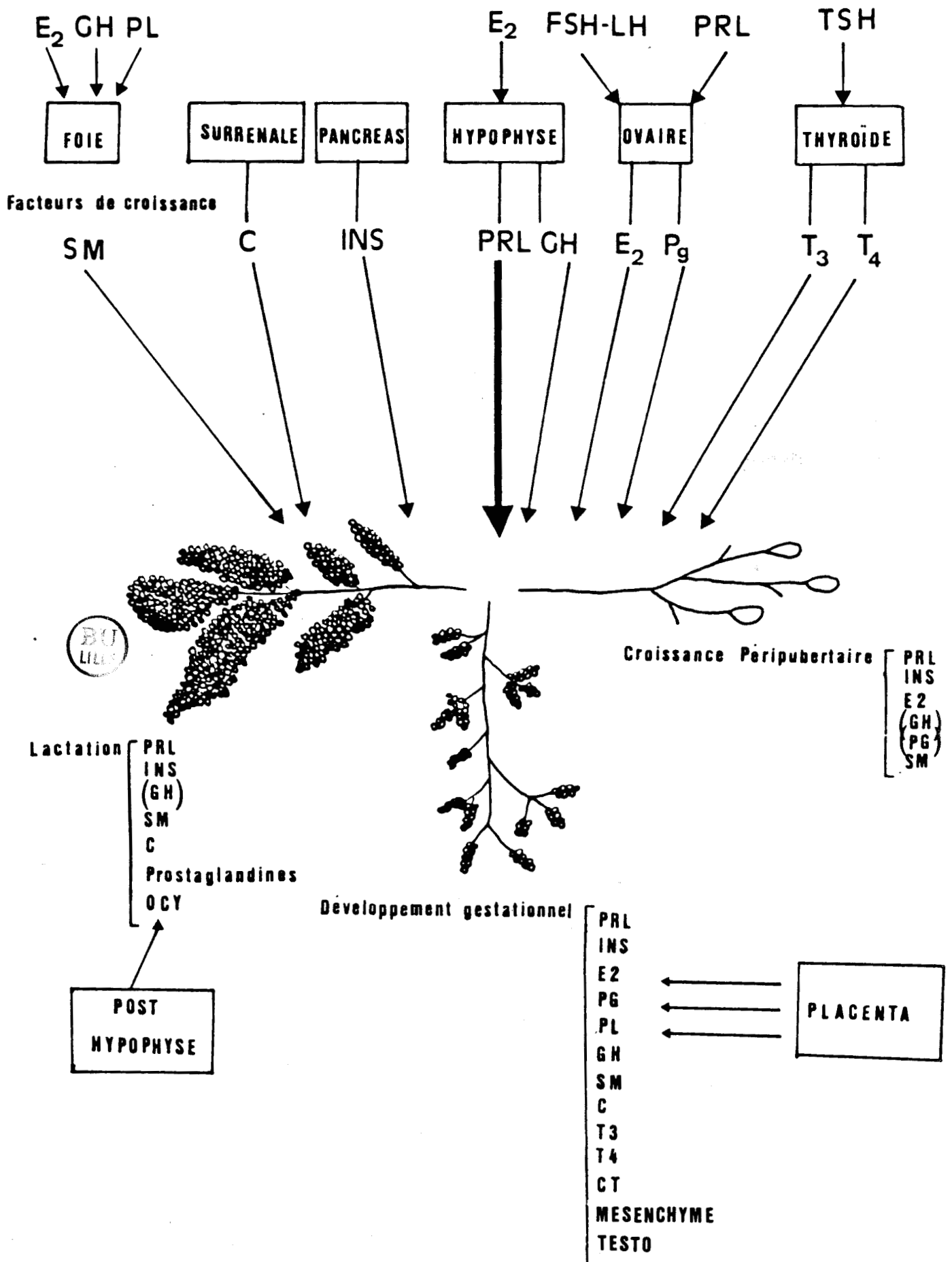


FIGURE 4.1 - SCHEMA GENERAL DU CONTROLE HORMONAL DE LA GLANDE MAMMAIRE NORMALE

#### 4.1. INTRODUCTION

##### 4.1.1. CONTROLE HORMONAL DE LA GLANDE MAMMAIRE NORMALE

La glande mammaire comprend deux structures épithéliales distinctes : une formation tubulaire et une formation alvéolaire ainsi que des tissus annexes. La structure canalaire (ou tubulaire) se forme dès la vie foetale, se développe au cours de la première partie de la vie et se complète définitivement au cours de la première gestation. La structure alvéolaire se forme à partir de la structure canaliculaire presque exclusivement au cours de la gestation. Les cellules épithéliales alvéolaires assurent la synthèse et la sécrétion de lait pendant la lactation, puis elles involuent au moment du sevrage.

La formation des structures épithéliales et la mise en place de la synthèse de lait sont sous la dépendance d'équilibres endocriniens précis, les hormones agissant de manière séquentielle, en association ou en synergie. La définition de ces complexes hormonaux a fait l'objet de nombreuses revues (DENAMUR, 1971 ; TOPPER et FREEMAN, 1980). Les techniques d'études sont de trois types : 1) suivi des variations de concentrations hormonales plasmatiques contemporaines de modifications mammaires, 2) manipulations hormonales in vivo et 3) in vitro. Pour des raisons évidentes, il n'existe que peu de renseignements dans l'espèce humaine (ROTTEN et GAUTRAY, 1978). La régulation telle qu'on peut la concevoir actuellement est représentée sur la figure 4.1. La PRL est l'hormone essentielle, obligatoire, qui contrôle à la fois la multiplication et la différenciation des cellules épithéliales mammaires ; selon les espèces, elle est capable d'agir seule ou en synergie avec les corticoïdes (C), l'hormone de croissance (GH), la thyroxine (T4), la tri-iodothyronine (T3). Une hormone placentaire, en particulier dans l'espèce humaine (hPL) semble jouer le même rôle que la PRL. Le rôle directement mitogène des stéroïdes est à l'heure actuelle encore discuté. Au niveau moléculaire, le mécanisme d'action des hormones stéroïdes sur les cellules mammaires est presque complètement inconnu. L'oestradiol (E2) semble surtout impliqué dans l'acquisition des capacités de réponse de la cellule à la prolactine. La progestérone (Pg) joue un rôle inhibiteur de l'activité sécrétoire mais laisse se dérouler (ou même favorise) la croissance de la glande mammaire. L'ocytocine (OCY) est responsable de l'éjection du lait. L'insuline

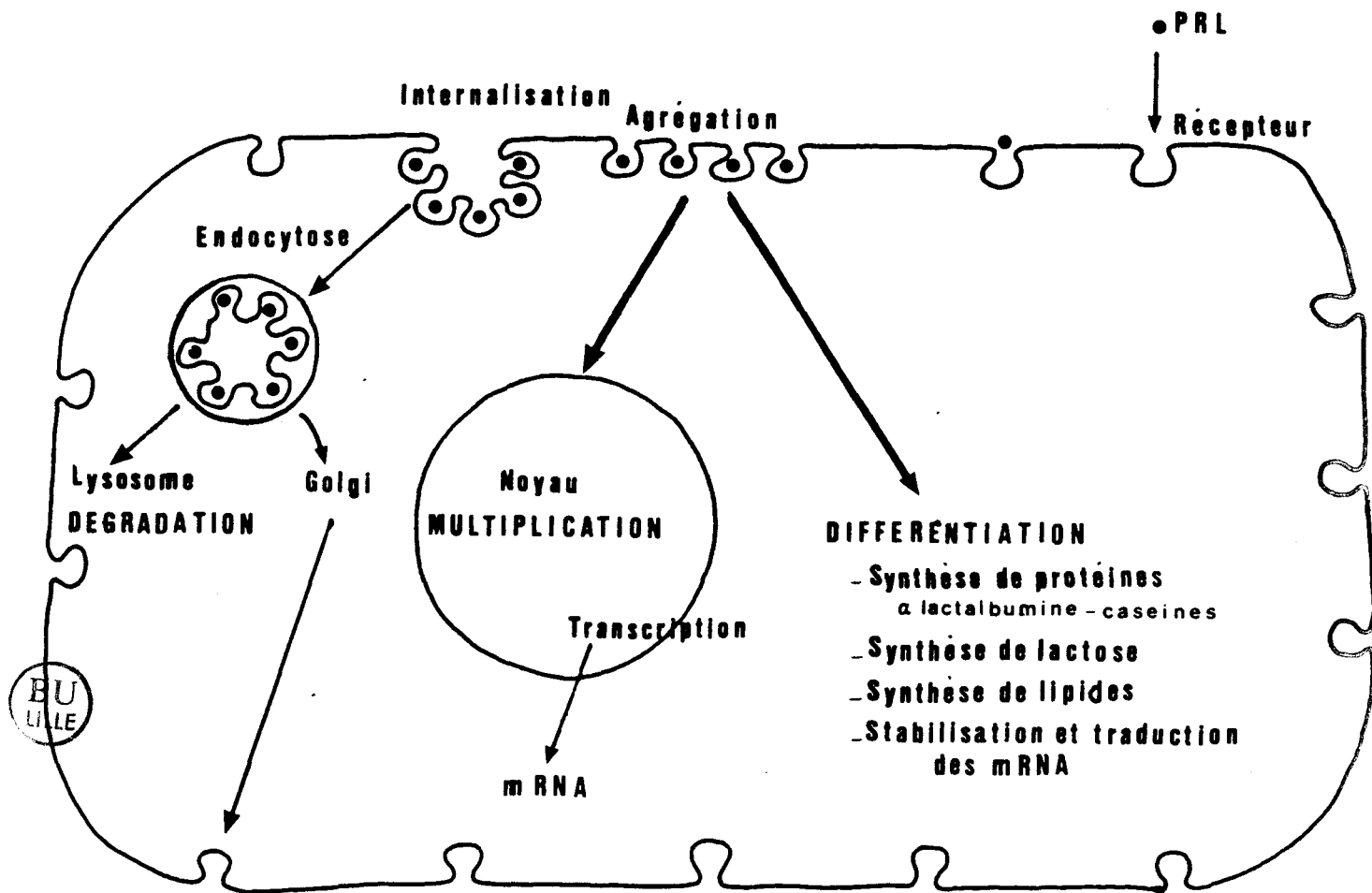


FIGURE 4.2 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES ASSURANT LA RECONNAISSANCE ET LE TRANSFERT DE LA STIMULATION DE LA PRL DANS LA CELLULE MAMMAIRE (d'après J. DJIANE, Doctorat d'Etat, 1982)

La PRL s'associe à un récepteur spécifique situé au niveau de la membrane plasmique des cellules épithéliales mammaires. Les récepteurs s'agrègent entre eux et sont progressivement enfermés dans une vésicule d'endocytose qui va (peut-être après une étape golgienne où une partie des récepteurs se trouvent recyclés) fusionner avec les lysosomes où les complexes hormones-récepteur seront dégradés.

(INS) et les facteurs de croissance (somatomédines SM et epidermal Growth Factors) sont aussi impliqués dans la multiplication cellulaire. La formation de l'ébauche mammaire au cours de la vie foetale résulte d'une action inductrice du mésenchyme sous-jacent. La nature du stimulus produit par le mésenchyme est inconnue mais pourrait être un facteur de croissance. Un facteur de croissance de type SM : la "synlactine", pourrait être, au moins partiellement, le médiateur de l'action mitogène de la PRL. (ANDERSON et coll., 1983).

La PRL exerce son action cellulaire par l'intermédiaire de récepteurs (fig 4.2). La PRL est reconnue au niveau de la cellule épithéliale mammaire par les récepteurs de la membrane plasmique (BERGERON et coll., 1978). Les caractéristiques des récepteurs ont été analysées en détail par SHIU et FRIESEN (1974). La PRL est capable de modifier le niveau de ses propres récepteurs selon une double régulation. Elle stimule la synthèse de ses propres récepteurs (DJIANE et coll., 1977). Mais en plus, elle est capable, dans certaines conditions, de provoquer leur diminution importante mais transitoire (DJIANE et coll., 1979). Ce phénomène de régulation négative correspond à une accélération de l'internalisation des complexes PRL-récepteur, suivie de leur dégradation dans les lysosomes. Il a en effet été démontré que la régulation négative touche les récepteurs périphériques (membrane plasmique) (DJIANE et coll., 1981) et qu'elle est inhibée par les agents bloquant le fonctionnement lysosomal (DJIANE et coll., 1980). La dégradation des récepteurs dans les lysosomes ne constitue pas une étape déterminante dans l'effet biologique de la PRL, puisque les agents qui bloquent le fonctionnement des lysosomes, ne modifient pas la réponse cellulaire (HOUDEBINE et coll., 1979, 1980). Des travaux récents conduisent à penser que le signal hormonal pourrait être transmis par une macromolécule distincte du site de liaison. Les drogues qui agissent sur les microtubules et les microfilaments laissent se dérouler la régulation négative des récepteurs mais interrompent le message prolactinique : une structure de type tubuline est donc impliquée dans le transfert du message hormonal (HOUDEBINE, 1982). Par ailleurs, des anticorps antirécepteurs sont doués de propriétés biologiques analogues à la PRL (DJIANE et coll., 1981b). Ainsi une molécule dont la seule propriété est de se lier au récepteur, est capable de provoquer le transfert de la stimulation hormonale (KELLY, 1984).

#### 4.1.2. CONTROLE HORMONAL DES TUMEURS MAMMAIRES

##### 4.1.2.1. CANCERS MAMMAIRES EXPERIMENTAUX

Les tissus mammaires exposés à des cancérogènes chimiques comme le 7,12-diméthylbenzanthracène (DMBA) ou le méthyl-nitroso-urée (MNU) subissent une transformation maligne (HUGGINS et coll., 1959). Les tumeurs induites peuvent être classées en deux catégories selon qu'elles conservent ou non les mécanismes de contrôle hormonal normalement présents dans la glande mammaire (HOLLANDER et DIAMOND, 1978). Si les contrôles sont conservés, c'est-à-dire si la croissance tumorale et, dans certains cas, des fonctions cellulaires spécifiques peuvent être modulées par les hormones, les tumeurs sont considérées comme hormonodépendantes. Si les contrôles sont perdus, les tumeurs sont autonomes, c'est-à-dire que leur croissance n'est pas influencée par les hormones.

Le rôle de la PRL dans les cancers mammaires expérimentaux murins a fait l'objet de revues générales très documentées (MEITES et coll., 1972 ; KIM et FURTH, 1976 ; WELSCH, 1976 ; Mc GUIRE, 1977 ; WELSCH et NAGASAWA, 1977 ; MEITES, 1979 ; MEITES, 1980). La prolactine agit au moment de l'induction tumorale chez le rat et la souris, puis sur la croissance tumorale chez le rat seulement. Chez la souris, toute augmentation de la sécrétion de PRL s'accompagne d'une fréquence accrue de l'apparition des tumeurs mammaires (MORI et coll., 1980). Les facteurs endocriniens nécessaires à la tumorigénèse cessent d'être opérationnels quand le cancer se développe. Ni les stéroïdes, ni l'ovariectomie n'influencent généralement l'évolution d'une tumeur induite. Chez le rat adulte, le rôle de la prolactine dans l'apparition de cancers spontanés et DMBA-induits est connu depuis de nombreuses années. Si on administre un antiprolactinique ou un anti-oestrogène ou si on castré l'animal, 20 jours avant l'exposition au DMBA, on diminue de façon significative la fréquence tumorale. Ce traitement est efficace jusqu'à 20 jours après l'application de DMBA. Le rôle majeur semble revenir à la prolactine : en effet, il est possible d'induire des tumeurs mammaires par le DMBA chez la rate ovariectomisée en administrant PRL et GH. De plus l'apparition de tumeurs augmente parallèlement au taux de sécrétion de PRL. Si la PRL facilite l'induction de tumeurs lorsque son administration est contem-

poraine de celle d'un cancérigène, son action est complètement différente si elle est administrée longtemps avant le cancérigène. L'incidence tumorale est considérablement réduite chez des rats traités par la PRL pendant la période néo-natale (MORI et coll., 1980). L'induction de tumeurs par la nitroso-méthyl-urée (NMU) est fortement réduite chez des rats adultes traités durant leur développement sexuel par l'oestradiol (qui augmente la PRL) ou la progestérone (GRUBBS et coll., 1983). Le rôle des hormones au moment de l'induction des cancers du sein chez la femme est suggéré par les enquêtes épidémiologiques : le risque de cancer du sein est augmenté, lorsqu'un déséquilibre hormonal a favorisé la multiplication cellulaire et donc l'apparition de cellules transformées (cycles anovulatoires, ménopause tardive...), inversement la différenciation mammaire (grossesse, allaitement...) limite l'apparition des tumeurs. Les tumeurs induites chez le rat constituent donc un bon modèle pour l'étude des cancers du sein humains.

Un certain nombre de faits prouvent que la PRL est l'hormone la plus importante dans le contrôle de la croissance des tumeurs mammaires expérimentales chez le rat. L'injection de PRL stimule la croissance tumorale chez les animaux intacts (KELLY et coll., 1974) et réactive très rapidement la croissance tumorale chez des animaux ovariectomisés, surrénalectomisés et hypophysectomisés (PEARSON et coll., 1969). La PRL, à la différence de l'hormone de croissance, augmente le nombre et la taille des tumeurs chez la rate surrénalectomisée et ovariectomisée, de manière dose-dépendante (NAGASAWA, 1970). La perphénazine, l'halopéridol, la TRH (thyrotropin releasing hormone) et la surrénalectomie, qui tous augmentent les concentrations de PRL circulante, augmentent le nombre et la taille des tumeurs DMBA induites chez le rat (CHEN et coll., 1976, 1977 ; PEARSON et coll., 1969 ; QUADRI et coll., 1973). Approximativement un tiers des tumeurs mammaires DMBA induites chez le rat sont prolactino-dépendantes. Le rôle majeur de la PRL dans la stimulation de la glande mammaire est confirmé in vitro. Quand on ajoute de la PRL à des tumeurs mammaires en culture organotypique en présence d'insuline ou d'insuline et de cortisol, on stimule la synthèse de DNA par rapport aux cultures témoins incubées avec de l'insuline seule ou de l'insuline et du cortisol seuls (LEWIS et coll., 1974 ; PASTEELS et coll., 1976 ; WELSCH, 1972). La PRL en présence de 5 % de sérum de veau foetal est capable de stimuler 2 à 3 fois la synthèse d'ADN dans les tumeurs mammaires en culture primaire (RUDLAND et coll., 1977). Le nombre de noyaux

cellulaires marqués par la thymidine tritiée augmente de 30 fois si la PRL est ajoutée à un milieu contenant de l'insuline et du cortisol, mais l'insuline et/ou le cortisol sont sans effet en absence de PRL. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus sur des glandes mammaires normales en cultures primaires ou organotypiques dans lesquelles l'insuline et le cortisol semblent nécessaires à l'action de la PRL.

L'ensemble de ces études expérimentales suggère que la PRL est l'hormone essentielle de la croissance tumorale hormonodépendante. D'autres hormones sont aussi impliquées dans le contrôle des cancers mammaires expérimentaux. Des études ont indiqué que les oestrogènes pouvaient être impliqués d'une manière directe dans la croissance tumorale (SINHA et coll., 1973 ; LEUNG et coll., 1975, 1981) ; cependant le pourcentage des tumeurs oestrogénodépendantes est faible si les niveaux de PRL sont maintenus après ovariectomie. In vitro, la synthèse d'ADN est inhibée par l'oestradiol dans les tumeurs mammaires de rat en culture d'explants. Les effets de la progestérone ne sont pas clairs ; il semble que cette hormone, en association avec la PRL et l'oestradiol, augmente l'induction et favorise la croissance des tumeurs hormonodépendantes (YANI et coll., 1976 ; HEUSON et coll., 1976 ; HORWITZ et coll., 1977 ; MATZUZAWA et YAMAMOTO, 1977). Certaines tumeurs mammaires peuvent être classées comme insulino-dépendantes. L'induction d'un diabète insulino-prive à l'aide de streptozotocine (COHEN et HILF, 1974, 1975) ou d'alloxane (HEUSON et LEGROS, 1970 ; HEUSON et coll., 1972) chez les rats porteurs de tumeurs provoque la régression, au moins partielle, de 60 à 90 % des tumeurs. Chez les rats hypophysectomisés, l'insuline associée à la PRL stimule davantage la croissance que la PRL seule (HEUSON et coll., 1972, 1972b). In vitro, les rôles relatifs de l'insuline et de la PRL ne sont pas élucidés. La PRL pourrait sensibiliser la cellule mammaire à l'insuline qui serait alors le stimulus mitogénique (OKA, 1972). L'insuline serait nécessaire à la synthèse complète d'ADN, alors que la PRL serait indispensable au déclenchement d'un nouveau cycle de division (MUKHERJEE, 1973). Rappelons qu'in vitro, l'insuline est employée à des concentrations élevées. A ces concentrations, elle se lie aux récepteurs de l'IGF (Insulin Like Growth Factor) et peut jouer le rôle de ce facteur de croissance.



#### 4.1.2.2. CANCERS DU SEIN DANS L'ESPECE HUMAINE

Le rôle de la PRL dans les cancers du sein humains n'est pas établi. Quelques revues ont été consacrées à ce sujet (NAGASAWA, 1979 ; article VII). Les concentrations circulantes de PRL ne semblent pas plus élevées chez les patientes atteintes de cancer du sein et dans les populations à risques que chez les témoins. Cependant, des modifications de la sécrétion de PRL ont été signalées chez les femmes atteintes d'un cancer du sein et des drogues hyperprolactinémiantes semblent capables d'augmenter le risque de cancer. Les essais d'antiprolactiniques ont donné des résultats décevants. La présence de PRL est cependant nécessaire au développement de tumeurs chez des souris athymiques auxquelles on a inoculé des cellules de cancer du sein humain.

In vitro, certains cancers du sein, en culture organotypique ou primaire, répondent à une stimulation par la PRL, en augmentant leur synthèse d'ADN. Une revue bibliographique figure dans l'article V. Il a aussi été décrit des lignées de cellules épithéliomateuses de cancer du sein sensibles à la PRL (SHAFIE et BROOKS, 1977 ; SHIU et PATERSON, 1984) mais aussi à l'insuline (BENSON et HOLDAWAY, 1982), à l'oestradiol (LIPPMAN et coll., 1975 ; LIPPMAN et coll., 1976), aux facteurs de croissance, en particulier l'EGF (FITZPATRICK et coll., 1984 ; DICKSON et coll., 1984) et les somatomédines (FURNALETTO et DI CARLO, 1984), et enfin à la calcitonine (NG et coll., 1983).

#### 4.1.3. RECEPTEURS ET DEPENDANCE HORMONALE DE LA GLANDE MAMMAIRE TUMORALE

Les hormones agissent de façon spécifique par l'intermédiaire de protéines réceptrices, cytoplasmiques pour les stéroïdes et membranaires pour les hormones polypeptidiques. Dans les tumeurs mammaires, ces récepteurs peuvent être conservés ou perdus au cours de la transformation néoplasique. Les récepteurs étant indispensables à l'action hormonale, la disparition de ceux-ci indique donc qu'une tumeur a perdu sa capacité de reconnaître l'hormone et d'être stimulée par elle. La présence de récepteurs de la PRL dans les tumeurs mammaires de rat a été mise en évidence par TURKINGTON (1974). De nombreuses études ont par la suite confirmé ces observations (COSTLOW et Mc GUIRE, 1978). Il semble que l'on puisse établir un lien entre la présence de récepteurs de la PRL et la dépendance de la tumeur

vis-à-vis de cette hormone (COSTLOW et coll., 1974, 1976 ; DE SOMBRE et coll., 1976). Le taux de récepteurs pourrait indiquer le degré de capacité de réponse à la prolactine (KELLY et coll., 1974).

Des sites de liaison de la PRL ont été détectés dans les cancers du sein dans l'espèce humaine et nous avons montré dans le premier chapitre qu'ils avaient les caractéristiques de récepteurs. Les liens entre la présence des récepteurs et la sensibilité à la PRL des cancers du sein ne sont pas connus. Nous déterminerons, dans la première partie de l'exposé qui suit, la part des cancers du sein humains qui possèdent des récepteurs de la PRL. Dans une seconde partie, nous chercherons à savoir si, comme pour les récepteurs aux hormones polypeptidiques dans une situation physiologique (chapitre II), le taux de récepteurs est modulé par les taux de prolactine circulante. Dans une troisième partie, nous envisagerons les effets cellulaires de la prolactine après liaison au récepteur. Nous présenterons enfin une application clinique possible immédiate liée à la présence des récepteurs de la PRL dans les tumeurs.

#### 4.2. LES RECEPTEURS DE LA PRL DANS LES TUMEURS INDIVIDUELLES

Nous avons mesuré les niveaux de récepteurs prolactiniques dans les cancers du sein humains. Le prélèvement est généralement effectué sous anesthésie générale, c'est-à-dire dans des conditions où les taux de PRL circulante sont élevés. Une partie des récepteurs peut donc être masquée par l'hormone endogène. Dans le premier chapitre, nous avons mis en évidence la faible dissociabilité de la PRL fixée à son récepteur. Lors du dosage, une partie des récepteurs pourrait rester occupée par l'hormone endogène et serait donc indisponible pour l'hormone radioactive utilisée pour ce titrage. Pour pallier cet inconvénient, nous avons désaturé les récepteurs de la PRL en utilisant le chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2$  3M). L'efficacité de cet agent, qui ne dénature pas le récepteur, a été mise en évidence dans le premier chapitre.

La publication n° III présente dans le détail les résultats que nous avons obtenus. Nous avons dosé à la fois les récepteurs libres de la PRL (sans traitement par  $\text{MgCl}_2$  des préparations membranaires) et les récepteurs totaux de la PRL (après traitement par  $\text{MgCl}_2$  des préparations membranaires) dans 72 cancers du sein humains. Quarante neuf pour cent des cancers

du sein humains sont positifs en récepteurs libres de la PRL ; la liaison spécifique moyenne (exprimée en pourcentage de liaison spécifique par rapport à la radioactivité totale introduite dans le milieu d'incubation et pour 400  $\mu$ g de protéines membranaires) est de 1,95 %. Soixante et onze pour cent des tumeurs sont positives en récepteurs totaux de la PRL, la liaison spécifique moyenne est dans ce cas de 3,17 %. L'augmentation des taux de récepteurs de la PRL et du nombre de tumeurs positives en récepteurs de la PRL après traitement par  $MgCl_2$  est significative et ce, d'autant plus que les résultats ne tiennent pas compte de la perte de protéines entraînée par  $MgCl_2$ , variable selon les tumeurs, mais en moyenne de 30 %. L'effet de  $MgCl_2$  est mal connu : outre la désaturation des récepteurs masqués par l'hormone endogène, il pourrait aussi, par exemple, induire la rupture de vésicules d'endocytose rendant accessible des récepteurs cryptiques.

#### 4.3. MODULATION DU CONTENU EN RECEPTEURS DE LA PRL

##### 4.3.1. MODULATION IN VIVO

Comme nous l'avons rappelé, les récepteurs prolactiniques dans la glande mammaire normale sont régulés par la PRL. A court terme, la PRL régule négativement le taux de ses récepteurs. L'augmentation de PRL, due à l'anesthésie elle-même et aux stress préopératoires, pourrait donc induire non seulement une occupation des récepteurs mais aussi une augmentation de sa dégradation. Il est possible d'abaisser les concentrations de PRL circulantes, y compris sous anesthésie, en utilisant une drogue dopaminergique. On peut alors espérer obtenir une augmentation de la quantité disponible des récepteurs de la PRL en raison : 1) d'un démasquage des récepteurs occupés par la PRL, 2) d'une diminution de la régulation négative des récepteurs. La publication suivante (publication n° IV) décrit l'effet d'une drogue dopaminergique d'utilisation courante qui inhibe la sécrétion de prolactine : la bromocriptine. La bromocriptine a été administrée à la dose de 2.5 mg per os, 2 fois par jour pendant 4 jours. Cette drogue est incapable de démasquer in vivo les récepteurs. Pour tenter d'expliquer cette inefficacité, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées :

1) La spécificité des récepteurs s'exerce vis-à-vis de l'ensemble des hormones lactogènes (chapitre II) : l'action de la GH pourrait en partie expliquer l'inefficacité de la bromocriptine. Les concentrations circulantes de GH sont augmentées sous anesthésie (2.6 ng/ml) par rapport à la normale (1

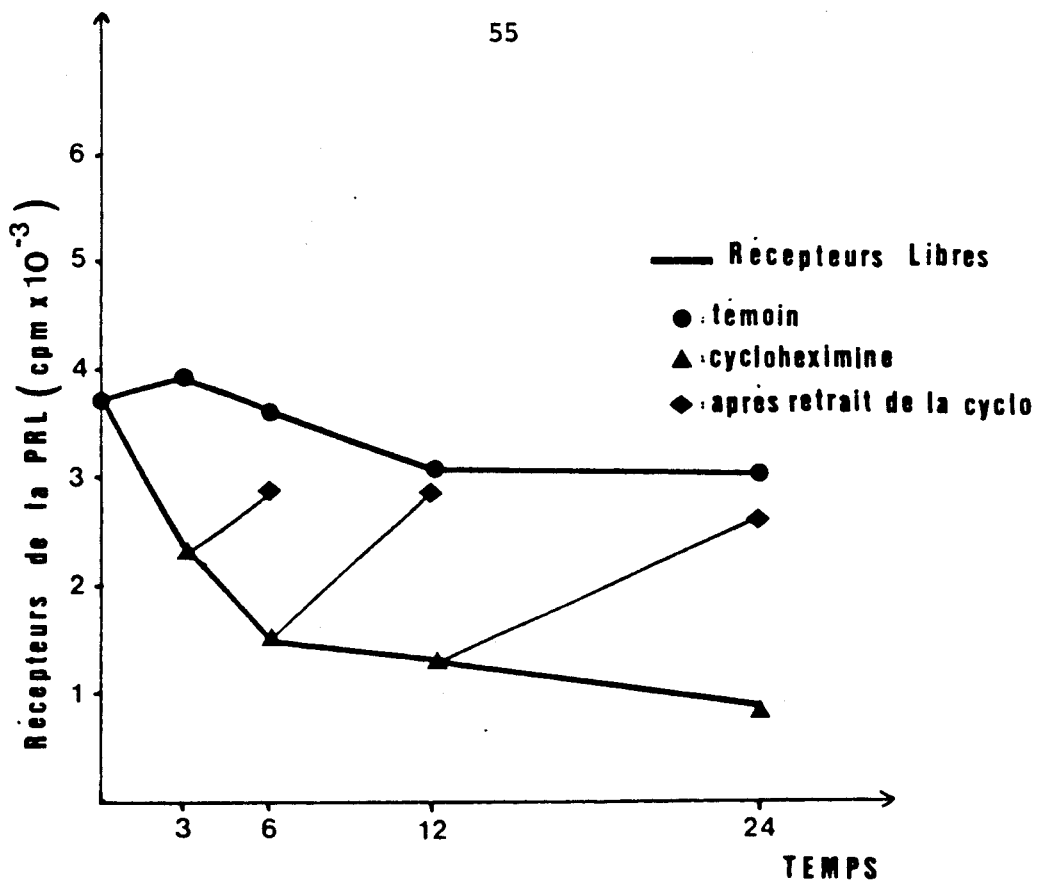


FIGURE 4.3. - EFFET DE LA CYCLOHEXIMIDE (1  $\mu\text{g/ml}$ ) SUR LES RECEPTEURS LIBRES DE LA PRL dans les cellules épithéliales de cancer du sein MCF-7 en culture à long terme. Les cellules sont cultivées dans du milieu MEM contenant de l'insuline (5  $\mu\text{g/ml}$ ) et du sérum de veau foetal (10 % final) en présence et en absence de cycloheximide. Les récepteurs de la PRL sont dosés dans les conditions standard sur les fractions microsomiales préparées à partir des cellules décollées manuellement. Chaque point est la moyenne de trois déterminations.

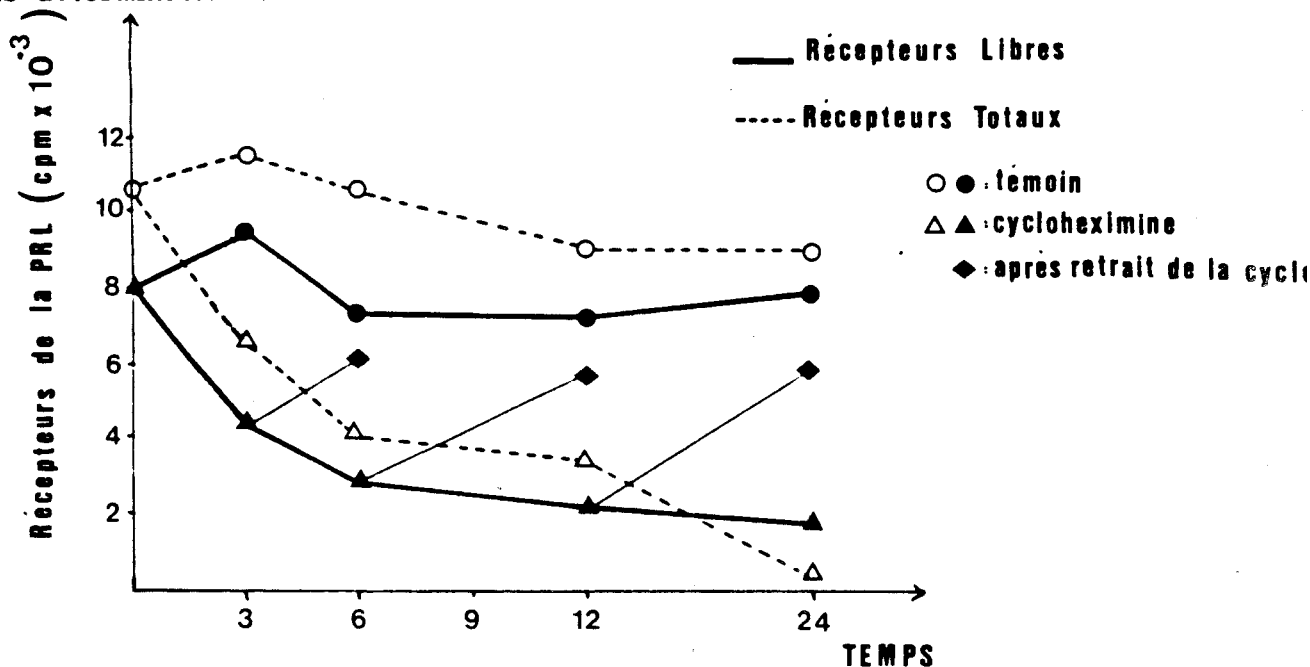


FIGURE 4.4. - EFFET DE LA CYCLOHEXIMIDE (1  $\mu\text{g/ml}$ ) SUR LES RECEPTEURS LIBRES ET TOTAUX DE LA PRL dans les cellules épithéliales de cancer du sein T47-D en culture à long terme. Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI en présence d'insuline (0,6  $\mu\text{g/ml}$ ) et de sérum de veau foetal (10 % final) (voir légende fig 4.1). Chaque point est la moyenne de 5 déterminations.

ng/ml) ; la bromocriptine n'induit pas de diminution de concentration (2.8 ng/ml). La GH pourrait donc seule réguler négativement les récepteurs.

2) Le traitement par la bromocriptine pourrait avoir été trop long. La diminution trop prolongée de la PRL pourrait induire une diminution des récepteurs de la PRL. Pour compléter l'étude présentée dans la publication n° IV et tester cette hypothèse, nous avons, à la place de la bromocriptine, utilisé une drogue antiprolactinique à effet plus rapide et plus durable : le CU 320 85, administré à la dose de 0.5 mg la veille de l'intervention. Le niveau de récepteurs de la PRL n'a pas été augmenté dans ces conditions. Ces résultats pourraient suggérer, comme cela a été montré pour les récepteurs de l'insuline dans les lignées tumorales (MONTJOY et coll., 1983) ou pour les récepteurs de la PRL dans les tumeurs NMU-induites (GANDILHON et coll., 1983), une résistance des récepteurs à une régulation négative dans les tumeurs.

#### 4.3.2. MODULATION IN VITRO

Nous avons utilisé deux lignées de cellules épithéliales de cancer du sein en culture (MCF-7 et T47-D) (SHIU, 1979), pour étudier les cinétiques et le lieu de dégradation ainsi que la régulation des récepteurs de la PRL.

La cycloheximide inhibe la synthèse protéique au niveau traductionnel : elle provoque rapidement une diminution des récepteurs de la PRL dans la cellule : la moitié des récepteurs disparaît en 8 heures (fig. 4.3 et 4.4). Le blocage de la transcription par l'actinomycine-D ne modifie pas la concentration en récepteurs des cellules, même si le contact atteint 24 heures. Ces résultats indiquent que les ARN messagers qui codent pour les récepteurs de la PRL dans la cellule épithéliale de cancer du sein (DJIANE et coll., 1979b) sont particulièrement stables, comme cela été démontré dans la glande mammaire normale.

Le blocage pendant 24 heures du fonctionnement des lysosomes par la chloroquine (100, 50, 25  $\mu$ M) ou le chlorure d'ammonium (10, 5 et 1 mM) ou la méthylamine (20, 10 et 5 mM) ne provoque pas d'augmentation significative des concentrations de récepteurs libres de la PRL dans les cellules MCF-7 ou T47-D en culture, à la différence de ce qui est observé dans la glande mammaire normale (DJIANE et coll., 1980). Cette absence d'effet des agents lysosomotropes a été décrite dans les cellules de tumeurs mammaires DMBA induites (COSTLOW et HAMPLE, 1980) et dans les cancers mammaires

NMU- et DMBA-induits en culture d'explants (GANDILHON et coll., 1983b). Le mécanisme de dégradation des récepteurs de la PRL dans les tumeurs mammaires est donc différent du mécanisme décrit dans la glande mammaire normale. Cette différence pourrait être une caractéristique du tissu cancéreux. D'autres différences dans la régulation in vitro du récepteur semblent exister, puisque des concentrations de oPRL variant de 100 ng/ml jusqu'à 100 µg/ml n'induisent pas de régulation négative des récepteurs. Ces résultats méritent d'être confirmés en utilisant une hormone lactogène d'origine humaine car la oPRL pourrait se lier aux récepteurs sans que les étapes ultérieures d'internalisation aient lieu ; ceci a été décrit pour les anticorps anti-récepteurs de la PRL (DJIANE et coll., 1981b). L'hormone placentaire lactogène qui est disponible en quantité suffisante, devrait nous permettre de mener à bien cette étude. Ces résultats préliminaires sont néanmoins à rapprocher de ceux que nous avons obtenu in vivo, et la résistance des récepteurs à une régulation négative par l'hormone homologue pourrait être une caractéristique des cellules tumorales.

#### 4.4. EFFETS CELLULAIRES DE LA PRL APRES LIAISON AUX RECEPTEURS

La présence de récepteurs de la prolactine dans les cancers du sein ne signifie pas forcément que la cellule épithéliomateuse est encore sous le contrôle de la PRL. Au cours de la transformation néoplasique, les événements biochimiques au-delà de la liaison de l'hormone à son récepteur peuvent avoir été modifiés. La PRL, après liaison à son récepteur, stimule la multiplication et la différenciation des cellules épithéliales dans la glande mammaire normale. Dans ce chapitre, nous présentons les résultats d'expérimentations visant à déterminer si, dans les cancers du sein, la PRL est aussi capable, par l'intermédiaire de son récepteur, d'induire des effets cellulaires.

##### 4.4.1. STIMULATION PAR LA PRL DE LA SYNTHÈSE DE DNA

Nous avons recherché les relations entre la présence de récepteurs et la stimulation de la synthèse de DNA par la PRL (article V). Des explants de cancers du sein sont cultivés en présence d'insuline, de cortisol et de doses croissantes de PRL. La prolactine stimule la synthèse de DNA dans 16 % des cas. L'effet maximum est obtenu à des concentrations de 50 à 200 ng/ml, qui peuvent être considérées comme physiologiques. Au-delà de ces concentra-

tions, on observe une inhibition de la synthèse de DNA. La présence de récepteurs est nécessaire mais non suffisante pour obtenir une stimulation par la PRL.

#### 4.4.2. STIMULATION PAR LA PRL DE LA SYNTHÈSE D'ALPHA-LACTALBUMINE

L'alpha-lactalbumine est produite par la cellule épithéliale mammaire normale sous stimulation prolactinique (chapitre 3.1). C'est la protéine principale du lait humain. Nous avons évalué le taux de cette protéine dans le sérum prélevé au moment de l'opération chez les femmes atteintes d'un cancer du sein, c'est-à-dire dans des conditions où les niveaux de prolactine circulante sont élevés (article VI). L'alpha-lactalbumine est détectable dans 27 % des sérums de patientes. Il n'y a pas de relation entre la présence de récepteurs dans les tumeurs et celle d'alpha-lactalbumine dans les sérums. Ceci pourrait être dû, en partie, aux difficultés de détection de l'alpha-lactalbumine sérique liées à la sensibilité des dosages et à d'éventuelles interférences sériques. Pour cette raison, la détection intra-tumorale de cette protéine serait plus appropriée : nous mettons en oeuvre actuellement la mesure de l'alpha-lactalbumine dans les tumeurs par dosage radioimmunologique et par immunocytochimie. Il reste que l'alpha-lactalbumine sérique est détectable dans 18 % (25/136) des sérums, en l'absence de récepteurs de la PRL dans la tumeur : ceci suggère que la production de cette protéine ne serait plus sous contrôle prolactinique, contrairement à ce qui se produit dans la glande mammaire normale.

#### 4.4.3. CORRELATIONS ENTRE RECEPTEURS DE LA PRL ET RECEPTEURS DES HORMONES STÉROÏDES

Les récepteurs de la PRL et les récepteurs des hormones stéroïdes ont été dosés simultanément dans les cancers du sein (publication VII). Une corrélation significative a été trouvée entre les récepteurs stéroïdiens et les récepteurs libres de la PRL. Nous avons confirmé ces résultats sur une série plus importante, depuis cette étude. Récemment MURPHY et coll. (1984, 1984c) ont retrouvé cette corrélation sur une série de 31 biopsies de cancers du sein et sur 14 lignées de cellules épithéliomateuses en culture. Les récepteurs de la PRL pourraient donc être, comme les récepteurs de l'oestradiol, des marqueurs de la différenciation cellulaire. La corrélation positive significative entre les concentrations des récepteurs de l'oestradiol et des

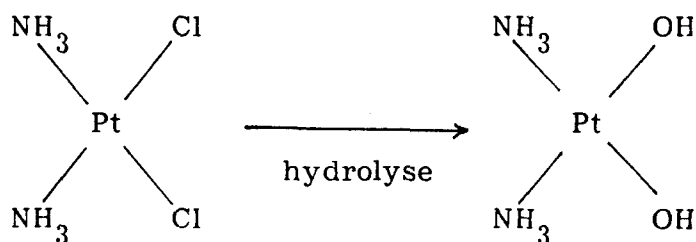
récepteurs de la PRL suggère que les expressions des gènes de ces protéines sont couplées. Une première interprétation est que la présence de récepteurs de la PRL soit un préalable à celle des récepteurs de l'oestradiol dans la glande mammaire. Il a été décrit que la PRL augmentait les concentrations de récepteurs de l'oestradiol dans les tumeurs DMBA-induites, *in vivo* (VIGNON et coll., 1976 ; ARAFAH et coll., 1980) comme *in vitro* (LEUNG, 1975). De plus, dans une lignée de cellules épithéliales de cancer du sein humain (SHAFIE et BROOKS, 1977) et dans la glande mammaire normale de souris (MULDOON et coll., 1981), la PRL provoque à court terme la conversion des récepteurs cytoplasmiques de l'oestradiol de forme inactive en forme active et élève les niveaux de récepteurs nucléaires de l'oestradiol. Nous avons pour notre part observé une augmentation des concentrations en récepteurs de l'oestradiol chez les femmes non ménopausées après traitement par la bromocriptine (publication IV), qui pourrait être due à une diminution de la translocation nucléaire des récepteurs de l'oestradiol. Le récepteur de l'oestradiol pourrait donc être un marqueur de l'action de la PRL dans la cellule épithéliale.

La seconde possibilité, qui ne doit pas être éliminée est que les oestrogènes aient un effet direct ou indirect sur l'expression des récepteurs de la prolactine comme cela a été rapporté dans le tissu hépatique des rongeurs (POSNER, 1976).

#### 4.5. POSSIBLE APPLICATION PRATIQUE : CIBLAGE DES CELLULES CON- TENANT DES RECEPTEURS DE LA PRL PAR DES AGENTS ANTIMITO- TIQUES

La présence de récepteurs de la PRL dans au moins 50 % de cancers du sein peut être d'un grand intérêt si on cherche à améliorer la spécificité d'action de drogues anticancéreuses. Quelle que soit l'activité du récepteur, il est possible de l'utiliser pour permettre la reconnaissance d'une drogue par la cellule cancéreuse. Nous avons préparé des complexes PRL-dérivés du platine, car certains dérivés du platine sont des agents antitumoraux très utilisés. L'un de ces complexes a gardé sa capacité de liaison aux récepteurs de la PRL. Les détails de la préparation de ce complexe figurent dans l'article VIII. Le composé est obtenu en incubant, à 37° C (en tampon phosphate), la PRL avec un dérivé du platine : le cisplatine. Le dérivé hydrolysé du platine a une grande affinité pour les protéines.





L'interaction entre le cisplatine et la PRL donne un complexe stable qu'il est possible de séparer par chromatographie liquide haute performance. La PRL n'est pas dénaturée et le complexe PRL-cisplatine se lie aux récepteurs de la PRL avec la même affinité que la PRL seule. L'efficacité d'un tel complexe sur l'induction d'une régression tumorale est à l'étude.

#### 4.6. DISCUSSION - CONCLUSION

Nous avons cherché à savoir si le récepteur de la PRL était capable, outre d'assurer sa fonction de reconnaissance spécifique de l'hormone lactogène, de moduler l'activité hormonale et de transmettre l'information hormonale aux effecteurs cellulaires. Le récepteur prolactinique, dans plus de 50 % des cancers du sein, est capable de reconnaître spécifiquement les hormones lactogènes. Ses deux autres fonctions spécifiques sont perdues, au moins en partie, au cours du processus néoplasique. In vivo comme in vitro, la concentration en récepteurs ne semble plus être modifiée par la PRL. La production d'alpha-lactalbumine n'est plus sous contrôle prolactinique. In vitro, la liaison de l'hormone aux récepteurs ne conduit pas toujours à la stimulation de la synthèse d'ADN, suggérant que la formation du complexe ne produit pas, dans tous les cas, les événements intra-cellulaires au-delà de l'étape de liaison. Les défauts de fonctionnement, soit du récepteur lui-même, soit des étapes post-récepteur que nous observons dans la cellule néoplasique, ont été décrits dans d'autres situations pathologiques. Dans tous les cas, c'est l'effet hormonal qui est diminué ou supprimé. Ainsi les anomalies de la sensibilité tissulaire à l'insuline sont bien connues (DEWAILLY et coll., 1980). L'insulino-résistance peut être en rapport avec une anomalie génétique qui provoque une faible expression du récepteur ou un défaut des étapes post-récepteur. L'insulino-résistance dans l'obésité et le diabète gras trouve une origine dans un hyperinsulinisme qui provoque une diminution du nombre de récepteurs. Des cas de résistance périphérique aux androgènes (pseudo-hermaphrodisme) ont aussi été décrits (DEWAILLY et coll., 1981) : le déficit

peut siéger aux différentes étapes de l'action des androgènes : au niveau de la liaison hormone-récepteur cytosolique, au niveau des interactions du complexe hormone-récepteur avec la chromatine du DNA (testicule féminisant), au niveau de l'activité 5 alpha-réductase. Enfin diverses formes de résistance à l'hormone para-thyroïdienne (PTH) ont été décrites : elles sont dues là aussi à un défaut du récepteur ou des étapes post-récepteur (VERHOEVEN, 1979).

L'ensemble de notre travail est sous tendu par des préoccupations cliniques et thérapeutiques. La mise en oeuvre de traitements hormonaux des tumeurs nécessite une bonne connaissance du contrôle hormonal des cancers du sein. Ces dernières années, l'attention a surtout été portée sur l'identification et la quantification des récepteurs stéroïdiens dans les cancers du sein et sur la détermination des relations entre le taux de ces récepteurs et l'hormonodépendance des tumeurs. Les études de relation entre les taux de récepteurs stéroïdiens et la réponse à une hormonothérapie montrent qu'il est difficile de prédire avec précision l'hormonodépendance des tumeurs individuelles (BONNETERRE et coll., 1983). Le contrôle des cellules épithéliales du cancer du sein met vraisemblablement en jeu des associations, séquences et synergies hormonales (chapitre 4.1.). L'effet stimulant de la prolactine sur la synthèse d'ADN, la corrélation entre récepteurs stéroïdiens et récepteurs prolactiniques ainsi que les modulations de taux de récepteurs stéroïdiens induits par traitement avec un antiprolactinique, montrent que la PRL est impliquée dans ce contrôle. L'altération ou la disparition des récepteurs de la PRL dans la cellule cancéreuse modifierait l'hormonosensibilité tumorale. Le dosage simultané des récepteurs stéroïdiens et de ceux de la prolactine devrait permettre d'améliorer la prédiction d'hormonosensibilité des tumeurs.

## **Article III**

## Total prolactin binding sites in human breast cancer biopsies

J.P. Peyrat<sup>a</sup>, D. Dewailly<sup>a</sup>, J. Djiane<sup>b</sup>, P.A. Kelly<sup>c</sup>, B. Vandewalle<sup>a</sup>, J. Bonnetterre<sup>d</sup>, J. Lefebvre<sup>a</sup>  
<sup>a</sup>Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale, Centre de Biologie Clinique-Institut Pasteur de Lille, 20 Boulevard Louis XIV, 50019 Lille Cédex, France; <sup>b</sup>Laboratoire de Physiologie de la Lactation CNRZ-INRA, 75350 Jouy en Josas, France; <sup>c</sup>Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire, Le Centre Hospitalier de l'Université Laval, 2705 Boul. Laurier, Québec, G1V 4G2 Canada; <sup>d</sup>Centre Anticancéreux de Lille (Centre Oscar Lambret), Rue Frédéric Combemale, BP 307, 59000 Lille, France

**Keywords:** breast cancer, binding, prolactin receptor

### Summary

Total and free prolactin receptors were assayed in 72 human breast tumor biopsies. Forty-nine percent of the tumors are positive (specific binding greater than 0.8% of total radioactivity) when assaying free receptors, while 71% are positive when total receptors levels are determined. No clear relationship exists between the prolactin receptor positivity and the presence of either progesterone or estradiol receptors. Measurement of total prolactin receptors could be an important and independent criterion of the hormonal sensitivity of the tumors.

### Introduction

The involvement of prolactin is now well established in the induction and promotion of many experimental mammary tumors (1-5). However, the role of prolactin in the development of human breast cancer is less well established (6-7).

The first step of the action of prolactin is its binding to cell surface receptors. It is therefore evident that the quantification of the level of available receptors for prolactin would allow the identification of those tumors which might respond to endocrine manipulations involving prolactin.

The first studies on prolactin receptors in human breast cancer have been published only in the last several years (8-11) and have presented differing results. None of these studies took into account the possibility that prolactin receptors

might be occupied by endogenous prolactin and thus remain undetected by the conventional assay technique, and only a few established correlations with the levels of estradiol and progesterone receptors.

In the present report the levels of free and total prolactin receptors in 72 tumors have been determined and correlated with the concentration of estradiol and progesterone receptors.

### Materials and methods

#### *Collection of tumors*

Tumor specimens, only adenocarcinomas, were obtained primarily from the Centre Oscar Lambret (Centre Anticancéreux de Lille). At the time of collection, fat was removed and samples



were divided in two pieces: one was submitted for histologic studies and the other was frozen.

#### *Tissue processing*

The frozen tissues were weighed and then pulverized with a Thermovac tissue pulverizer (Thermovac Industries Corp., N.Y.). The tissues were homogenized in Tris 0.02 M, EDTA 3 mM, dithiothreitol 1mM, azide 0.01%, pH 7.8 buffer.

The homogenate was centrifuged at 800 g for 10 minutes and the supernatant ultracentrifuged at 105 000 g for 60 minutes. The supernatant (cytosol) was carefully removed with a syringe in order to avoid the floating lipid layer. The pellet (microsomal fraction) was resuspended in 25 mM Tris HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> buffer pH 7.6. Later, the protein concentration was determined by the method of Lowry (12), applied either directly in the cytosol or after extraction from the membrane (with NaOH 1N) in the microsomal fraction.

#### *Hormones*

Labeling of hGH (NIH HS 2160 E, 2 IU/mg) and hPRL (NPA batch 5 AFP 1582C) was carried out with Na<sup>125</sup>I using low concentrations of chloramine T (13–14). The binding capacity of these hormones was assayed in a fraction enriched with human tumor membranes; hGH was found to have a higher binding capacity and was therefore used as the marker in the assays. The specific activity was approximately 75 Ci/g as determined directly or by the self-displacement method (15). Between 70 and 80% of the iodinated GH added could be specifically bound to prolactin receptors in receptor-enriched membranes (e.g., mammary glands from lactating rabbits pretreated with CB 154: Sandoz, Basle, Switzerland) (16). Ovine PRL (NIH-P-S13, 30 IU/mg) was used to displace labeled hGH. [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$  estradiol (specific activity 135 Ci/mmol) and [<sup>3</sup>H] R5020 were purchased from N.E.N. (Boston, Mass). Non-radioactive diethylstilbestrol and cortisol were purchased from Steraloids, Inc. (Pawling, N.J.).

#### *Assay of prolactin receptors (PRL R)*

*Free receptors.* The assay was performed according to Shiu et al. (17). Four hundred micrograms of membrane proteins were incubated with approximately 100 000 cpm of iodinated GH in the presence or absence of a 1000-fold excess of unlabeled oPRL (1 microgram). The final incubation volume was adjusted to 0.5 ml with Tris MgCl<sub>2</sub> buffer (pH 7.6) containing 0.1% bovine serum albumin.

*Total receptors.* Since prolactin does not appear to dissociate from its receptors during membrane preparation, desaturation of occupied receptors was performed before the assay of prolactin sites. To accomplish this, crude membrane proteins normally used in the assay were preincubated with 0.5 ml 3 M MgCl<sub>2</sub> for 5 minutes, and 4 ml of cold Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.1% BSA were then added to each tube. Following centrifugation at 2200 g, the pellets were resuspended in Tris HCl buffer and binding of the labeled hormone was assayed as described above.

Specific binding was calculated as the difference between the cpm bound in the absence and the presence of the excess unlabeled hormone and expressed as the percentage of the total radioactivity added to the tube.

#### *Assay of estradiol receptors (ER) and progesterone receptors (PgR)*

ER was determined by the DCC method (18). Scatchard analysis of binding data was performed in order to quantitate the number of free binding sites per milligram of cytosol protein. Nonspecific binding was estimated from incubations with an excess of unlabeled DES, which avoids interference by TeBG. PgR was also assayed by the DCC method (19) using tritiated and non-radioactive R5020.



## Results

The specific binding of  $^{125}\text{I}$  labeled hGH to plastic tubes, i.e. to 'non-physiological' binding sites, is estimated by measuring the apparent displacement of  $^{125}\text{I}$  hGH by 1 microgram of unlabeled oPRL in the absence of tumor membranes. Its maximal value is 0.8% of the total counts added. Therefore, tumors whose specific binding is greater than 0.8% are considered positive (PRL R<sup>+</sup>). Total binding averages between 5% and 13% whereas nonspecific binding ranges between 5% and 9% of the total counts added.

Forty-nine percent of the tumors (35/72) are positive (PRL R<sup>+</sup>) when free receptors are measured, while 71% (51/72) are positive in terms of total receptors (Fig. 1). Of the positive tumors, the average specific binding value is  $3.17 \pm 0.27$ , which is significantly ( $p < 0.01$ ) greater than free receptor levels:  $1.95 \pm 0.15$ . Treatment with 3 M MgCl<sub>2</sub> leads to an approximate 30% loss of tumor membrane proteins, as has been reported for mammary and liver tissue (14). In spite of this, this treatment leads to an increase in prolactin binding in 80% of the samples. Specifically, 16 tumors which have non-detectable

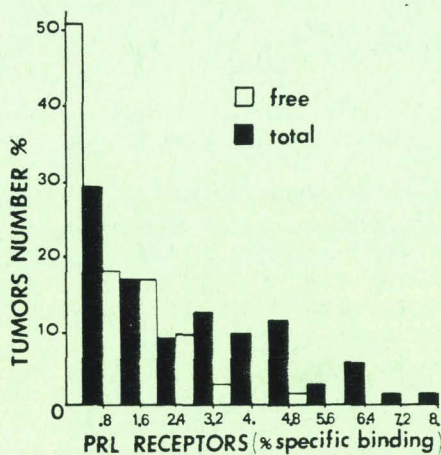


Fig. 1. Distribution of 72 human breast tumors as a function of their prolactin receptor (PRL R) levels (in percentage of total counts per 400 micrograms of membrane proteins). For free receptors, specific binding for 35 PRL R positive tumors is  $1.95\% \pm 0.15\%$  (SEM). For total receptors, specific binding for 51 PRL R positive tumors is  $3.17\% \pm 0.27\%$  (SEM).

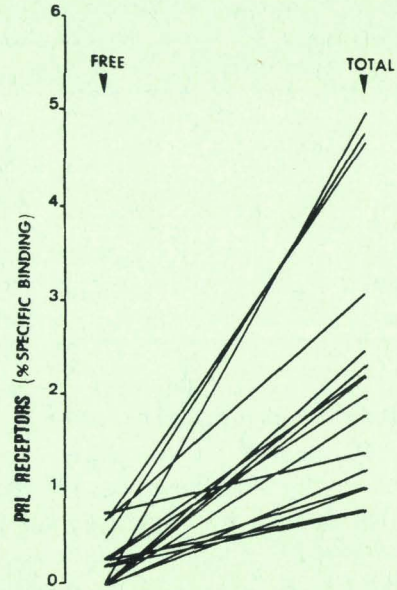


Fig. 2. Prolactin receptor levels in 16 human mammary tumors in which specific binding is detectable only after MgCl<sub>2</sub> treatment of the receptors (total receptors).

levels of free receptors become positive when the total receptors are determined (Fig. 2). Of the 72 tumors examined only five are metastasized; three are PRL R<sup>+</sup> and two PRL R<sup>-</sup> with respect to either total or free receptor levels. One local recurrence is PRL R<sup>-</sup> with respect to either total or free receptor levels.

When the absolute levels of estrogen, progesterone and prolactin receptors are compared, nonsignificant correlation is obtained. Taking only the tumors that contain both ER and PRL R, there is still no correlation between the amount of PRL bound and the amount of estrogen bound; also there is no relation between PgR and PRL R if all the PgR<sup>+</sup>/PRL R<sup>+</sup> tumors are examined.

The relationship between the presence of PRL R, ER and PgR in tumors is shown in Table 1. The tumors whose specific binding is greater than 3 fmoles/mg protein for ER and 25 fmoles/mg protein for PgR are considered positive (ER<sup>+</sup> and PgR<sup>+</sup>). No significant relationship ( $\chi^2$  test) exists between the presence of free or total prolactin receptors and the presence of steroid receptors.



Table 1. Relationship between free or total PRL R and ER and/or PgR in human breast cancers.

	(No. of cancers)	Free PRL R <sup>+</sup>	Total PRL R <sup>+</sup>
ER <sup>+</sup>	(52)	50%	71%
ER <sup>-</sup>	(16)	38%	69%
PgR <sup>+</sup>	(40)	45%	75%
PgR <sup>-</sup>	(28)	50%	64%
ER <sup>+</sup> PgR <sup>+</sup>	(36)	50%	75%
ER <sup>+</sup> PgR <sup>-</sup>	(16)	50%	63%
ER <sup>-</sup> PgR <sup>+</sup>	(4)	0%	75%
ER <sup>-</sup> PgR <sup>-</sup>	(12)	50%	67%

After the desaturation process, there is quite the same percentage of tumors that become PRL R<sup>+</sup> in all the subdivisions of steroid receptor. (The difference observed for the ER<sup>-</sup> PgR<sup>+</sup> subdivision is not significant as the number of observations is too small.) It should be noted that 8 of the tumors which are ER<sup>-</sup> PgR<sup>-</sup> are PRL R<sup>+</sup>.

#### Discussion/conclusion

The present study supports the findings of others (8-11), who have reported that some human breast tumors contain low but measurable levels of free prolactin receptors. Since the biopsies are removed under conditions which might lead to an increase in the circulating levels of prolactin, a portion of the prolactin binding sites could be occupied. The utilization of 3 M MgCl<sub>2</sub> to dissociate endogenously bound prolactin, thus allowing the measurement of total prolactin receptors, has in fact allowed a greater number of tumors to be considered PRL R<sup>+</sup>, while increasing the average level of prolactin binding in the PRL R<sup>+</sup> tumors from 1.95 to 3.17%.

Although the explanation for the low level of prolactin binding in human breast cancer is unclear, it should be pointed out that similar levels of prolactin binding in rat testicular tissue (1 to 2%) have been reported (20, 21) and for this tissue a specific stimulatory effect of PRL on the level of testicular Leydig cell LH receptors has been established (22). Therefore the low level of

receptors in human breast cancer biopsies does not rule out an important role of prolactin in the development of the tumor.

We failed to find any correlation between prolactin and steroid receptor levels, as was also reported by Holdaway et al. (8). Furthermore, the presence of total PRL R is not significantly associated with the presence of ER or PgR.

Improvement in the detection of prolactin receptors by their desaturation may subsequently support the importance of prolactin as a growth factor in these tumors. We are now establishing clinical correlations between the presence of total PRL R and response to endocrine therapy, with the aim to verify the value of these receptor measurements in predicting tumor responsiveness.

#### Acknowledgments

The oPRL, hGH and hPRL were kindly supplied by the NIAMDD Pituitary Hormone Distribution Program. The expert technical assistance of Marie-Michèle Delepierre is gratefully acknowledged.

#### References

1. Welsch CW, Nagasawa H: Prolactin and murine mammary tumorigenesis: A review. *Cancer Res* 37:951-963, 1977
2. Pearson OH, Llerena O, Llerena L, Molina A, Butler T: Prolactin-dependent rat mammary cancer: a model for man? *Trans Assoc Am Physicians* 82:225-237, 1969
3. Kelly PA, Bradley C, Shiu RPC, Meites J, Friesen HG: Prolactin binding to rat mammary tumor tissue. *Proc Soc Exptl Biol Med* 146:816-819, 1974
4. Asselin J, Kelly PA, Caron MG, Labrie F: Control of hormone receptor levels and growth of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumors by estrogens, progesterone and prolactin. *Endocrinology* 101: 666-671, 1977
5. Turcot-Lemay L, Kelly PA: Characterization of estradiol, progesterone and prolactin receptors in nitroso-methyl-urea-induced mammary tumors and effect of antiestrogen treatment on the development and growth of these tumors. *Cancer Res* (in press)
6. Costlow ME, McGuire W: Prolactin receptors and hor-



- mone dependence in mammary carcinoma. In RK Sharra and WE Criss (eds): *Endocrine Control in Neoplasia*. Raven Press, New York, 1978, pp 121-150
7. Pearson OH, Manni A: Hormonal control of breast cancer growth in women and rats. In L Martini and VHT James (eds): *Current Topics in Experimental Endocrinology*, Vol III. Academic Press, New York and London, 1977, pp 75-92
8. Holdaway IM, Friesen HG: Hormone binding by human mammary carcinoma. *Cancer Res* 37: 1946-1951, 1977
9. Pearson O, Manni A, Chambers M, Brodkey J, Marshall JS: Role of pituitary hormones in the growth of human breast cancer. *Cancer Res* 38:4323-4326, 1978
10. Di Carlo R, Muccioli G: Prolactin receptor in human mammary carcinoma. *Tumori* 65:695-702, 1979
11. Partridge RK, Hähnel R: Prolactin receptors in human breast carcinoma. *Cancer* 43:643-646, 1979
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951
13. Greenwood FC, Hunter WH, Glover JS: The preparation of  $^{131}\text{I}$  labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* 89:114-123, 1963
14. Kelly PA, Leblanc G, Djiane J: Estimation of total prolactin binding sites after in vitro desaturation. *Endocrinology* 104:1631-1638, 1979
15. Catt KJ, Ketelsleger JM, Dufau ML: Receptors for gonadotropic hormones. In M Blecher (ed): *Methods in Molecular Biology*, Part 1, Vol 9. Marcel Dekker, New York, 1976, pp 175-250
16. Djiane J, Durand P, Kelly PA: Evolution of prolactin receptors in rabbit mammary gland throughout pregnancy and lactation. *Endocrinology* 100:1348-1356, 1977
17. Shiu RPC, Kelly PA, Friesen HG: Radioreceptor assay for prolactin and other lactogenic hormones. *Science* 180:968-973, 1973
18. EORTC: Breast Cancer Cooperative Group: Standards for the assessment of estrogen receptors in human breast cancer. *Europ J Cancer* 9:379-381, 1973
19. Horwitz KB, McGuire WL: Specific progesterone receptors in human breast cancer. *Steroids* 25:497-505, 1975
20. Aragona C, Friesen HG: Specific prolactin binding sites in the prostate and testis of rats. *Endocrinology* 97:677-684, 1975
21. Charreau EH, Attramadal A, Torjesen PA, Purois K, Calandra R, Hansson V: Prolactin binding in rat testis: specific receptors in interstitial cells. *Mol Cell Endocrinology* 6:303-307, 1977
22. Sharpe RM, McNeilly AS: The effect of induced hyperprolactinemia on Leydig cell function and LH-induced loss of LH-receptors in the rat testis. *Mol Cell Endocrinology* 16:19-27, 1979



## **Article IV**

# Effect of Bromocriptin Treatment on Prolactin and Steroid Receptor Levels in Human Breast Cancer

J. P. PEYRAT,<sup>†‡</sup> PH. VENNIN,<sup>†</sup> J. BONNETERRE,<sup>†</sup> B. HECQUET,<sup>†</sup> B. VANDEWALLE,<sup>†</sup> P. A. KELLY<sup>§</sup> and J. DJIANE<sup>¶</sup>

<sup>†</sup>Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale, Centre Oscar Lambret, Centre de Lutte Contre le Cancer de la Région Nord, Rue Frédéric Combemale, 59020 Lille Cedex, France, <sup>¶</sup>Laboratoire de Physiologie de la Lactation INRA-CNRZ 78350 Jouy-en-Josas, France and <sup>§</sup>Laboratory of Molecular Endocrinology, Royal Victoria Hospital, Montreal, Quebec H3A 1A1, Canada

**Abstract**—We have investigated the effect of bromocriptin, a prolactin-lowering drug, on prolactin, estradiol and progesterone receptors in breast cancers. Doses of 2.5 mg per os of bromocriptin were given twice daily for 4 days before surgery. The efficiency of the treatment was evaluated by assaying the plasma prolactin level. The results obtained for the treated population ( $n = 30$ ) was compared to those obtained for an untreated one ( $n = 120$ ) during the same period. Bromocriptin does not increase the available prolactin receptors in breast cancer specimens. Unmasking *in vitro* receptors with  $MgCl_2$  3 M leads in both cases to an increase in prolactin receptors. The number of positive estradiol receptor tumors was increased after bromocriptin treatment. Neither the rate of positivity nor the level of progesterone receptors is changed by the treatment. This study demonstrates clearly the inefficiency of bromocriptin in unmasking *in vivo* prolactin receptors in breast cancer.

## INTRODUCTION

PROLACTIN (PRL) is an important hormone controlling the growth of the normal mammary gland and the synthesis activity of the normal mammary cell [1, 2]. These actions are mediated by specific membrane receptors [3, 4].

PRL is involved in induction and promotion of experimental mammary cancers [5, 6]. Prolactin receptors (PRL R) have been detected and characterized in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)- and nitrosomethylurea (NMU)-induced mammary tumors in rats [7, 8].

The role of PRL in human breast cancer has not yet been established [9]. Results are controversial but there are several lines of evidence suggesting that prolactin may play a role in induction and/or promotion of breast cancer. We and others have demonstrated that PRL binding is detectable in 50% of the tumors [10-19]. These binding sites

have all the characteristics of receptors [20]. Nevertheless the levels of prolactin receptors in breast cancer are low and difficult to detect. We previously postulated that, since specimens are obtained in surgery, the rise in prolactin plasma levels during general anesthesia [21, 22] may lead to the blocking of available receptor sites. For this reason, in a previous work [15] we treated the breast cancer cell membranes with 3 M  $MgCl_2$  *in vitro* to desaturate the receptors: the percentage of PRL R-positive tumors and the levels of PRL R were both increased when compared to the conventional PRL R assay.

In the present work we titrated the amount of prolactin receptors, avoiding their occupancy by endogenous prolactin *in vivo*. This was achieved by using bromocriptin, a compound which is known to depress prolactin secretion.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and treatment

All the women taking part in this study were seen at the Centre Oscar Lambret (an anticancer center in the north of France). Tumor specimens

Accepted 11 May 1984.

\*This work was supported by a grant from the Association Pour la Recherche sur le Cancer (Villejuif).

‡To whom requests for reprints should be addressed.



were obtained from women undergoing surgery for primary breast cancer (adenocarcinomas >2 cm) with no evidence of metastatic or inflammatory disease. Between January 1983 and September 1983 30/150 were randomly selected for treatment by bromocriptin (CB 154, Parlodel, Sandoz). There is no difference between the histological characteristics of the treated group and controls as regards tumor type (Table 1), cellular density, differentiation and histological grading.

Doses of 2.5 mg of bromocriptin were given *per os* twice daily for 4 days before surgery. The last dose was administered immediately before surgery. The efficiency of the treatment was evaluated by assaying the plasma PRL level (<10 ng/ml). Ten milliliters of peripheral blood were collected in dry tubes during anesthesia. Hormone levels were measured using a commercial kit: PRL (Abbott).

#### *Collection of tumors and tissue processing*

At the time of surgery fat was removed and the samples were divided into three pieces: one was submitted for histologic studies and the others were frozen until receptor determinations were carried out.

The frozen tissues were weighed and then pulverized (Spex freezer/Mill, Bioblock, France). The tissue was homogenized in Tris 0.02 M, EDTA 3 mM, dithiothreitol 1 mM, azide 0.01%, pH 7.6 buffer. The homogenate was centrifuged at 800 g for 10 min and the supernatant ultracentrifuged at 105,000 g for 60 min. The supernatant (cytosol) was carefully removed with a syringe in order to avoid the floating lipid layer. The pellet (microsomal fraction) was resuspended in 25 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6 buffer. The protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.* [23] either directly in the cytosol or after extraction from the membrane with NaOH 1 M in the microsomal fraction.

#### *Hormones*

Labeling of hPRL (NPA batch 5 AFP 1582 C) was carried out with Na<sup>125</sup>I using a low concentration of chloramin T [24, 25]. [<sup>125</sup>I]hPRL was then purified on rabbit mammary gland membrane receptors as described elsewhere [20]. The specific activity was 75  $\mu$ Ci/ $\mu$ g. Ovine PRL

(NIH-P-S-15 30.5 IU/mg) was used to displace labeled hPRL. [<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -Estradiol (135 Ci/mmol) and [<sup>3</sup>H]promegestone (R<sub>5020</sub>) were purchased from New England Nuclear (Boston, MA). Non-radioactive steroids were purchased from Steraloids (Pawling, NJ).

#### *Assay of PRL R*

Four hundred micrograms of membrane proteins were incubated with approximately 200,000 counts/min of iodinated hPRL in the presence or absence of a 1000-fold excess of unlabeled oPRL (1  $\mu$ g) as described elsewhere [15, 17]. The final incubation volume was adjusted to 0.5 ml with Tris-MgCl<sub>2</sub> buffer (pH 7.6) containing 0.1% bovine serum albumin (free PRL R). Since PRL does not appear to dissociate from its receptors during membrane preparation, when it was possible desaturation of occupied receptors with MgCl<sub>2</sub> 3 M was performed before the assay of PRL sites [15] (total PRL R).

#### *Assay of estradiol receptors (ER) and progesterone receptors (PgR)*

Steroid receptors were determined by the DCC method [26]. The ER content of the diluted cytosol was determined by incubation of 100  $\mu$ l cytosol (in duplicate) with 50  $\mu$ l of four doses (10, 5, 1 and 0.5 mM) of [<sup>3</sup>H]2,4,6,7-estradiol with and without a 100-fold excess of diethylstilbestrol (DES). PR was assayed with four doses (10, 5, 1 and 0.5 mM) of [<sup>3</sup>H]R<sub>5020</sub> with and without a 100-fold excess of non-labeled R<sub>5020</sub>.

The radioactive ligands and cytosol were incubated at 4°C for 16 hr. A 500- $\mu$ l suspension of dextran-coated charcoal (DCC) (2.5 mg Norit A-activated charcoal, 250  $\mu$ g dextran in 1 ml Tris buffer, pH 8.0, 4°C) was added to each tube. Tubes were then shaken for 45 min at 0–4°C and then sedimented by centrifugation at 4°C for 20 min at 3000 rev/min. The DCC-treated supernatant was combined with 3 ml of Beckman Ready-Solv scintillator and counted in a Beckman Model LS 6800 liquid scintillation counter. The ER and PR data were analyzed by the method of Scatchard to determine the dissociation constants ( $K_d$ ) and concentrations of ER and PR in each tumor specimen, expressed as fmol of receptor/mg

Table 1. *Histological characteristics of the two populations*

	Without treatment (n = 120)	Bromocriptin treatment (n = 30)
Invasive ductal carcinomas	87 (72.5%)	24 (80%)
Invasive lobular carcinomas	14 (11.7%)	2 (6.6%)
Invasive comedocarcinomas	9 (7.5%)	2 (6.6%)
Others	10 (8.3%)	2 (6.6%)



cytosol protein. The control of ER and PR assays was performed by the EORTC Receptor Group quality control system.

#### Statistical analysis

The distributions were normal except for ER+ and PgR+ (log normal). The comparison between the two percentages was carried out using the  $\chi^2$  method with the Yates correction for small samples and the comparison between the means using Student's method.

## RESULTS

### PRL levels

Six patients supposed to have received bromocriptin treatment were excluded from the study since their levels of PRL were very high (115, 47, 160, 80, 39 and 20 ng/ml). The PRL mean plasma level was  $2.45 \pm 0.39$  S.E.M. ( $n = 30$ ) (Fig. 1).

### PRL R levels

Figure 1 presents the results obtained for PRL R in breast cancers after bromocriptin treatment compared with those of the untreated population. There is no significant difference between the two populations.

There were 49% of free PRL R-positive tumors in the untreated population and 52% in the treated one. In both cases  $\text{MgCl}_2$  treatment led to an increase in PRL R-positive tumors (80% in the untreated population and 71% in the treated one) and in PRL R levels. Surprisingly there is a slight but not statistically significant decrease in PRL R levels after bromocriptin treatment.

### ER and PgR levels

Figures 2 and 3 show the effect of bromocriptin treatment on steroid receptors in breast cancers.

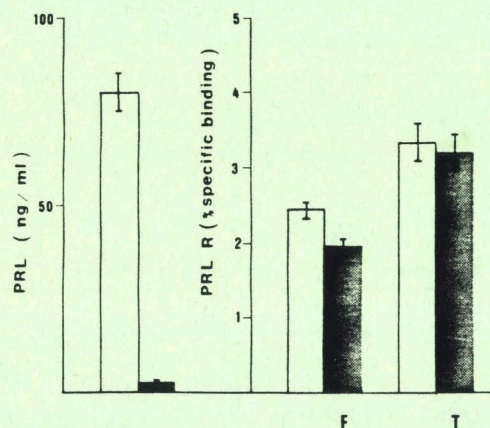


Fig. 1. Left panel: PRL mean level ( $\pm$  S.E.M.) at the time of mastectomy in patients  $\square$  untreated ( $n = 120$ ) or  $\blacksquare$  treated ( $n = 30$ ) by bromocriptin. Right panel: Free (F) PRL R and total (T) PRL R mean levels ( $\pm$  S.E.M.) in positive PRL R breast cancer of patients  $\square$  untreated or  $\blacksquare$  treated by bromocriptin.

The ER and PgR were considered positive when greater than 10 and 25 fmol/mg cytosolic protein respectively. The number of ER-positive tumors (Fig. 2) was significantly increased after treatment with bromocriptin in premenopausal women; there was a slight but not statistically significant increase in ER+ mean levels. Neither the positivity nor the mean level of PgR was changed by the treatment (Fig. 3). There was no modification of the statistical significance of the results if we analyzed ER and PR when PRL R were present.

## DISCUSSION

The present study shows that bromocriptin does not increase the available prolactin receptors

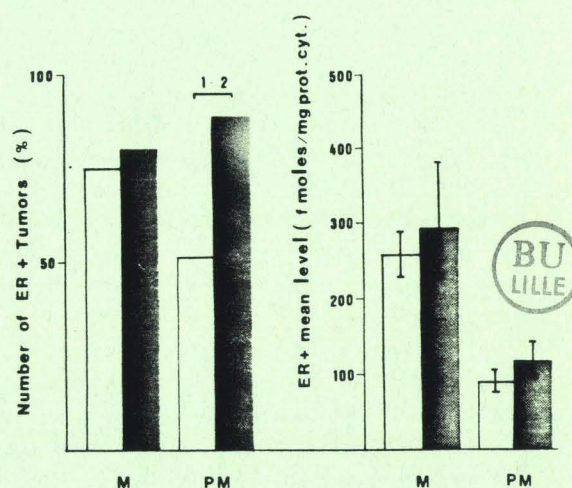


Fig. 2. Left panel: percentage of ER-positive tumors from patients  $\blacksquare$  treated or  $\square$  not treated by bromocriptin. 1:  $P = 0.04$  ( $\chi^2$ ); 2:  $P = 0.10$  ( $\chi^2$  with Yates correction). Right panel: mean levels of ER ( $\pm$  S.E.M.) in positive tumors. M: menopausal patients (untreated,  $n = 77$ ; treated,  $n = 21$ ); PM: premenopausal patients (untreated,  $n = 33$ ; treated,  $n = 9$ ).

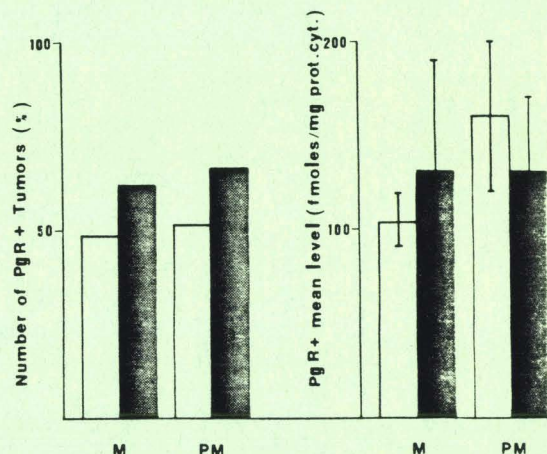


Fig. 3. Left panel: percentage of PR-positive tumors from patients  $\blacksquare$  treated or  $\square$  not treated by bromocriptin. Right panel: mean levels of PgR ( $\pm$  S.E.M.) in positive tumors. M: menopausal patients (untreated,  $n = 77$ ; treated,  $n = 21$ ); PM: premenopausal patients (untreated,  $n = 33$ ; treated,  $n = 9$ ).



in breast cancer specimens. High levels of PRL are able to induce a short-term reduction (occupancy) and down-regulation of its own receptors, in normal mammary glands, both *in vivo* [27] and *in vitro* [2, 28]. It has previously been shown that prolactin can also induce a down-regulation of its receptor levels in cultured cells from DMBA-induced tumors in rats [29]. In contrast, in NMU-induced mammary tumor explants down-regulation occurs only at non-physiological levels of PRL (20 µg/ml) [30] and markedly supra-physiological concentrations of insulin are required to down-regulate insulin receptors in tumor cell lines compared with normal cells [31]. This suggests a tumor-associated resistance to receptor down-regulation: if the rise in prolactin plasma levels during anesthesia does not induce a down-regulation in PRL R, then attempting to inhibit this reduction with anti-PRL drug is not useful.

Even after bromocriptin treatment  $\text{MgCl}_2$  3 M led to an increase in PRL R-positive tumors and in PRL R levels. This suggests that the unmasking of PRL R by  $\text{MgCl}_2$  in breast cancer [15] could be explained more by its action on cryptic receptors [32] than by the removing of endogenous PRL.

We observed a slight decrease (not statistically significant) in PRL R after bromocriptin treatment. It is well known that prolactin induces a delayed stimulatory effect on the levels of its own receptors [3, 33]. As bromocriptin was not well

tolerated by all the patients, half of them had treatment for nearly 1 week. The decrease in PRL during this time might have been long enough to induce a slight decrease in PRL R.

Finally, we observed an increase in the number of ER-positive tumors in breast cancer of premenopausal women. It has been published previously that prolactin increases the ER levels in DMBA-induced tumors [34], in human breast cancer cells in long-term cultures [35] and in normal mouse mammary tissue [36]: PRL causes the conversion of cytoplasmic ER from inactive (4S) to active (8S) forms and elevates nuclear receptor levels. Thus we could postulate that bromocriptin, which blocks PRL production, inhibits ER translocation and increases cytoplasmic ER forms in breast cancers.

The main contribution provided by the present work is a clear demonstration of the inefficiency of bromocriptin in unmasking prolactin receptors in breast cancer. The effect of this drug on ER levels has to be largely confirmed before a short-term bromocriptin treatment should be proposed to improve ER detection in premenopausal women.

**Acknowledgements**—The oPRL, hGH and hPRL were kindly supplied by the NIADDK. The expert technical assistance of Marie-Michèle Delepierre and Joëlle Fournier is gratefully acknowledged. The authors are grateful to Mrs Vendel for secretarial assistance.

## REFERENCES

1. Topper YJ, Freeman CS. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Phys Rev* 1980, **60**, 1049–1106.
2. Djiane J, Houdebine LM, Kelly PA. Correlation between prolactin–receptor interaction, down-regulation of receptors and stimulation of casein and deoxyribonucleic acid biosynthesis in rabbit mammary gland explants. *Endocrinology* 1982, **110**, 791–795.
3. Djiane J, Durand P, Kelly PA. Evolution of prolactin receptors in rabbit mammary gland during pregnancy and lactation. *Endocrinology* 1977, **100**, 1348–1356.
4. Shiu RPC, Friesen HG. Properties of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland. *Biochem J* 1974, **140**, 301–311.
5. Meites J. Relation of the neuro-endocrine system to the development and growth of experimental mammary tumors. *J Neural Trans* 1980, **48**, 25–42.
6. Welsch CW, Nagasawa H. Prolactin and murine mammary tumorigenesis. A review. *Cancer Res* 1977, **37**, 951–963.
7. Kelly PA, Bradley C, Shiu RPC, Meites J, Friesen HG. Prolactin binding to rat mammary tumor tissue. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974, **146**, 816–819.
8. Turcot-Lemay L, Kelly PA. Characterization of estradiol, progesterone and prolactin receptors in nitrosomethylurea-induced mammary tumors and effect of anti-estrogen treatment on the development and growth of these tumors. *Cancer Res* 1980, **40**, 3232–3240.
9. Nagasawa H. Prolactin and human breast cancer: a review. *Eur J Cancer* 1979, **15**, 267–279.
10. Holdaway IM, Friesen HG. Hormone binding by human mammary carcinoma. *Cancer Res* 1977, **37**, 1946–1952.



11. Stagner JI, Jochimsen PR, Sherman BM. Lactogenic hormone binding in human breast cancer: correlation with estrogen receptor. *Clin Res* 1977, **25**, 302A.
12. Pearson OH, Manni A, Chambers M, Brodkey J, Marshall JS. Role of pituitary hormones in the growth of human breast cancer. *Cancer Res* 1978, **38**, 4323-4326.
13. Di Carlo R, Mucciolo G. Prolactin receptor in human mammary carcinoma. *Tumori* 1979, **65**, 695-702.
14. Partridge RK, Hahnel R. Prolactin receptors in human breast carcinoma. *Cancer* 1979, **43**, 643-646.
15. Peyrat JP, Dewailly D, Djiane J *et al*. Total prolactin binding sites in human breast cancer biopsies. *Breast Cancer Res Treat* 1981, **1**, 369-373.
16. Rae Venter B, Nemoto T, Schneider SL, Dao TL. Prolactin binding by human mammary carcinoma: relationship to estrogen receptor protein concentration and patient age. *Breast Cancer Res Treat* 1981, **1**, 233-243.
17. Bonnetterre J, Peyrat JP, Vandewalle B, Beuscart R, Vie MC, Cappelaere P. Prolactin receptors in human breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1982, **18**, 1157-1162.
18. Turcot-Lemay L, Kelly PA. Prolactin receptors in human breast tumors. *JNCI* 1982, **68**, 381-383.
19. Dhadly MS, Walker RA. The localization of prolactin binding sites in human breast tissue. *Int J Cancer* 1983, **31**, 433-437.
20. Peyrat JP, Djiane J, Kelly PA, Vandewalle B, Bonnetterre J, Demaille A. Hormonal specificity of prolactin receptors in human breast cancer. *J Steroid Biochem* 1983, **19S**, 185.
21. Noel GL, Suh HK, Stone JG, Frantz AG. Human prolactin and growth hormone release during surgery and other conditions of stress. *J Clin Endocrinol Metab* 1972, **35**, 840.
22. Morgan L, Barrett A, Beswick F, Hollway T, Raggatt PR. Prolactin concentrations during anesthesia. *Br Med J* 1976, **2**, 980.
23. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, **193**, 265-275.
24. Greenwood FC, Hunter WH, Glover JS. The preparation of <sup>131</sup>I labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* 1963, **89**, 114-123.
25. Kelly PA, Leblanc G, Djiane J. Estimation of total prolactin binding sites after *in vitro* desaturation. *Endocrinology* 1979, **104**, 1631-1638.
26. EORTC Breast Cancer Cooperative Group. Standards for the assessment of estrogen receptors in human breast cancer. *Eur J Cancer* 1973, **9**, 379-381.
27. Djiane J, Clauser H, Kelly PA. Rapid down regulation of prolactin receptors in mammary gland and liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1979, **90**, 1371-1378.
28. Djiane J, Delouis C, Kelly PA. Prolactin receptors in organ culture of rabbit mammary gland: effect of cycloheximide and prolactin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979, **162**, 342-345.
29. Costlow ME, Gallagher PE, Koseky Y. Prolactin receptors in primary cultures of carcinogen induced rat mammary tumors. *Mol Cell Endocrinol* 1979, **14**, 81-97.
30. Gandilhon P, Melancon R, Gandilhon F, Djiane J, Kelly PA. Prolactin receptors in *N*-nitroso-*N*-methylurea-induced rat mammary tumors: relationship to tumor age and down-regulation in short term explant culture. *Anticancer Res* 1983, **3**, 203-206.
31. Mountjoy KG, Holdaway IM, Finlay GJ. Insulin receptor regulation in cultured human tumor cells. *Cancer Res* 1983, **43**, 4537-4542.
32. Costlow ME, Hamble A. Prolactin receptors in cultured rat mammary tumor cells. Energy dependent uptake and degradation of hormone receptors. *J Biol Chem* 1982, **257**, 9330-9334.
33. Gandilhon P, Melancon R, Djiane J, Kelly PA. *N*-Nitroso-*N*-methylurea-induced mammary tumors in the rat: role of prolactin and antiprolactin drug. *JNCI* 1983, **70**, 105-109.
34. Vignon F, Rochefort H. Regulation of estrogen receptors in ovarian dependent rat mammary tumors. I—Effect of castration and prolactin. *Endocrinology* 1976, **98**, 722-729.
35. Shafie S, Brooks SC. Effect of prolactin on growth and the estrogen receptor level of human breast cancer cells (MCF-7). *Cancer Res* 1977, **37**, 792-799.
36. Muldoon TG. Interplay between estradiol and prolactin in the regulation of steroid hormone receptor levels, nature, and functionality in normal mouse mammary tissue. *Endocrinology* 1981, **109**, 1339-1346.

## **Article V**



## Stimulation of DNA Synthesis by Prolactin in Human Breast Tumor Explants. Relation to Prolactin Receptors

J.P. PEYRAT, J. DJIANE\*, J. BONNETERRE, B. VANDEWALLE, Ph. VENNIN, A. DELOBELLE, G. DEPADT, and J. LEFEBVRE

*Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale, Centre de Lutte Contre le Cancer de la Région Nord, BP 307 - 59020, Lille Cedex; \* Laboratoire de Physiologie de la Lactation, CNRS - INRA, 78350 Jouy-en-Josas. France*

**Abstract.** Breast-cancer tissue from 38 patients was tested for prolactin sensitivity by measuring both 16-hour ( $^3\text{H}$ )dT incorporation in tissue fragments during 24-hour organ cultures, and prolactin receptors in tumor specimens. We observed a stimulation of DNA synthesis by prolactin in 6/38 (16%) cases; the stimulation was maximum with physiological concentrations of prolactin (0.05 to 0.2  $\mu\text{g/ml}$  medium). The stimulation of DNA synthesis never occurred in the absence of prolactin receptors. There is no relation between the response to prolactin and estradiol or progesterone receptor levels, but in four cases the stimulation was observed when the three receptors were present. Finally, the response to the stimulation was independent of the clinical stage of the patient.

Prolactin (PRL) is a major hormone implicated in mammary development, lactogenesis (1) as well as mammary tumor development (2,3,4). The role of PRL in human breast cancer has not been established. Results are often controversial but there are several lines of evidence which suggest that PRL may play a role in induction and/or growth of human breast cancers (5).

The initial event of PRL effect is its binding to specific membrane receptors. Therefore, PRL receptor (PRL R) assay as a quantitative index of PRL responsiveness of breast cancer has been developed. We and others have demonstrated that PRL binding is detectable in more than 50% of the tumors (6,7,8,9,10,11,12,13,14). The binding sites have all the characteristics of PRL R (15). Explants of human breast, both normal and neoplastic, can be maintained in organ culture (16,17). Such an *in vitro* method has been used to determine whether human mammary cancer tissue responds to hormones (18). It was found that mammary cancer tissues in approximately 15% of patients respond to PRL with an in-

crease in deshydrogenase activity (19) and DNA synthesis (20). Other authors did not confirm these results (21,22,23).

The aim of this work is to determine tentatively whether PRL R can be considered as an index of mammary cancer cells sensitivity to PRL. For this purpose, the presence of PRL R and DNA synthesis response to PRL are simultaneously determined.

### Materials and Methods

**Collection of tumors.** Tumor specimens were obtained from 38 patients undergoing surgery for primary breast cancer in the "Centre de Lutte Contre le Cancer de Lille" (France). At the time of collection, fat was removed and the samples were divided into three pieces: one was submitted for histologic studies, and the second was frozen until receptor determinations were carried out. The last fragment was placed in ice-cold medium 199 (Seromed) supplemented with penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100  $\mu\text{g/ml}$  and amphotericin B 250  $\mu\text{g/ml}$ . All the tumors were adenocarcinomas.

**Organ culture.** Explants were prepared for cultivation within one hour of removal. The breast cancer was placed in a sterile Petri dish under a laminar flow hood. All damaged and fatty tissue was removed and the rest was entirely cut into small fragments of 1  $\text{mm}^3$ . The explants were picked at random and placed on a stainless steel grid (approximately 20 explants per grid). Each grid was placed in an explant Petri dish (Falcon). Medium 199, containing glucose (2 g/l), an excess of essential amino acids (four times the usual concentration of amino acids in the medium), and bicarbonate (2.2 g/liter), were added to the dishes to cover the grids, taking care not to cover the explants entirely. The Petri dishes were placed in an incubator at 37° C under a controlled atmosphere of 57%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 38%  $\text{N}_2$ . The explants were cultured up to 24 h in the presence of insulin (5  $\mu\text{g/ml}$ , sigma), cortisol (500 ng/ml, steraloids) without (for control) or with ovine PRL (oPRL NIH P-S-15, 30.5 IU/mg) at different concentrations (0.1 -10  $\mu\text{g/ml}$ ).

**DNA synthesis.** For each tumor DNA synthesis was estimated by adding ( $^3\text{H}$ ) thymidine (New England Nuclear NET 027X, 20 Ci/mmol - 2.5  $\mu\text{Ci/ml}$ ) to culture medium with or without PRL (eight concentrations) and measuring the incorporation into DNA for the last sixteen hours. At the end of the incubation the explants were solubilized in 0.3 N NaOH overnight at 37° C, the DNA was precipitated with 5% trichloroacetic acid and collected on glass fiber filters (24). The radioactivity was estimated by scintillation counting.

**Prolactin receptor determination.** Crude membrane preparations were obtained after differential centrifugation as described previously (11,14).

Reprint requests to: Dr. J.P. Peyrat.

**Key Words:** Prolactin, receptors, DNA synthesis, human breast cancer.



The 105,000g pellet was resuspended in Tris buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) and an aliquot was taken to determine protein content (25). Specific binding was estimated by incubating 400 µg membrane protein with 200,000 cpm <sup>125</sup>I labeled human Growth Hormone (hGH NIH HS 22043; 2 IU/mg) in the absence or presence of an excess amount (1 µg) of unlabeled oPRL for 16 h at 20° C (11).

**Assay of Estradiol Receptors (ER) and Progesterone Receptors (PgR).** Steroid receptors were determined by the DCC method (11). Scatchard analysis of binding data was performed in order to quantify the receptors. For ER tritiated estradiol (NEN) was used; non-specific binding was estimated from incubations with an excess of unlabelled DES which avoids interference with TeBG. PgR were assayed using tritiated and non radioactive R 5020 (11).

**Histological procedures.** All biopsy specimens were taken for histological examination. The conservation of the tissue was controlled at the end of 24-h cultivation.

## Results

**Thymidine incorporation.** Fig 1 shows an example of the increase in DNA synthesis as a function of PRL concentration. Results are comparable if DNA or protein content are used to estimate the amount of tissue. The

maximum and significant responses for DNA synthesis were obtained at the PRL concentration of 100 ng/ml ( $p < 0.01$  compared to the control). At concentrations equal or superior to 500 ng/ml, PRL has no effect or an inhibitory effect. We detected 6/38 (16%) cancers that respond to PRL by an increase in DNA synthesis. This stimulation occurred between 50 and 200 ng/ml of PRL. If results are expressed as the percentage of stimulation over control, two cancers responded by more than a 250% stimulation and the 4 others responded by a stimulation of 150 to 250%.

**Relation between stimulation of DNA synthesis, PRL R (Table I), ER and PgR (Table II).** We are in possession of PRL R results for 34 breast cancers. Tumors whose specific binding was greater than 0.8% were considered positive (PRL R+). Nineteen tumors were positive (55%) according to findings previously reported (11). A significant relationship ( $\chi^2$  test,  $p < 0.01$ ) exists between the presence of PRL receptors and the response to PRL as stimulation of DNA synthesis was never seen in the absence of PRL R. In 13 cases there was no response to

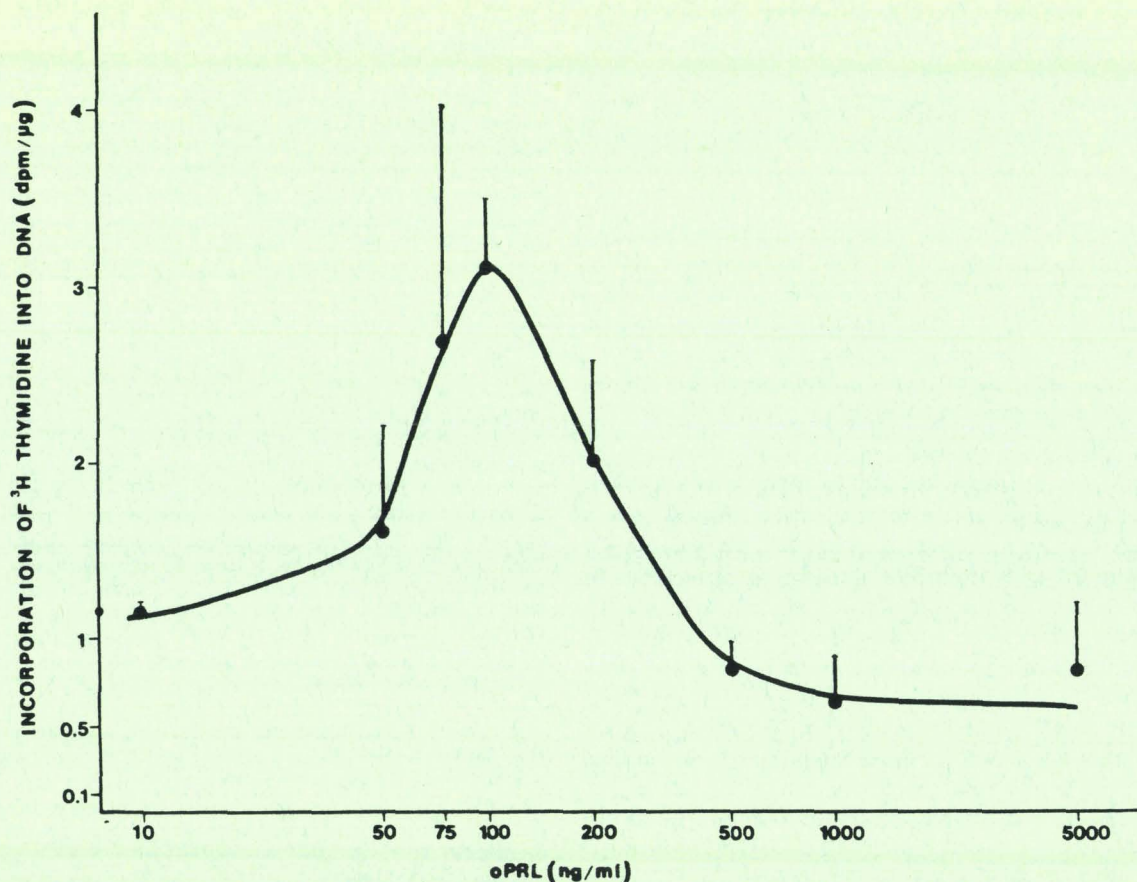


Fig. 1: Induction of DNA synthesis by increasing concentrations of PRL in breast cancer. DNA synthesis was estimated by the 16-hour incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine (2.5 µCi/ml) into DNA during 24 hours. Results are expressed as the ratio of stimulation on control. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent cultures.



Table I. Relationship between stimulation of DNA synthesis *in vitro* and prolactin receptors (PRL R).

	Number of cancers	Stimulation of DNA synthesis by PRL
PRL R+	19	6
PRL R-	15	0

Table II. Relationship between stimulation of DNA synthesis, estradiol receptors (ER) and progesterone receptors (PgR).

	Number of cancers	Stimulation of DNA synthesis by PRL
ER+ PgR+*	16	4
ER+ PgR-	9	0
ER- PgR+	6	1
ER- PgR-	7	1

\* ER > 10 fmoles/ng of cytosolic proteins  
PgR+ > 25 fmoles/ng of cytosolic proteins.

Table III. Relationship between histological classification of adenocarcinomas and *in vitro* DNA synthesis response to PRL.

	Number of cancers	Number of responses
Infiltrating ductal carcinoma	27	3
Infiltrating comedocarcinoma	4	1
Infiltrating lobular carcinoma	3	0
Tubular carcinoma	1	0
Medullary carcinoma	2	2
Apocrine carcinoma	1	0

PRL while PRL R were present. There was no significant relationship ( $\chi^2$  test) between the presence of estradiol or/and progesterone receptors and the DNA synthesis stimulation in response to PRL. The response to a PRL stimulation occurred four times when PRL R, ER and PgR were present together.

*Stimulation of DNA synthesis and clinical and pathological features:* Table III shows the relationship between histological classification and DNA synthesis response to PRL. Most of the adenocarcinomas were infiltrating ductal carcinomas, 3 of them responding to PRL stimulation. One comedocarcinoma responded to PRL stimulation and also the two medullary carcinomas. Relationships with pathological differentiation, histoprosthetic grading and cellular density were determined for infiltrating ductal carcinomas and comedocarcinomas (Table IV). There is no relationship between cellular density, differentiation, histoprosthetic grading. Finally, there is

Table IV. Relationship between histological parameters and DNA synthesis response to PRL\*.

		Number of tumors	Number of stimulations
Cellular density	1	8	1
	2	23	3
	3	0	0
Differentiation	well	8	2
	mean	9	1
	bad	14	1
Histoprosthetic grading	1	2	0
	2	21	3
	3	8	1

\* These parameters are not determined for cancers with particular histological forms.



no relation between response to stimulation and axillary metastasis.

## Discussion -Conclusion

A number of publications have presented data in terms of *in vitro* response to hormones and chemotherapy of human solid tumors. Advantages as well as disadvantages in human breast cancer explant culture method have been extensively discussed; the maintenance of explants for 24-h have been demonstrated (17,18,26,27,28,29). We confirm the 24-h viability of explants in M199 containing insulin and cortisol by comparison of the tumour histology before and after culture. The use of thymidine incorporation as an index of DNA synthesis in breast cancer explants can be misleading, since the uptake of label into cells from different parts of the same slice of tumor can be very different (30). Specifically for this reason we cut the tumor entirely and picked explants at random to place them on the grid. In spite of this SEM's shown in Fig. 1 are still large.

It has been observed that breast-cancer tissue shows varying 1-hour ( $^3\text{H}$ )-dT uptake during the first 48 h of cultivation (18); for this reason we labeled tissue with ( $^3\text{H}$ )-dT for 16 h to be sure that a sufficient number of cells were labeled in particular when passing or entering the S phase synchronously. When it was possible (five cases), we cultured tissue for 48 h and 72 h with ( $^3\text{H}$ )-dT labeling on the 16 last hours; we did not observe any difference with the results obtained under standard conditions (data not shown).

Our experiments performed on breast cancers in organ culture show that the addition of PRL to a medium containing insulin and hydrocortisone stimulates the DNA synthesis in some samples (16%). Similar results have been previously reported. Salih *et al* (19) reported



that 40% (16/50) of breast cancer carcinomas in organ culture responded to PRL at physiological concentrations by an increase in deshydrogenase activity (enzyme involved in nucleotide biosynthesis). Using this technique Beedy *et al* (23) were unable to demonstrate significant effects due to PRL (1 µg/ml) and Masters *et al* (22) were able to demonstrate *in vitro* PRL sensitivity in only 10 out of 83 breast cancers. Welsch *et al* (20) found that only a small fraction (15%) of these human breast carcinomas responded to oPRL (10 µg/ml) by increasing the incorporation of <sup>3</sup>H thymidine into DNA. Other *in vitro* studies on breast cancer cell lines or in primary culture have attempted to evaluate the potential of lactogenic hormones as a growth stimulant. It has been reported that PRL does not promote growth in various breast cancer cell lines (31,32). Several reports have recently demonstrated a growth effect of pharmacological (1 µg/ml) (33) or physiological (0.1 µg/ml) (34) quantities of PRL on cultured malignant human mammary epithelial cells.

We observed the maximal effect using physiological levels of PRL (0.05 to 0.2 µg/ml of medium). Similar results have been found in rat mammary tumor explants (35). At 1 µg/ml, we never detected any stimulation of DNA synthesis and at times (10 µg/ml), we observed an inhibition of the <sup>3</sup>H T incorporation: a similar observation has been reported by Salih *et al* (19). The conflicting results with regard to the stimulation of DNA synthesis in breast cancer by PRL could be, in part, explained by the differences in the concentration of PRL used in the different studies: either physiological doses (19,34) or pharmacological doses (22,23,36). In particular the real concentrations of prolactin in the medium of culture had to be determined as we noticed that 20 to 40% of PRL could be retained on the sterile filter.

Most of these investigations concerning the effect of PRL on human breast cancers have, like our own, used oPRL since hPRL is not available in great quantity. We have shown that lactogenic hormones: oPRL, hPRL, hGH are able to compete the binding of <sup>125</sup>I hPRL to breast cancer membrane receptors (15). However, it has not been shown clearly whether hPRL and oPRL have comparable effects on mammary cell growth. General conformational properties of the different mammalian prolactins are closely related to each other, but rates of proteolytically induced conformational collapse are found to be different (37): this could explain different efficiencies in prolactins. Recently, Malarkey *et al* (34) found that hPRL was able to stimulate tumor cell growth while oPRL in similar concentrations had no growth effect. Dilley and Kister (36) have found that hPRL but not oPRL (5 µg/ml) stimulated growth of normal human breast tissue in organotypic culture. These results contrast with the observations of Klevjer-Anderson and Buehring (32) who had in fact found similar activities for oPRL, hPRL, and hGH in their breast primary culture. Kleinberg *et al* (38) reported that hPRL is

twice as potent as oPRL in stimulating alpha-lactalbumin production in subhuman normal mammary tissue. In the same model hGH is 5 times more potent than oPRL after a 1 µg/ml hormone stimulation (39).

We found PRL R in 19/24 (55%) of the tumors; this is in good agreement with our previous results (11). The stimulation of DNA synthesis occurred only in the presence of PRL R. In 13 cases, in spite of the presence of PRL R no stimulation could be seen. These results show that the presence of receptors is necessary but not sufficient to obtain a stimulation by prolactin, and could explain why no stimulation of cell proliferation had been found in some studies (31).

Finally, it appeared that the response to a PRL stimulation occurred most frequently when ER and PgR were present; suggesting that the sensitivity to PRL was better when all the hormonal functions of the epithelial cells were conserved.

# Acknowledgements

The oPRL, hGH and hPRL were kindly supplied by the NIADDK. The expert technical assistance of Marie-Michele Delepierre and Joelle Fournier is gratefully acknowledged. The authors are grateful to Mrs Vendel for secretarial assistance. These studies were supported by the "Association pour le Développement de la Recherche contre le Cancer".

# References

- Topper YJ and Freeman CS: Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiological Reviews* 60: 1049-1106, 1980.
- Welsch CW and Nagasawa H: Prolactin and murine mammary tumorigenesis. A review. *Cancer Res* 37: 951-963, 1977.
- Rose DP, Gottardis M, and Nooman JJ: Rat mammary carcinoma regressions during suppression of serum growth hormone and prolactin. *Anticancer Res* 3: 323-325, 1983.
- Briand P: Hormone-dependent mammary tumors in mice and rats as a model for human breast cancer. *Anticancer Res* 3: 273-282, 1983.
- Nagasawa H: Prolactin and human breast cancer: A review. *Eur J Cancer* 15: 267-279, 1979.
- Holdaway IM and Friesen HG: Hormone binding by human mammary carcinoma. *Cancer Res* 37: 1946-1952, 1977.
- Stagner JJ, Jochimsen PR, and Sherman BH: Lactogenic hormone binding in human breast cancer: correlation with estrogen receptor. *Clin Res* 25: 302A, 1977.
- Pearson OH, Manni A, Chambers M, Brodkey J, and Marshall JS: Role of pituitary hormones in the growth of human breast cancer. *Cancer Res* 38: 4323-4326, 1978.
- Di Carlo R and Muccioli G: Prolactin receptors in human mammary carcinoma. *Tumori* 65: 695-702, 1979.
- Partridge RK and Hahnel R: Prolactin receptors in human breast carcinoma. *Cancer* 43: 643-646, 1979.
- Peyrat JP, Dewailly D, Djiane J, Kelly PA, Vandewalle B, Bonnetterre J, and Lefebvre J: Total prolactin binding sites in human breast cancer biopsies. *Breast Cancer Res Treat* 1: 369-373, 1981.
- Rae-Venter B, Nemoto T, Schneider SL, and Dao TL: Prolactin binding by human mammary carcinomas: relationship to estrogen receptor protein concentration and patient age. *Breast Cancer Res Treat* 1: 233-243, 1981.
- Turcot Lemay L and Kelly PA: Prolactin receptors in human breast tumors. *J Nat Cancer Inst* 68: 381-383, 1982.
- Bonnetterre J, Peyrat JP, Vandewalle B, Beuscart R, Vie MC, and Cappelaere P: Prolactin receptors in human breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 18: 1157-1162, 1982.
- Peyrat JP, Djiane J, Kelly PA, Vandewalle B, Bonnetterre J, and Demaille A: Hormonal specificity of prolactin receptors in human breast cancer. *J Steroid Biochem* 195: 185, 1983.
- Ceriani RL, Contesso GP, and Nataf BH: Hormone requirement for growth and differentiation of human mammary gland in organ culture. *Cancer Res* 32: 2190-2196, 1972.
- Lagios MD: Hormonally enhanced proliferation of human breast cancer in organ culture. An *in vitro* system for assessment of specific hormonal response. *Oncology* 29: 22-23, 1974.
- Poulsen HS, Bichel P, and Andersen J: Short term culture of human breast cancer: *in vitro* effects of hormones related to patient response. *Brit J Cancer* 46: 67-74, 1982.
- Salih H, Flax H, Brander W, and Hobbs JR: Prolactin dependence in human breast cancers. *Lancet* 25: 1103-1105, 1972.



- 20 Welsch CW, De Itturi C, and Brenman MJ: DNA synthesis of human, mouse and rat mammary carcinomas *in vitro*. Influence of insulin and prolactin. *Cancer* 38: 1272-1282, 1977.
- 21 Heuson JC, Pasteels JL, Legros N, Heuson-Stiennon J, and Leclercq G: Estradiol-dependent collagenolytic enzyme activity in long-term organ culture of human breast cancer. *Cancer Res* 35: 2039-2048, 1975.
- 22 Masters JRW, Sangster K, Smith H, and Forrest APM: Human breast carcinoma in organ cultures: the effect of hormones. *Br J Cancer* 33: 564-566, 1976.
- 23 Beedy DL, Easty GC, Gazet JC, Grigor K, and Neville AM: An assessment of the effects of hormones on short term organ cultures of human breast carcinoma. *Brit J Cancer* 31: 317-328, 1975.
- 24 Houdebine LM: Effect of various lysosomotropic agents and microtubule disrupting drugs on the lactogenic and the mammogenic action of PRL. *Eur J Cell Biol* 22: 755-760, 1980.
- 25 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A, and Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
- 26 Wellings SR and Jentoft VL: Organ cultures of normal, dysplastic, hyperplastic and neoplastic human mammary tissues. *J Nat Cancer Inst* 49: 329-338, 1972.
- 27 Finkelstein M, Geier A, Horn H, Levij IS, and Ever-Hadani P: Effect of testosterone and estradiol 17 B on synthesis of DNA, RNA and protein in human breast in organ culture. *Int J Cancer* 15: 78-90, 1975.
- 28 Pasteel JL, Heuson-Stiennon JA, Legros N, Leclercq G, and Heuson JC: Organ culture of human breast cancer. *In* Breast cancer: trends in research and treatment (Heuson JC, Matthei WH, and Rozenzweig M, eds) New York, Raven Press, 1976, pp 141-150.
- 29 Duncan JN, Davis JC, Wade AP, and Walker S: Short term organ culture of human breast tumour tissue and its application in studies of steroid metabolism. *Eur J Cancer Clin Oncol* 17: 1133-1142, 1981.
- 30 Smallwood SA, Cooper A, and Taylor I: The errors of thymidine labelling in breast cancer. *Clin Oncol* 9: 331-335, 1983.
- 31 Lippman ME, Osborne CK, Knazek R, and Young N: *In vitro* model systems for the study of hormone dependent human breast cancer. *N Engl J Med* 296: 154-159, 1977.
- 32 Shafie S and Brooks SL: Effect of PRL on growth and the estrogen receptor level of human breast cancer cells (MCF-7). *Cancer Res* 37: 792-799, 1977.
- 33 Klevjer-Anderson P, Buehring GC: Effect of hormones on growth rates of malignant and non malignant human mammary epithelia in cell culture. *In Vitro* 16: 491-501, 1980.
- 34 Malarkey WB, Kennedy M, Allred LE, and Milo G: Physiological concentrations of prolactin can promote the growth of human breast tumor cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 56: 673-677, 1983.
- 35 Edery M, Djiane J, Houdebine LM, and Kelly PA: Prolactin-like activity of antiprolactin receptor antibodies in rat mammary tumor explants. *Cancer Res* 43: 3170-3174, 1983.
- 36 Dilley WG and Kister SH: *In vitro* stimulation of human breast tissue by human PRL. *J Natl Cancer Inst* 35: 2039-2048, 1975.
- 37 Bewley TA and Li CH: Studies on prolactin: conformational comparison of human, equine and porcine pituitary prolactin. *Arch Biochem Biophys* 227: 618-625, 1983.
- 38 Kleinberg DL and Todd J: Alpha-lactalbumin in human and subhuman primate normal mammary tissue and in human breast cancer as a marker for prolactin activity. *Cancer Res* 38: 4318-4322, 1978.
- 39 Kleinberg DL and Todd J: Evidence that human growth hormone is a potent lactogen in primates. *J Clin Endocrinol Metab* 51: 1009-1013, 1980.

Received May 22, 1984

## **Article VI**

PROLACTIN RECEPTORS AND LACTALBUMIN PLASMA PRODUCTION  
IN HUMAN BREAST CANCERS

---

JP. PEYRAT\*, J. BONNETERRE, B. VANDEWALLE, Ph. VENNIN, A. LESOIN  
and J. LEFEBVRE

Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale  
Centre de Lutte Contre le Cancer de la Région Nord  
(Centre Oscar Lambret)  
1, Rue F. Combemale, BP 307, 59020 Lille Cédex (France)

\* To whom requests for reprints should be addressed



Animal studies have shown that prolactin (PRL) is an important hormone controlling the growth and synthetic activity of the normal mammary cell (1,2). In man, it has been demonstrated that PRL is required for the stimulation of lactalbumin production. Lactalbumin is a major protein component of human milk that acts as the specifier, or B protein, for the lactose synthetase system (3,4).

The actions of PRL are mediated by specific membrane receptors (2). The role of PRL in human breast cancer has not yet been established (5). We have demonstrated that PRL receptors (PRL R) are detectable in about 50 % of the tumors (6,7). Approximately 25 % of breast cancer patients have detectable lactalbumin in their serum (3) but whether PRL is involved in lactalbumin production is controversial (3,5).

The aim of this study was to determine if lactalbumin production was controlled by prolactin. For this, we have assayed simultaneously PRL R in breast cancers and lactalbumin in the serum of patients.

#### MATERIALS AND METHODS

. Patients, collection of tumor : All patients (n=136) were seen at the "Centre Oscar Lambret" (the anticancer Center of the North of France). Tumor specimens were obtained from women undergoing surgery for primary breast cancer. At the time of surgery, fat was removed and the tumor was frozen in liquid nitrogen.

. Radioimmunoassay of lactalbumin : Human alpha-lactalbumin was a generous gift of Doctor B. RIBADEAU-DUMAS (Laboratoire de Biochimie et Technologie Laitières, INRA, Jouy-en-Josas, France). It was prepared by a method adapted from KLEINBERG et al. (10). Antisera to this pure alpha-lactalbumin were raised in "Geant des Flandres" rabbits by injecting 1 mg of protein in 1 ml of complete Freund's adjuvant at days 1, 30, 60. At 90 days a booster was given and antibody titers were examined 1 week later.

Labelling of lactalbumin was carried out with Na <sup>125</sup>I using a low concentration of chloramin T. The standard curve is described in fig 1. Other proteins (lysosyme, lactoferrin, human casein, prolactin and gammaglobulin ; 1 µg/ml) did not cause displacement. The assays on the samples were run in duplicate using 50 µl of serum. The intra-assay precision was 5 % and the inter-assay precision was 10 %. As falsely high results can be caused by cross reacting human antibodies to bovine lactalbumin (6), serum that were able to bind <sup>125</sup>I human alpha-lactalbumin were eliminated.



. Assay of PRL R : It has already been extensively described (7,8). Four hundred micrograms of membrane protein prepared from the frozen tissue were incubated with 200 000 cpm of iodinated hGH in the presence or the absence of a 1000 fold excess of unlabeled oPRL. PRL R were considered as positive when 1000 cpm were specifically bound.

## RESULTS

Fig 1 shows the standard curve for human lactalbumin. The sensitivity of the assay is 2 ng/ml of lactalbumin per ml of serum.

Table 1 shows that PRL R were detected in 34 % (46/136) of the tumors and lactalbumin in 27 % (37/136) of the patients. There was no relation ( $X_2$  test) between the presence of PRL R in breast cancer and lactalbumin in serum.

## DISCUSSION, CONCLUSION

It has been proposed that milk protein synthesis in human breast cancers might indicate a functional hormone receptor mechanism (5) and could therefore select tumours responsive to endocrine therapy. It has been shown that lactalbumin production in most cases cannot be stimulated by PRL in malignant breast tissue (3,5) : this might have indicated absence or deficiency of PRL R in malignant tissue. This work shows that in human breast cancer the presence of PRL R is not necessary for alpha-lactalbumin production suggesting that this protein synthesis is no longer under PRL control.

## REFERENCES

1. TOPPER, Y.J. and C.S. FREEMAN 1980. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Phys. Rev.* 60: 1049-1106.
2. DJIANE, J., L.M. HOUEBINE and P.A. KELLY 1982. Correlation between prolactin-receptor interaction, down-regulation of receptors and stimulation of casein and deoxyribonucleic acid biosynthesis in rabbit mammary gland explants. *Endocrinology* 110: 791-795.
3. KLEINBERG, D.L. and J. TODD 1978. Alpha-lactalbumin in human and subhuman primate normal mammary tissue and in human breast cancer as a marker for prolactin activity. *Cancer Res.* 38: 4318-4322.
4. WILSON, G.D., K.L. WOODS, R.A. WALKER and A. HOWELL 1980. Effect of prolactin on lactalbumin production by normal and malignant human breast tissue in organ culture. *Cancer Res.* 40: 486-488.



5. NAGASAWA H. 1979. Prolactin and human breast cancer : a review. *Eur. J. Cancer* 15: 267-279.
6. WOODS, K.L. and D.A. HEATH 1978. The interference of endogenous antibodies to bovine lactalbumin in the radioimmunoassay of human lactalbumin in serum. *Clinical Chimica Acta* 84:207-211.
7. PEYRAT, J.P., J. DJIANE, P.A. KELLY, B. VANDEWALLE, J. BONNETERRE and A. DEMAILLE 1984. Characterization of prolactin receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* (in press).
8. BONNETERRE, J., J.P. PEYRAT, B. VANDEWALLE, R. BEUSCART, M.C. VIE and P. CAPPELAERE 1982. Prolactin receptors in human breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 18: 1157-1162.
9. WOODS, K.L., D.H. COVE, J.M. MORRISON and D.A. HEATH 1979. The investigation of lactalbumin as a possible marker for human breast cancer. *Eur. J. Cancer* 15: 47-51.
10. KLEINBERG, D.L., J. TODD and M.L. GROVES 1977. Studies in human alpha-lactalbumin : radioimmunoassay measurements in normal human breast and breast cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45: 1238-1250.



TABLE 1  
PRL R STATUS AND ALPHA-LACTALBUMIN PRODUCTION  
IN 136 HUMAN BREAST CANCERS

	PRL -	PRL + <sup>1</sup>
lactalbumin -	65	34
lactalbumin + <sup>2</sup>	25	12

<sup>1</sup> > 1000 cpm of specific binding

<sup>2</sup> > 2 ng/ml

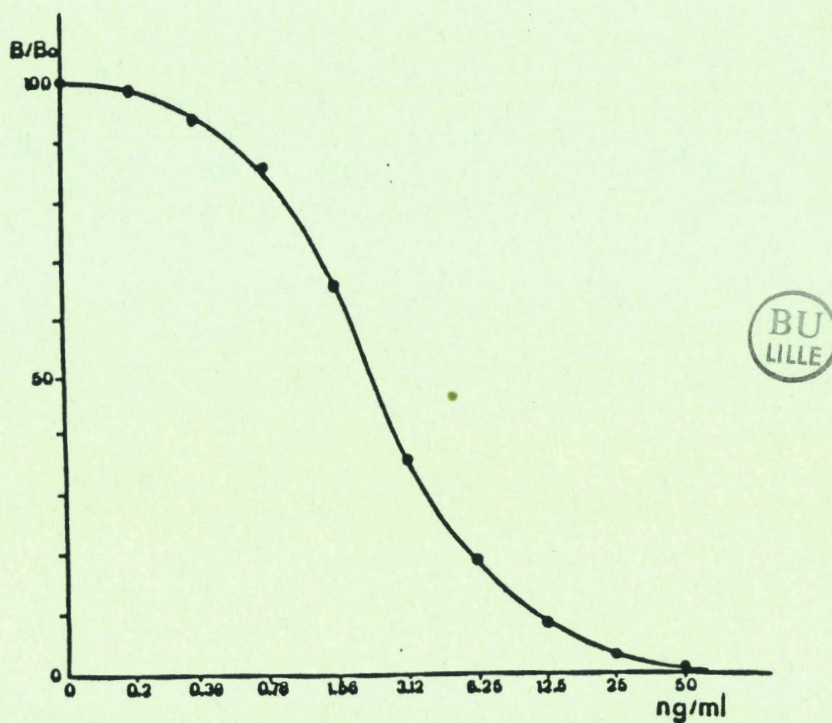


Fig 1 : Standard curve for human alpha-lactalbumin assay. <sup>125</sup>I lactalbumin (20 000 cpm) was incubated with 100 µl of antisera (1/30 000 initial concentration) in presence or absence of cold lactalbumin. 50 µl of human lactalbumin free serum were added to each point. The final volume is 600 µl. Incubation : 15 h 30° C. Precipitation with polyethylene glycol (PEG) at a final concentration of 12,5 %.

## **Article VII**



# Prolactin Receptors in Human Breast Cancer

J. BONNETERRE,\* J. PH. PEYRAT,\* B. VANDEWALLE,\* R. BEUSCART,† M. C. VIE†  
and P. CAPPELAERE\*

\*Centre Oscar Lambret, rue Frédéric Combemale BP 307, 59020 Lille Cedex, France and †Service de Statistiques, Faculté de Médecine, 1, place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

**Abstract**—Prolactin receptors have been measured in 92 human breast carcinomas. Both free and total receptors (after desaturation by  $MgCl_2$ ) have been looked for. Free receptors have been found in 46% of the cases, total receptors in 72%. Specific binding ranges from 0.8 to 8.0%. No correlation could be found between prolactin receptors and age, weight, menopausal status and pathological features (differentiation, histoprognostic grading, cellular density). A highly significant correlation has been found between prolactin receptors on the one hand and estradiol and progesterone receptors on the other.

## INTRODUCTION

THE INVOLVEMENT of prolactin in mammary tumors is well-established in rodents. Prolactin stimulates the appearance and growth of spontaneous or DMBA-induced tumors in rats; in mice, prolactin only induces preneoplastic lesions and has no effect on the growth of the adenocarcinomas [1]. The role of prolactin in human breast cancer is not established. Many detailed reviews have been devoted to the subject [2-4]. In most studies [5-14], prolactin plasma levels have not been found to be different between cancer patients, or a high-risk population, and control. However Murray *et al.* [15], Rolandi *et al.* [16] and Aldinger *et al.* [17] obtained higher values in breast cancer patients; the prolactin response to TRH was also found to be higher than in controls [18]. Night prolactin plasma levels are lower in postmenopausal patients and higher in premenopausal ones [19]. Serum prolactin concentrations were found to be higher in the follicular phase of the menstrual cycle in breast cancer [20]. Kwa and Wand [21] found an abnormal luteal phase evening peak in women with a family history of breast cancer. Breast cancer was found to be more frequent among Rauwolfia derivative users in three studies [22-24], the relative risk being from 2 to 4. However, most authors have not reported such

results [25-32]. Finally, even anti-prolactinic treatments have given disappointing results [31-36].

The discovery of prolactin receptors in breast cancers [37-41], the stimulation of growth of human tumor cells by prolactin [43-45] and the presence of lactalbumin in tumor cells prompted us to look for prolactin receptors as they appeared to be a sign of hormonal sensitivity. A first publication on a heterogeneous group of breast cancer patients (primary and recurring) had shown the interest of the desaturation of receptors before the assay [46].

The example of steroid is encouraging too. Endocrine therapy was widely used prior to knowledge of oestrogen and progesterone receptors. Measurement of these receptors has proved to be of some use in selecting patients for anti-estrogen therapy and in prognosis.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

The presence of prolactin receptors was looked for in 92 patients undergoing surgery for primary breast cancer in the Centre Oscar Lambret (Lille). Tumor specimens were taken immediately after surgery, fat was removed and samples were divided into two parts: one was submitted for pathological examination, the other immediately frozen and sent for receptor analysis. All the tumors were adenocarcinomas.



### Methods

**Tissue processing.** The frozen tissue was weighed and then pulverized with a Thermovac Tissue Pulverizer (Thermovac Industries Corp., NY). The tissue was homogenized in Tris 0.02 M, EDTA 3 mM, dithiothreitol 1 mM, azide 0.01%, pH 7.8 buffer.

The homogenate was centrifuged at 800 g for 10 min and the supernatant ultracentrifuged at 105,000 g for 60 min. The supernatant (cytosol) was carefully removed with a syringe in order to avoid the floating lipid layer. The pellet (microsomal fraction) was re-suspended in 25 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> buffer, pH 7.8. Later, the protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.* [47] applied either directly in the cytosol or after extraction from the membrane (with NaOH 1 N) in the microsomal fraction.

**Hormones.** Labelling of hGH (NIH HS 2160 E, 20 IU/mg) and hPRL (NPA batch 5 AFP 1582 C) was carried out with Na<sup>[125]I</sup> using low concentrations of chloramine T [48, 49]. The binding capacity of these hormones was assayed in a fraction enriched on sucrose 2 M with human tumor membranes; hGH was found to have a higher binding capacity and was therefore used as the marker in the assays. GH is a lactogenic hormone in primates [50] and it acts in the same way as hPRL on breast cancer epithelial cells in culture [51]. The specific activity was approximately 75  $\mu$ Ci/g as determined directly or by the self-displacement method [52]. Between 70 and 80% of the iodinated GH added could be specifically bound to prolactin receptors in receptor-enriched membranes (e.g. mammary glands from lactating rabbits pre-treated with CB 154: Sandoz, Basel, Switzerland) [53]. Ovine PRL (NIH-P-S13 30 IU/mg) was used to displace labelled hGH. [<sup>3</sup>H]-17- $\beta$ -Estradiol (sp. act. 135 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-R 5020 were purchased from N.E.N. (Boston, MA), non-radioactive diethylstilboestrol and cortisol were purchased from Steraloids, Inc. (Pawling, NJ).

**Assay of prolactin receptors (PRL R).** Free receptors. The assay was performed in duplicate according to Shiu [54]. Four hundred micrograms of membrane proteins were incubated with approximately 100,000 counts/min of iodinated GH in the presence or absence of a 1000-fold excess of unlabelled oPRL (1  $\mu$ g). The final incubation volume was adjusted to 0.5 ml with Tris-MgCl<sub>2</sub> buffer (pH 7.6) containing 0.1% bovine serum albumin.

Total receptors. Since prolactin does not appear to dissociate from its receptors during membrane preparation, de-saturation of

occupied receptors was performed before the assay of prolactin sites [49]. To accomplish this, crude membrane proteins normally used in the assay were pre-incubated with 0.5 ml of 3 M MgCl<sub>2</sub> for 5 min and 4 ml of cold Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.1% BSA were then added to each tube. Following centrifugation at 2200 g, the pellets were re-suspended in Tris-HCl buffer and binding of the labelled hormone was assayed as described above.

Specific binding was calculated as the difference between the radioactivity bound in the absence and the presence of an excess of unlabelled hormone and expressed as the percentage of the total radioactivity added.

**Assay of estradiol receptors (ER) and progesterone receptors (PgR).** ER was determined by the DCC method [55]. Scatchard analysis of binding data was performed in order to quantify the number of free binding sites per mg of cytosol protein. Non-specific binding was estimated from incubations with an excess of unlabelled DES, which avoids interference with TeBG. PgR were also assayed by the DCC method [56], using tritiated and non-radioactive R 5020.

### Statistical analysis

The relation between quantitative variables was studied by the calculation of the Spearman rank correlation coefficient *r*.

The relation between qualitative variables was studied by analyses of variance. Results were calculated according to Fischer-Snedecor's *f*-value.

## RESULTS

### Specific binding of iodinated hGH

The specific binding of [<sup>125</sup>I]-labelled hGH to plastic tubes, i.e. to 'non-physiological' binding sites, was estimated by measuring the apparent displacement of [<sup>125</sup>I]-hGH per  $\mu$ g of unlabelled oPRL in the absence of tumor membranes or in the presence of 400  $\mu$ g of denatured boiled membranes. Its maximal value was 0.8% of the total radioactivity added. Therefore tumors whose specific binding was greater than 0.8% were considered positive (PRL R<sub>+</sub>). Total binding averaged between 5 and 13%, whereas non-specific binding ranges between 5 and 9% of the total radioactivity added.

Forty-six per cent of the tumors were positive when free receptors were measured, while 72% were positive in terms of total receptors. The mean values of the specific binding were respectively  $1.69 \pm 0.9\%$  for free receptors and  $2.43 \pm 1.65\%$  for total receptors. Treatment with MgCl<sub>2</sub> led to an approximate 30% loss of



tumor membrane proteins [48]. In spite of this,  $MgCl_2$  treatment led to an increase in prolactin binding in 80% of the tumors. It allowed positivation in free prolactin receptor of receptor-negative tumors; in one case, the specific binding was increased five-fold.

The specific binding activity ranged between 0.8 and 5.6% for free receptors, and between 0.8 and 8.0% for total receptors. In most cases it was between 0.8 and 4.6% (Fig. 1).

#### Relations with clinical features

In our population a correlation has been found between estrogen receptor and age ( $f = 3.995$ ) and histoprognotic grading according to Scarff and Bloom ( $f = 3.256$ ), and between progesterone receptor and weight ( $r = 0.299$ ) and histoprognotic grading ( $f = 3.256$ ). Prior treatment by chemotherapy had no effect on the level of estrogen, progesterone and prolactin receptors.

A correlation was looked for between prolactin receptors and age, weight, menopausal status, pathological differentiation, histoprognotic grading, cellular density, stromal reaction and axillary metastasis. None could be found.

Thus if prolactin and estrogen receptors are linked, it is improbable that it is through these factors.

#### Relations with hormonal features

Prolactin levels were assayed in all the patients just before surgery. No relation was found between prolactin plasma levels and prolactin receptor levels.

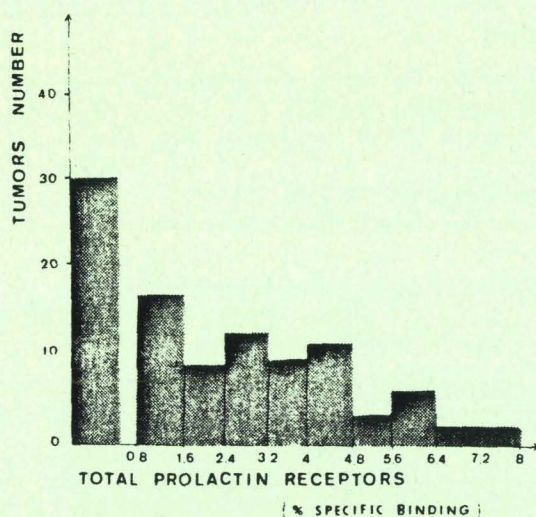


Fig. 1. Distribution of 92 human breast tumors as a function of their prolactin receptor levels.

No correlation could be found between prolactin receptors on the one hand and estradiol or estrone plasma levels on the other.

A highly significant correlation was found between saturated prolactin and estrogen receptors ( $r = 0.24$ ) on the one hand and progesterone receptors on the other ( $r = 0.225$ ). No correlation was found, however, between total prolactin receptors and estradiol or progesterone receptors. When the positivity threshold was 3 fmol/mg of cytosolic proteins (the limit of the biochemical detection), there was no relation between the presence of RE and the presence of free prolactin receptors ( $\chi^2 = 3.05$ ).

When the positivity threshold of RE was 50 fmol/mg of cytosolic protein (the limit for hormonotherapy in the Centre Oscar Lambret), the correlation between RE and free PRL R was closely linked ( $\chi^2 = 5.23$ ) (Table 1).

#### DISCUSSION

Our results confirm those already obtained by other authors [37-42] (Table 2). Prolactin receptors exist in some human breast cancers. The method used is very close in every study. The most important difference is the iodinated hormone used: generally human prolactin [37, 38, 41, 42], but ovine prolactin too, [39, 41, 42] and human GH [38, 42, present study]. Turcot-Lemay and Kelly [42] have shown that the percentage of prolactin receptor-positive tumors varies from 12% with hGH to 30% with ovine prolactin and 58% with human prolactin. The author concludes that human prolactin is the best hormone for the assay. To our knowledge, as yet no other author has tried to de-saturate the receptors in breast cancer, but it has been done using other tissues; we have seen that it appears physiologically logical and gives better results in

Table 1. Number of tumors with prolactin receptors as a function of ER threshold

ER (fmol/mg protein)	No. of tumors	Free PRL R.
(1) < 3	11	3
(2) > 3	64	30
(3) < 50	34	11
(4) > 50	41	22

The presence of free PRL R is linked to the presence of ER when ER > 50 fmol/mg cytosolic protein.



Table 2. Comparison of the results of prolactin receptor assays published

References	No. of tumors	Iodinated hormone	% Positive tumors	Range of % specific binding
[37]	41	hPR	20	1-4.2
[38]	20	hPR	70	0.5-2.5
		hGH		0.5-5.1
[39]	111	oPR	51	1-9.22
[41]	83	hPR	32.5	1-4.3
[40]	8	oPR	37.5	
[42]	759	hPR	58	
		oPR	30	0.5- > 10
		hGH	12	
Present study	92	hGH	free 46 total 72	0.8-8

specific binding. Nevertheless, the average value of the percentage of prolactin receptor-positive tumors is around 50%. The range of specific binding is very close in all the studies, the maximum value being around 10% [42].

To our knowledge, it is the first time that a statistically significant correlation has been found between prolactin receptors and steroid receptors. It is interesting to note that in DMBA-induced tumors in rats it has been shown that prolactin and estrogen induce prolactin and estrogen receptors, estrogen inducing progesterone receptors too [57]. All these receptors are thus inter-linked.

No correlation has been found between RE and RPg on the one hand and total receptors on the other.  $MgCl_2$  acts on internalized receptors, which seem not to have any physiological role [58]. Contrary to estrogen receptors, no correlation could be found between prolactin receptors and clinical or pathological features. This could be explained by the fact that estrogen is a major hormone for epithelial

differentiation and growth, while prolactin can act only on growth [59]. The inter-relations between the receptors do not exist through pathological features.

Prolactin receptors are much more frequent in estrogen- and/or progesterone-positive tumors. That is to say, among estrogen-positive and progesterone-positive tumors prolactin receptors select a population of particularly hormone-sensitive cells.

It is important to note that some steroid receptor-negative tumors have prolactin receptors (3 out of 11 of our patients). It might be clinically useful in those cases whose prognosis is bad to propose an anti-prolactinic treatment. Its precise modalities must be studied; it has been shown [60, 61] that hypophysectomy (by surgery or yttrium) leaves enough prolactin-secreting cells to allow secretion which is either spontaneous or follows TRH stimulation in a high percentage of cases. This treatment should be associated with medical anti-prolactinic treatment [61].

## REFERENCES

1. MEITES J. Relation of the neuro-endocrine system to the development and growth of experimental mammary tumors. *J Neural Trans* 1980, **48**, 25-42.
2. CAPPELAERE P. Prolactine et cancers mammaires. *Pathol Biol (Paris)* 1975, **23**, 161-170.
3. ROBYN C. Prolactine et cancer du sein. *Pathol Biol (Paris)* 1975, **23**, 783-792.
4. NAGASAWA H. Prolactin and human breast cancer: a review. *Eur J Cancer* 1979, **15**, 267-279.
5. BOYNS AR, COLE EN, GRIFFITHS K *et al.* Plasma prolactin in breast cancer. *Eur J Cancer* 1973, **9**, 99-102.
6. WILSON RG, BUCHAN R, ROBERTS MM *et al.* Plasma prolactin and breast cancer. *Cancer* 1974, **33**, 1325-1327.
7. GORINS A, NETTER A. La prolactine. Son dosage radioimmunologique dans les cancers du sein et les mastopathies bénignes de la femme. *Nouv Press Med* 1974, **3**, 73-75.
8. MITTRA I, HAYWARD JL, MCNEILLY AS. Hypothalamic pituitary prolactin axis in breast cancer. *Lancet* 1974, **ii**, 889-891.



9. FRANKS S, RAPHs DNL, SEAGROTT V, JACOBS HS. Prolactin concentrations in patients with breast cancer. *Br Med J* 1974, 4, 320-321.
10. KWA HG, ENGELSMAN E, DEJONG-BAKKER M, CLETON FJ. Plasma prolactin in human breast cancer. *Lancet* 1974, ii, 433-434.
11. SHETH NA, RANADIVE KJ, SURAIYA JN, SHETH AR. Circulating levels of prolactin in human breast cancer. *Br J Cancer* 1975, 32, 160-167.
12. JONES MK, RAMSAY ID, BOOTH M, COLLINS WO. Hormone concentrations in post-menopausal patients with breast cancer. *Clin Oncol* 1977, 3, 177-181.
13. HOFF J, HOFF-BARDIER M, BAYARD, F. La prolactine. Son rôle dans l'hormonodépendance des cancers du sein. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1978, 7, 19-30.
14. ENGLAND PC, SELLWOOD RA. Serum prolactin in normal women and women with benign and malignant breast disease. *Cancer Detect Prevent* 1979, 2, 441-451.
15. MURRAY RML, MOZAFFARIAN G, PEARSON OH. Prolactin levels with L-Dopa treatment in metastatic breast carcinoma. In: BOYNS AR, GRIFFITH K, eds. *Prolactin and Carcinogenesis*. Cardiff, Alpha Omega Alpha, 1972, 158.
16. ROLANDI E, BARRECA T, MASTURZO P, POLLERI A, INDIVERI F, BARABINO A. Prolactine et cancer du sein. *Nouv Presse Med* 1974, 3, 2743.
17. ALDINGER KA, SCHULZ PN, BLUMENSCHIEIN GR, SAMAN NA. Thyroid stimulating hormone and prolactin levels in breast cancer. *Arch Intern Med* 1978, 138, 1638-1641.
18. OHGO S, KATO Y, CHICHARA K, IMURA H. Plasma prolactin responses to thyrotropin releasing hormone in patients with breast cancer. *Cancer* 1976, 37, 1412-1416.
19. MALARKEY WB, SCHROEDER LL, STEVENS VC, JAMES AG, LANESE RR. Disordered nocturnal prolactin regulation in women with breast cancer. *Cancer Res* 1977, 37, 4650-4654.
20. COLE EN, ENGLAND PC, SELLWOOD RA, GRIFFITHS K. Serum prolactin concentrations throughout the menstrual cycle of normal women and patients with recent breast cancers. *Eur J Cancer* 1977, 13, 677-684.
21. KWA HG, WAND DY. An abnormal luteal phase evening peak of plasma prolactin in women with a family history of breast cancer. *Int J Cancer* 1977, 20, 12-14.
22. BOSTON COLLABORATIVE DRUG SURVEILLANCE PROGRAM. Reserpine and breast cancer. *Lancet* 1974, ii, 669-671.
23. ARMSTRONG G, STEVENS N, DOLL R. Retrospective study of the association between use of Rauwolfia derivatives and breast cancer in English women. *Lancet* 1974, ii, 672-675.
24. HEINONEN OP, SHAPIRO S, TUOMINEN L, TURUNEN MI. Reserpine use in relation to breast cancer. *Lancet* 1974, ii, 675-677.
25. RASSIDAKIS NC, KELLEPORIS M, GOULIS K. On the incidence of malignancy among schizophrenic patients. *Agressologie* 1973, 269-273.
26. ETTIGI P, LAL S, FRIESEN HG. Prolactin, phenothiazines, admission to mental hospital and carcinoma of the breast. *Lancet* 1973, ii, 266-267.
27. LILIENTHAL AM, CHANG L, THOMAS DB, LEVIN ML. Rauwolfia derivatives and breast cancer. *Johns Hopkins Med J* 1975, 139, 41-50.
28. LASKA EM, SIEGEL C, MEISNER M. Matched pairs study of reserpine use and breast cancer. *Lancet* 1975, ii, 296-300.
29. MACK TM, HENDERSON BE, GERKINS UR. Reserpine and breast cancer in a retirement community. *N Engl J Med* 1975, 292, 1366-1371.
30. O'FALLON WM, LABARTHE DR, KURLAND LT. Rauwolfia derivatives and breast cancer. *Lancet* 1975, ii, 292-296.
31. AROMAA A, HAKAMA M, HAKULINEN T. Rauwolfia and breast cancer. *Lancet* 1976, ii, 518.
32. SCHYVE PM, SMITHLINE F, MELTZER HY. Neuroleptic induced prolactin level elevation and breast cancer. *Arch Gen Psychiat* 1978, 35, 1291-1301.
33. MINTON JP. The response of breast cancer patients with bone pain to L Dopa. *Cancer* 1974, 33, 358-363.
34. EUROPEAN BREAST CANCER GROUP. Clinical trial of 2 Bromocriptine (CB 154) in advanced breast cancer. *Eur J Cancer* 1972 8, 155-156.
35. EUROPEAN BREAST CANCER GROUP. Clinical trial of the cyclic imide 1 (morpholinomethyl) 4 phtalimids piperidindione-2,6 (CG 603) in advanced breast cancer. *Eur J Cancer* 1972, 8, 157-158.



36. BARRETT A, MORGAN L, RAGATT PR, HOBBS JR. Bromocriptine in the treatment of advanced breast cancer. *Clin Oncol* 1976, **2**, 373-377.
37. HOLDAWAY IM, FRIESEN HG. Hormone binding by human mammary carcinoma. *Cancer Res* 1977, **37**, 1946-1952.
38. STAGNER JJ, JOCHIMSEN PR, SHERMAN BM. Lactogenic hormone binding in human breast cancer: correlation with estrogen receptor. *Clin Res* 1977, **25**, 302A.
39. PEARSON OH, MANNI A, CHAMBERS M, BRODKEY J, MARSHALL JS. Role of pituitary hormones in the growth of human breast cancer. *Cancer Res* 1978, **38**, 4323-4326.
40. PARTRIDGE RK, HAHNEL R. Prolactin receptors in human breast carcinoma. *Cancer* 1979, **43**, 643-646.
41. DI CARLO R, MUCCIOLI G. Prolactin receptor in human mammary carcinoma. *Tumori* 1979, **65**, 695-702.
42. TURCOT-LEMAY L, KELLY PA. Prolactin receptors in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1982, **68**, 381-383.
43. SALIH H, FLAX H, BRANDER W, HOBBS JR. Prolactin dependence in human breast cancers. *Lancet* 1972, **ii**, 1103-1104.
44. WILSON GD, WOODS KL, WALKER RA, HOWELL A. Effect of prolactin on lactalbumin production by normal and malignant human breast tissue in organ culture. *Cancer Res* 1980, **40**, 486-489.
45. BAHU RM, MANGKORNAKOK-MARK M, ALBERTSON D, FORS E, MOLTENI A, BATTIFORA H. Detection of alpha lactalbumin in breast lesions and relationship to estrogen receptors and serum prolactin. *Cancer* 1980, **46**, 1775-1780.
46. PEYRAT JP, DEWAILLY D, DJIANE J *et al.* Total prolactin binding sites in human breast cancer biopsies. *Breast Cancer Res Treat* 1981, **1**, 369-373.
47. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR A, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, **193**, 265-275.
48. GREENWOOD FC, HUNTER WH, GLOVER JS. The preparation of <sup>131</sup>I labelled growth hormone of high specific radioactivity. *Biochemistry* 1963, **89**, 114-123.
49. KELLY PA, LEBLANC G, DJIANE J. Estimation of total prolactin binding sites after *in vitro* desaturation. *Endocrinology* 1979, **104**, 1631-1638.
50. KLEINBERG DL, TODD J. Evidence that human growth hormone is a potent lactogen in primates. *J Clin Endocrinol Metab* 1980, **51**, 1009-1013.
51. DE SOUZA I, MORGAN L, LEWIS UJ, RAGGATT PR, SALIH H, HOBBS JR. Growth-hormone dependence among human breast cancer. *Lancet* **ii**, 182-184.
52. CATT KJ, KETELSLEGER JM, DUFAU ML. Receptors for gonadotropic hormones. In: BLECHER M, ed. *Molecular Biology* 1976, Vol. 9, 175-250.
53. DJIANE J, DURAND P, KELLY PA. Evolution of prolactin receptors in rabbit mammary gland throughout pregnancy and lactation. *Endocrinology* 1977, **100**, 1348-1356.
54. SHIU RPC, KELLY PA, FRIESEN HG. Radioreceptor assay for prolactin and other lactogenic hormones. *Science* 1973, **180**, 968-973.
55. EORTC BREAST CANCER COOPERATIVE GROUP. Standards for the assessment of estrogen receptors in human breast cancer. *Eur J Cancer* 1973, **9**, 379-381.
56. HORWITZ KB, MCGUIRE WL. Specific progesterone receptors in human breast cancer. *Steroid* 1975, **25**, 497-505.
57. COSTLOW ME, MCGUIRE WL. Prolactin receptors and hormone dependence in mammary carcinoma. In: SHARM RK, CRISS WE, eds. *Endocrine Control in Neoplasia*. New York, 1978, 121-150.
58. TEYSSOT B, HOUEBINE LM, DJIANE J. Prolactin induces the release of a factor from membranes capable of stimulating B-casein gene transcription in isolated mammary nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, **78**, 6729-6733.
59. LEUNG BS, SASAKI GH, LEUNG JS. Estrogen prolactin dependency in 7,12-dimethyl-benzanthracene induced tumors. *Cancer Res* 1975, **35**, 621-627.
60. TURKINGTON RW, UNDERWOOD LE, VAN WYK JJ. Elevated serum prolactin levels after pituitary stalk section in man. *N Engl J Med* 1971, **285**, 707.
61. GRANGE JC. Contribution à l'Etude de la Sécrétion Résiduelle de Prolactine après Hypophysectomie Stéréotaxique par Yttrium 90 dans le Cancer du Sein Méastatique et de son Traitement Associé par la Bromocriptine. *Thèse de Médecine*, Paris, 1979.



## **Article VIII**

# **CIS-PLATINUM COMPLEX WITH RETAINED PROLACTIN RECEPTOR SPECIFIC BINDING**

by B. Hecquet, J. P. Peyrat, J. Bonnetterre and A. Demaille

(Laboratoire de Pharmacodynamie Clinique et Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale, Centre Oscar Lambret\*, Lille)

## **ABSTRACT**

*Two complexes of prolactin and platinum have been synthesized and their biological activity was assayed by radioreceptor assay. Only the cis-platinum prolactin complex retains the capacity of native prolactin to bind to cell receptor membrane. Prolactin could be used to increase the specificity of cis-platinum to cells with prolactin receptors.*

\* Rue F. Combemale, B. P. 307, 59020 Lille Cedex, France.

Reprints: B. Hecquet, Laboratoire de Pharmacodynamie Clinique.

## **ABRÉGÉ**

*Deux complexes prolactine-platines ont été préparés et leur activité biologique a été testée par la technique des radiorécepteurs. Seul le complexe cis-platine-prolactine conserve la propriété de la prolactine de se fixer sur ses récepteurs membranaires. La prolactine pourrait donc être utilisée pour augmenter la spécificité du cis-platine envers les cellules ayant des récepteurs à prolactine.*

## **INTRODUCTION**

Platinum coordinated compounds have received considerable interest as antitumor agents (11, 14), in particular cis-platinum (cis-diammine dichloro-platinum (II)) which has an important impact on the current therapeutic approach to testicular, ovarian, head and neck and bladder cancers (15). But only few studies reported the clinical impact of cis-platinum on other cancers, such as breast cancer.

Some human mammary cancers contain a measurable amount of prolactin receptors (1, 5, 9), so that drug targeting with emphasis on the use of prolactin might be an approach of interest in breast cancer therapy. For this approach an antitumor drug must be



complexed to prolactin without any loss of the prolactin properties. The complex must be then tested on tumor cells to establish the clinical interest.

Recently, platinum was complexed with other proteins antitumor immunoglobulins, which have been shown to be effective in inhibition of DNA synthesis in tumor cell line of DMBA-induced lymphoma and leukemia in mice (6).

We have prepared platinum complexed prolactin in an attempt to optimize the platinum effect on breast cancer cells. The synthesis of the complexes and the retained prolactin receptor activity tested on epithelial membrane cells are described in the present paper.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Preparation of Prolactin Pt complexes

**K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>-prolactin:** 1.2 mg of ovine prolactin (OPRL, NIH P-S-13) is added to 100  $\mu$ l of ammonium bicarbonate 1 M pH 7.8 (prolactin is easily solubilized) and diluted with 300  $\mu$ l of phosphate buffer 0.05 M (pH 7.4), 60  $\mu$ g of K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> (Prolabo, France) in 90  $\mu$ l of the phosphate buffer is added. The reaction occurs at room temperature (20°C), aliquots of 10  $\mu$ l are injected into the HPLC at appropriate time intervals.

**Cis-platinum-prolactin:** 1 mg of prolactin is solubilized in 100  $\mu$ l of ammonium bicarbonate 1 M and diluted with 300  $\mu$ l of phosphate buffer (pH 7.4). 75  $\mu$ g of cis-platinum (bulk powder from Laboratoires Roger Bellon, France) in 90  $\mu$ g of water is added and the solution is equilibrated at 37°C. Aliquots are injected into the HPLC as previously.

##### Separation of the Platinum-complexes

Platinum-prolactin complexes were separated from platinum metabolites by use of the high performance liquid chromatography. The HPLC system consists of a Waters pump (model F 6000 A) a LKB Uvicord S absorbance detector (254 nm). Solutions were injected onto a Waters I 125 protein column and eluted by the application of a solvent NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 1 M, phosphate 0.05 M buffer, H<sub>2</sub>O (1.5/4.5/1.35, v/v/v). The flow rate was 2 ml/min. Retention times were about 6.5 min for K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> and cis-platinum, about 4.5 min for prolactin and platinum-prolactin complexes. The volume of elution for prolactin and platinum-prolactin complexes was 3.5 ml. This volume was adjusted to 10 ml with glycerol in order to avoid any degradation of prolactin.

##### Platinum Analysis

Platinum was estimated by flameless atomic absorption spectrophotometry (FAAS) using a Perkin Elmer model 2280 absorption spectrophotometer equipped with a model HGA 400 graphite furnace. A three-stage temperature program with 30 sec drying, 30 sec charring and 5 sec atomization (2,700°C) was used.

##### Specific binding of the complexes

A prolactin radioreceptor assay was used for the measurement of platinum-prolactin complexes (10). Labeling of ovine prolactin (OPRL NIH-P-S-13) was carried out with Na <sup>125</sup>I using low concentrations of chloramine T (3, 7). Mammary tissue from rabbits at the onset of lactation and treated with bromocriptine as described by Durand and Djiane (2) was used for the preparation of the protein 100,000 g membrane pellet and

was assayed according to Lowry (8). For the assay 200  $\mu$ g of membrane proteins were incubated with 50,000 cpm (0.5 ng) of <sup>125</sup>I prolactin, and 100  $\mu$ l of solution of platinum-prolactin. The volume was adjusted to 0.5 ml with 25 mM-Tris-HCl buffer, pH 7.6, containing 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.1 % (W/v) bovine serum albumin (fraction V, Sigma). The reaction was stopped after 6 hours by adding 4 ml ice-cold incubation buffer. Membrane-bound and free hormone were separated by centrifugation at 3,000 g for 20 min. Prolactin activity of complexes were assessed by comparison with a standard curve established from incubation of increasing amounts of non-radioactive ovine prolactin, under the same conditions.

#### RESULTS

Complexes of platinum-prolactin were prepared with two platinum compounds K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> and cis-platinum.

##### Kinetic of fixation of platinum on prolactin

The rate of fixation of platinum compounds (K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> and cis-platinum) on prolactin was monitored by FAAS platinum dosage in the HPLC prolactin fraction. In each case a small amount of platinum is fixed immediately (see Fig. 1). Then the reaction was found to follow the well known curve of cis-platinum binding on protein, or an apparent linear binding for K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>. When the ratio moles of platinum fixed/mole of prolactin is greater than unity the reaction seems to become rather slow in the case of cis-platinum.

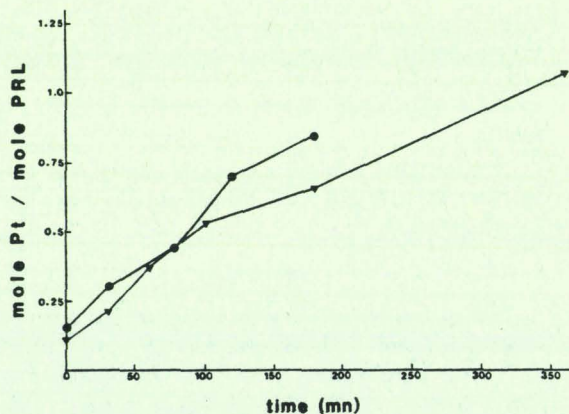


FIG. 1.

Ratio of platinum (Pt) complexed with prolactin (PRL) as a function of time.

- (●) reaction with K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>.  
(▲) reaction with Cis-platinum.

##### Stability of platinum-prolactin complexes

Stability of platinum-prolactin complexes was tested by HPLC rechromatography of the complexes



after four days in phosphate buffer (pH 7.4) at room temperature. Loss of platinum less than 10 % could be detected.

#### Prolactin activity of platinum prolactin complexes

Figure 2 shows the loss of binding capacity of the  $K_2PtCl_6$ -prolactin complex on the cell membrane receptors. The formation of the complex and the loss of the binding capacity of prolactin are correlated.

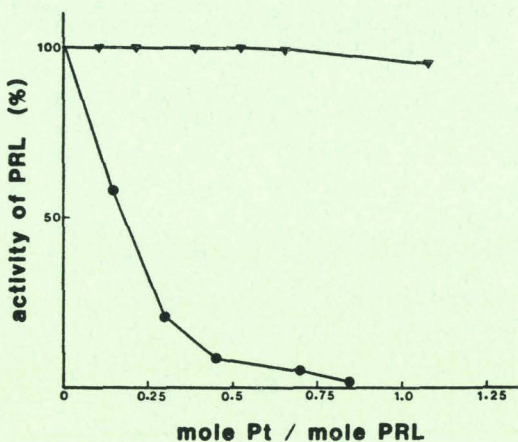


FIG. 2.

Capacity of binding to prolactin receptors (activity) of Cis-platinum-prolactin (▲) and  $K_2PtCl_6$ -prolactin (●) complexes with various amount of platinum per mole of prolactin.

In contrast the binding capacity of the cis-platinum-prolactin complex is retained even when about one

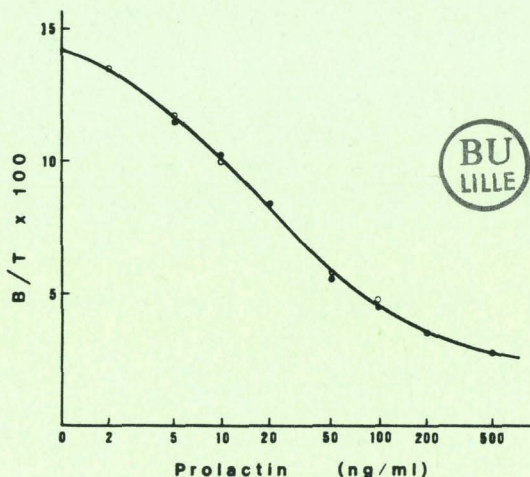


FIG. 3.

Competitive curves of the radioreceptor assay for prolactin (●) and cis-platinum-prolactin complex (○).

molecule of platinum is complexed with one molecule of prolactin. The analysis of the displacement curve does not show any modification of prolactin affinity by the cis-platinum fixation (Fig. 3).

#### DISCUSSION

$K_2PtCl_6$  reacts with prolactin and we have demonstrated that the complex formed between prolactin and the platinum salt does not retain the ability to bind to prolactin receptors, whereas it did retain the ability to interact with  $K_2PtCl_6$ -antibodies complexes (6). The loss of the activity is proportional to the fixation of platinum and is about complete when one mole of platinum is fixed per mole of prolactin. Only one molecule of platinum salt fixed can inhibit one molecule of prolactin.

Cis-platinum reacts with prolactin as with many proteins and peptides (4, 12, 13). The rate of reaction corresponds to the rate of aquation of cis-platinum which is in agreement with the mechanism of platinum fixation on proteins (12). The part of immediate cis-platinum fixation is probably due to the presence of aquated molecules in the initial solution. The complex formed is stable for at least 4 days in a pH 7.4 buffer.

The present studies demonstrated that the cis-platinum-protein complexes (until about 1 mole of cis-platinum per mole of prolactin) retain the prolactin property to bind to cell membrane receptors.

In conclusion, the mechanism of complexation of  $K_2PtCl_6$  and cis-platinum with prolactin are probably different. Cis-platinum complexation does not alter prolactin properties. Prolactin can be used as a cis-platinum carrier to increase its specificity towards tumor cells with prolactin receptors. If prolactin is a good potential carrier since it is a natural product which is proved to be able *in vivo* to reach specific cells, more studies are necessary to evaluate the real clinical interest of the complex. In particular evaluation of the respective toxicity on tumors cells and normal cells both with prolactin receptors are now in progress.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was realized with the technical assistance of Charles Fournier and is supported by the « Comité Départemental du Pas-de-Calais de la Ligue Nationale Française Contre le Cancer ». The OPRL was kindly supplied by the Niamdd Pituitary Hormone Distribution Program.

#### REFERENCES

1. Bonnetterre J., Peyrat J. P., Vandewalle B., Beuscart R., Vie M. C. & Cappelaere P. Prolactin receptors in human breast cancer. *Eur. J. Cancer clin. Oncol.*, 1982, 18, 1157.
2. Durand P. & Djiane J. Lactogenic activity in the serum of rabbits



- during pregnancy and early lactation. *J. Endocr.*, 1977, 75, 33.
3. Greenwood F. C., Hunter W. H. & Glover J. S. The preparation of  $^{125}\text{I}$  labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 1963, 89, 114.
  4. Gullo J. J., Litterst C. L., Mc Guire P. J. and al. Pharmacokinetics and protein binding of cis-dichlorodiammine-platinum II administered as a one hour or as a twenty hour infusion. *Cancer Chem. Pharm.*, 1980, 5, 21.
  5. Holdaway I. H. & Friesen H. G. Hormone binding by human-mammary carcinoma. *Cancer Res.*, 1977, 37, 1946.
  6. Hurwitz E., Kashi R. & Wilchek H. Platinum-complexed anti-tumors immunoglobulins that specifically inhibit DNA synthesis of mouse tumor cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1982, 1, 47.
  7. Kelly P. A., Leblanc G. & Djiane J. Estimation of total prolactin binding sites after *in vitro* desaturation. *Endocrinology*, 1979, 104, 1631.
  8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. & Randall R. J. Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
  9. Peyrat J. P., Dewailly D., Djiane J., Kelly P. A., Vandewalle B., Bonneterre J. & Lefebvre J. Total prolactin binding sites in human breast cancer biopsies. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1981, 1, 369.
  10. Peyrat J. P., Siam Mourot C., Djiane J. & Lefebvre J. Prolactine circulante chez l'homme : corrélations entre dosages radio-immunologiques (RIA) et dosage radiohormone récepteurs (RRA). *Ann. Endocrinol.*, 1981, 42, 30C.
  11. Prestayko A. W., Crooke S. T. & Carter S. K. Cis-platin current status and new developments. *Acad. Press* (N. Y.), 1980.
  12. Repta A. J. & Long D. F. Reactions of Cis-platin with human plasma and plasma fractions. P. 285, in: Cis-platin current status and new developments. *Acad. Press* (N. Y.), 1980.
  13. Riley C. M., Sternson L. A. Repta A. J. Assessment of Cis-platin reactivity with peptides and proteins using reverse-phase high performance liquid chromatography and flameless atomic absorption spectroscopy. *Ann. Biochem.*, 1982, 124, 167.
  14. Rosenberg B. Anticancer activity of cis-dichlorodiammine-platinum (II) and some relevant chemistry. *Cancer Treat. Rep.*, 1979, 9, 1433.
  15. Rozenzweig M., Abele R., Von Hoff D. D. & Muggia F. M. Cis-platin: impact of new anticancer agent on current therapeutic strategies. *Anticancer Res.*, 1981, 1, 199.

## V- CONCLUSION GENERALE

-----



L'objet de cette étude était de comparer le fonctionnement des récepteurs aux hormones polypeptidiques en situation physiologique et en pathologie cancéreuse. Les différences apparaissent aussi bien sur la présence des récepteurs que sur leur capacité de modulation et de transfert de l'information hormonale.

Les récepteurs de la LH sont présents dans le testicule dès la naissance et tout au long de la vie post-natale chez le porc. C'est donc lors de leur différenciation au cours de la vie foetale, que les cellules cibles acquièrent les récepteurs. La présence de récepteurs de la LH a été démontrée dans le testicule au cours de la dernière période de la vie foetale chez l'homme (FROWEIN et ENGEL, 1974) comme chez le rat (FROWEIN et ENGEL, 1974) ou le lapin (CATT et coll., 1975). L'apparition des récepteurs est concomitante du développement histologique de la cellule de Leydig et de l'acquisition de la capacité à synthétiser de la testostérone (CATT et coll., 1975 ; HUHTANIEMI et coll., 1977). Le processus de différenciation d'une cellule souche en une cellule "mature", c'est-à-dire en cellule qui possède des récepteurs de la LH et une machinerie enzymatique complète permettant la synthèse de testostérone, semble ne durer que quelques heures (12 h) (CATT et coll., 1975). L'ensemble de ces données montre qu'en situation physiologique, le récepteur est une protéine de constitution de la cellule différenciée. La présence de récepteurs de la PRL dans certaines tumeurs signifie que les cellules cancéreuses ont conservé une protéine de "constitution" caractéristique des cellules épithéliales normales. En ce sens, les récepteurs peuvent être considérés comme des marqueurs de la différenciation cellulaire.

En situation physiologique, une des composantes de la sensibilité de la cellule à l'hormone est le nombre de récepteurs ou leur affinité pour l'hormone. Le testicule, au cours de son développement post-natal, subit des variations de sa réceptivité à la LH. Si l'affinité du récepteur pour la LH reste constante, le nombre de récepteurs montre d'importantes variations. En l'absence de LH, les cellules de Leydig entretiennent un niveau de base de récepteurs. Le contenu cellulaire en récepteurs de la LH est modifié par la LH elle-même : l'augmentation des récepteurs après la naissance et durant la puberté est liée à celle de la LH sérique, ce qui suggère une régulation

positive par la LH du taux de ses récepteurs. Ce type de régulation est un phénomène assez généralement rencontré. Ainsi les récepteurs de l'angiotensine (HAUGER et coll., 1978), ceux du LH-RH (LOUMAYE et CATT, 1982) et ceux de la PRL (POSNER et coll., 1975 ; DJIANE et coll., 1977) sont-ils régulés positivement par leur hormone. Le contenu cellulaire en récepteurs à un moment donné est conditionné par son taux de synthèse et son taux de dégradation. Dans une situation physiologique où les variations hormonales sont progressives, le processus de régulation négative (DJIANE et coll., 1979) induit à court terme par l'hormone, est masqué par la stimulation à long terme de la synthèse de récepteur par l'hormone. La signification de la régulation positive des récepteurs de la LH est particulièrement évidente au moment de la puberté où l'augmentation de la LH sérique est modeste par rapport aux modifications de l'activité cellulaire. Cette régulation participe donc à l'augmentation de la sensibilité de la cellule de Leydig dont l'activité sécrétoire augmente. On peut aussi imaginer que l'augmentation de récepteurs associée à l'augmentation de l'hormone protège la cellule contre un ou plusieurs déficits transitoires en hormone et lui confère une relative indépendance.

Dans la glande mammaire en situation physiologique, on constate une augmentation des récepteurs de la PRL pendant la grossesse et la lactation (KELLY et coll., 1979b) en relation avec l'augmentation des concentrations circulantes de PRL. Les concentrations de récepteurs dans la glande mammaire normale sont très basses ou indétectables. Le contenu en récepteurs de la PRL dans les cancers du sein apparaît anormalement élevé et vraisemblablement proche du contenu du sein durant la gestation ou la lactation, ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans divers modèles expérimentaux (COSTLOW et coll., 1974 ; SMITH et coll., 1976). L'activation du gène codant pour le récepteur de la PRL dans la cellule épithéliale mammaire cancéreuse, en dehors de toute augmentation de PRL, est un phénomène qui paraît donc anormal. La présence d'un récepteur d'une hormone impliquée dans la multiplication cellulaire pourrait être considérée non comme la persistance de caractéristiques de la cellule normale, mais comme un facteur impliqué directement dans le développement tumoral. La découverte récente des liens existants entre les oncogènes cellulaires et les facteurs de croissance viennent étayer cette hypothèse (WEINBERG, 1984 ; STILES, 1984 ; MARX, 1984b ; MARX, 1984c). Les produits d'oncogènes cellulaires activés peuvent être soit des facteurs de croissance (WATERFIELD, 1983), soit leurs

récepteurs spécifiques (KAMATRA et FERANISCO, 1984 ; WANG, 1984 ; MARX, 1984c). Dans la cellule épithéliale mammaire cancéreuse, le gène du récepteur de la PRL est vraisemblablement exposé à perturbation. Cette perturbation peut être une mutation du gène lui-même, mais surtout de son gène régulateur (répresseur). L'altération du gène répresseur conduirait à l'expression anormale des récepteurs de la PRL, la cellule cancéreuse se trouvant alors dans un état de différenciation qui pourrait permettre l'action mitogène de la PRL.

La réponse cellulaire à une stimulation hormonale est une caractéristique de la cellule normale. Ainsi dans le testicule de porc, l'augmentation du taux basal de récepteurs correspond aux périodes de différenciation et d'activité cellulaire. Elle est toujours associée à l'augmentation de production de testostérone. La situation est complètement différente dans le tissu néoplasique : des altérations de la capacité de réponse cellulaire à la PRL sont observées dans les cancers du sein. Ainsi la PRL, malgré la présence de récepteurs, n'est pas capable d'induire dans tous les cas, *in vitro*, la multiplication des cellules épithéliales mammaires cancéreuses. Il y a donc une nette dissociation entre la réceptivité cellulaire à la PRL, qui est conservée, et la sensibilité cellulaire à cette hormone, qui est perdue, vraisemblablement en raison d'altérations dans les étapes qui suivent la liaison de l'hormone au récepteur. La situation se complique lorsque l'on étudie l'alpha-lactalbumine qui est un marqueur de différenciation sous contrôle prolactinique dans la glande mammaire normale : la cellule épithéliale de cancer du sein est capable de produire de l'alpha-lactalbumine en l'absence de récepteurs de la PRL, ce qui laisse penser qu'une lésion s'est opérée au niveau du gène de cette protéine. La synthèse d'alpha-lactalbumine et celle des récepteurs de la PRL sont des phénomènes qui caractérisent en situation normale une cellule épithéliale mammaire bien différenciée ; on constate que ces caractéristiques du tissu parental bien différencié sont retrouvées dans les cellules tumorales.



L'apparition des cancers est due à des modifications importantes de cellules qui peuvent survivre et se multiplier dans un environnement qui par ailleurs contrôle efficacement la croissance de composants tissulaires normaux. Dans un organe normal, le remarquable équilibre entre perte et production cellulaires, la capacité d'augmenter ou de réduire cette production selon les besoins, impliquent l'existence de mécanismes de régulation dont malheureusement pratiquement rien n'est connu. On peut envisager deux hypothèses sur la manière dont une cellule échappe aux signaux de contrôle de la croissance. La première hypothèse est que les cellules acquièrent des récepteurs aux agents stimulant la croissance. Il est possible de concevoir que la grande quantité de récepteurs dans les cellules cancéreuses permet à ces cellules de proliférer dans un milieu qui contient de relativement faibles concentrations d'hormone circulante. L'apparition de récepteurs "ectopiques" a même été décrite : les cellules tumorales peuvent être stimulées par des hormones ou des facteurs de croissance qui diffèrent de ceux qui stimulent les cellules du tissu parental normal (CIKES, 1978). La production de ces récepteurs "ectopiques" ne semble pas correspondre à un processus aléatoire mais est un événement déterminé par l'origine embryonnaire des tissus parentaux. Mais une seconde hypothèse ne doit pas être éliminée : l'apparition et la croissance des cancers peuvent être en relation avec une perte ou une altération des récepteurs aux agents qui favorisent la différenciation cellulaire normale. Depuis très longtemps, il est admis que des liens étroits existent entre cancer, différenciation et multiplication cellulaires. Une grande variété de cancers sont liés soit à une altération de la différenciation, soit à un blocage plus ou moins total de celle-ci. Un tissu cancéreux semble progresser au cours de son histoire vers toujours plus de malignité, perdant de plus en plus de caractéristiques du tissu différencié. L'idée que les altérations ou les blocages des mécanismes de la différenciation cellulaire des cellules cancéreuses est irréversible, paraissaient solidement établie. Elle est aujourd'hui remise en cause et plusieurs modèles ont établi que la reprise du programme de différenciation dans une cellule cancéreuse pouvait s'accompagner d'une perte de malignité. Il est donc possible d'imaginer qu'un facteur physiologique comme une hormone, nécessaire à la croissance et à la différenciation des cellules normales, puisse favoriser la redifférenciation des

cellules cancéreuses et la perte de leur malignité. La présence de récepteurs serait alors indispensable au déroulement du programme de différenciation.

Ces deux hypothèses mettent en évidence l'intérêt que l'on doit porter à l'étude des récepteurs hormonaux dans les cancers. La connaissance des modifications de réceptivité aux hormones et aux facteurs de croissance permet la mise en oeuvre de moyens pour lutter contre le développement des tumeurs. Par exemple, l'utilisation d'antagonistes des hormones qui agissent en bloquant les récepteurs hormonaux peut limiter l'effet prolifératif des hormones. Les hormones peuvent être couplées à des agents antimitotiques et transporter ces derniers jusqu'aux cellules cancéreuses en rendant leur action plus spécifique. Enfin on peut envisager de perturber l'équilibre peu stable d'une cellule cancéreuse, et de favoriser sa redifférenciation, en modifiant son environnement hormonal.

## **VI- REFERENCES**

-----



- ANDERSON TR., RODRIGUEZ J., NICOLL CS. The synlactin hypothesis : prolactin's mitogenic action may involve synergism with a somatomedin-like molecule. In : INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS/SOMATOMEDINS. pp. 71-78. Walter de Gruyter et Co, Berlin, New-York, 1983.
- AOKI A. Hormonal control of Leydig cell differentiation. PROTOPLASMA, 1970, 71, 209-225.
- ARAFAH BM., MANNI A., PEARSON OH. Effect of hypophysectomy and hormone replacement on hormone receptor levels and the growth of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat. ENDOCRINOLOGY, 1980, 107, 1364-1369.
- BECK JS. and GOREN HJ. Simulation of association curves and "Scatchard" plots of binding reactions where ligand and receptor are degraded or internalized. J. RECEPT. RES., 1983, 3 (5), 561-577.
- BENSON EA., HOLDAWAY IM. Regulation of insulin binding to human mammary carcinoma. CANCER RES., 1982, 42, 1137-1141.
- BERGERON JJH., POSNER BJ., JOSEFSBERG S., SIKSTROM R. Intra-cellular polypeptide hormone receptors. The demonstration of specific binding sites for insulin and human growth hormone in Golgi fractions isolated from the liver of female rats. J. BIOL. CHEM., 1978, 253, 4058-4066.
- BONNETERRE J., PEYRAT JP., VENNIN P., VANDEWALLE B., CAPPELAERE P. Les récepteurs hormonaux dans les cancers du sein en 1983. Intérêt pratique. SENOLOGIA, 1983, 2, 1, 1-10.
- CARPENTER G. The biochemistry and physiology of the receptor-kinase for epidermal growth factor. MOL. CELL. ENDOCRINOL., 1983, 31, 1-19.
- CATT KJ., DUFAU ML., TSURUHARA T. Studies on a radioligand receptor assay system for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1971, 32, 860-863.
- CATT KJ., DUFAU ML. Spare gonadotrophin receptors in rat testis. NATURE NEW BIOL., 1973, 244, 219-221.
- CATT KJ., DUFAU ML., NEAVES WB., WALSH PC. WILSON JD. LH-hCG receptors and testosterone content during differentiation of the testis in the rabbit embryo. ENDOCRINOLOGY, 1975, 97, 1157-1163.
- CATT KJ., KETELSLEGERS JM., DUFAU ML. Receptors for gonadotropic hormones. p. 175-250. In : METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY 9. METHODS IN RECEPTOR RESEARCH I, Melvin Blecker Ed., 1976.
- CHEN HJ., BRADLEY CJ., MEITES J. Stimulation of carcinogen induced mammary tumor growth in rats by adrenalectomy. CANCER RES., 1976, 36, 1414-1417.
- CHEN HJ., BRADLEY CJ., MEITES J. Stimulation of growth of carcinogen induced mammary cancers in rats by thyrotropin releasing hormone. CANCER RES., 1977, 37, 64-66.

- CIKES M. Expression of hormone receptors in cancer cells : a hypothesis. EUR. J. CANCER, 1978, 14, 211-215.
- CLERMONT Y., MAUGER A. Effect of a spermatogonial chalone on the growing rat testis. CELL TISSUE KINET., 1976, 9, 99-104.
- CODINA J., HILDEBRANDT JD., SEKURA RD., BIRNBAUMER M., BRYAN J., MANCLARK CR., IYENCAR R., BIRNBAUMER L.  $N_s$  and  $N_i$ , the stimulatory and inhibitory regulatory components of adenyl cyclases. Purification of the human erythrocytes proteins without the use of activating regulatory ligands. J. BIOL. CHEM., 1984, 9, 5871-5886.
- COHEN N., HILF R. Influence of insulin on growth and metabolism of 7,12 dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors. CANCER RES., 1974, 34, 3245-3252.
- COHEN N., HILF R. Effect of estrogen treatment on DMBA-induced mammary tumor growth and biochemistry in intact and diabetic rats (38535). PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 1975, 148, 339-343.
- COLENBRANDER B., KRUP TAM., DIELEMAN SJ. Changes in serum LH concentrations during normal and abnormal sexual development in the pig. BIOL. REPROD., 1977, 17 (4), 506-513.
- COOKE BA., LINDH LM., VAN DER MOLEN HJ. The mechanism of action of luteotropin on regulation protein(s) involved in Leydig cell steroidogenesis. BIOCHEM. J., 1979, 184, 33-38.
- COSTLOW ME., BUSCHOW RA., Mc GUIRE WL. Prolactin receptors in an estrogen receptor-deficient mammary carcinoma. SCIENCE, 1974, 184, 85-86.
- COSTLOW ME., BUSCHOW RA., Mc GUIRE WL. Prolactin receptors in 7,12-dimethylbenzanthracene-induced mammary tumors following endocrine ablation. CANCER RES., 1976, 36, 3941-3943.
- COSTLOW ME., Mc GUIRE WL. Prolactin receptors and hormone dependence in mammary carcinoma. p. 121-150. In : ENDOCRINE CONTROL IN NEOPLASIA. Sharma RK., Criss WE. Ed. Raven Press New-York, 1978.
- COSTLOW ME., HAMPLE A. Metabolic inhibitors increased prolactin binding to cultured mammary tumor cells. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 1980, 92, 213-220.
- CUATRECASAS P. Membrane receptors. ANNU. REV. BIOCHEM., 1974, 43, 169-214.
- DEMOULIN A., FRANCHIMONT P. In vitro inhibition of prolactin release by a substance present in human sperm (HSP). IRCS MEDICAL SCIENCE, 1978, 6, 533.
- DEMOULIN A., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. Le testicule normal : structure, fonction et acquisitions endocrinologiques récentes. J. GYNECOL. OBSTET. BIOL. REPROD., 1984, 1, 3-12.
- DE KRETZER DM. Changes in testicular interstitial cells in mice during post-natal development. Z. ZELLFORSCH, 1967, 108, 475-486.

- DE KRETZER DM., CATT KJ., BURGER HG., SMITH GC. Radioautographic studies on the localization of <sup>125</sup>I labeled human luteinizing and growth hormone in immature male rats. J. ENDOCRINOL., 1969, 43, 105-111.
- DE LA LLOSA P., DUROSAY M., TERTRIN-CLARY C., JUTISZ M. Chemical modification of lysine residues in ovine luteinizing hormone. Effect on biological activity. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 1974a, 342, 97-104.
- DE LA LLOSA P., MARCHE P., MORGAT JL., LLOSA-HERMIER MP. A new procedure for labelling luteinizing hormone with tritium. FEBS LETT., 1974b, 45, 1, 162-165.
- DE LA LLOSA-HERMIER MP., DE LA LLOSA P., HERMIER C. Studies on the binding activity to different gonadal receptors of ovine luteinizing hormone (LH) after chemical modification of lysine residues. GEN. COMP. ENDOCRINOL., 1977, 31, 302-306.
- DE MEYTS P. Cooperative properties of hormone receptors in cell membranes. J. SUPRAMOL. STRUCT., 1976, 4, 241-258.
- DENAMUR R. Reviews of the progress of dairy science. J. DAIRY RES., 1971, 38, 237-264.
- DE SOMBRE ER., KLEDZIK G., MARSHALL S., MEITES J. Estrogen and prolactin receptor concentrations in rat mammary tumors and response to endocrine ablation. CANCER RES., 1976, 36, 354-358.
- DEWAILLY D., PEYRAT JP., VANDEWALLE B., LEFEBVRE J. Les récepteurs de l'insuline et leur implication dans les états d'insulino-résistance. LA MEDECINE INFANTILE, 1980, 87, 84-89.
- DEWAILLY D., VANDEWALLE B., PEYRAT JP., LEFEBVRE J. La sensibilité périphérique aux androgènes : aspects fondamentaux et pratiques. LA MEDECINE INFANTILE, 1981, 88, 932-942.
- DICKSON RB., HUFF KK., LIPPMAN ME. Isolation of growth promoting peptides from serum free conditioned media of MCF-7 human breast cancer cells. 7th INT. CONGR. ENDOCRINOL., EXCERPTA MEDICA, 1984, p. 452, n° 384, 1984.
- DIERICHS R., WROBEL KH., SCHILLING E. Licht-und elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Leydigzellen des Schweines während der postnatalen Entwicklung. Z. ZELLFORSCH, 1973, 143, 207-227.
- DJIANE J., DURAND P., KELLY PA. Evolution of prolactin receptors in rabbit mammary gland during pregnancy and lactation. ENDOCRINOLOGY, 1977, 100, 1348-1356.
- DJIANE J., CLAUSER H., KELLY PA. Rapid down-regulation of prolactin receptors in mammary gland and liver. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 1979, 90, 4, 1371-1378.
- DJIANE J., DELOUIS C., KELLY PA. Prolactin receptors in organ culture of rabbit mammary gland : effect of cycloheximide and prolactin. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 1979b, 162, 342-345.



- DJIANE J., KELLY PA., HOUDEBINE LM. Effects of lysosomotropic agents, cytochalasin B and colchicine on the "down-regulation" of prolactin receptors in mammary gland explants. MOL. CELL. ENDOCR., 1980, 18, 87-98.
- DJIANE J., HOUDEBINE LM., KELLY PA. Down-regulation of prolactin receptors in rabbit mammary gland : differential subcellular localization. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 1981a, 168, 378-381.
- DJIANE J., HOUDEBINE LM., KELLY PA. Prolactin-like activity of anti-prolactin receptor antibodies on casein and DNA synthesis in the mammary gland. PROC. NATL. ACAD. SCI., USA, 1981b, 78, 7445-7448.
- DJIANE J., HOUDEBINE LM., KELLY PA. Correlation between prolactin-receptor interaction, down-regulation of receptors and stimulation of casein and deoxyribonucleic acid biosynthesis in rabbit mammary gland explants. ENDOCRINOLOGY, 1982, 110, 791-795.
- DJIANE J. Récepteurs de la prolactine dans la glande mammaire : leurs rôles dans les mécanismes de reconnaissance et de transfert de la stimulation hormonale. Thèse de Doctorat d'Etat, Université d'Orsay, Paris XIème, 1982.
- DUFAU ML., CATT KJ., TSURUHARA T. Gonadotropin stimulation of testosterone production by the rat testis in vitro. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 1971, 252, 574-579.
- DUFAU ML., BAUKAL AJ., CATT KJ. Hormone-induced guanyl nucleotide binding and activation of adenylate cyclase in the Leydig cell. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1980, 77, 5837-5841.
- DUFAURE JP., DU MESNIL DU BUISSON F., MORAT M., CHEVALIER M., LOCATELLI A. Effet de l'hypophysectomie et de l'administration d'hormone gonadotrope (hCG) sur les cellules de Leydig du testicule de verrat. C.R ACAD. SCI. PARIS, Série D, 1974, 279, 1907-1910.
- ELSAESSER F., PARVIZI N., ELLENDORFF F. Steroid feedback on luteinizing hormone secretion during sexual maturation in the pig. J. ENDOCR., 1978, 78, 329-342.
- ESSIG M., SCHOENFELD C., D'ELETTO R., AMELAR R., DUBIN L., STEINETZ BG., O BYRNE EM., WEISS G. Relation in human seminal plasma. ANN. N.Y. ACAD. SCI., 1982, 380, 224-229.
- FELDMAN HA. Statistical limits in Scatchard analysis. J. BIOL. CHEM., 1983, 258 (21), 12865-12867.
- FITZPATRICK SL., LACHANCE MP., SCHULTZ GS. Characterization of epidermal growth factor receptor and action of human breast cancer cells in culture. CANCER RES., 1984, 44, 3159-3642.
- FRANCHIMONT P., VERSTRAELEN-PROYARD J., HAZEE-HAGELSTEIN MT., RENARD Ch., DEMOULIN A., BOURGUIGNON JP., HUSTIN J. Inhibin from concept to reality. In : VITAMINS AND HORMONES. Munson PL. et al. Ed. Academic Press, New-York, 1979, 37, 243-302.

- FROWEIN J., ENGEL W. Constitutivity of the hCG-receptor protein in the testis of rat and man. NATURE, 1974, 249, 377-378.
- FURNALETTO RW., DI CARLO JN. Somatomedin-C receptors and Growth effects in human breast cells maintained in long-term tissue culture. CANCER RES., 1984, 44, 2122-2128.
- GANDILHON P., MELANCON R., GANDILHON F., DJIANE J., KELLY PA. Prolactin receptors in N-nitroso-N-methylurea- induced rat mammary tumors : relationship to tumor age and down-regulation in short term explant culture. ANTICANCER RES., 1983, 3, 203-206.
- GANDILHON P., MELANCON R., GANDILHON F., DJIANE J., KELLY PA. Prolactin receptors in explant cultures of carcinogen-induced rat mammary tumors. EUR. J. CANCER CLIN. ONCOL., 1983b, 19, 561-566.
- GAVISH M., AMIT T., BARKEY RJ., YODIM MBH. Characterization of CHAPS-solubilized prolactin receptors induced by estradiol in liver of male rats. Unmasking of cryptic sites by chaps. FEBS LETTERS, 1983, 154, 81-86.
- GELMAN AG. Guanine nucleotide-binding regulatory proteins and dual control of adenylate cyclase. J. CLIN. INVEST., 1984, 73, 1-4.
- GREENSTEIN BD. The role of hormone receptors in development and puberty. J. REPROD. FERT., 1978, 52, 419-426.
- GRUBBS CJ., DILL DL., FARNELL DR. N-nitroso-N-methyl urea induced mammary carcinogenesis : effect of pregnancy on preneoplastic cells. J. NAT. CANCER INST., 1983, 71, 625-628.
- GUILLEMIN R. On the word "Cybernin". In : INTROGONADAL REGULATION OF REPRODUCTION. Franchimont P., Channing CP. Eds. ACADEMIC PRESS. London, UK, 1981, 1-7.
- HALL PF., EIK-NES KB. The action of gonadotropic hormones upon rabbit testis in vitro. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 1962, 63, 411-422.
- HALL PF. On the stimulation of testicular steroidogenesis in the rabbit by interstitial cell-stimulating hormone. ENDOCRINOLOGY, 1966, 78, 690-698.
- HANSSON V., RITZEN EM., FRENCH FS., NAYFEH SN. Androgen transport and receptor mechanism in testis and epididymis. In : HANBOOK OF PHYSIOLOGY SECT. 7. Hamilton DW., Greep RO. Ed. AM. PHYSIOL. SOC., Washington, 1975, 5, 173-201.
- HAOUR F., SAEZ JM. Leydig cell responsiveness to LH-hCG stimulation. Mechanism of hCG and steroid induced refractoriness. p. 497-516. In : STRUCTURE AND FUNCTION OF GONADOTROPINS. Mc Kerns KW. Ed. Plenum Press, New-York, 1978.
- HAOUR F., DRAY F., MATHER JP. Response of Leydig cell to acute stimulation by hCG. ANN. N.Y. ACAD. SCI., 1982, 383, 231-248.
- HAUGER RL., AGUILERA G., CATT KJ. Angiotensine II regulates its receptor sites in the adrenal glomerulosa zone. NATURE, 1978, 271, 176-177.

- HENNEN G., PRUSIK Z., HAGHUIN-ROGISTER G. Porcine LH and its subunits. Isolation and characterization. EUR. J. BIOCHEM., 1971, 18, 3776-3883.
- HEUSON JC., LEGROS N. Effect of insulin and of alloxan diabetes on growth of the rat carcinoma in vivo. EUR. J. CANCER, 1970, 6, 349-351.
- HEUSON JC., LEGROS N., HEIMANN R. Influence of insulin administration on growth of the 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- induced mammary carcinoma in intact, oophorectomized and hypophysectomized rats. CANCER RES., 1972, 32, 233-238.
- HEUSON JC., LEGROS N. Influence of insulin deprivation on growth of the 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- induced mammary carcinoma in rats subjected to alloxan diabetes and food restriction. CANCER RES., 1972b, 32, 226-232.
- HEUSON JC., LEGROS H., HEUSON-STIENNON JA., LECLERCQ G., PASTEELS JL. Hormone dependency of rat mammary tumors. pp 81-93. In : BREAST CANCER : Trends in research and treatment. Heuson JC., Mathelem WH., Rozenzweig M. Eds., Raven press, New-York, 1976.
- HOLLANDER VP., DIAMOND EJ. Hormonal control in animal breast cancer. pp. 93-119. In : ENDOCRINE CONTROL IN NEOPLASIA. Sharma K., Criss WE. Eds. Raven Press, New-York, 1978.
- HOLLENBERG MD. Hormone receptor interactions at the cell membrane. PHARMACOL. REV., 1979, 30, 393-410.
- HORWITZ KB., Mc GUIRE WL. Progesterone and progesterone receptors in experimental breast cancer. CANCER RES., 1977, 37, 1733-1738.
- HOUEBINE LM., DJIANE J. Rôle des lysosomes, des microtubules et des microfilaments dans le mécanisme de l'action lactogène de la prolactine sur la glande mammaire de lapine. C.R. ACAD. SCI. PARIS, 1979, 289, 679-682.
- HOUEBINE LM., DJIANE J. Effects of lysosomotropic agents, microfilaments and microtubules disrupting drugs on the activation of casein gene expression by prolactin in the mammary gland. MOL. CELL. ENDOCR., 1980, 17, 1-15.
- HOUEBINE LM., OLLIVIER-BOUSQUET M., DJIANE J. Rôle des protéines membranaires liant la colchicine dans la transmission du message prolactinique aux gènes des caséines dans la glande mammaire de lapine. BIOCHIMIE, 1982, 64, 21-28.
- HSUEH AJW., DUFAU ML., CATT KJ. Gonadotropin induced regulation of luteinizing hormone receptors and desensitization of testicular 3'-5' cyclic AMP and testosterone responses. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1977, 74, 592-595.
- HUGGINS C., BRIZIARELLI G., SUTTON H. Jr. Rapid induction of mammary carcinoma in the rat and the influence of hormones on the tumors. J. EXP. MED., 1959, 109, 25-41.
- HUHTANIEMI IT., KORENBROT CC., JAFFE RB. hCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1977, 44, 963-967.



- JOSSO N., PICARD JY., TRAN D. The anti-mullerian hormone. In : RECENT PROGRESS IN HORMONE RESEARCH. Greep RD. Ed. Academic Press, New-York, 1977, 33, 117-160.
- KAHN CR. Membrane receptors for polypeptide hormones. In : METHODS IN MEMBRANE BIOLOGY. Korn ED. Ed. Plenum Publishing Corporation, New-York, 1975, 3, 81-146.
- KAHN CR., MEDO J., KASUGA M. Structure, biosynthesis and phosphorylation of the insulin receptor. p. 3-11. In : HORMONE RECEPTORS AND RECEPTOR DISEASES. Imura H., Kuzerya H. Eds. EXCERPTA MEDICA International Congress Series, 603, 1983.
- KAMATRA T., FERAMISCO JR. Is the ras oncogene protein a component of the epidermal growth factor receptor system. p. 11-16. In : CANCER CELLS 1. THE TRANSFORMED PHENOTYPE. Levine AJ. Ed. Cold Spring Harbor, New-York, 1984.
- KELLY PA., BRADLEY C., SHIU RPC., MEITES J., FRIESEN HG. Prolactin binding to rat mammary tumor tissue. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 1974, 146, 816-819.
- KELLY PA., TURCOT-LEMAY L., CUSAN L. Control of prolactin receptors in normal and neoplastic tissue. p. 171-184. In : HORMONES AND CANCER. Iacobelli S., Lindner HR., King RJB., Lippman ME. Eds. Raven Press (New-York), 1979a.
- KELLY PA., LEBLANC G., DJIANE J. Estimation of total prolactin binding sites after in vitro desaturation. ENDOCRINOLOGY, 1979b, 104, 1631-1638.
- KELLY PA., DJIANE J., KATOH M., FERLAND LH., HOUEBINE LM., TEYSSOT B., DUSANTER-FOURT I. The interaction of prolactin with its receptors in target tissues and its mechanism of action. REC. PROGRESS IN HORMONE RESEARCH, 1984, 40, 379-439.
- KETELSLEGERS JM., KNOTT GD., CATT KJ. Kinetics of gonadotropin binding by receptors of the rat testis. Analysis by a non linear curve-fitting method. BIOCHEMISTRY, 1975, 14, 3075-3083.
- KETELSLEGERS JM., HETZEL WD., SHERINS RJ., CATT KJ. Developmental changes in testicular gonadotropin receptors : plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat. ENDOCRINOLOGY, 1978, 103, 212-222.
- KIM U., FURTH J. The role of prolactin in carcinogenesis. VITAM. HORM., 1976, 34, 107-136.
- KLOTZ IM. Number of receptor sites from Scatchard graphs : facts and fantasies. SCIENCE, 1980, 217, 1247-1249.
- LARNER J., GALASKO G., CHENG K., DE PAOLI-ROACH AA., HUANG L., DAGGY P., KELLOG J. Generation by insulin of a chemical mediator that controls protein phosphorylation and dephosphorylation. SCIENCE, 1979, 206, 1408-1410.

- LAWRENCE NR., DAVIES AG. Stimulation of testicular protein synthesis in vivo by gonadotropins and growth hormone in hypophysectomized adult mice. J. REPROD. FERT., 1977, 49, 41-45.
- LEDWITZ-RIGBY F., RIGBY RW. et coll. Inhibitory action of porcine follicular fluid upon granulosa cell luteinization : in vitro assay and influence of follicular maturation. J. ENDOCRINOL., 1977, 74, 175-184.
- LEFKOWITZ RJ., CARON MG., STILES GL. Mechanisms of membrane-receptor regulation. Biochemical, physiological, and clinical insights derived from studies of the adrenergic receptors. N. ENG. J. MED., 1984, 310, 1570-1579.
- LEIDENBERGER F., REICHERT LE. Jr. Studies on the uptake of human chorionic gonadotropin and its subunits by rat testicular homogenates and interstitial tissue. ENDOCRINOLOGY, 1972, 91, 901-909.
- LEUNG BS., SASAKI GM. On the mechanism of prolactin and estrogen action in 7,12 dimethylbenz(a)anthracene induced mammary carcinoma in the rat. II. In vivo tumor responses and estrogen receptors. ENDOCRINOLOGY, 1975, 97, 564-572.
- LEUNG CKH., SHIU RPC. Required of both estrogen and pituitary factors for the growth of human breast cancer cells in athymic nude mice. CANCER RES., 1981, 41, 546-551.
- LEWIS D., HALLOWES RC. Correlation between the effects of hormones on the synthesis of DNA in explants from induced rat mammary tumors and the growth of the tumors. J. ENDOCRINOL., 1974, 62, 225-240.
- LIN MC., WELTON AF., BERMAN MF. Essential role of GTP in the expression of adenylate cyclase activity after cholera toxin treatment. J. CYCLIC NUCLEOTIDES RES., 1978, 4, 159-168.
- LIPPMAN M., BOLAN G. Oestrogen-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. NATURE, 1975, 256, 592-593.
- LIPPMAN M., BOLAN G., HUFF K. The effects of estrogens and anti-estrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. CANCER RES., 1976, 36, 4595-4601.
- LISCIA DS., ALHADI T., VONDERHAAR BK. Solubilization of active prolactin receptors by a non-denaturing zwitterionic detergent. J. BIOL. CHEM., 1982, 257, 9401-9405.
- LONDOS C., SALOMON Y., LIN MC., HARWOOD JP., SCHRAMM M., WOLF J., RODBELL M. 5' Guanylylimidodiphosphate, a potent activator of adenylate-cyclase system in eukaryotic cells. PROC. NAT. ACAD. SCI., 1974, 71, 3087-3090.
- LOUMAYE E., DE COOMAN S., THOMAS K. Immunoreactive relasin-like substance in human male seminal plasma. J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1980, 51, 1142-1143.
- LOUMAYE E., CATT KJ. Homologous regulation of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured pituitary cells. SCIENCE, 1982, 215, 983-985.

- MANCINI RE., CASTRO A., SEIGUER AC. Histological localization of follicle-stimulating and luteinizing hormone in the rat testis. J. HISTOCHEM. CYTOCHEM., 1967, 15, 516-525.
- MARX JL. A new view of receptor action. SCIENCE, 1984, 224, 271-274.
- MARX JL. What do oncogenes do ? SCIENCE, 1984b, 223, 673-676.
- MARX JL. Oncogene linked to growth factor receptor. SCIENCE, 1984c, 223, 806.
- MATSUZAWA A., YAMAMOTO T. No growth of the pregnancy-dependent mouse mammary tumor (TPD MT-4) without pituitary hormones. J. NAT. CANCER INST., 1977, 58, 1087-1091.
- MEITES J., LU KH., WUTTRE W. et coll. Recent studies on functions and control of prolactin secretion in rats. RECENT. PROGR. HORM. RES., 1972, 28, 471-526.
- MEITES J. Role of neuroendocrine system in regulation of mammary tumors in different species. ARCH. TOXICOL., 1979, 2, 47-58.
- MEITES J. Relation of the neuroendocrine system to the development and growth of experimental mammary tumors. J. NEURAL. TRANSMISSION, 1980, 48, 25-42.
- MENDELSON C., DUFAU ML., CATT KJ. Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cell. J. BIOL. CHEM., 1975, 250, 8818-8823.
- MEUSY-DESSOLLE N. Variation quantitative de la testostérone plasmatique chez le porc mâle, de la naissance à l'âge adulte. C.R ACAD. SCI. PARIS, Série D, 1975, 281, 1871-1878.
- MORAT M. Action morphogène des hormones gonadotropes sur les cellules de Leydig du testicule de ver de terre. I. Effet de l'hypophysectomie. ARCH. ANAT. MICR. MORPH. EXPER., 1977, 66, 119-142.
- MORAT M. Action morphogène des hormones gonadotropes sur les cellules de Leydig du testicule de ver de terre. II. Effets de l'administration de gonadotropine chorionique après hypophysectomie action in vivo et en culture organotypique. ARCH. ANAT. MICR. MORPH. EXPER., 1977b, 66, 181-205.
- MORI T., NAGASAWA H., BERN HA. Long term effects of perinatal exposure to hormones on normal and neoplastic mammary growth in rodents : a review. J. ENVIRONNEMENTAL PATHOL. TOXICOL., 1980, 3, 191-205.
- MOUNTJOY KG., HOLDAWAY IM., FINLAY GJ. Insulin receptor regulation in cultured human tumor cells. CANCER RES., 1983, 43, 4537-4542.
- MUKHERJEE AS., WASHBURN LL., BANERJEE MR. Role of insulin as a "permissive" hormone in mammary gland development. NATURE, 1973, 246, 159-160.
- MULDOON TG. Interplay between estradiol and prolactin in the regulation of steroid hormone receptor levels, nature and functionality in normal mouse mammary tissue. ENDOCRINOLOGY, 1981, 109, 1339-1346.



- MUNSON P.J., RODBARD D., KLOTZ IM. Number of receptor sites from Scatchard and Klotz graphs : a constructive critique. SCIENCE, 1983, 220, 979-981.
- MURPHY L.J., MURPHY LL., VRMOVSEK E., SUTHERLAND RL., LAZARUS L. Correlation of lactogenic receptor concentration in human breast cancer with estrogen receptor concentration. CANCER RES., 1984, 44, 1963-1968.
- MURPHY L.J., VRHOUSEK E., SUTHERLAND RL., LAZARUS L. Growth hormone binding to cultured human breast cancer cells. J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1984b, 58, 149-156.
- MURPHY L.J., VRMOUSEK E., Mc GINLEY R., MURPHY LC., SUTHERLAND RL., LAZARUS L. Growth hormone receptors in human breast cancer : correlation with estrogen receptor status. p. 313-320. In : PROGRESS IN CANCER RESEARCH AND THERAPY. Vol 31. Bresciani F. et coll. Eds. Raven Press (New-York), 1984c.
- NAGASAWA H., YANAI R. Effects of prolactin or growth hormone on growth of carcinogen induced mammary tumors of adreno-ovariectomized rats. INT. J. CANCER, 1970, 6, 488-495.
- NAGASAWA H. Prolactin and human breast cancer : a review. EUR. J. CANCER, 1979, 15, 267-279.
- NEAVES WB. Ultrastructural transformation of a murine Leydig cell tumor after gonadotropin administration. J. NAT. CANCER INST., 1973, 50, 1069-1073.
- NG KW., LIVESEY SA., LARKINS RG., MARTIN TJ. Calcitonin effects on growth and on selective activation of type II isoenzyme of cyclic adenosine 3'-5' monophosphate dependent protein kinase in T47-D human breast cancer cells. CANCER RES., 1983, 43, 784-800.
- OKA T., TOPPER YJ. Is prolactin mitogenic for mammary epithelium ? PROC. NAT. ACAD. SCI. USA, 1972, 69, 1693-1696.
- PASTEELS JL., HEUSON JC., HEUSON-STIENNON J., LEGROS N. Effects of insulin, progesterone and estradiol on DNA synthesis in organ culture of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- induced rat mammary tumors. CANCER RES., 1976, 36, 2162-2170.
- PEARSON OH., LLENERA O., LLENERA L., MOLINA A., BUTLER T. Prolactin-dependent rat mammary cancer : a model for man ? TRANS. ASSOC. AM. PHYSICIANS, 1969, 82, 225-237.
- POSNER BI., KELLY PA., FRIESEN HG. Prolactin receptors in rat liver possible induction by prolactin. SCIENCE, 1975, 188, 57.
- POSNER BI. Regulation of lactogen specific binding sites in rat liver : studies on the role of lactogens and oestrogens. ENDOCRINOLOGY, 1977, 99, 1168-1177.
- QUADRI SK., CLARK JL., MEITES J. Effects of LSD, paragyline and haloperidol on mammary tumor growth in rats. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 1973, 142, 22-26.
- RAE-VENTER B., DAO TL. Hydrodynamic properties of rat hepatic prolactin receptors. ARCH. BIOCH. BIOPHYS., 1983, 222, 12-21.

- REICHERT LE., SANZO MA., DIAS JA. Studies on purification and characterization of gonadotropin binding inhibitors and stimulators from human serum and seminal plasma. In : INTRAGONADAL REGULATION OF REPRODUCTION. p. 61-80. Franchimont P., Channing CP. Eds. Academic Press, London U.K, 1981.
- REIMAN EM., SOLOFF MS. The effect of radioactive contaminants on the estimation of binding parameters by Scatchard analysis. BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA, 1978, 533, 130-139.
- ROBISON GA., BUTCHER RW., SUTHERLAND EW. Cyclic AMP. ANNU. REV. BIOCHEM., 1968, 37, 149-174.
- RODBELL M., KRARS HMJ., POHL SL., BIRNBAUMER L. The glucagon sensitive adenylate cyclase system in plasma membranes of rat liver. V An obligatory role of quanyl nucleotides in glucagon action. J. BIOL. CHEM., 1971, 246, 1877-1881.
- RODBELL M., LIN MC., SALOMON Y., LONDOS C., HARWOOD JP., MARTIN BR., RENDEL M., BERMAN M. The role of adenine and quanine nucleotides in the activity and response of adenylate cyclase systems of hormones. ADV. CYCLIC NUCLEOTIDE RES., 1975, 5, 3-29.
- RODBELL M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. NATURE, 1980, 284, 17-22.
- ROMMERTS FFG., COOKE BA., VAN DER KEMP JWCM., VAN DER MOLEN HJ., Stimulation of 3', 5' cyclic AMP and testosterone in rat testis in vitro. FEBS LETT., 1972, 24, 251-254.
- ROMMERTS FFG., COOKE BA., VAN DER KEMP JWCM., VAN DER MOLEN HJ. Effect of luteinizing hormone on 3', 5' cyclic AMP and testosterone production in isolated interstitial tissue of rat testis. FEBS LETT., 1973, 33, 114-118.
- ROTTEN D., GAUTRAY JP. Physiologie et physiopathologie du sein au cours de la grossesse et du post-partum. ENCYCL. MED. CHIR. (Paris), Fasc. 5008 A30, 1978, 6, 1-28.
- RUDLAND PD., HALLOWES RC., DURBIN H., LEWIS D. Mitogenic activity of pituitary hormones on cell cultures of normal and carcinogen-induced tumor epithelium from rat mammary glands. J. CELL. BIOL., 1977, 73, 561-577.
- SASAKI GH., LEUNG BS. On the mechanism of hormone action in 7,12 dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor. I. Prolactin and progesterone effects on estrogen receptor in vitro. CANCER, 1975, 35, 645-651.
- SCATCHARD G. The attraction of proteins for small molecules and ions. ANN. N.Y. ACAD. SCI., 1949, 51, 660-672.
- SCHAFER DE. Measurement of receptor-ligand binding : theory and practice. p. 445-507. In : TRACER KINETICS AND PHYSIOLOGICAL MODELING. Lambrecht RM., Rescigno A. Eds. Springer Verlag, Berlin, 1983.
- SCHRAMM M., SELINGER Z. Message transmission : receptor controlled adenylate cyclase system. SCIENCE, 1984, 225, 1350-1356.

- SHAFIE S., BROOKS SC. Effect of prolactin on growth and the estrogen receptor level of human breast cancer cells (MCF-7). *CANCER RES.*, 1977, 37, 792-799.
- SHARPE RM. Extra-pituitary actions of LH-RH and its agonists. *NATURE*, 1980, 286, 12-14.
- SHARPE RM., FRASER HM. hCG stimulation of testicular LH-RH-like activity. *NATURE*, 1980, 287, 642-643.
- SHIU RPC., FRIESEN HG. Solubilization and purification of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland. *J. BIOL. CHEM.*, 1974, 249, 7902-7911.
- SHIU RPC. Prolactin receptors in human breast cancer cells in long-term tissue culture. *CANCER RES.*, 1979, 39, 4381-4386.
- SHIU RPC., PATERSON JA. Alteration of cell shape, adhesion, and lipid accumulation in human breast cancer cells (T47-D) by human prolactin and growth hormone. *CANCER RES.*, 1984, 44, 1178-1186.
- SINGER SJ. The fluid mosaic model of membrane structure. Some applications to ligand receptors and cell-cell interactions. p. 1-24. In : *SURFACE MEMBRANE RECEPTORS : Interface between cells and their environment*. Bradshaw R. Ed. Plenum Press, 1976.
- SINHA D., COOPER D., DAO TL. The nature of estrogen and prolactin effect on mammary tumorigenesis. *CANCER RES.*, 1973, 33, 411-414.
- SMITH RD., HILF R., SENIOR AE. Prolactin binding to mammary gland, 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene-induced mammary tumors and liver in rats. *CANCER RES.*, 1976, 36, 3726-3732.
- SPIEGEL AH., DOWNS RW. Guanine nucleotides : key regulators of hormone receptor-adenylate cyclase interaction. *ENDOCRINE REV.*, 1981, 2, 275-305.
- STEINBERGER A. Regulation of inhibin secretion in the testis. p. 283-298. In : *INTRAGONADAL REGULATION OF REPRODUCTION*. Franchimont P., Channing CP. Eds. Academic Press, London U.K., 1981.
- STEINBERGER A., STEINBERGER E. Inhibition of FSH by a Sertoli cell factor in vitro. p. 271-279. In : *THE TESTIS IN NORMAL AND INFERTILE MEN*. Troen P., Nankin HR. Eds. Raven Press, New-York, 1976.
- STILES CD. The biological role of oncogenes : insights from platelet-derived growth factor. *PROC. AM. ASS. CANCER RES.*, 1984, 398.
- SUTHERLAND EW., RALL TW., MENON T., MURAD F., CHI YM., KALINER LH., FREIDBERG JL. Adenyl cyclase. *J. BIOL. CHEM.*, 1956, 237, 1220-1243.
- TELL GPE., HAOUR F., SAEZ JM. Hormonal regulation of membrane receptors and cell responsiveness : a review. *METABOLISM*, 1978, 14, 1566-1592.
- TERENIUS L. Selective retention of estrogen isomers in estrogen-dependent breast tumors of the rat demonstrated by in vitro methods. *CANCER RES.*, 1968, 28, 328-337.
- THUMANN A., BUSTOS-OBREGON E. An in vitro system for the study of rat spermatogonial proliferative control. *ANDROLOGIA*, 1978, 10, 22-25.



- TOPPER YJ., FREEMAN CS. Multiple hormone interaction in the developmental biology of the mammary gland. *PHYSIOL. REV.*, 1980, 60, 4, 1049-1106.
- TURKINGTON RW. Prolactin receptors in mammary carcinoma cells. *CANCER RES.*, 1974, 34, 758-763.
- VERHOEVEN GFM., WILSON SD. The syndromes of primary hormone resistance. *METABOLISM*, 1979, 28, 253-289.
- VIGNON F., ROCHEFORT H. Regulation of estrogen receptors in ovarian dependent rat mammary tumors. I. Effect of castration and prolactin. *ENDOCRINOLOGY*, 1976, 98, 722-729.
- WANG JYJ., WILLIAMS LT. A-v-sis oncogene protein produced in bacteria competes for platelet-derived growth factor binding to its receptor. *J. BIOL. CHEM.*, 1984, 259, 10645-10648.
- WATERFIELD MD., SCRACE GI., WHITTLE N. Platelet derived growth factor is structurally derived to the putative transforming p28-sis of simian sarcoma virus. *NATURE*, 1983, 304, 35-39.
- WEDER HG., SCHILDKNECHT J., LUTZ RA., KESSELRING P. Determination of binding parameters from Scatchard plots. Theoretical and practical considerations. *EUR. J. BIOCHEM.*, 1974, 42, 475-481.
- WEINBERG Une base moléculaire du cancer. *POUR LA SCIENCE*, 1984, 1, 12-26.
- WELSCH CW., RIVERA EM. Differential effects of estrogen and prolactin on DNA synthesis in organ cultures of DMBA-induced rat mammary carcinoma. *PROC. SOC. EXP. BIOL. MED.*, 1972, 139, 623-626.
- WELSCH CW. Interaction of estrogen and prolactin in spontaneous mammary tumorigenesis of the mouse. *J. TOXICOL. ENVIRONMENTAL HEALTH*, 1976, 1, 161-175.
- WELSCH CW., NAGASAWA M. Prolactin and murine mammary tumorigenesis : a review. *CANCER RES.* 1977, 37, 951-963.
- WOODS MC., SIMPSON ME. Pituitary control of the testis of the hypophysectomized rat. *ENDOCRINOLOGY*, 1961, 69, 91-125.
- YANI R., NAGASAWA H. Importance of progesterone in DNA synthesis of pregnancy dependent mammary tumors in mice. *INT. J. CANCER*, 1976, 18, 317-321.

TITRE DE LA THESE :

LA RECEPTIVITE AUX HORMONES POLYPEPTIDIQUES EN SITUATION  
PHYSIOLOGIQUE ET EN PATHOLOGIE TUMORALE

RESUME

Nous avons mis en évidence des récepteurs aux hormones polypeptidiques dans deux tissus différents. Les récepteurs de l'hormone lutéinisante (R-LH) dans le testicule de porc ont une affinité élevée pour leur ligand ( $K_a=10^{10} \text{ M}^{-1}$ ), sont en nombre limité ( $7 \cdot 10^{-13}$  moles par gramme de testicule) et leur spécificité ne s'exerce que vis-à-vis des hormones à activité lutéinisante. Les récepteurs de la prolactine (R-PRL) dans les cancers du sein humain ont eux aussi une affinité élevée pour leur ligand ( $K_a=3,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) sont en nombre limité ( $12,5$  fmoles par mg de protéines de membranes cellulaires) et leur activité ne s'exerce que vis-à-vis des hormones à activité lactogène.

Dans le testicule de porc l'affinité des R-LH ne change pas au cours du développement post-natal. Pendant la période néonatale, le nombre de R-LH par cellule de Leydig augmente jusqu'à 30 jours. A partir du 30ème jour, on observe une diminution de ce nombre jusqu'au 100ème jour, moment où débute la période pré-pubertaire. Après 100 jours, le nombre de R-LH par cellule de Leydig augmente à nouveau ; le nombre total de R-LH augmente aussi fortement en raison de la croissance testiculaire. Ces résultats sont comparés aux variations des concentrations de LH et de testostérone circulantes.

Les R-PRL ne sont détectés que dans environ la moitié des cancers du sein. Une partie des R-PRL est masquée par l'hormone endogène. Une diminution des concentrations circulantes de PRL ne modifie pas les concentrations de récepteurs. En présence de récepteurs de la PRL 32 % tumeurs répondent à la PRL, in vitro, par une augmentation de la synthèse d'ADN. Enfin, de l'alpha-lactalbumine sérique est détectable en l'absence de R-PRL dans les cancers du sein.

La confrontation des résultats des deux études met en évidence des différences majeures dans le fonctionnement des récepteurs aux hormones polypeptidiques. Contrairement à ce qui est observé en situation physiologique, il y a absence de régulation du récepteur par l'hormone homologue et dissociation entre réceptivité et sensibilité cellulaire dans les cancers du sein.

Mots clefs : Récepteurs, hormone lutéinisante, prolactine, testicule, glande mammaire

