

50376
1987
231

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376
1987
231

Année 1987

N° d'ordre : 741

THESE

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

Docteur es-sciences naturelles

option biochimie

par

Brigitte VANDEWALLE



OESTROGENES ET CATECHOLOESTROGENES DANS LES CANCERS DU SEIN

Effets sur la croissance et la différenciation cellulaires

présentée le 16 Septembre 1987 devant la Commission d'Examen

JURY

Président et rapporteur : Professeur J. KREMBEL
Rapporteurs : Professeur J. LEFEBVRE
Professeur F. BAYARD
Examineurs : Docteur S. SAEZ
Professeur M. PORCHET
Docteur L. IVAN

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, CORDONNIER, 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	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CAYATTE Jean-Louis	Sciences économiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean-Jacques	Biologie
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences économiques
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean-Paul	Spectrométrie des solides
M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographi-
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphé-
	riques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GREGORY Pierre	I.P.A.
M. GREMY Jean-Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNEL Gérard	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

Ce travail a été réalisé au Centre Anticancéreux de la Région Nord et je remercie particulièrement le Professeur A. DEMAILLE, Directeur du Centre, de m'avoir donné les moyens de le mener à terme.

Les différents thèmes de recherche ont aussi été soutenus par :

*- le COMITE DEPARTEMENTAL DE LA LIGUE NATIONALE FRANCAISE
CONTRE LE CANCER DU NORD ET DU PAS-DE-CALAIS*

*- LA FNCLCC : FEDERATION NATIONALE DES CENTRES DE LUTTE
CONTRE LE CANCER*

*. Etude de l'hormonosensibilité des tumeurs malignes en cultures
organotypiques et primaires*

*. Récepteurs de la transferrine et activité proliférative des cellules
épithéliomateuses mammaires : implications pronostiques et thérapeu-
tiques*

- L'ARC : ASSOCIATION POUR LA RECHERCHE SUR LE CANCER

Subvention n° 6499

*. Etude du rôle potentiellement anti-oestrogénique des catéchol-
oestrogènes dans le cancer du sein*

Qu'il me soit permis d'exprimer ma gratitude à mes Juges :

Monsieur le Professeur KREMBEL

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de présider ce Jury. Vous nous avez accueillis dans votre laboratoire lors de la mise en route du dosage des récepteurs hormonaux dans le sein et m'avez depuis toujours soutenue dans mon travail. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur LEFEBVRE

Vous suivez depuis plus de 10 ans l'évolution de ma carrière et m'avez toujours facilité la tâche. Tout au long de ce travail vous m'avez aidée et encouragée. Soyez-en remercié et veuillez accepter le témoignage de ma reconnaissance et de mon fidèle attachement.

Monsieur le Professeur BAYARD

Vous m'avez fait bénéficier de vos critiques et de vos conseils et fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Permettez-moi de vous exprimer ma reconnaissance et mes sincères remerciements.

Madame le Docteur SAEZ

Votre compétence alliée à une grande disponibilité et une grande gentillesse m'ont été précieuses lors de la rédaction de cette thèse. Soyez assurée de ma profonde gratitude et du plaisir de vous compter parmi mes juges.

Monsieur le Professeur PORCHET

Soyez remercié pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et de l'honneur que vous me faites de participer à ce Jury.

Madame le Docteur IVAN

Votre tenacité et votre grande faculté de travail m'ont toujours marquée et stimulée. Je vous exprime ma reconnaissance pour les encouragements et les conseils que vous m'avez toujours prodigués.

C'est avec plaisir que je remercie tous ceux qui ont contribué à ce travail ou l'ont facilité :

- Mes collègues du Centre Oscar Lambret : Jean-Philippe PEYRAT, Jacques BONNETERRE, Marie-Odile VILAIN, Philippe VENNIN, Anne-Marie GRANIER et Bernard HECQUET qui m'ont tous aidée à différentes étapes de ces travaux.

- Maude COLLYN-D'HOOGHE, Jean-Bernard SAVARY et Frédéric HILLDEBRANDT avec qui ma collaboration fut très fructueuse et enrichissante.

- Enfin je n'aurais garde d'oublier :

. Louis HORNEZ dont la grande compétence technique, l'esprit critique et l'ingéniosité ont été indispensables à la réalisation de ce travail.

. Yvette VENDEL qui, avec patience et bonne humeur, a dactylographié ce manuscrit.

Les publications rapportées dans cette thèse sont :

- article I : page 15

Establishment and characterization of a new cell line (VHB-1) derived from a primary breast carcinoma.

B. Vandewalle, M. Collyn-D'Hooghe, JB. Savary, MO. Vilain, JP. Payrat, M. Deminatti, A. Delobelle-Deroide, J. Lefebvre
J. Cancer Res. Clin. Oncol., 1987 (sous presse)

- article II : page 37

Nuclear estradiol binding sites in human breast cancer.

B. Vandewalle, JP. Peyrat, J. Bonneterre, B. Hecquet, D. Dewailly, J. Lefebvre
Cancer Res., 1983, 43, 4497-4503.

- article III : page 52

Catecholesterol binding sites in breast cancer.

B. Vandewalle, JP. Peyrat, J. Bonneterre, J. Lefebvre
J. Steroid Biochem., 1985, 23, 603-610.

- article IV : page 96

Transferrin receptors in cultured breast cancer cells.

B. Vandewalle, AM. Granier, JP. Peyrat, J. Bonneterre, J. Lefebvre
J. Cancer Res. Clin. Oncol., 1985, 110, 71-76.

- article V : page 97

Further characterization of the light breast cyst fluid protein GCDFP-15

B. Vandewalle, L. Hornez, P. Vennin, JP. Peyrat, J. Lefebvre
Biochimie, 1986, 68, 649-656.

D'autres résultats acquis dans le domaine de l'hormonosensibilité des cancers du sein ont conduit aux publications ou communications suivantes :

- VANDEWALLE B., PEYRAT JP., DEWAILLY D., BONNETERRE J.,
DEMAILLE A., LEFEBVRE J.
Nuclear estrogen receptor assay in human breast cancer. relation with cytoplasmic estrogen and progesterone receptors. Reviews on Endocrine Related Cancer, 1981, suppl. 9, 83-94.
- BONNETERRE J., PEYRAT JP., VANDEWALLE B., VIE MC., BEUSCART R.,
DEMAILLE A. *A multimodal approach to the hormone dependence of human breast cancer. UICC, 13th International Cancer Congress, Seattle, October 1982. Abst. n° 3355.*
- BONNETERRE J., VANDEWALLE B., PEYRAT JP., GOSSELIN P.,
SERVENT V., VIE MC., DEMAILLE A. *Steroids and gonadotropins levels in artificial menopause. Second International Congress on Hormones and Cancer, Monte Carlo, September 1983. In : J. STEROID. BIOCHEM., 1983, 19S, 76.*
- BONNETERRE J., PEYRAT JP., VENNIN Ph., VANDEWALLE B.,
CAPPELAERE P.
Hormonal receptors in breast cancer in 1983. Pratical interest. Int. J. Breast and Mammary Pathologie - Sénologia, 1983, 2, 1-10
- VANDEWALLE B., BONNETERRE J., PEYRAT JP., LEFEBVRE J.,
DEMAILLE A. *Nuclear estradiol receptors in breast cancer : characterization and relation with clinical pathological and other hormonal features. Second International Congress on Hormones and Cancer, Monte Carlo, September 1983. In : J. STEROID. BIOCHEM., 1983, 19S, 399.*
- BONNETERRE J., HORNER D., PEYRAT JP., CAMBIER L.,
VANDEWALLE B., EVAIN P., DEMAILLE A.
Valeur pronostique des récepteurs hormonaux stéroïdiens dans les cancers évolués du sein. IVème Forum de Cancérologie (Société Française du Cancer, Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer), Paris 28-29 Mai 1984. In : BULL. CANCER, 1984, 71, 241-242.

- PEYRAT JP., DJIANE J., KELLY PA., VANDEWALLE B., BONNETERRE J., DEMAILLE A.
Characterization of prolactin receptors in human breast cancer. Breast Cancer Res. Treat., 1984, 4, 275-281.

- VANDEWALLE B., GRANIER AM., PEYRAT JP., BONNETERRE J., LEFEBVRE J.
Transferrin receptors in cultured breast cancer cells. International Congress on Endocrinology of the Breast, Torino, Italy, September 18-22, 1984.

- VANDEWALLE B., BONNETERRE J., PEYRAT JP., LEFEBVRE J.
Estradiol and catecholestrogen binding sites in breast cancer. 7th International Congress of Endocrinology. Quebec, Juin 1984. In : Excerpta Medica Int. Congress Series 652, 1984, p. 1526 n°2532.

- BONNETERRE J., HORNER D., PEYRAT JP., VANDEWALLE B., CAMBIER L., DEMAILLE A.
Estradiol on progesterone receptors in breast cancer. Prognostic value after relapse. Breast Cancer Res. Treat., 1985, 5, 149-155.

- LEFEBVRE J., PEYRAT JP., VANDEWALLE B., BONNETERRE J., DEMAILLE A.
Les récepteurs hormonaux en pathologie mammaire. Les aspects actuels. VIIèmes Journées de la Société Française de Sénologie et de Pathologie Mammaire. Lille, Le Touquet, 3-5 Octobre 1985. In : Les maladies du sein en 1985. Formation Médicale en Sénologie. A. Demaille et al. Ed. MASSON (Paris), 1985, p. 137-192.

- VANDEWALLE B., PEYRAT JP., VENNIN Ph., LEFEBVRE J.
Protéine de kyste du sein : caractérisation biochimique. Vè Congrès Français d'Endocrinologie, Bordeaux, 3-5 Octobre 1985. In : ANN. ENDOCRINOL., 1985, 46, p. 135 n° 21.

- COLLYN-D'HOOGHE M., VANDEWALLE B., LOUCHEUX-LEFEBVRE MH.
A new breast tumor cell line (VHB-1) derived from a solid carcinoma. Characterization and expression of cellular oncogenes. IVth Annual ECP Symposium. Concepts and theory in carcinogenesis. Brugge, Belgium, June 11-13 1986. In : CANCER LETTERS, 1986, 30, S41.

- PEYRAT JP., BONNETERRE J., VANDEWALLE B., VENNIN Ph., LESOIN A., LEFEBVRE J.
Prolactin receptors and lactalbumin plasma level production in human breast cancers. ANN. N.Y. ACAD. SCI., 1986, 264, 427-430.

- VANDEWALLE B., GRANIER AM., PEYRAT JP., BONNETERRE J., LEFEBVRE J.
Detection of transferrin receptors in cultured breast cancer cells. ANN. N.Y. ACAD. SCI., 1986, 464, 482-486.

- VANDEWALLE B., BONNETERRE J., PEYRAT JP., LEFEBVRE J.
Transferrin receptors in breast tumors : relation with steroid receptors and anatomoclinical features. First International Congress on Cancer and Hormones. Rome, April 23-27, 1986. In : ANTICANCER RES., 1986, 6, (3) 374.

- VANDEWALLE B., HORNEZ L., LEFEBVRE J.
Solubilization and characterization of catecholestrogen microsomal binding sites in an estrogen receptor positive human breast cancer cell-line. VIIth International Congress on Hormonal Steroids, Madrid, September 21-26, 1986.

ABREVIATIONS UTILISEES

<i>RE</i>	<i>Récepteur d'oestrogène</i>
<i>CE</i>	<i>Catécholestrogènes</i>
<i>2OH-E1</i>	<i>2-hydroxy-oestrone</i>
<i>E2</i>	<i>Oestradiol</i>
<i>E1</i>	<i>Oestrone</i>
<i>COMT</i>	<i>Catéchol-O-méthyltransférase</i>
<i>AEBS</i>	<i>Site anti-oestrogénique (Anti-Estrogen Binding Site)</i>
<i>EDTA</i>	<i>Acide éthylènedinitrotétra-acétique - sel disodique</i>
<i>CHAPS</i>	<i>(3(3-chloramidopropyl-diméthylammonio)-1-propane sulfonic acid</i>
<i>SVNN</i>	<i>Sérum de veau nouveau-né</i>
<i>SVF</i>	<i>Sérum de veau foetal</i>
<i>SVF-DCC</i>	<i>Sérum de veau foetal traité au charbon-dextran</i>
<i>fmole</i>	<i>femtomole</i>

INTRODUCTION

L'implication des hormones dans la croissance et la différenciation des cellules mammaires est connue depuis longtemps. L'expérimentation animale et la culture de tissus ont permis de préciser, à différentes étapes de la morphogénèse, l'impact de chaque hormone sur les différents constituants de la glande mammaire (TOPPER, 1980 ; HOUDEBINE, 1985).

Rappelons que la glande mammaire est composée de plusieurs lobes drainés chacun par un canal galactophore qui s'abouche par un pore au mamelon. Les 15 à 25 lobes mammaires sont maintenus dans une enveloppe fibro-graisseuse. A l'intérieur du lobe, chaque canal se ramifie en plusieurs canaux secondaires dont chacun, après s'être divisé en plusieurs branches, draine un groupe de lobules. Les canaux galactophores et les structures lobulo-alvéolaires sont constitués de cellules épithéliales qui reposent sur une assise continue ou discontinue de cellules myoépithéliales dont le rôle est triple : excrétion du lait, nutrition de l'épithélium et tissu de réserve. Ces structures sont entourées de tissu conjonctif intra- et extra-lobulaire qui est hormonodépendant (HAAGENSEN, 1971). Son contenu vasculonerveux participe à la nutrition et à la fonction sécrétoire de la glande. Le tissu adipeux de l'enveloppe fibro-graisseuse est le siège de l'aromatisation des androgènes en oestrogènes et participe comme les autres tissus à l'élaboration du milieu hormonal qui influence directement ou indirectement les cellules épithéliales mammaires.

Certains cas pathologiques en clinique humaine (puberté précoce) ou l'administration d'hormones de synthèse (cancer de la prostate, traitements oestrogéniques et progestatifs substitutifs à visée contraceptive) ont conforté les résultats des expérimentations animales et enfin récemment, la mise en évidence de récepteurs hormonaux intra-cellulaires de l'oestradiol et de

la progestérone a permis de confirmer les faits expérimentaux accumulés, à savoir que les différentes hormones mammatropes sont essentiellement les oestrogènes, la progestérone et la prolactine ; les autres hormones (thyroïdiennes, glucocorticoïdes, androgènes, hypophysaires) ont un rôle probablement accessoire ou mal connu.

Toutes ces hormones agissent en synergie sur le sein.

Les oestrogènes sont essentiellement des hormones de la croissance mammaire. Ils favorisent les mitoses et accélèrent la synthèse de l'ADN. Cette action s'exerce sur les galactophores qui s'allongent et se ramifient et sur les cellules conjonctives (BASSLER, 1970). L'augmentation de la vascularisation du conjonctif palléal et de la perméabilité capillaire qui leur est due permet le passage de substances nécessaires aux mitoses cellulaires. Ils sont de plus responsables de la distribution de la graisse sous-cutanée.

La progestérone, l'hormone de la différenciation sécrétoire de la glande, ne peut agir que sur un sein préalablement soumis à l'influence des oestrogènes. Elle favorise les synthèses protéiques et oriente l'organisation cellulaire des acinis dans le sens sécrétoire. Elle s'oppose à l'action des oestrogènes en bloquant les mitoses cellulaires, particulièrement au niveau des galactophores et du conjonctif, en diminuant la perméabilité capillaire et la dilatation vasculaire et en accélérant la transformation de l'oestradiol en oestrone. La progestérone associée aux oestrogènes permet donc un développement optimal de la portion sécrétoire de la glande tout en limitant l'effet prolifératif de ces oestrogènes sur les galactophores. En synergie encore avec les oestrogènes, elle bloque l'action lactogène de la prolactine au niveau de la cellule acineuse.

La prolactine est essentiellement l'hormone de la lactation ; elle provoque l'activation des gènes de synthèse des différents constituants du lait. Son rôle dans le développement de la glande mammaire qui paraissait très accessoire semble être remis en question. Elle serait l'inducteur essentiel de la différenciation cellulaire (HOUDEBINE, 1985).

Parmi les hormones dont le rôle est moins connu, il est à noter l'insuline et l'hormone de croissance qui favorisent la croissance du tissu mammaire en culture (CERIANI, 1972) , le cortisol qui induit la synthèse des lactoprotéines, les hormones thyroïdiennes qui stimulent le développement canalaire et les androgènes qui ont un rôle supposé, mais non prouvé dans la trophicité acineuse (LLOYD, 1979).

Cette revue sommaire de l'endocrinologie du sein met en relief la complexité des interactions hormonales affectant la croissance et la différenciation des cellules normales.

Les hormones sont aussi largement impliquées dans le processus de tumorigénèse, et la croissance des cellules tumorales mammaires.

L'oestradiol (E2) joue dans ces processus un rôle primordial et ses modes de fixation et d'action dans les cellules tumorales mammaires ont été et sont encore très amplement étudiés. Notre contribution en ce domaine est la mise en évidence, dans les cancers du sein, d'un site nucléaire de faible affinité pour E2 dont un rôle précis dans la croissance reste à définir clairement.

Considérés comme composés inactifs, les métabolites de l'oestradiol ont pendant longtemps suscité peu d'intérêt. Il est maintenant connu que leur inefficacité est due à un pouvoir de rétention faible dans le noyau et que

sous stimulation continue, ils sont généralement agonistes de l'oestradiol (CLARK, 1976). Des expériences récentes tendraient pourtant à montrer que quelques uns d'entre eux, notamment certains catécholoestrogènes, auraient des effets différents de ceux des oestrogènes parents (NAGASAWA, 1981). Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'un d'entre eux, le 2hydroxy-oestrone (2OH-E1) et avons étudié sa spécificité de liaison aux différentes fractions sub-cellulaires du tissu tumoral mammaire.

Les effets des deux stéroïdes parents : E2 et 2OH-E1 ont été appréciés à l'aide de modèles cellulaires. Il nous a paru intéressant d'estimer les effets cellulaires par des approches variées et nous avons, pour ce faire, mis au point nos "outils" de travail. Dans l'étude de la croissance cellulaire, nous ajoutons à l'estimation classique du nombre de cellules, l'étude et la mesure des récepteurs de la transferrine qui reflètent l'activité proliférative des cellules. Dans l'étude de la différenciation fonctionnelle des cellules, nous complétons l'analyse des protéines synthétisées ou sécrétées par l'étude et la mesure d'une protéine caractéristique des cellules différenciées de type apocrine : la "Gross Cystic Disease Fluid Protein" (GCDFP-15).

La première partie de ce travail est centrée sur l'étude des oestrogènes dans les cancers du sein, la deuxième sur l'étude d'un de leur métabolite, le catécholoestrogène 2-hydroxy-oestrone (2OH-E1), et notamment l'étude de sa fixation dans les tumeurs du sein. Dans une troisième partie, nous rapportons les effets de ces deux stéroïdes parents sur la croissance et la différenciation fonctionnelle des cellules tumorales mammaires en culture.

BASES DE TRAVAIL

A - MATERIEL D'ETUDE

Les échantillons de tumeur du sein ont été obtenus lors des interventions chirurgicales. Dès l'ablation, chaque échantillon a été séparé en deux morceaux : l'un destiné à l'étude anatomopathologique immédiate, l'autre conservé dans l'azote liquide en vue des études biochimiques ultérieures.

Nous avons utilisé en outre des modèles : les lignées cellulaires classiques comme la lignée MCF-7 hormonosensible établie par SOULE en 1973 et la lignée MDA-MB-231 hormono-insensible établie par CAILLEAU en 1974 ; ces deux lignées dérivent de métastases pleurales de cancer du sein. Nous rapportons aussi dans ce travail beaucoup d'études effectuées sur une nouvelle lignée, appelée VHB-1, que nous avons établie à partir d'un carcinome galactophorique. Ces cellules possèdent les récepteurs de l'oestradiol, de la progestérone, des androgènes, des glucocorticoïdes et de la prolactine. Elles ne peuvent induire de tumeurs chez la souris nude qu'en présence d'oestradiol. N'étant établie que depuis 2 ans à partir d'une tumeur primitive, cette lignée représente un modèle très proche de la tumeur d'origine. Ses caractéristiques sont détaillées dans l'article I.

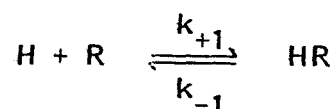
B - RAPPEL DES CARACTERISTIQUES DE LIAISON D'UNE HORMONE SUR UN SITE RECEPTEUR SPECIFIQUE

Les caractéristiques de liaison sont déduites d'expérimentations qui consistent à incuber des concentrations d'hormone marquée avec des fractions sub-cellulaires ou des cellules entières contenant les récepteurs.

Après incubation, le complexe hormone-récepteur est séparé de l'hormone libre.

a) Interaction hormone-récepteur

Le récepteur doit être suffisamment spécifique et former avec l'hormone un complexe (HR) réversible, saturable, de haute affinité et faible capacité. Le modèle le plus simple est représenté par une réaction à une seule étape, bimoléculaire et réversible :



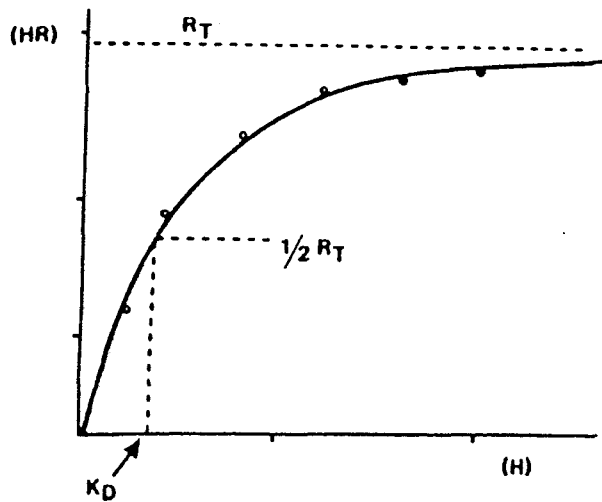
qui obéit à la loi d'action de masse, ainsi à l'équilibre $K_A = (HR)/(H).(R)$ où (HR) représente la concentration d'hormone liée ; (H) celle de l'hormone libre et (R) la concentration des sites non occupés, soit $(R_T) - (HR)$, où (R_T) est la concentration en sites totaux.

K_A est la constante d'association à l'équilibre (en M^{-1}), inverse de la constante de dissociation, K_D (en M) :

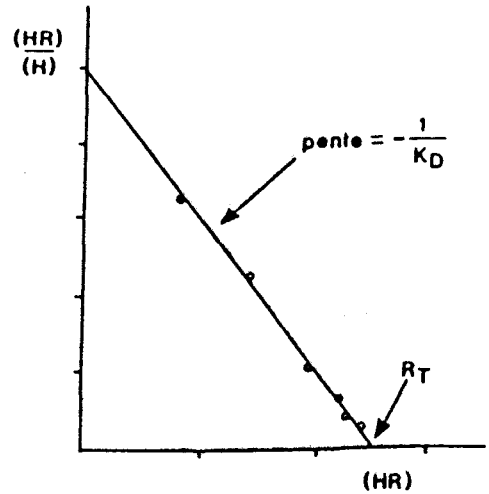
$$K_A = \frac{1}{K_D} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}}$$

où k_{+1} et k_{-1} sont respectivement les constantes de vitesse d'association ($M^{-1} \text{ sec}^{-1}$) et de dissociation (sec^{-1}). En pratique expérimentale, lorsque l'interaction hormone-récepteur a atteint l'équilibre, on peut doser les concentrations en hormone liée et hormone libre. On peut alors, selon la représentation de SCATCHARD (1949), la plus fréquemment utilisée, construire la courbe de variation du rapport de l'hormone liée à l'hormone libre en fonction de l'hormone liée, dans le cas le plus simple, l'équation est une droite :

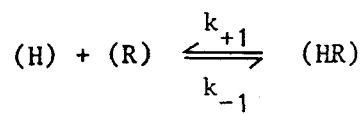
$$\frac{(HR)}{(H)} = K_A ((R_T) - (HR))$$



Représentation directe Michaélienne



Représentation de Scatchard



$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{(H)(R)}{(HR)}$$

$$\frac{(HR)}{(H)} = \frac{1}{K_D} ((RT) - (HR))$$

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

k_{-1} = constante de vitesse de dissociation (sec^{-1})

K_D = constante de dissociation à l'équilibre (M)

R_T = récepteurs totaux

Figure 1 - Représentation de la liaison hormone récepteur

La pente est $-K_A$ et l'intersection avec l'axe des abscisses est (R_T) : concentration en sites totaux (Figure 1).

L'hormone marquée est capable de se fixer sur de nombreux sites, qui, en plus des sites spécifiques saturables de haute affinité, sont représentés par des protéines non spécifiques, dont la plus importante est l'albumine. Afin d'estimer la liaison spécifique, le principe de la dilution isotopique du traceur radioactif est très souvent appliqué. Cette dilution du traceur est réalisée par l'apport au milieu d'un large excès d'hormone non radioactive (de l'ordre de 100 fois) qui entraîne pratiquement la disparition de la liaison des sites de haute affinité avec le traceur. Au contraire, les sites d'affinité plus faible (100 fois et plus), non saturables dans les conditions expérimentales, sont peu perturbés et restent marqués pratiquement de manière identique. Il s'ensuit, qu'après avoir soustrait la fraction résiduelle de la liaison obtenue après dilution isotopique, qui représente la liaison non spécifique, de la valeur obtenue sans dilution, on obtient une valeur de radioactivité qui correspond à la liaison spécifique.

En pratique, la représentation graphique de SCATCHARD donne souvent une courbe qu'on peut interpréter par :

- l'existence de deux sites indépendants d'affinité différente (WEDER, 1974) : dans un système comprenant deux sites de liaison n'interagissant pas l'un sur l'autre et où les constantes d'associations et les concentrations en sites de liaison sont différentes, la représentation $(HR)/(H)$ en fonction de (HR) donne une ligne courbe. En tout point P de la courbe, la concentration de ligand libre est en équilibre avec les concentrations de ligand lié à chacun des deux sites. De cette façon $(HR)/(H)$ (ou HR) au point P est égal à la somme des $(HR)/(H)$ (ou HR) de chaque groupe de sites de liaison

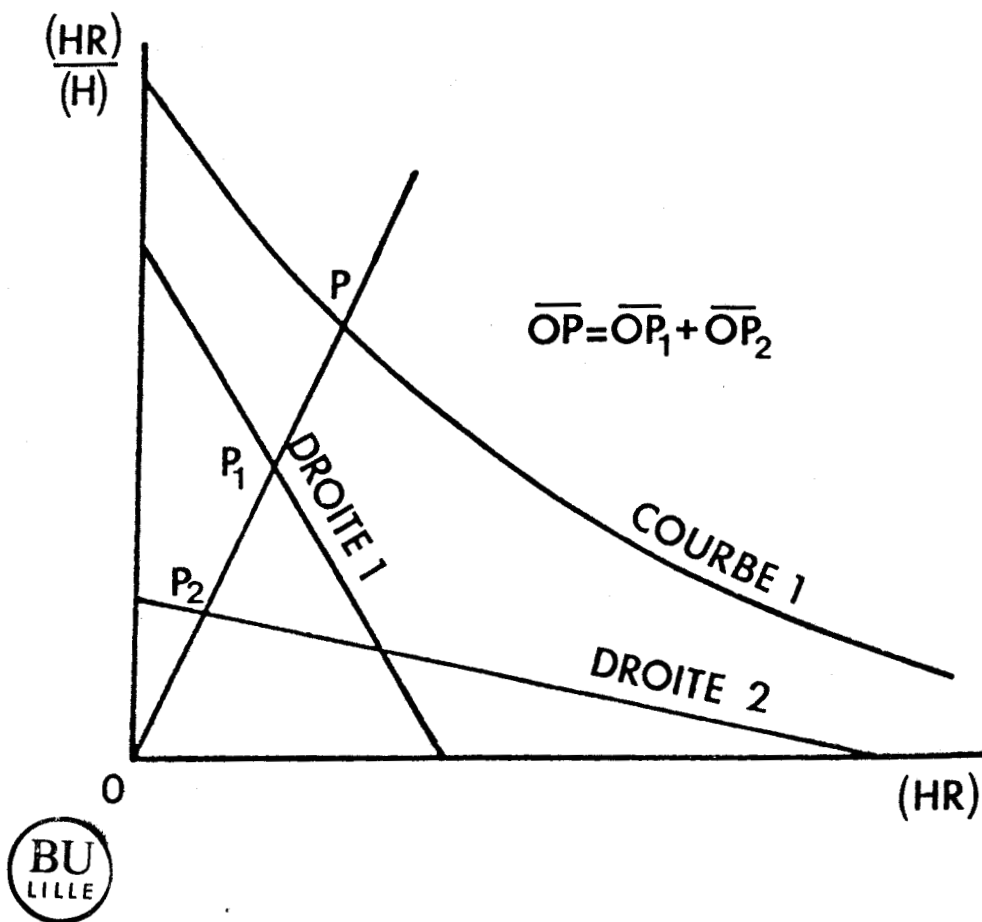


Figure 2 - Méthode de ROSENTHAL (1967)

pour une valeur constante de (H). Il faut alors faire une déconvolution (Figure 2) pour retrouver les deux droites représentant les liaisons sur chaque site pris isolément (ROSENTHAL, 1967).

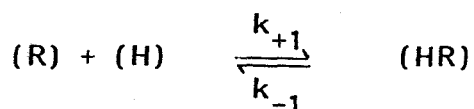
- l'existence d'interactions site-site (DE MEYTS, 1976) : le récepteur se comporte alors comme une protéine allostérique dont la coopérativité peut être positive (la liaison d'un premier ligand augmente l'affinité du récepteur pour un second ligand), ou plus souvent négative (l'affinité diminue pour le second ligand). Chaque conformation du récepteur aura une constante d'affinité propre.

Il faut toutefois être très prudent dans l'interprétation des représentations de Scatchard quand elles ont des formes courbes ou sigmoïdes. De grandes précautions doivent être prises avant d'affirmer qu'on est en présence d'un comportement allostérique des récepteurs et les possibilités d'interaction entre plusieurs molécules de ligand ou de modification, d'inactivation ou d'hétérogénéité de ce même ligand doivent être d'abord écartées (BECK, 1983).

b) Aspect cinétique de la liaison protéine-ligand

La mesure des vitesses d'association et de dissociation peut aussi fournir une estimation de la constante de dissociation à l'équilibre (CUATRECASAS, 1974).

Selon le schéma réactionnel minimum, on a :



La vitesse de formation de HR est :

$$\frac{d(HR)}{dt} = k_{+1} (R) (H)$$

La vitesse de disparition de HR est :

$$\frac{-d(HR)}{dt} = k_{-1}(HR)$$

k_{+1} et k_{-1} sont les constantes de vitesses correspondantes. A l'équilibre, ces deux vitesses sont égales et par conséquent :

$$k_{+1}(R)(H) = k_{-1}(HR)$$

et $K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{(R)(H)}{(HR)}$ constante de dissociation à l'équilibre

$$K_A = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} \quad \text{constante d'association à l'équilibre}$$

K_D représente la constante de dissociation et K_A la constante d'association confondue le plus souvent avec l'affinité du ligand pour la protéine. On vérifie immédiatement que, si à l'équilibre la concentration de (HR) est très supérieure à (R) et (H), l'affinité est très élevée et la constante k_{-1} est donc très inférieure à k_{+1} .

K_A et K_D ont donc deux significations, ce sont des rapports de concentrations quand tous les éléments ont atteint l'équilibre, mais ce sont aussi des rapports de deux constantes de vitesse de dimensions différentes : k_{+1} s'exprime en $M^{-1} s^{-1}$ et k_{-1} en s^{-1} correspondant respectivement à une réaction bimoléculaire et monomoléculaire.

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

$$k_{+1} = \frac{2,303}{t} \left[\frac{1}{(H_0) - (R_0)} \log \frac{((R_0) ((H_0) - (HR)))}{(H_0) ((R_0) - (HR))} \right]$$

et la réaction de dissociation suit une loi de premier ordre :

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

Elle est linéaire en coordonnées semi-logarithmiques, la pente de la droite étant d'autant plus forte que la vitesse de dissociation est grande. Les quelques auteurs qui se sont attachés à déterminer les valeurs des deux constantes de vitesse k_{+1} et k_{-1} ont pu faire le constat suivant : en général, pour une série de ligands homologues ayant une affinité pour une protéine, les constantes k_{+1} sont très voisines et ce sont les constantes k_{-1} correspondant à la dissociation qui varient de plusieurs ordres de grandeur et qui sont par conséquent responsables des variations de K_A et K_D .

c) Spécificité et transformation

La réaction d'un ligand sur son récepteur est dite spécifique quand d'autres ligands non homologues, de nature différente, ne peuvent entrer en compétition pour sa liaison au récepteur. Quand on utilise des ligands homologues froids, les expériences de compétition permettent la détermination de leur affinité relative pour le récepteur et la mesure indirecte de leur constante de dissociation.

Dès 1935, PAULING a cherché à relier les variations des constantes d'affinité à la géométrie de la protéine. Depuis, l'idée a pris un tel développement qu'actuellement toutes les hypothèses et schémas réactionnels qui tentent d'expliquer l'action d'un agoniste sur un récepteur membranaire ou cytoplasmique, font appel à la notion de plasticité de la protéine cible. La fixation s'accompagne d'une transition de structure ou "transconformation" responsable de l'effet.

Les transconformations induites par la fixation du ligand ne sont pas les seules à être mises en jeu. Un certain nombre de fluctuations de la structure des protéines sont commandées par la force ionique et par le pH du milieu qui entoure la protéine.

La plasticité des protéines permet de considérer la liaison protéine-ligand comme un processus s'effectuant en plusieurs étapes. Si la transconformation de la protéine permet d'expliquer la prodigieuse spécificité des systèmes biologiques, elle débouche également sur une série de concepts tels que le concept de déterminant, qui permet de mettre en évidence la partie du ligand capable d'induire la transconformation et par suite d'obtenir l'effet biologique, le concept de mémoire au niveau moléculaire qui peut s'expliquer par la lenteur de certaines transconformations et le concept de coopérativité qui permet de comprendre la subtilité des régulations dans les systèmes biologiques à partir d'échanges d'informations structurales au niveau des macromolécules.

ARTICLE I

**ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION
OF A NEW CELL LINE (VHB-1) DERIVED FROM
A PRIMARY BREAST CARCINOMA**

Vandewalle B*, Collyn d'Hooghe M, Savary JB***,
Vilain MO****, Peyrat JP*, Deminatti M***,
Delobelle-Deroide A****, Lefebvre J***

*** Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale, Centre
Oscar Lambret (Dir.: Pr A. Demaille), BP 307, 59020
Lille, FRANCE**

**** U124 INSERM, Institut de Recherches sur le Cancer
de Lille, 59045 Lille Cédex, FRANCE**

***** Service de Cytogénétique, CHU Lille
Avenue du Pr Leclercq, 59047 Lille Cédex, FRANCE**

****** Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Centre Oscar
Lambret (Dir.: Pr A. Demaille), BP 307, 59020
Lille, FRANCE**

SUMMARY

A continuous line of human breast carcinoma cells, VHB-1, was established in culture following collagenase treatment of an infiltrating duct-cell carcinoma. The cells display an epithelial pattern and multiply rapidly. Maintained in monolayer culture, the VHB-1 cells exhibit a 30 hr doubling time and a plating efficiency of 20 %. The cells possess an abnormal karyotype with a mode of 70-74 chromosomes per cell. The karyotype is heavily rearranged and numerous marker chromosomes are found. Transplantation of the cells into nude mice produced tumors bearing histological resemblance to the original material. The VHB-1 cells contain significant levels of prolactin receptors and are steroid hormone (estrogen, progesterone, androgen, glucocorticoid) receptor positive, they are moreover capable of functional differentiation in vitro. These characteristics make the VHB-1 cell line a suitable model for studying the biological properties of human breast tumors.

KEY WORDS : Breast carcinoma cell line, In vitro model

INTRODUCTION

Attempts to culture breast tumor cells have so far apparently been less successful with solid tumors than with malignant effusion (Cailleau et al. 1974) and since the first successful long-term culture of a breast tumor (BT 20 cell-line) reported by Lasfargues and Ozzelo in 1958, there are still few well-characterized celllines derived from primary breast carcinoma (Engel and Yound 1978). To our knowledge, only one steroid receptor positive cell-line derived from a primary lesion has been established at this time (Yamame et al. 1984). The general lack of success that has attended attempts to establish such cell-lines lies in the fact that solid tumors are often necrotic and the viability of the cells obtained is usually low, moreover contaminations by fibroblasts are frequent. Well-characterized cell lines available for the study of the pathogenesis of breast cancer are needed for "in vitro" model systems in multidisciplinary research ; in this report we describe the establishment and characterization of an additional positive receptor cell line designated VHB-1 derived from a ductal mammary carcinoma.

MATERIAL AND METHODS

. Origin and establishment of the cell line

The tumor was obtained from the surgical specimen of a 74-year-old woman, previously treated in January and February 1982 by radiotherapy for a breast cancer (T2c N1b M0). Because of local relapse associated with pulmonary metastasis, 18 months later she received tamoxifen plus medroxyprogesterone acetate. As the hormone-therapy was no longer efficient she finally underwent a mastectomy in March 1984. She was still receiving hormone therapy at the time of surgery. No lymph node involvement was detected. The tumor was pathologically classified as an infiltrating, moderately differentiated, ductal epithelioma. The patient died from progressive disease in June 1985.

Tumor tissue was received in the laboratory 15 min after surgery, fatty tissue was separated from the firmer part of the tumor material, which was then rinsed with Earle's balanced salt solution, minced with scissors and scalpels, suspended in 10 ml of 1 mg/ml collagenase (in Hank's balanced salt solution) and incubated at room temperature overnight. Digested tumor material was then cleared of most of the fibroblasts by a sedimentation fractionation procedure according to Hiratzuko et al. (1982) ; the culture was then sustained in 50 ml polystyrene tissue culture flasks (Primaria, Falcon Becton Dickinson Oxmard CA, USA). The medium used was

Earle's minimal essential medium (MEM, Seromed Biochrom KG, Berlin, Germany) supplemented with penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 µg/ml, amphotericin B 250 µg/ml, 10 % fetal calf serum and insulin 5 µg/ml.

. Growth rate determination

To study the growth rate of VHB-1 cells, Leighton tubes (2,42 cm²) were seeded at 1.5×10^5 cells/2 ml liquid medium. After detachment by trypsinization, coulter counter cell counts were determined daily without refeeding. Doubling times were determined during the log phase of the growth.

Cell plating efficiency on plastic were studied by seeding 1×10^3 to 5×10^3 cells in 6 cm Petri dishes. Fifteen days after plating, plastic adherent colonies were washed gently with PBS solution (phosphate buffered saline : 0.15 M NaCl, 0.1 M phosphate, pH 7.2) then stained and fixed simultaneously in methanol formalin crystal violet solution.

. Growth in semi-solid medium

For anchorage independent cloning assays, the medium used for cell cultivation was gelled with agarose to a final concentration of 0.56 % for the bottom layer and 0.36 % for the plating layer. Six cm Petri dishes containing 2.5×10^4 VHB-1 cells in agar medium were incubated at 37° in a humidified atmosphere of 5 % CO₂. Colonies were counted at 15-20 days post plating using an inverted microscope.

. Tumorigenicity

Athymic nude mice were used to estimate malignancy of the VHB-1 cells. The animals received s.c injections of $3 \cdot 10^6$ cells in PBS. The animals were moreover stimulated by one injection of 1 mg estradiol (oestradiol-retard, Theramex, Monaco) per month.

. Study of epithelial nature of the cells

Tumors for light microscopy were fixed in 10 % buffered formalin. Sections from paraffin-embedded tissue were cut at 5 μ m and stained with hematoxylin and eosin (H and E) or Alcian blue (pH 2.5) for mucin detection.

Glycoproteins isolated from human milk fat globule membrane, designated epithelial membrane antigen (EMA) were detected immunohistochemically with a commercially available monoclonal antibody (anti-EMA antibodies, clone E 29, Dako Corporation, Santa Barbara, CA, USA) using a peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique on paraffin-embedded induced tumors.

The intermediate filaments of cytokeratin were stained on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections by a PAP technique using a monoclonal antibody which reacts with human keratin 55-57 kd (clone KL₁, Jackson Immunoresearch Laboratories Inc, Avondale, PA USA).

The intermediate filaments of vimentin were sought using a monoclonal antibody (clone V9, Amersham, Buckinghamshire, UK).

. Karyotype analysis

The cells treated with 0.04 % colcemid for 2 h at 37° were placed in hypotonic 0.3 % KCl Na-citrate solution for 10 minutes, fixed with methanol acetic acid solution (3 : 1). R banding was performed according to Dutrillaux and Viegas (1981).

. Mycoplasma and enzyme determinations

Mycoplasma contamination was detected by DNA staining using the "mykoplasmentest" kit from seromed (Biochrom KG, Berlin, Germany). Phenotypes of lactico-dehydrogenase (LDH), and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) isoenzymes were determined electrophoretically using kits from Helena Laboratories (Beaumont, Texas, USA). Catechol-o-methyltransferase (COMT) and estrogen-2-hydroxylase were determined according to Hoffman (1979).

. Hormone receptors

Estrogen and progesterone receptors analyses were performed in the patient's original tumor in 1984 using classical DCC methods (EORTC Breast Cooperative Group 1979; Duffy and Duffy 1979) and prolactin receptors were assayed on microsomal fractions (Peyrat et al. 1984).

In the cell line, steroid hormone receptors were measured by whole-cell assays in monolayer cultures (Olea-Serrano et al. 1985; Steiner and Wittliff 1985). The

steroids used were (^3H) estradiol 90 Ci/mmol and (^3H) dihydrotestosterone 128 Ci/mmol from New England Nuclear (Boston, Mass, USA) and (^3H) org-2058 47 Ci/mmol and (^3H) triamcinolone acetonide 30 Ci/mmol from Amersham (Buckinghamshire, UK).

All the unlabeled steroids were from Steraloids Inc (Pawling, NJ, USA). Cultures were performed at 37° C in T-75 flasks. The medium used was Earle's minimal essential medium supplemented with L glutamine (0.6 mg/ml) penicillin (100 Units/ml) and 10 % inactivated fetal calf serum. After 4 days of culture, fixed number of cells grown in multiwell dishes were pulsed with (^3H) steroids for 30 min in serum free medium at concentrations ranging from 0.25 to 20 nM. Additional dishes were filled with the same concentrations of labeled steroids plus a 200-fold excess of the corresponding unlabeled steroid. After incubation the medium was removed, the cells were washed with ice-cold 0.9 % saline and bound steroids were extracted from the monolayer by incubation in ethanol at room temperature. After counting of aliquots of ethanol, specific (^3H) steroid uptake was calculated from the difference of incorporated radioactivity after incubations in the absence or presence of an excess of unlabeled steroid. Binding parameters were analyzed by the method of Scatchard (1949) ; maximal binding capacities were expressed in fmol/ 10^6 cells and the dissociation constants in nanomol/l. Prolactin receptors were measured on cell

membranes using 200 000 cpm $(^{125})_I$ hGH (80 μ Ci/ μ g) as tracer (Peyrat et al., 1984). Specific binding capacities were expressed in fmol/mg protein.

• Induced proteins

Two milk proteins were studied in the culture media ; firstly alpha-lactalbumin assayed using antisera raised against pure alpha-lactalbumin (Peyrat et al. 1986), the sensitivity of the assay was 0.2 ng per ml of medium ; secondly the sweat alpha-2-globulin described by Jirka (1968) which is present in a number of external secretions. This protein has been extensively studied by Haagensen (1981) and termed GCDFP15 (Gross Cystic Disease Fluid Protein). We have purified this product of mammary and sweat glands from breast cystic fluid of patients with breast cyst disease, and raised antisera against the protein (Vandewalle et al. 1986) ; the sensitivity of the radioimmunoassay was 5 ng per ml of medium.

RESULTS

• Establishment of culture and morphological features

Explantation of material from patients with mammary cancer resulted in a yield of only 25 successful subcultures from 47 experiments ; 24 of these died after the first transplantation and only 1 gave a stable line of

cells. The day after seeding a few elongated branching fibroblasts formed network-like complexes but in the culture there were also rather large, scattered, epithelium-like cells which differed sharply from the surrounding fibroblast-like cells. These cells had very large nuclei and a relatively small mass of cytoplasm. As cultivation proceeded the fibroblast-like cells were gradually displaced by vigorously proliferating islands of epithelium-like cells, and in subsequent passages the fibroblasts disappeared. The cells were irregular in shape and demonstrated intracytoplasmic vacuoles and aggregation of chromatin granules. They revealed neoplastic and pleomorphic features such as irregularities in size and shape of nuclei and nucleoli (fig 1). By electron microscopy, cells showed ultrastructural features of epithelium (fig 2). Culture tests for mycoplasma at the 20th and the 89th passages were repeatedly negative.

. Growth characteristics

Growth curves of VHB-1 cells in liquid medium are shown in fig 3. In the exponential growth phase the average doubling times (DT) at the 25th and the 87th passages were estimated at 37 and 31 hr respectively. The beginning of the plateau (day 4) corresponded to a cell density of 4.2×10^5 cells/cm². Depletion of exogenous insulin did not significantly modify the growth of VHB-1 cells (DT = 30 hr). VHB-1 cells grew uninterruptedly for over 30 months.

. Clonal studies

In order to check the tumoral nature of the VHB-1 cells, we tested their ability to grow in agar. After 15 days of culture in semi-solid agar, cells presented a 4 % cloning efficiency. In a liquid medium, the plating efficiency as defined by Puck and Marcus (1955) reached 20%.

. Heterotransplantation

The s.c heterotransplantation of the VHB-1 cells into 6 nude mice continuously stimulated with estradiol led to the formation of 6-10 mm palpable tumors in 4 animals within 8 weeks. We always failed to induce tumors in non-stimulated animals.

The tumors obtained were soft, grayish white. The microscopic appearance mimicked the poorly differentiated solid masses of the original primary tumor (fig 4-5a). There were some lacunae throughout the cell masses and the cells, sometimes, showed mucus-secreting vacuoles which were visualized using Alcian blue stain in about 5-10 % of cell population (fig 5b).

Nearly, 20 % of the cells were immunoreactive for EMA with granular cytoplasmic staining of variable intensity (fig 5c). Furthermore, nearly all the tumoral cells exhibited diffuse staining with cytokeratin monoclonal antibodies (fig 5d). Using anti-vimentin antibodies no staining could be observed as found in all epithelial cells.

. Chromosome analysis

Sixty-five metaphase plates corresponding to cultures from the 20th and the 87th passages were selected for chromosomal study. No shift in modal chromosome number was observed in these two populations, which showed a predominance of cells with a chromosome count of 72 ; 91% of those cells demonstrated chromosome numbers of 70-74 (fig 6).

R banding chromosome analysis revealed a heavily rearranged human karyotype. Using this staining, which highlights telomeric parts of the chromosomes, only 39 normal chromosomes could be identified (fig 7). The other chromosomes termed as markers might result either from intrachromosomal rearrangements (ie isochromosomes, ring chromosomes) or interchromosomal rearrangements. Large size chromosomes seemed more frequently rearranged than the others, but due to the great number of abnormal chromosomes, it was impossible to ascertain if the modifications resulted from two rearrangements or more. Furthermore, besides structural rearrangements leading to aberrant chromosomes, numerical abnormalities were observed in the following groups of chromosomes : group A : nullosomy 1 and 2, monosomy 3 ; group B : trisomy 4 ; group C : nullosomy 10, tetrasomy 11, monosomy X ; group E : monosomy 17 ; group F : monosomy 20 and group G : trisomy 21, monosomy 22.

. Enzyme determination

Isoenzyme determination revealed LDH of human phenotype. All LDH in the VHB-1 cell line was LDH 5. Type B isoenzyme mobility pattern for G6PD or slow migrating band was constantly found in VHB-1 cells. Enzymatic activities of COMT and estrogen-2-hydroxylase were respectively 1350 and 30 pmol of 2-methoxyestradiol formed per 20 min per mg protein

. Differentiation features

. Hormone receptor

The patient's original tumor was weakly estrogen-receptor positive (28 fmol/mg protein) and progesterone-receptor negative, furthermore prolactin receptor levels were at the threshold of detection i.e 1.5 fmol/mg protein.

VHB-1 cells were incubated with increasing concentrations of (^3H) steroids to measure the binding reaction parameters. As found by Olea-Serrano et al (1985), analysis of the data according to Scatchard gave patterns indicative of two classes of binding sites, a high-affinity class of limited capacity and a low-affinity class of high capacity ; the high-affinity class of binding sites corresponds to type I binding sites defined as classical receptors. The dissociation constant (Kd) of the binding reactions of tritiated steroids to the high-affinity sites and the binding capacities of these sites are shown in

table 1. They are in good agreement with values currently ascribed to receptors (Olea-Serrano et al. 1985; Steiner and Wittliff 1985). Prolactin receptors determined by conventional biochemical methods were weakly positive in cell membranes.

. Hormone responsiveness

Following estradiol stimulation of VHB-1 cells by 10^{-8} M estradiol over 3 days, a synthesis of progesterone receptors was noted and the (3 H) ORG-2058 incorporated per 10^6 cells was about 30 % more than the control values. At the same time there was an approximately 20 % increase in total cell number in E2 treated cells over controls (table 2).

. Induced proteins

When the cells were cultivated in MEM without fetal calf serum but containing insulin 5 μ g/ml, transferrin 30 μ g/ml and fibronectin 7.5 ng/ml, we were able to determine in the 72 hour-culture media detectable levels of alpha-lactalbumin and GCDFP-15. After E_2 stimulation (10^{-8} M) both levels dropped compared to base levels (table 3).

DISCUSSION

The aim of development of tumor cell-lines is the creation of an "in vitro" representation of malignant cells in the primary tumor, it seems thus more logical to begin

with tumor cells from the original tumor site. To avoid contamination with fibroblasts, which is one of the major difficulties in establishing cell lines from solid mammary tumors, we used the simple method of Hiratsuka et al (1982) which yields enriched epithelial cell cultures as a result of the differential rate of settling between fibroblasts and epithelial cells, furthermore we used primary culture flasks known to inhibit fibroblast proliferation. As cultivation proceeded the fibroblasts were gradually displaced by vigorously proliferating epithelial cells. In this way, among the 47 breast tumors processed, we succeeded in developing an epithelial cell line termed VHB-1. A long-term and stable proliferation then took place over more than 130 successful passages during 30 months. The VHB-1 cell-population doubling-time was 31-37 hr and saturation density was 4.2×10^5 cells/cm², their cloning efficiency was very high, these values are in agreement with those found in other cell line established from primary tumors (Yamame et al. 1984; Plata et al. 1973). The chromosome distribution showed a single population of hyperploid cells with a stable modal chromosomal number of 72 throughout successive cultures, the apparent stability noted both in chromosomal number and in number and morphological features of rearranged chromosomes suggested that the malignant feature did not come from long-term "in vitro" cultivation.

Specific cell organelle characteristics of "in vitro" tissue may be retained after long-term growth "in vivo" (Buchring and Hackett 1974), thus the ultrastructure of cells in culture may reflect the tissue of origin. The electron microscopy of VHB-1 cells showed the presence of desmosomes and bundles of tonofibrils that are characteristic structure markers identifying epithelial cells.

The microscopic features of the induced tumors were histologically similar to a poorly differentiated adenocarcinoma with moderate mucin secretion. Epithelial membrane antigen, which is a highly effective marker for establishing the epithelial nature of neoplastic cells (Pinkus and Kurtin 1985) was detected in the tumor cells, conversely, they positively reacted with cytokeratin monoclonal antibodies and it is known that keratin filaments are present in almost all epithelial cells (Franke et al. 1979). Moreover negative staining with vimentin monoclonal antibodies supplies evidence that the VHB-1 cells are not cells of mesenchymal derivation. The question as to whether these epithelial tumor cells have retained some of the functional activities that would characterize their mammary origin was investigated by determination of the secreted proteins alpha-lactalbumin and GCDFP-15. The presence of detectable levels of these proteins means that the cells have not lost their differentiation characteristics.

By whole-cell assays, which give a valuable estimation of the total unsaturated receptor contents, VHB-1 cells were shown to contain estrogen, progesterone glucocorticoid, androgen and prolactin receptors. Steroid receptor capacities were stable throughout cell cultures. Prolactin receptor capacities were at the threshold of detection at early cultivation and grew till the 50th passage. They are now stabilized and are weakly positive. Estrogen receptors are functional and responsive to estradiol stimulation since progesterone receptor synthesis was induced. Most of the cells containing estrogen and progesterone receptors are derived from pleural effusions or ascites (Engel and Yound 1978). There is, to our knowledge, only one recent report of the presence of estrogen and androgen receptors in a cell line derived from solid breast tumor (Yamame et al. 1984). The VHB-1 cells are moreover able to produce differentiation proteins which supplies additional evidence that they have retained functional activities. These results allow the use of VHB-1 cells for hormone stimulation studies and for establishing structure-activity relationships. Moreover, the need of additional cell culture material is obvious in oncogene studies. As several reports have described the expression of oncogenes analogous to retroviral oncogenes in established cell lines from a variety of tumors, experiments are in progress to analyze possible genomic rearrangements and variations in the expression of several onco-

genes. Furthermore experiments are currently being carried out to evaluate the transforming capability of VHB-1 DNA on NIH 3T3 cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from "L'Association de Recherches sur le Cancer" and from "La Ligue Nationale Contre le Cancer". We would like to thank Dr Hildebrand HF. (Faculté de Médecine, Lille) for electron microscopy examination. We gratefully acknowledge the skilful technical assistance of L. Hornez, J. Fournier, M.M Louchez, D. Lantoine, G. Delassus, A. Laspeyre and the expert secretarial assistance of Y. Vendel.

REFERENCES

1. Buchring GC, Hackett AJ. (1974) Human breast tumor cell lines : identity evaluation by ultrastructure. *J Natl Cancer Inst* 53: 621-629.
2. Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ. (1974) Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Nat Cancer Inst* 53: 661-674.
3. Duffy MJ, Duffy GJ. (1979) Studies on progesterone receptors in human breast carcinoma : use of natural and synthetic ligands. *Eur J Cancer Clin Oncol* 15: 1181-1184.
4. Dutrillaux B, Viregas-Pequignot E. (1981) High resolution R and G banding in the same preparation. *Human Genet* 57: 93-95.
5. Engel LW, Yound NA. (1978) Human breast carcinoma cells in continuous culture : a review. *Cancer Res* 38: 4327-4339.
6. EORTC Breast Cooperative Group. (1979) Revision of the standards for the assessment of hormone receptors in human breast cancer ; report of the second EORTC workshop, Held on 16-17 March, 1979, in the Netherlands Cancer Institute. *Eur J Cancer Clin Oncol* 16: 1513-1515.
7. Franke WW, Appelhaus VS, Schmid E, Freudenstein C, Osborn M, Weber K. (1979) Identification and characterization in mammalian tissues by immunofluorescence microscopy using antibodies to prekeratin. *Differ* 15: 7-15.

8. Haagensen DR. (1981) Biochemical relationship between gross cystic disease and breast carcinoma. In : Breast carcinoma, risk and detection. Haagensen CD, Bodian C, Haagensen DR eds, WB Saunders Company, Philadelphia.
9. Hiratsuka M, Senoo T, Kimoto T, Namba M. (1982) An improved short term culture method for human mammary epithelial cells. *Gann* 73: 124-128.
10. Hoffman AR, Paul SM, Axelrod J. (1979) Catechol-estrogen synthesis and metabolism by human breast tumors in vitro. *Cancer Res* 39: 4584-4587.
11. Jirka M. (1968) An alpha-2-globulin component present in sweat, saliva, tears, human milk, colostrum and cerumen. *FEBS Letters* 1: 77-80.
12. Lasfargues EY, Ozzello L. (1958) Cultivation of human breast carcinomas. *J Nat Cancer Inst* 21: 1131-1147.
13. Olea-Serrano N, Devleeschouwer N, Leclercq G, Heuson JC. (1985) Assay for estrogen and progesterone receptors of breast cancer cell-lines in monolayer culture. *Eur J Cancer Clin Oncol* 21: 965-973.
14. Peyrat JP, Djiane J, Kelly PA, Vandewalle B, Bonnetterre J, Demaille A. (1984) Characterization of prolactin receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 4: 275-281.
15. Peyrat JP, Bonnetterre J, Vandewalle B, Vennin Ph, Lesoin A, Lefebvre J. (1986) Prolactin receptors and lactalbumin production in human breast cancer. *Ann NY Acad Sci* 464: 427-430.

16. Pinkus GS, Kurtin PJ. (1985) Epithelial membrane antigen. A diagnostic discriminant in surgical pathology. *Hum Pathol* 16: 929-940.
17. Plata EJ, Acki T, Robertson DP, Chu AW, Gerwing BI. (1973) An established cultured cell line (HBT-39) from human breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 50: 849-862.
18. Puck TT, Marcus PI. (1955) A rapid method for viable cell titration and clone production with Hela cells in tissue culture. The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc Nat Acad Sci* 41: 432-437.
19. Scatchard G. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51: 600-672.
20. Steiner AE, Wittliff JL. (1985) A whole-cell assay for glucocorticoid binding sites in normal human lymphocytes. *Clin Chem* 31: 1855-1860.
21. Vandewalle B, Hornez L, Vennin P, Peyrat JP, Lefebvre J. (1986) Further characterization of the light breast cyst fluid protein GCDFP-15. *Biochimie* 68: 649-656.
22. Yamame M, Nishiki M, Kataoka T, Kishi N, Amano K, Nakagawa K, Ohumichi T, Naito M, Ito A, Ezaki H. (1984) Establishment and characterization of new cell line (YMB-1) derived from human breast carcinoma. *Hirohima J Med Sci* 33: 715-720.

LEGEND OF FIGURES

Fig 1 : Light micrograph of VHB-1 cells at the 3rd day of culture (passage 87)

A : monolayer cultures, phase contrast (x320)

B : Papanicolaou staining (x1000) showing anisonucleosis, nucleoli, mitotic figures and intracytoplasmic vacuoles.

Fig 2 : Electron micrograph of VHB-1 cells (passage 87) showing characteristic bundles of tonofilaments (T) and desmosomes (D) (x8000)

Two other typical desmosomes are represented in the insert (x10 000).

Fig 3 : Growth curves of VHB-1 cells

25th passage : ■ ; 87th passage : ▲ with or ● without insulin in the culture medium. Each point represents the mean of 12 tubes.

Fig 4 : Low power view of the original tumor from which cell line VHB-1 was derived showing irregular acinar structures in a fibrous stroma and solid masses. The tumor was a moderately differentiated ductal carcinoma (H and E, x63).

Fig 5 : Tumor induced by VHB-1 cells.

a : Tumor shows a poor differentiation and infiltration of muscle by carcinomatous cells (H and E x250).

b : Alcian blue stain shows some positive mucin secreting cells (x400).

c : Formalin fixed, paraffin-embedded tissues sections stained with monoclonal anti-EMA. Cytoplasmic staining is shown in nearly 20 % of the cells (x400).

d : Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue section stained with monoclonal anti-keratin. Intense cytoplasmic staining is present in nearly all carcinoma cells in contrast to unstained striated muscle cells (hematoxylin counterstain, x400).

Fig 6 : Chromosomal number distribution in a random count of 65 VHB-1 cell-metaphases. The modal number was 72.

Fig 7 : R-banded karyotype of VHB-1 cells. Using this staining only 39 normal chromosomes out of the 73 could be identified. The other rearranged "marker" chromosomes were numerous.

Iso : isochromosome, r : ring chromosome.

**Table 1 - Hormone binding characteristics of VHB-1 cells
at the 95th passage**

Type of receptor	Binding capacity*	Dissociation constant (Kd)
Estrogen	72 ± 31 ^a	0.5 ± 0.3
Progesterone	220 ± 100	0.6 ± 0.4
Glucocorticoid	25 ± 14	2.2 ± 1.3
Androgen	123 ± 35	1.4 ± 0.4
Prolactin	12 ± 4 ^b	-

* : Mean values ± SD of 3 different experiments

a : The binding capacities of steroid receptors are expressed in fmol/10⁶ cells, the dissociation constants are expressed in 10⁻⁹ M

b : The binding capacity is expressed in fmol/mg protein.

Table 2 - Progesterone binding of VHB-1 cells following estradiol stimulation for 72 hours

	Cell number per flask	fmol of (³ H) org-2058 per 10 ⁶ cells
Control cells	977 800 ± 38 400*	185 ± 6,4
E2-treated cells (10 ⁻⁸ M)	1 219 340 ± 7 930	238 ± 7,1

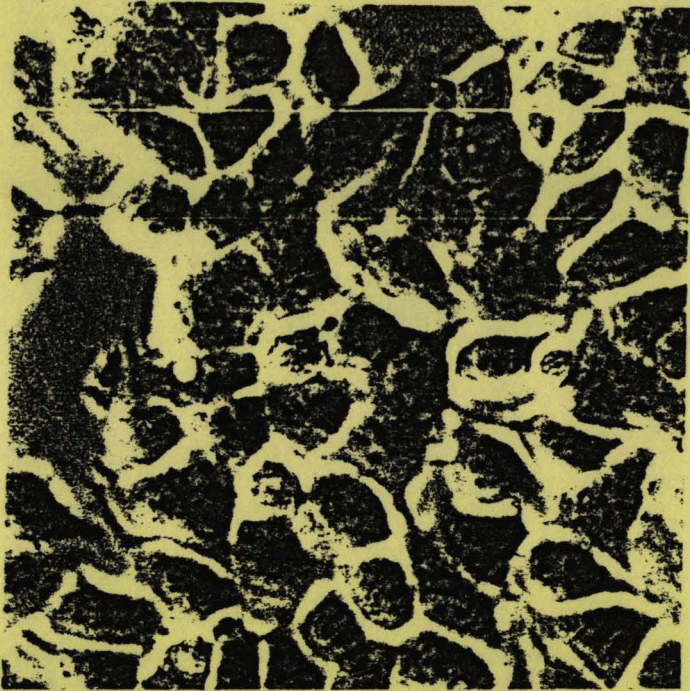
* : mean ± SD of 3 different experiments (passage 87)

Table 3 - Proteins secreted in the 72 hour culture media
by VHB-1 cells (passage 87)

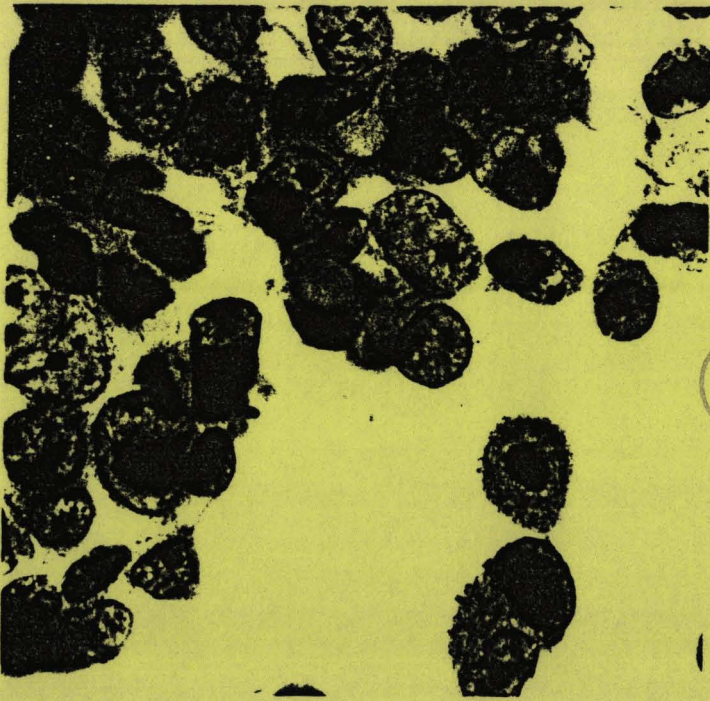
	Alpha-lactalbumin	GCDFP-15
Control cells	0.52 ± 0.04	9.8 ± 0.5
E2-treated cells (10 ⁻⁸ M)	0.27 ± 0.02	5.5 ± 0.3

Values (mean ± SD, n = 6) are expressed in ng per 10⁶
cells

A



B



BU
LILLE

Fig 1

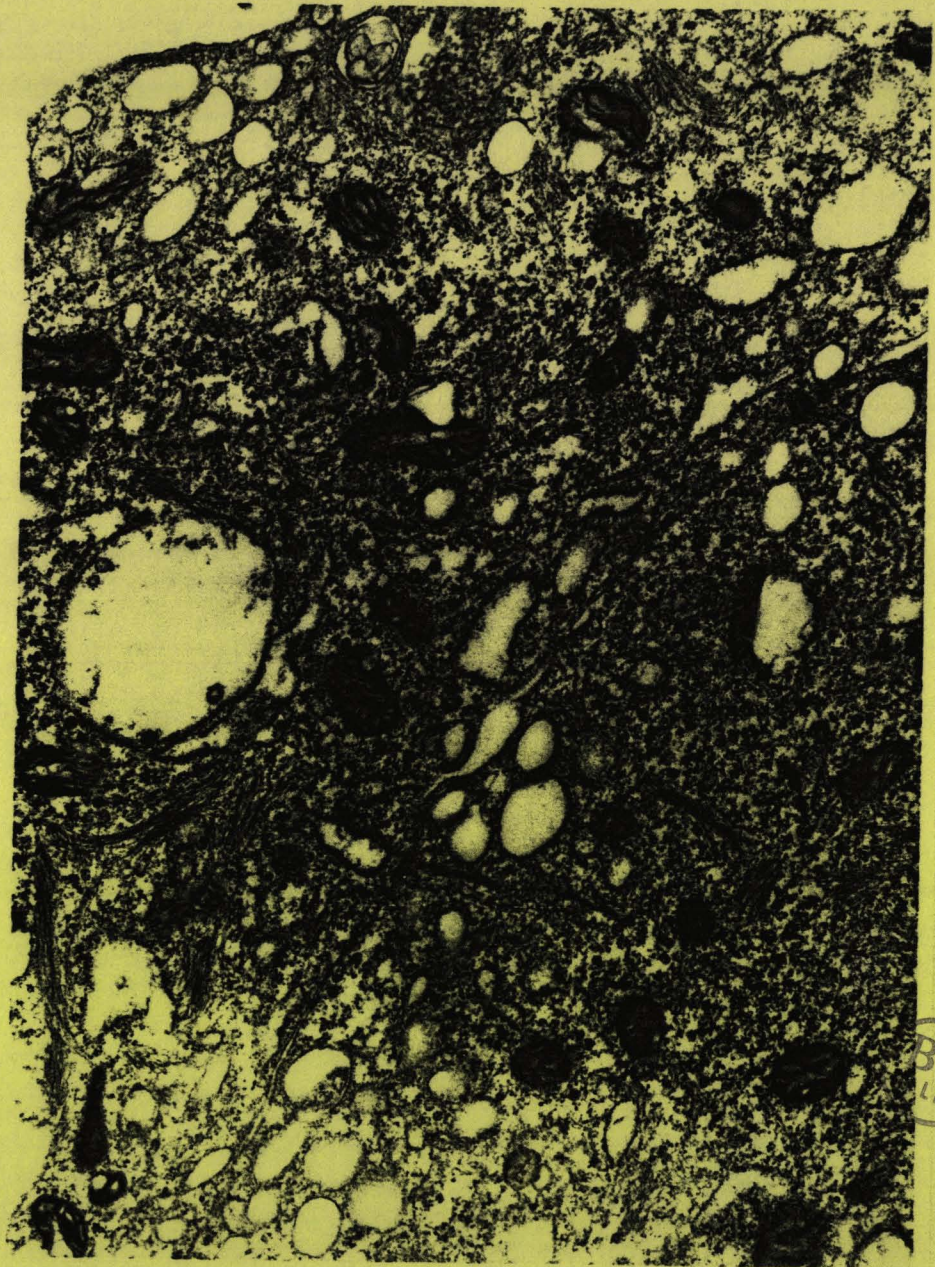
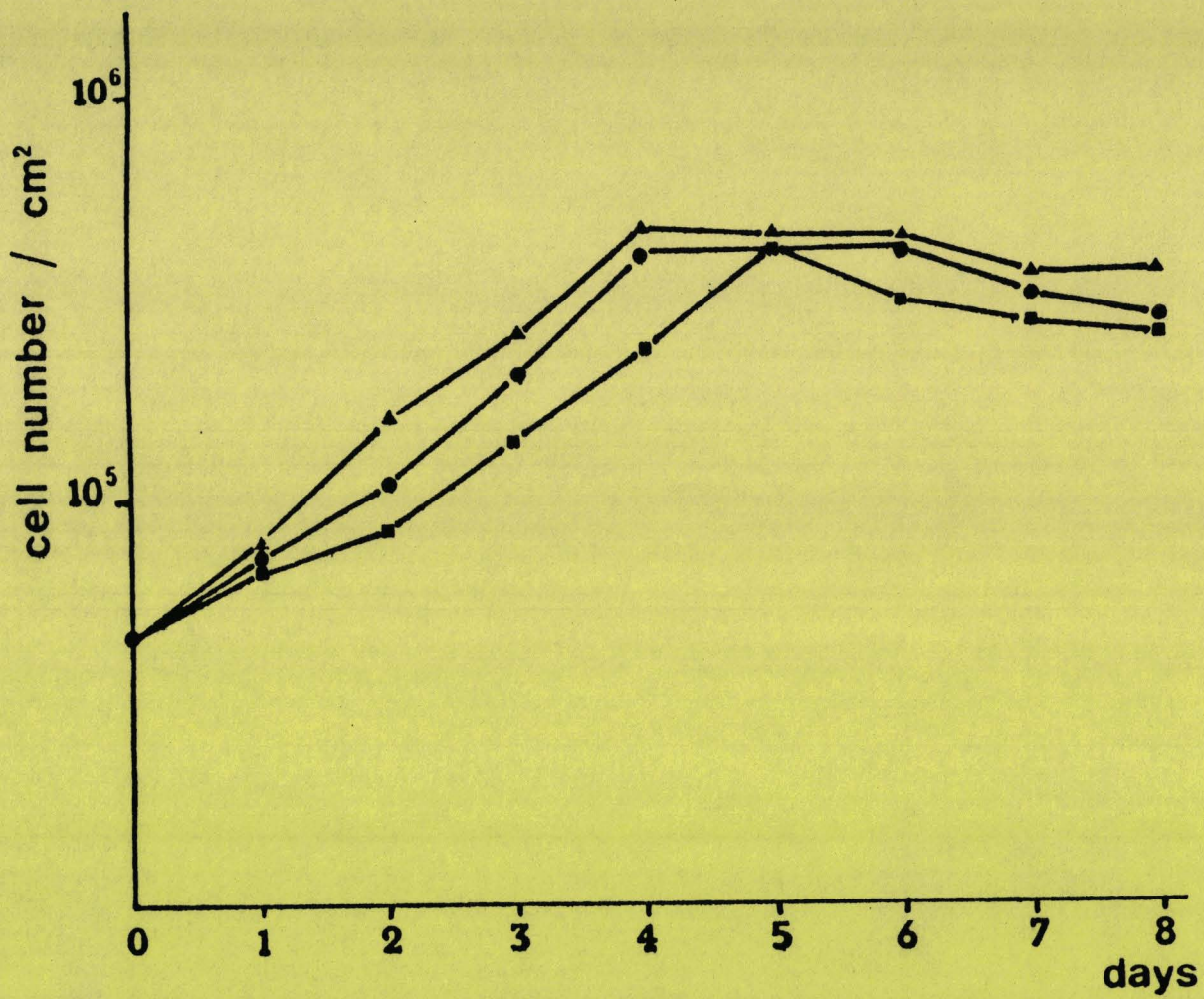
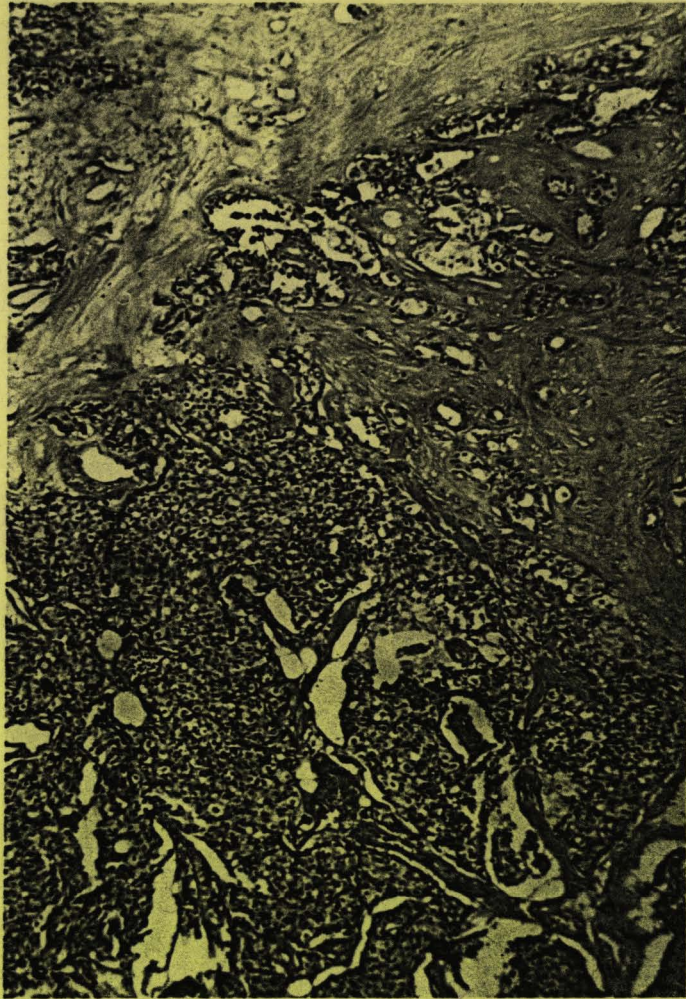


fig 2



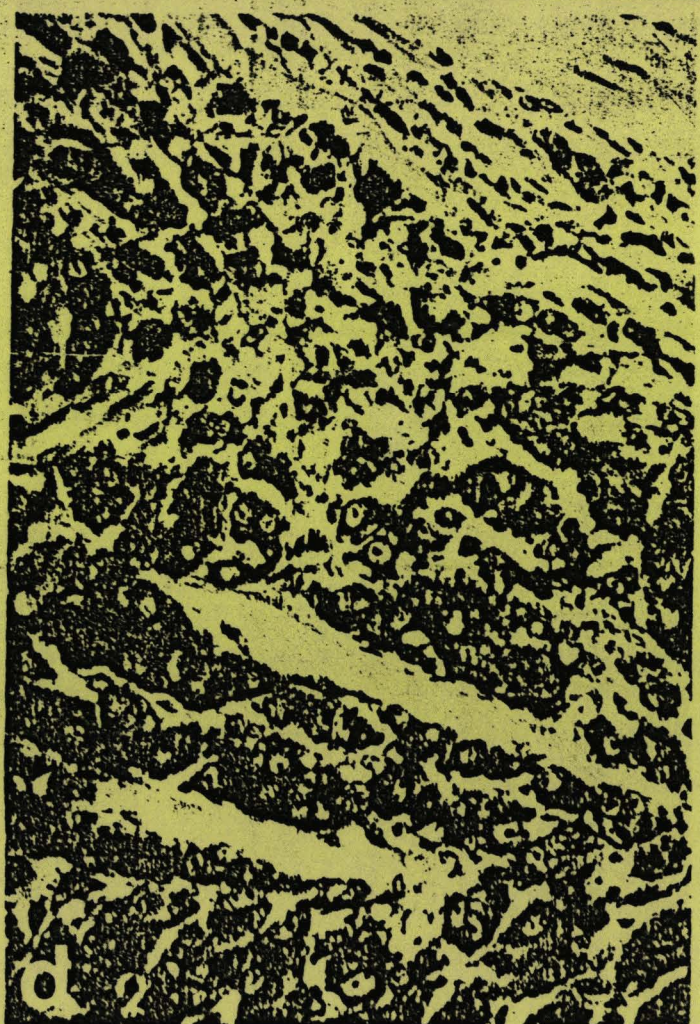
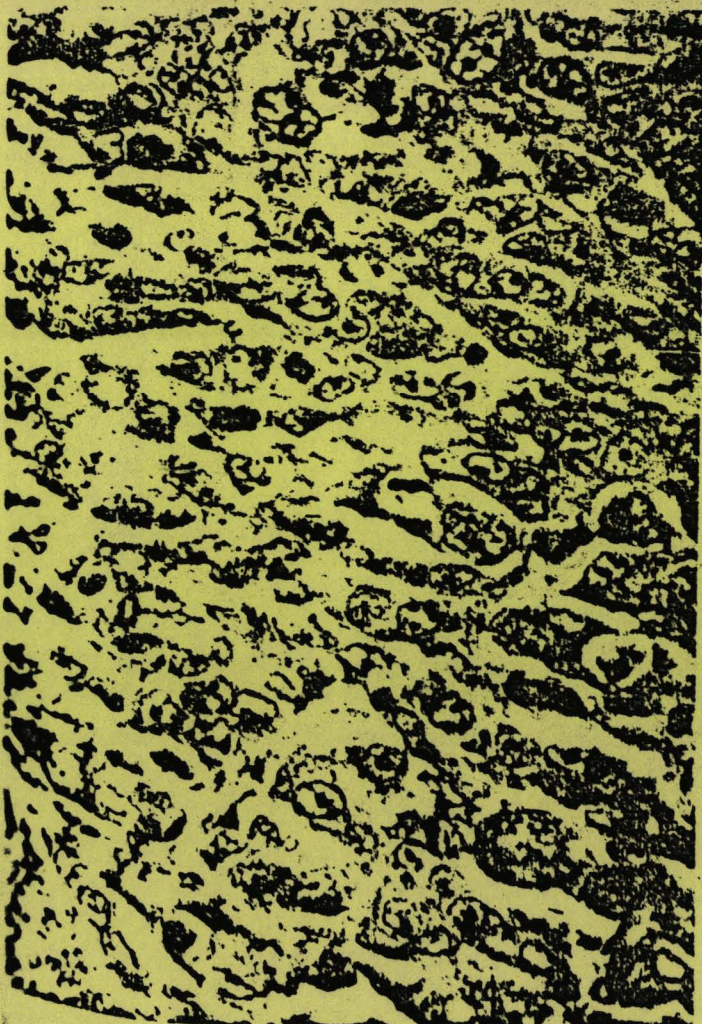
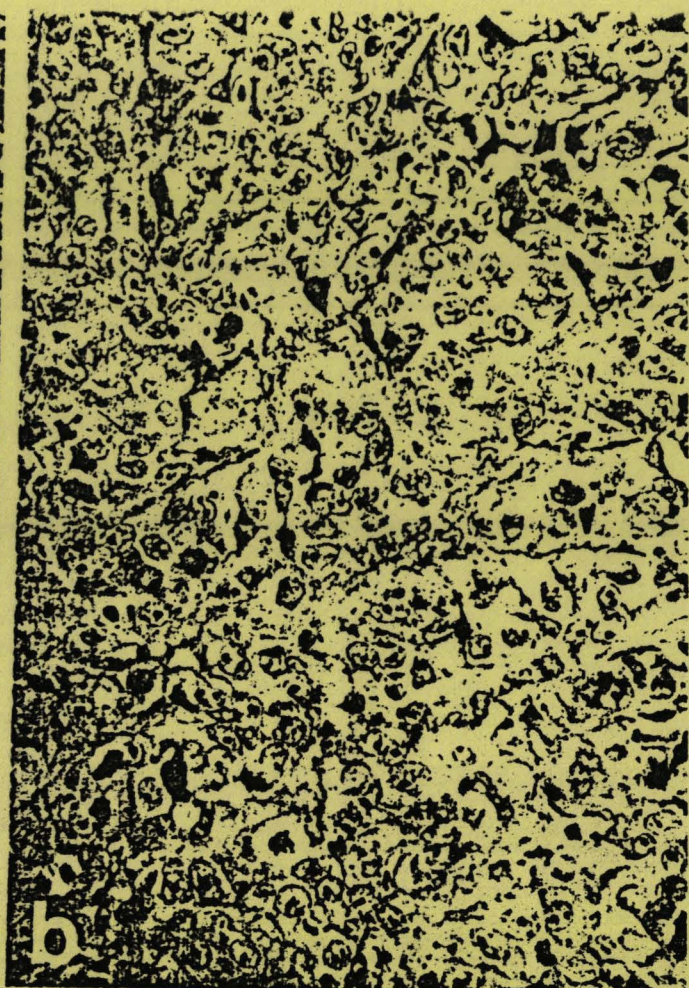
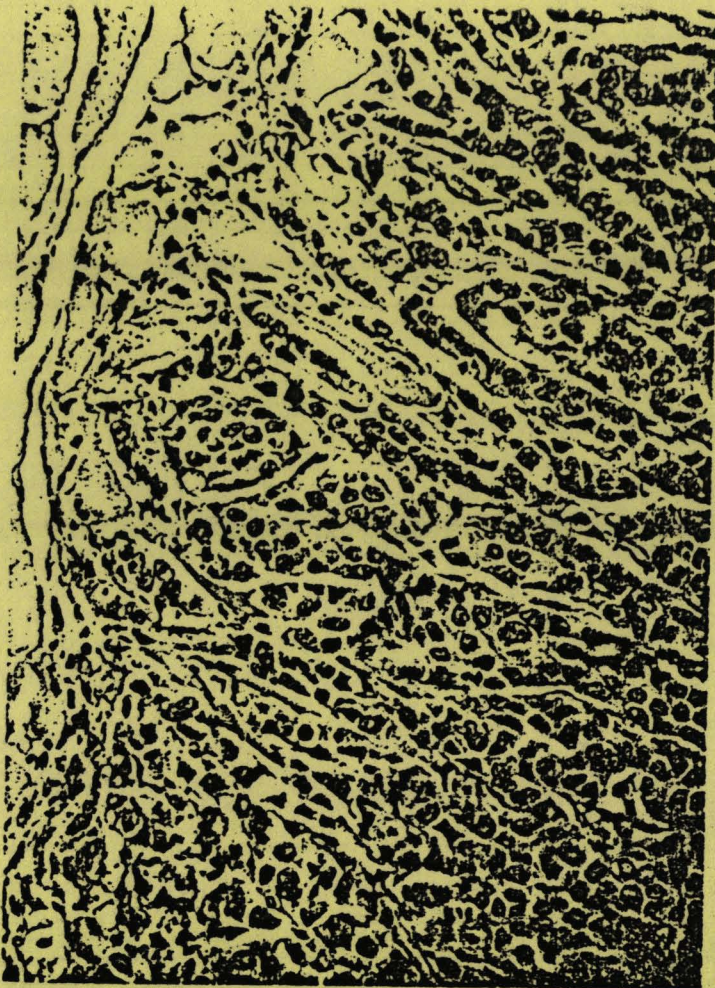
Rf 3





BU
LILLE

Fig 4



Rf 5

BU
LILLE

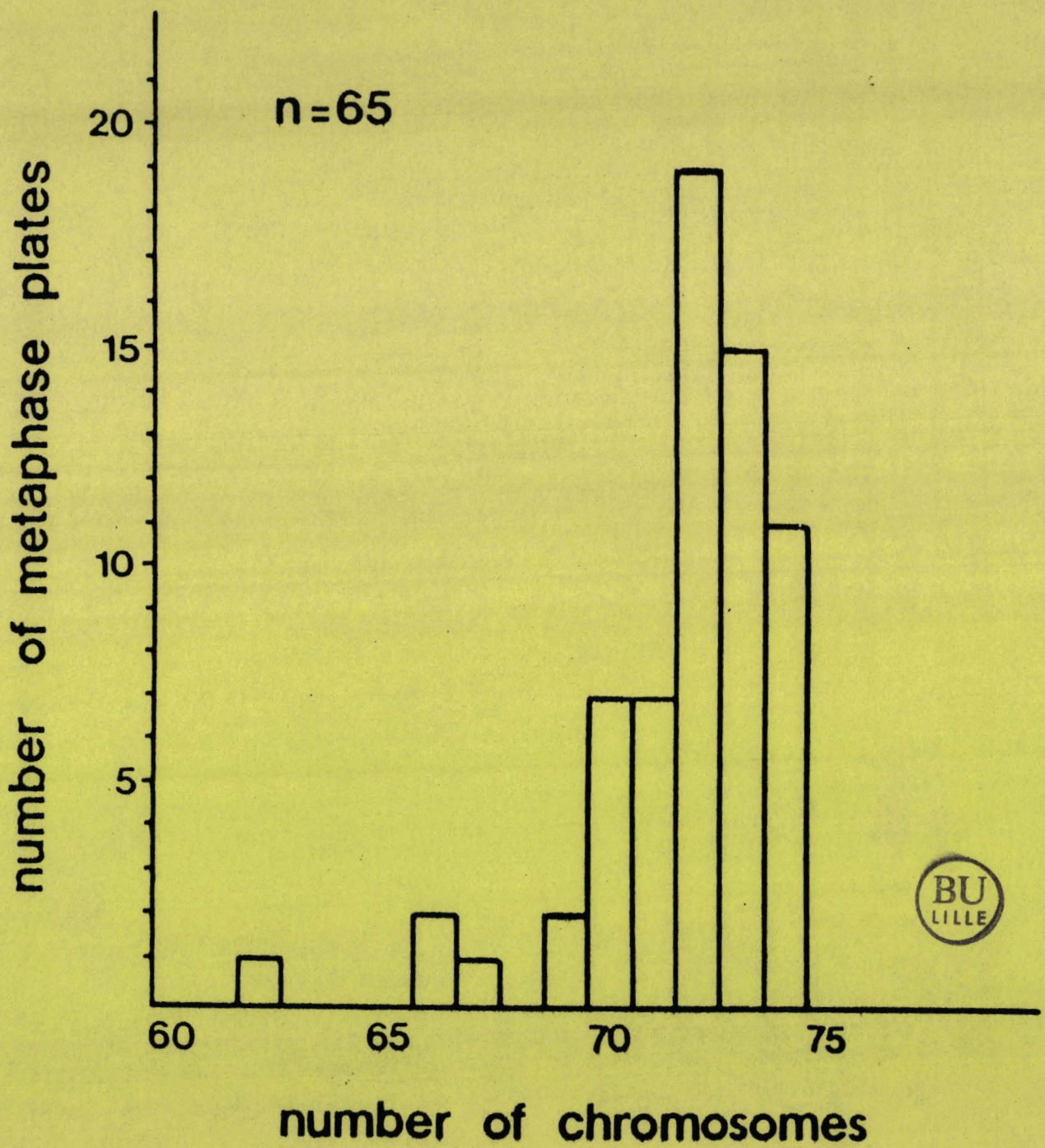
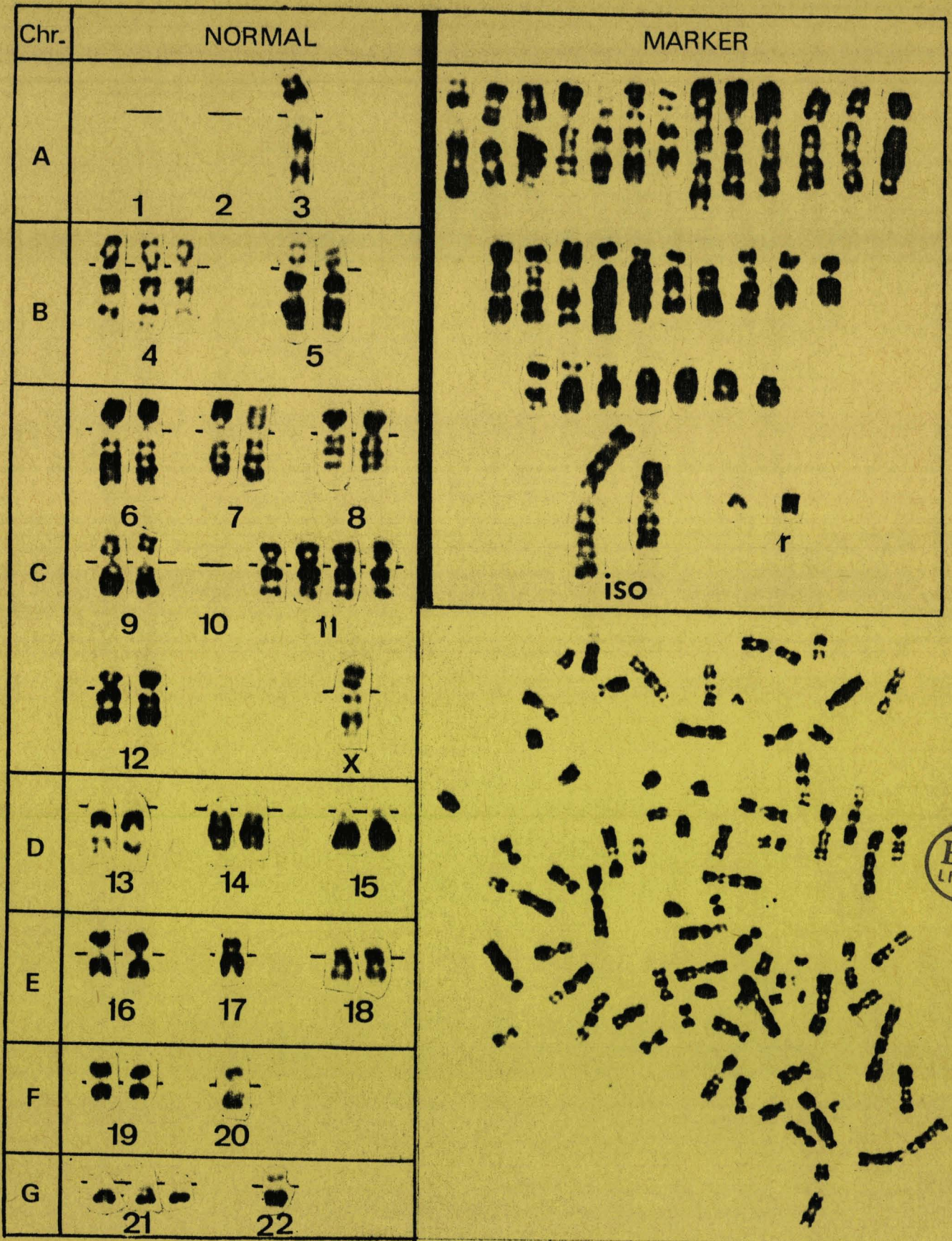


Fig 6



BU
LILLE

Fig 7

**OESTROGENES
ET
CANCERS DU SEIN**

GENERALITES

A - OESTROGENES ET TUMORIGENESE

Les oestrogènes ont longtemps été considérés comme les principales hormones impliquées dans la tumorigénèse des glandes mammaires (GARDNER, 1959). On sait maintenant que la prolactine tient aussi une place importante dans ces processus et beaucoup de revues ont été consacrées à l'interaction de ces deux hormones (NAGASAWA, 1981).

Les oestrogènes sont des promoteurs de la cancérogénèse mammaire. Associés à des carcinogènes chimiques ou physiques, ils favorisent le développement et la croissance des tumeurs mammaires (SHELLABERGER, 1980) : en effet, seuls les rats traités par un oestrogène synthétique, le diéthylstilboestrol, développent des adénocarcinomes à la suite d'une exposition aux rayons X (HOLTSMAN, 1979). De plus, le méthyl-nitrosourée (MNU) induit des tumeurs mammaires chez la rate au moment du développement sexuel mais n'a aucun effet chez la rate castrée (HUGGINS, 1959).

Récemment, KORENMAN (1980) a avancé l'hypothèse de la "fenêtre oestrogénique" indiquant que la prédominance des oestrogènes endogènes ou exogènes favorise, chez la femme, la promotion de la carcinogénèse : pendant la puberté et la période péri-ménopausique des effets oestrogéniques mal contrebalancés par la progestérone offriraient un terrain favorable à l'induction des cancers du sein par les cancérogènes de l'environnement.

B - HORMONODEPENDANCE DES TUMEURS MAMMAIRES EXPERIMENTALES

Les tissus mammaires exposés à des cancérogènes chimiques comme le 7,12 diméthylbenzanthracène (DMBA) ou le méthyl-nitrosourée (MNU) subissent une transformation maligne. Les tumeurs induites peuvent être classées en deux catégories selon qu'elles conservent ou non les mécanismes de contrôle normalement présents dans la glande mammaire (HOLLANDER, 1978). Si les contrôles sont conservés, c'est-à-dire si la croissance tumorale et, dans certains cas, les fonctions cellulaires spécifiques sont 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 plus influencée par les hormones.

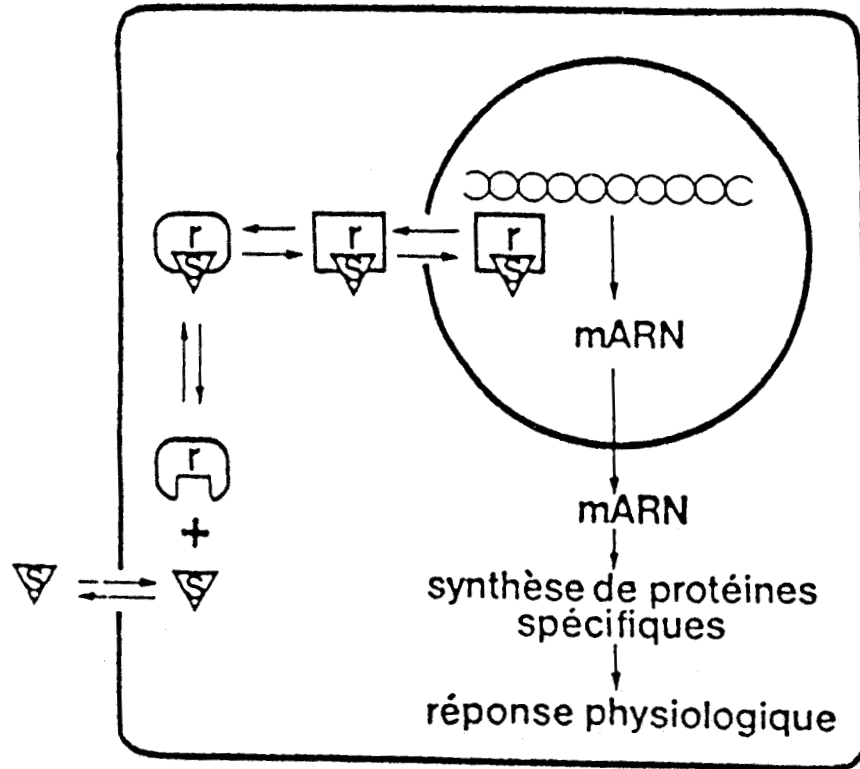
C - HORMONOSENSIBILITE DES CANCERS DU SEIN

L'hormonosensibilité des cancers du sein a été envisagée pour la première fois au siècle dernier quand COOPER en 1836 constata une relation entre la croissance tumorale et le cycle menstruel. En 1896, BEATSON établit un parallèle entre la mammogénèse qui précède la lactation et la prolifération tumorale et suggéra que ces deux phénomènes étaient sous la dépendance des ovaires. Il pratiqua une ovariectomie chez deux malades en activité génitale et obtint une régression du cancer du sein. Il a fallu plus d'un demi-siècle pour que la surrénalectomie (HUGGINS, 1952) et l'hypophysectomie (LUFT, 1958) soient proposées comme hormonothérapies ablatives dans le cancer du sein.

Les indications de ces différents types de traitement étaient empiriques et déduites de l'expérience clinique de leurs utilisateurs à savoir que certaines hormones stéroïdes et probablement certaines hormones hypophysaires pouvaient modifier l'évolution naturelle de certains cancers du sein. Il ressortait de ces expérimentations qu'environ un tiers des cancers du sein étaient sensibles aux manipulations hormonales. Un progrès considérable a été réalisé grâce à la découverte du récepteur de l'oestradiol. La sélection des malades pouvant bénéficier d'une thérapie hormonale ablative ou additive devint alors possible, les chances de succès thérapeutique chez les malades sélectionnées furent alors estimées à 55-60 %. Les récepteurs de la progestérone, des androgènes, des glucocorticoïdes et de la prolactine furent ultérieurement décrits dans les cancers du sein. La présence simultanée des récepteurs de l'oestradiol et de la progestérone dans une tumeur, hisait le taux de réponse aux manipulations hormonales à environ 77 % (OSBORNE, 1979).



mécanisme d'action des stéroïdes



HISTORIQUE

1958 : SYNTHÈSE D'OESTROGENES RADIO-
ACTIFS DE HAUTE AFFINITE
(JENSEN, GLASSCOCH)

→ POSSIBILITE DE SUIVRE LA DES-
TINEE DE L'HORMONE

1962 : EMERGENCE D'UNE IMAGE COHERENTE
DE L'INTERACTION DE L'ESTRADIOL
AVEC LA CELLULE CIBLE

1965 : PROGRES :

- DANS LA COMPREHENSION DE LA
STRUCTURE DE LA CHROMATINE
- DANS LE PROCESSUS DE SYNTHÈSE
DES ACIDES RIBONUCLEIQUES ET
PROTEINES

→ SYSTEMES DE TRADUCTION IN VITRO

Figure 3

LES RECEPTEURS

Dès 1962, JENSEN met en évidence le récepteur de l'oestradiol, structure intracellulaire spécifique de cette hormone et présente dans tous les tissus cibles. D'abord étudié dans le tissu mammaire tumoral (JENSEN, 1962), le mécanisme d'action des récepteurs de l'oestradiol a été précisé dans l'endomètre normal (MILGROM, 1973). Ce mécanisme d'action tel qu'il était décrit est schématiquement rappelé sur la figure 3 : l'hormone pénètre d'une façon vraisemblablement passive dans la cellule et se fixe d'une façon spécifique sur des protéines réceptrices cytosoliques ou récepteurs, ayant une forte affinité pour l'hormone. La fixation de l'hormone induit un changement de conformation du récepteur, phénomène appelé activation en raison de la faculté qu'il confère au complexe hormone-récepteur (HR) de se lier aux composants nucléaires. L'interaction du complexe HR avec des séquences d'ADN spécifiques induit une altération de l'expression des gènes, point de départ de la réponse physiologique.

Il a fallu attendre les progrès dans la compréhension des structures nucléaires et la mise en place de systèmes de traduction *in vitro* pour montrer que c'était la stimulation des ARN polymérases qui était responsable de la synthèse de protéines spécifiques. L'hormone n'est pas "consommée" au cours de ce mécanisme et, une fois libérée de son récepteur, peut quitter la cellule.

La régulation de la synthèse et de la dégradation des récepteurs est effectuée par les hormones elles-mêmes :

- L'oestradiol provoque la synthèse de son propre récepteur et de celui de la progestérone qui représente ainsi un véritable marqueur de l'activité fonctionnelle du récepteur de l'oestradiol (RE).

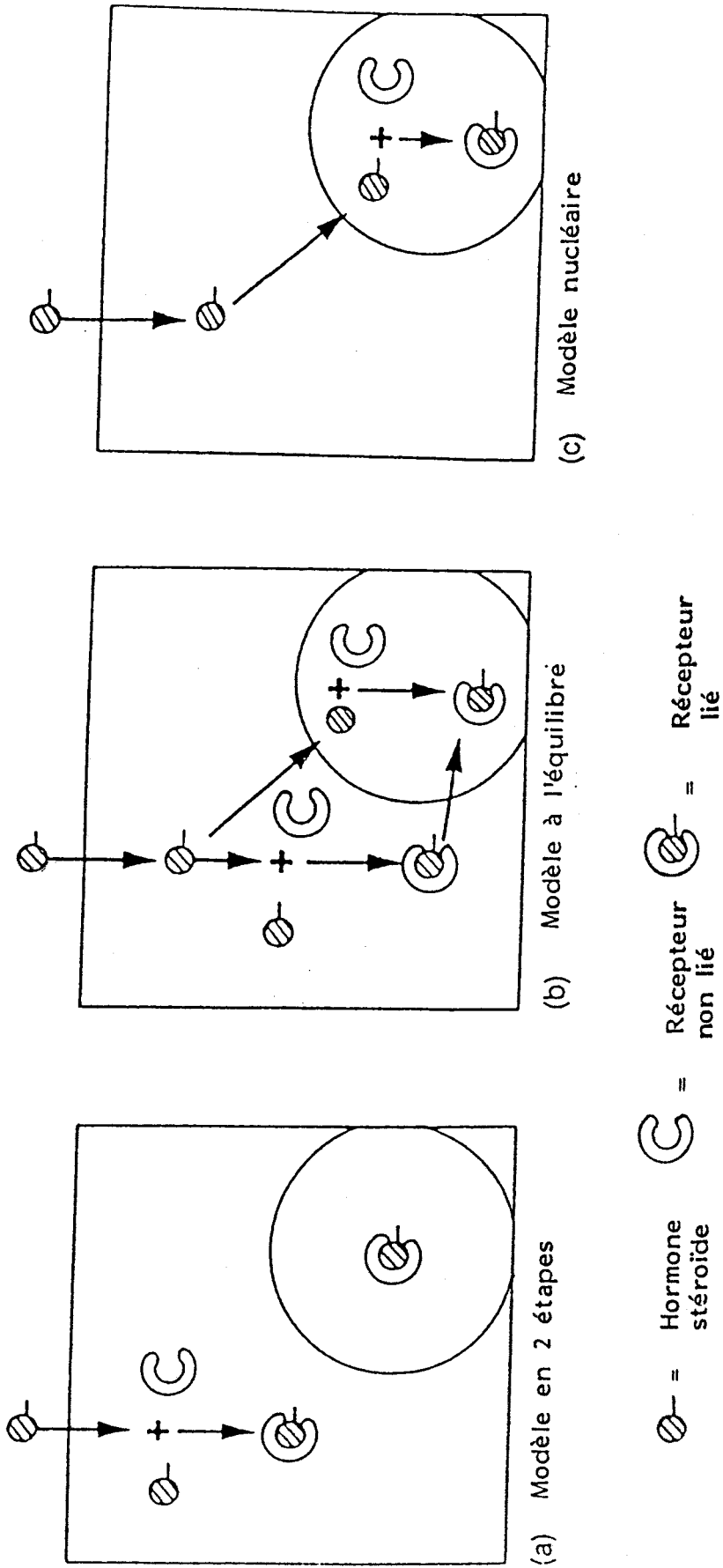


Figure 4 - Les 3 modèles de distribution intracellulaire des récepteurs des hormones stéroïdes (Clark, 1984)

- La progestérone inhibe la synthèse de son propre récepteur ainsi que la synthèse du RE ; ainsi se trouvent expliquées diverses constatations expérimentales : activité de la progestérone uniquement sur une glande préalablement soumise aux oestrogènes et effets anti-oestrogéniques de la progestérone.

Par une double approche, histo-autoradiographique et biochimique, SHERIDAN (1979) a montré que le modèle d'action classique des hormones stéroïdes en deux étapes devait être repris car il se révélait inexact : selon les auteurs, les récepteurs hormonaux stéroïdiens sont répartis dans la cellule en fonction du volume aqueux accessible et leur diffusion intracellulaire montre un équilibre nucléo-cytoplasmique et une prédominance du compartiment nucléaire, celui-ci représentant 60 à 80 % du volume cellulaire.

Après fractionnement subcellulaire, les récepteurs non liés et non transconformés présents dans le compartiment cytosolique ne doivent pas être confondus avec ceux initialement présents dans le compartiment cytoplasmique. En effet, de nombreuses protéines nucléaires non stabilisées sont extraites lors du fractionnement cellulaire et passent par diffusion et équilibre de dilution du compartiment nucléaire au compartiment cytosolique. C'est cette confusion qui fut à l'origine du modèle d'action en deux étapes.

Très récemment, par des méthodes nouvelles de fractionnement cellulaire utilisant l'énucléation (WESHONS, 1984) et la mise en oeuvre de méthodes immunocytochimiques à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs de l'oestradiol (KING, 1984), il a été prouvé que les récepteurs inoccupés par l'hormone résidaient bien primitivement dans le noyau (Figure 4). Il existe cependant encore des controverses quant à la diffusion passive de l'oestradiol à travers la membrane plasmique. L'équipe de PIETRAS et

SZEGO a en effet mis en évidence depuis plusieurs années des récepteurs membranaires de l'oestradiol dans l'utérus de rat (PIETRAS, 1979). Dans les tumeurs mammaires de rat, il pourrait aussi exister de telles structures réceptrices membranaires impliquées dans la croissance par l'intermédiaire de l'AMPc (MOROZOVA, 1986).

A - STRUCTURE DES RECEPTEURS

Le récepteur des oestrogènes, dans sa forme inactivée, est une protéine de poids moléculaire de 200-300 Kdaltons (Kda), dont la constante de sédimentation en gradient de sucrose est 8-10S, et le pI acide (4,6). Récemment WALTER (1985), par clonage de gènes, a isolé dans des cellules MCF7 l'ADN complémentaire du récepteur des oestrogènes. L'ARN messager code pour une protéine de 66 Kda. Cette sous-unité spécifique lie une protéine non spécifique (90 Kda) du groupe des "heat shock proteins" (JOAB, 1984). Très récemment, KUMAR (1986) a pu montrer que la sous-unité spécifique comprenait trois domaines : la partie C-terminale liant le stéroïde, la partie médiane riche en cystéine et lysine liant l'ADN, présentant toutes deux de grandes homologues entre espèces, et la partie N-terminale qui pourrait sélectivement interagir avec la machinerie transcriptionnelle. Fait surprenant, cette sous-unité spécifique possède de grandes analogies dans ses parties C-terminale et médiane avec une protéine codée par l'oncogène V-erb-A (BISHOP, 1986).

De récents travaux ont permis de conclure que beaucoup de récepteurs stéroïdiens et vraisemblablement tous sont des phosphoprotéines, d'où l'attention accrue sur les mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation. Le récepteur de l'oestradiol est un modèle très étudié en ce do-

main. MIGLIACCIO (1982) a montré que le récepteur doit être phosphorylé sur une tyrosine pour lier l'oestradiol. Le système enzymatique impliqué dans la phosphorylation de RE est dépendant du calcium et de la calmoduline (MIGLIACCIO, 1984). L'activité tyrosine-kinase serait stimulée par l'oestradiol, le cuivre (FISHMAN, 1987), mais aussi par des facteurs de croissance comme l'insuline, "l'Epidermal Growth Factor" (EGF), la somatomédine, et le "Platelet Derivative Growth Factor" (PDGF). La protéine 90 Kda associée au récepteur est, elle aussi, phosphorylée. Elle est identique à la protéine 90 Kda complexée aux produits d'au moins trois oncogènes de la famille des tyrosine-kinases (src, fes, fgr) (ZIEMIECKI, 1986).

In vivo, le complexe oestradiol-récepteur peut être déphosphorylé dans le noyau par des phosphatases (AURRICHIO, 1986). Le récepteur est alors inactivé. Il peut être réactivé par des kinases et lier à nouveau l'hormone : le récepteur est ainsi recyclé.

Ce mécanisme est contesté par l'équipe de LIPPMAN (KNABBE, 1986), qui ne détecte pas de phosphotyrosine après marquage des récepteurs au phosphore 32. Les auteurs décrivent par contre sous stimulation par les esters de phorbol, une phosphorylation du récepteur de l'oestradiol sur la sérine et la thréonine provoquant une diminution de la liaison de l'oestradiol.

B - TRANSFORMATION DU RECEPTEUR

In vitro, dans le cytosol, la fixation de l'hormone au récepteur s'accompagne d'une transformation de celui-ci, avec réduction de sa taille. Elle est caractérisée par une dissociation du récepteur avec perte de la sous-unité qui ne lie pas les stéroïdes. Ces phénomènes ne peuvent avoir lieu en

présence de molybdate de sodium qui stabilise le complexe dans une forme non dissociée. La transformation s'accompagne d'une perte de charges négatives (récepteur activé pI : 5,5 - 7) avec conversion des formes 8-10S en formes 3-4S.

Après liaison du ligand, le récepteur s'associe plus fortement à la chromatine et son extraction n'est possible qu'avec des solutions concentrées en sels. Les complexes sédimentent alors en gradient de sucrose en formes 5S. D'après les travaux de MILLER et coll. (1985), cette forme résulterait de la dimérisation de deux sous-unités 3-4S. La dimérisation du récepteur est, croit-on, essentielle pour que les récepteurs acquièrent une haute affinité pour la chromatine. Cette conversion des récepteurs en dimères est démontrée par l'utilisation d'inhibiteurs de la dimérisation qui empêchent la formation de récepteurs de forte affinité (TRAISH, 1980 ; SHYAMALA, 1980) et par les expériences de LINDSTED (1986) qui, à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-récepteurs (H-165), montrent que les récepteurs, sous forme 4S, réagissent avec une seule molécule d'anticorps tandis que les récepteurs sous forme 5S en fixent deux. In vivo, l'existence de tels mécanismes est probable mais non encore démontrée.

C - LIAISON NUCLEAIRE

La nature des accepteurs nucléaires sur lesquels les récepteurs se lient reste obscure. Il est généralement admis que l'accepteur nucléaire est composé d'un complexe chromatinien associant l'ADN et les protéines non-histones (revue de SPELSBERG, 1984). BARRACK (1983) a suggéré que les récepteurs d'oestrogènes pourraient être associés à une trame de protéines intranucléaires, exemptes à 98-99 % d'ARN, d'ADN, de lipides et de protéines chromosomiques. Cette structure appelée matrice nucléaire servirait de site d'attachement pour la réplication de l'ADN.

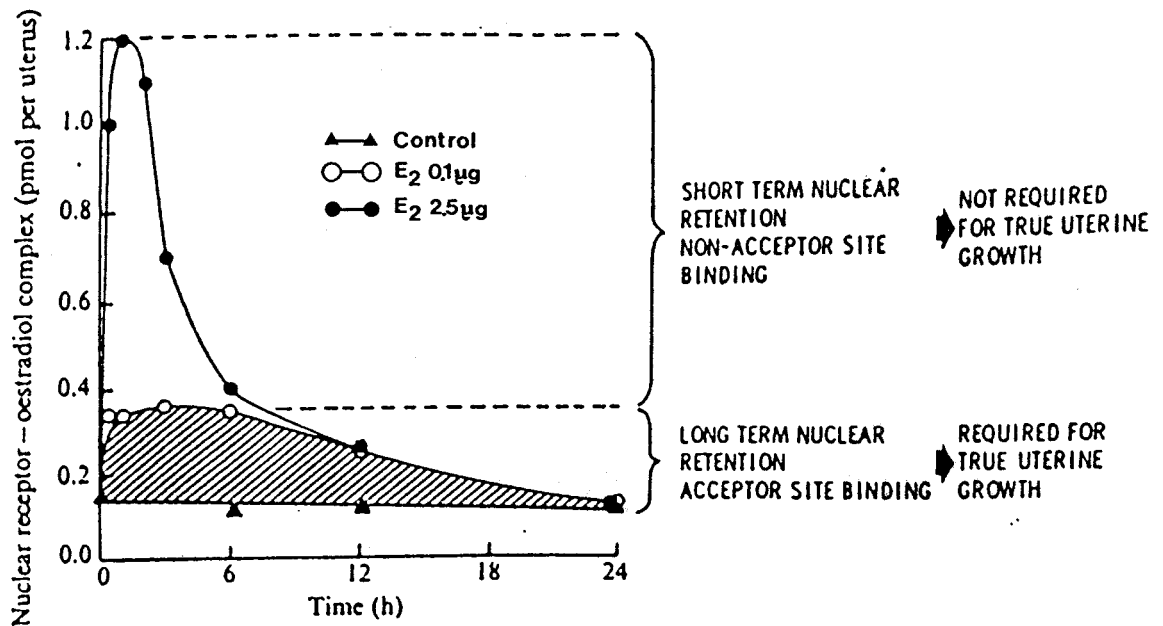


Figure 5 - Relation entre la rétention nucléaire des récepteurs de l'oestradiol et la croissance utérine

(CLARK, 1976)

La spécificité de liaison du complexe HR à l'ADN a longtemps été controversée car, dans beaucoup de systèmes étudiés, cette liaison était rarement saturable et spécifique, le complexe HR étant en effet capable de se lier aussi bien à l'ADN de cellules procaryotes qu'eucaryotes. Il y avait, dans ces expériences, masquage des sites saturables de forte affinité par des liaisons non spécifiques, probablement ioniques, avec l'ADN. On sait maintenant que les récepteurs des stéroïdes interagissent d'une façon saturable avec la chromatine intacte ou partiellement déprotéinisée. Des protéines spécifiques semblent être associées aux sites accepteurs puisque l'élimination de ces protéines par la pronase diminue considérablement la fixation du récepteur (RUH, 1983). Il y a à la fois une spécificité de tissu et d'espèce des sites accepteurs de la chromatine (SINGH, 1986).

a) Fixation du complexe E2-R au noyau

La majorité des travaux a surtout été effectuée dans l'utérus de rate et dans la lignée cellulaire MCF7.

Les travaux de CLARK (1976) ont fourni des informations importantes sur la relation entre l'occupation des récepteurs nucléaires et la réponse physiologique dans l'utérus de rate. Ils ont notamment montré que les doses physiologiques d'oestradiol (0,05 - 0,1 µg) ne saturaient pas les récepteurs nucléaires et que les taux d'occupation étaient très faibles par rapport à ceux notés après injection d'oestradiol à des doses pharmacologiques. Cependant, 6 heures après injection, les taux d'occupation étaient identiques dans les deux cas (Figure 5). Ces résultats corroboraient ceux de GIANOPOULOS (1971) montrant la rétention du récepteur par un nombre limité de sites nucléaires spécifiques. SCHOENBERG (1981) a aussi démontré une relation quantitative entre les récepteurs nucléaires d'oestrogènes qui

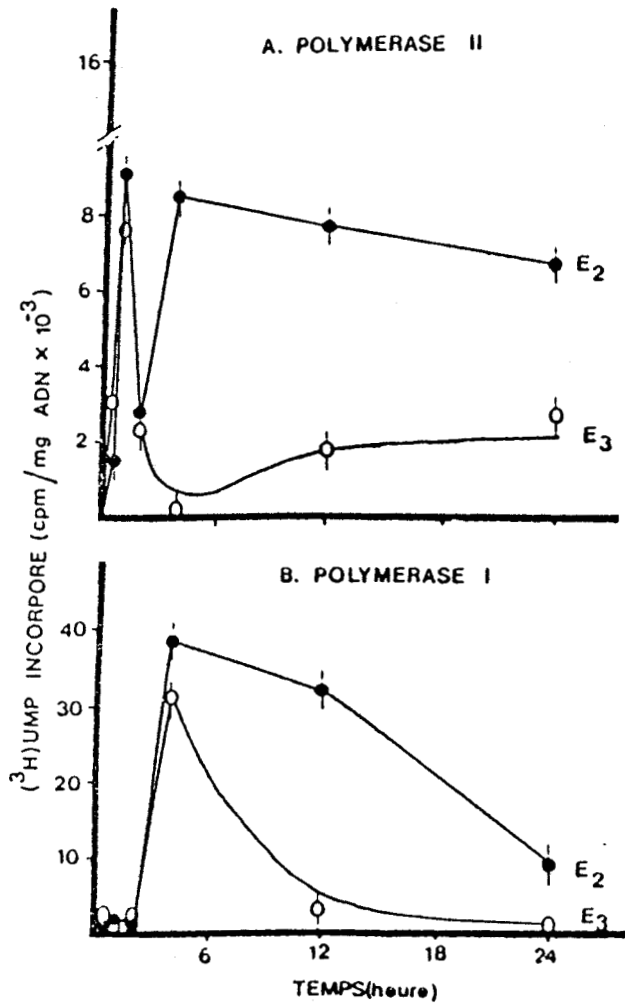


Figure 6 - Induction polymérase I et II dans l'utérus de rate

(HARDIN, 1976)

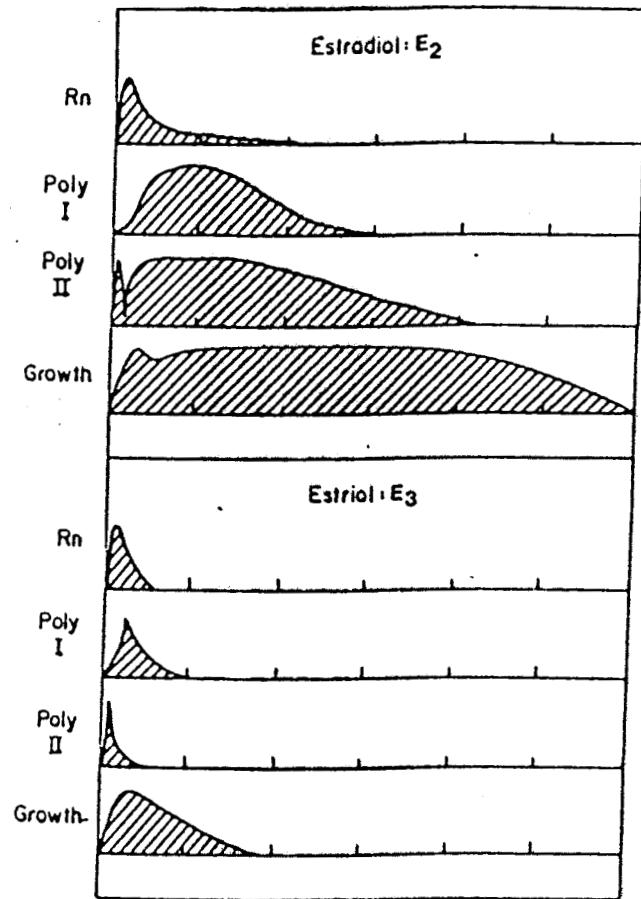


Figure 7 - Effet de E₂ et E₃ sur la réponse utéro-trophique

(MARKAVERICH, 1980)

peuvent être difficilement extraits par les solutions salines (KCl) et les récepteurs sensibles à l'action des nucléases. Cette étude suggère que les récepteurs résistant à l'extraction par le KCl se lient à des régions de la chromatine qui, étant plus sensibles à l'action des nucléases, sont les plus activement transcrites. Les sites récepteurs semblent retenus sur les sites accepteurs de la chromatine pendant des périodes de temps prolongées, caractéristique nécessaire à l'induction de la croissance utérine, tandis que les sites plus facilement extractibles par le KCl et résistant à l'action des nucléases sont moins retenus dans le noyau. Selon la durée de la rétention du récepteur dans le noyau, les effets oestrogéniques seront donc différents. Dans l'utérus, où les effets ont été les mieux étudiés, une liste a pu être établie :

- Effets utérotrophiques précoces (1 à 6 heures) :

- . oxydation du glucose,
- . incorporation d'acides aminés
- . mobilisation d'histamine,
- . stimulation de l'activité de l'ARN polymérase II
- . recyclage du récepteur

- Effets utérotrophiques tardifs (6 à 24 heures) :

- . action soutenue de l'ARN polymérase
- . synthèse de l'ARN, de protéines : (récepteurs)
- . synthèse de l'ADN : hypertrophie cellulaire (croissance utérine).

Une illustration des effets des oestrogènes à long ou à court terme est donnée par l'action de l'oestradiol ou de l'oestriol sur la stimulation des ARN polymérases (Figure 6) :

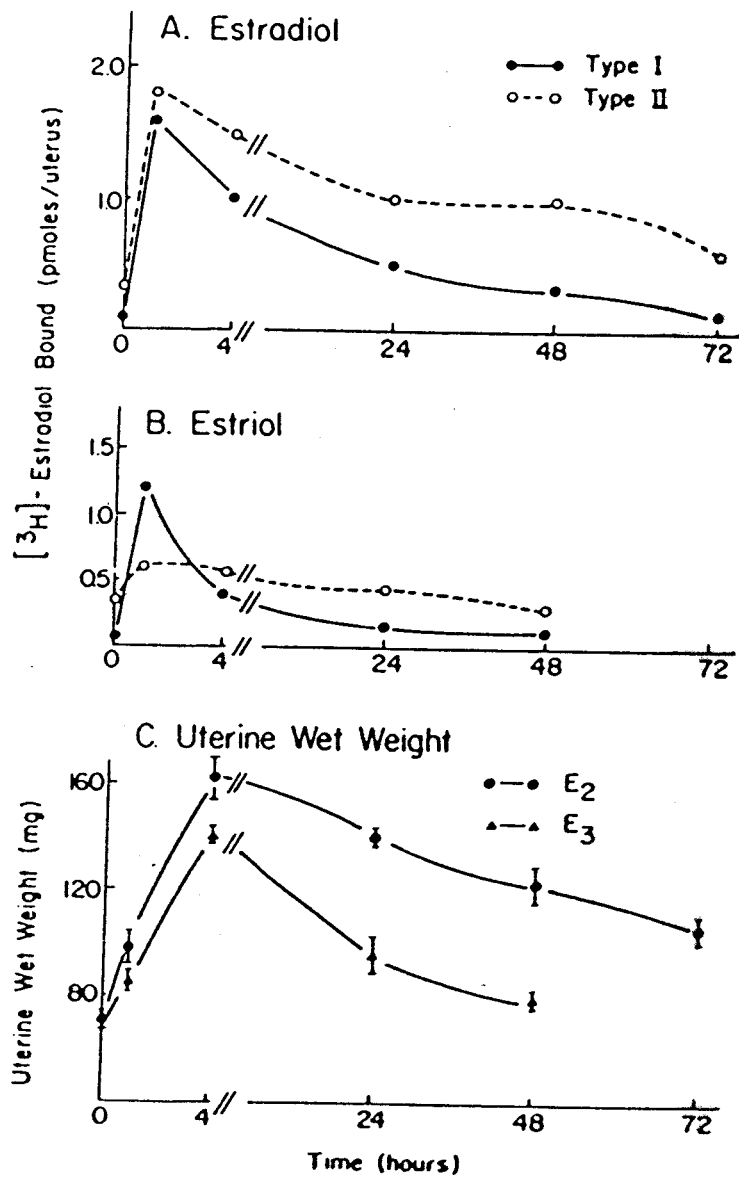


Figure 8 - Effet de E₂ et E₃ sur la formation des sites nucléaires I et II

(CLARK, 1981)

Après injection d'oestradiol, on note, dans la première heure, l'apparition d'un pic d'ARN polymérase II, le degré de liaison des complexes HR dans le noyau est de plus étroitement corrélé à l'induction de l'ARN polymérase II dans l'utérus (CHUKNYISKA, 1985). Ce premier pic est suivi 4 à 6 heures plus tard d'un second pic. L'augmentation de ce deuxième pic est parallèle à la stimulation de l'ARN polymérase I.

Après injection d'oestriol, par contre, on note encore l'apparition précoce d'un pic d'ARN polymérase II mais elle n'est pas suivie d'un deuxième pic. Les ARN polymérases I sont alors très peu stimulées et leur action peu soutenue.

L'oestriol a peu d'effet sur la croissance utérine (Figure 7). Ses faibles effets oestrogéniques sont dus au fait qu'il n'est retenu que pendant un temps inférieur à 6 heures dans le noyau et qu'il est incapable d'induire une action soutenue de l'ARN polymérase. Si, par contre, on pose des implants d'oestriol à l'animal, les effets oestrogéniques sont tout à fait analogues à ceux produits par l'oestradiol.

La rétention plus ou moins longue des oestrogènes dans le noyau a, selon CLARK (1982), des effets sur un autre paramètre : la formation d'un deuxième type de récepteur nucléaire ayant une affinité faible pour l'oestradiol. L'apparition de ce récepteur de type II est corrélée à une rétention longue du récepteur de type I dans le noyau et à la croissance utérine (MOSES, 1985 ; CLARK, 1985). L'oestriol, faiblement retenu dans le noyau, est incapable de l'induire (Figure 8).

Dans une lignée d'hépatocytes humains, l'induction d'un site nucléaire de faible affinité a aussi été décelée 6 heures après stimulation par l'oestradiol et augmentation des sites nucléaires de forte affinité. Une fois

induit, le site de faible affinité persistait dans au moins 15 générations de cellules filles cultivées sans hormones. Il serait selon les auteurs, le reflet de modifications induites dans la chromatine, responsables d'un effet mémoire, facilitant dans les cellules traitées, la stimulation de protéines induites (TAM, 1986).

b) Sites de liaison multiples dans les tumeurs du sein

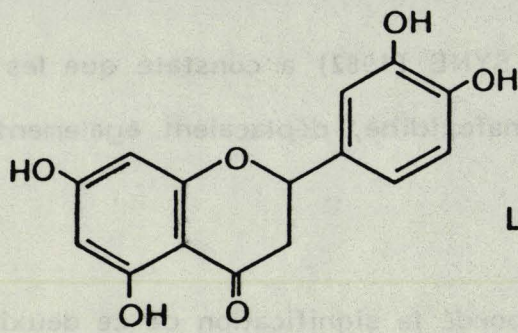
Nous avons recherché dans le sein, tissu soumis à l'imprégnation oestrogénique, la présence d'un deuxième type de site récepteur de l'oestradiol. Nos résultats figurent dans l'article II. Nous avons effectivement mis en évidence dans les tumeurs du sein deux types de sites nucléaires, un de forte affinité ($K_D < 1$ nM) (site A) et un autre de faible affinité (K_D environ 20 nM) (site B) pour l'oestradiol. Ces deux types de sites ont des constantes de vitesse de dissociation différentes, le type de forte affinité (A) se dissociant plus lentement ($k_{-1} = 5,44 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$) que le site B de faible affinité ($k_{-1} = 1,16 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$). Nous constatons, dans la majorité des 134 tumeurs étudiées, une association entre sites puisque les deux types sont présents dans 29,8 % et absents dans 63,5 % des cas. Leurs taux sont corrélés à ceux des récepteurs cytosoliques de l'oestradiol et de la progestérone et corrélés à la différenciation cellulaire : les cellules les plus différenciées contenant plus de récepteurs nucléaires des deux types. Ces sites sont spécifiques des oestrogènes, et les stéroïdes à effet non oestrogénique comme la progestérone, le cortisol et la dihydrotestostérone, ne peuvent entrer en compétition avec les oestrogènes pour l'occupation des sites. Il est intéressant de noter que les oestrogènes qui ont une faible action oestrogénique comme l'oestriol, l'oestrone et surtout, dans la catégorie des catécholoestrogènes, la 2-hydroxy-oestrone, déplacent plus le ligand du site de faible affinité que celui du site de forte affinité (Tableau 1, article II).

Dans un travail similaire, SYNE (1982) a constaté que les anti-hormones comme le tamoxifène et la nafoxidine, déplaçaient également l'oestradiol des deux types de sites.

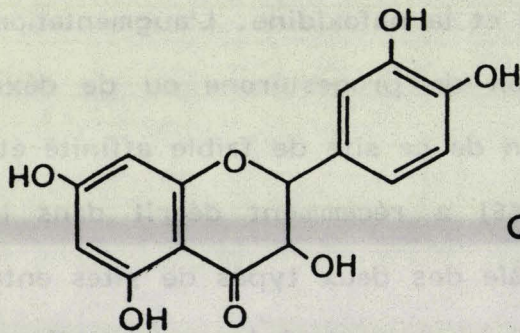
Aucune étude n'a encore abordé la signification de ce deuxième type de site dans le sein. Dans l'utérus de rate, MARKAVERICH (1981) a montré que le nombre de sites de faible affinité était considérablement augmenté par l'administration d'oestradiol mais aussi, à un moindre degré, par des anti-œstrogènes comme le clomiphène et la nafoxidine. L'augmentation du site II était bloquée par l'administration de progestérone ou de dexaméthasone. Dans tous les cas, l'augmentation de ce site de faible affinité était corrélée à la croissance. KORNYEI (1986) a récemment décrit dans le myomètre humain une concentration maximale des deux types de sites entre le 10ème et 14ème jour du cycle menstruel, au moment où la concentration d'oestradiol est la plus forte.

Une question importante, encore sans réponse, est de savoir si ces sites de faible affinité lient l'oestradiol "in vivo". Leur fonction pourrait être de fixer une molécule différente, d'où la faible affinité de l'oestradiol pour ces sites lors des conditions d'échange.

Les dernières études de MARKAVERITCH (1984) et CLARK (1986) montrent que les sites pourraient être occupés par un inhibiteur endogène, facilement dissociable par dilution de l'homogénat. Cet inhibiteur, qu'ils trouvent en quantité plus importante dans le tissu sain que dans les tissus tumoraux, a été isolé de l'utérus de rate. C'est une molécule stable à la chaleur (100°, 60 minutes) qui n'est pas de nature protéique. Ce serait un composé de type phénanthrène dont le poids moléculaire serait d'environ 300, sa demi-vie biologique étant de 7 à 10 jours. Il ne semble pas être



LUTEOLINE MW = 286



QUERCETINE MW = 302



Figure 9 - Exemple de molécules de la famille des bioflavonoïdes, qui se lient aux sites nucléaires de faible affinité inhibent la croissance cellulaire (Markaverich, 1987)

d'origine ovarienne ou surrénalienne. Cette molécule pourrait être un métabolite de stéroïdes d'origine hépatique, ou, selon CLARK, être apparentée aux bioflavonoïdes tels que la lutéoline, la quercetine (Figure 9) fournis par l'alimentation et particulièrement les fruits acides. L'addition de quercetine (5-10 µg/ml de milieu de culture) provoque une inhibition de la croissance des cellules MCF7, inhibition qui serait médiée spécifiquement par les sites nucléaires de faible affinité. De plus, l'injection de lutéoline ou de quercetine bloque la stimulation du site nucléaire de faible affinité normalement induite par l'oestradiol dans l'utérus de rate immature, ce blocage étant accompagné d'une inhibition de la croissance utérine (MARKAVERICH, 1987). La purification complète de cet inhibiteur est actuellement effectuée dans l'utérus de rate et ses effets biologiques seront ultérieurement précisés.

Bien que la signification de l'inhibiteur reste à définir, CLARK pense qu'il pourrait agir en modifiant ou en régulant l'activité utérotrophique des oestrogènes. La fixation de l'oestradiol sur le site I entraînerait la dissociation de l'inhibiteur du site II et augmenterait le nombre de ces sites.

En résumé, les récepteurs de type I ou A, dont la constante d'affinité est forte, doivent représenter les récepteurs classiques des oestrogènes et les récepteurs de type II ou B semblent résulter d'une réponse spécifique aux oestrogènes. Ils seraient étroitement corrélés à la croissance cellulaire (MARKAVERICH, 1979 ; CLARK, 1982), ils pourraient être des marqueurs de l'action oestrogénique au même titre que la synthèse du récepteur de la progestérone ou de protéines induites (SIMMEN, 1984). Ces sites pourraient donc représenter :

- des composants propres des mécanismes qui contrôlent la synthèse de l'ARN et/ou de l'ADN ;
- un mécanisme d'amplification des événements nucléaires initiés par la liaison du récepteur sur les sites accepteurs.

ARTICLE II

Nuclear Estradiol-binding Sites in Human Breast Cancer¹

Brigitte Vandewalle,² Jean-Philippe Peyrat, Jacques Bonnetterre, Bernard Hecquet, Didier Dewailly, and Jean Lefebvre

Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale, Centre de Lutte Contre le Cancer du Nord de la France (Centre Oscar Lambret), Rue Frédéric Combemale, BP 307, 59020 Lille Cedex, France

ABSTRACT

The binding of estradiol to nuclear fractions extracted from human breast carcinomatous tissue was demonstrated. The material, which was extracted with KCl, had an approximate molecular weight of 37,000 and bound estradiol with both high and low affinity ($K_d \approx 1$ nM, type A receptors; $K_d \approx 30$ nM, type B receptors) as calculated according to the method of Scatchard. Competition studies indicated that both components were specific for estradiol, and among the 134 tumors studied the receptors were found to be linked in almost all cases. Thirty-six % of the tumors were nuclear receptor positive. Cytoplasmic estradiol and progesterone receptors were also measured. Among the cytoplasmic tumors positive for cytoplasmic and progesterone receptors, 37% were devoid of both types of nuclear receptors; this may explain the failure of endocrine therapy in some cases. The determination of nuclear binding sites in human breast tumors appeared to be an interesting criterion for the assessment of estradiol-dependent cell growth.

INTRODUCTION

Following the demonstration by Jensen *et al.* (16) that the presence of estrogen receptors in human breast cancer correlated with response to endocrine therapy, determinations of ERC³ have been used extensively in many laboratories. However, the presence of ERC in a tumor results in only a 55 to 60% chance of remission in response to endocrine-ablative or -additive therapy (17). From these observations, it is obvious that the presence of ERC alone is not a sufficient marker of hormonal sensitivity.

Estrogen receptors may recognize estrogens but may not be able to initiate events beyond the binding step; thus, a product of estrogen action might be a more accurate indicator of the integrity of the estrogen response system than is the presence of the estrogen receptor by itself.

PGR, the synthesis of which is known to be controlled by estrogens (15, 32), are thought to be valuable additional criteria of estrogen sensitivity (2). According to the multicenter study of Osborne and McGuire (29), 77% of patients with tumors contain-

ing both ERC and PGRC will respond to endocrine manipulations.

It remains unclear why the remaining 23% do not respond to such treatments, despite the presence of PGR suggesting that the estradiol system is operating. Several explanations can be offered to account for this. (a) It may be due to the heterogeneity of the tumoral tissue; tumors might contain a heterogeneous population of hormone-dependent and autonomous cell types (23). (b) PGR may reflect only a part of estrogen action; this could explain the dissociation between the effects of estrogen on growth and PGR induction (24). (c) It has been demonstrated that the presence of PGR may occur in some cells unresponsive to estradiol (14, 18, 26).

This consideration prompted different authors to investigate other criteria which may be more closely linked with mammary tumor growth such as prolactin (3, 33, 35, 37), estradiol-induced protein (7, 47), and estradiol nuclear receptors (1, 10, 12, 13, 28, 40, 42, 43).

In the present report, we have investigated nuclear binding sites in human breast tumors in order to improve the selection of patients who would benefit from hormone therapy.

MATERIALS AND METHODS

Tumor Specimens

Mammary tumor specimens were exclusively adenocarcinomas. At the time of collection, fat was removed, and samples were divided into 2 pieces. One was submitted for histological studies, and the other was frozen and stored in liquid nitrogen until assays were performed. For some experiments, tissue from several ERC-, PGRC-positive tumors were pooled in order to provide sufficient material.

Reagents and Buffers

[³H]Estradiol, 160 Ci/mmol; [¹²⁵I]-estradiol, 1000 Ci/mmol; [³H]R 5020, 90 Ci/mmol; and unlabeled R 5020 were purchased from New England Nuclear, Boston, Mass. DES, cortisol, dihydrotestosterone, and progesterone were from Steraloids, Inc. (Pawling, N. J.). Sephadex LH 20, Sephadex G-200, and the standard protein calibration kit were purchased from Pharmacia, Uppsala, Sweden; the Bio-Rad protein kit assay was from Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.

The buffers used were P buffer, TK buffer, TP buffer, N₁ buffer, and N₂ buffer. Bio-Gel HT HAP (Bio-Rad) was washed extensively at 4° with TP buffer until the wash buffer reached pH 7.2. The HAP was resuspended in TP buffer (70% HAP-30% buffer).

Tissue Processing

All procedures were carried out at 4° unless otherwise stated. The frozen tissues were weighed and then pulverized with a Thermovac tissue pulverizer (Thermovac Industries, Inc., Copiague, N. Y.). The resulting fine powder was homogenized in P buffer using a motor-driven homogenizer (Interbraun, Melsungen, Germany). The crude nuclear fraction was prepared by centrifuging the homogenate at 800 × g for 20 min; the nuclear pellet was then washed 3 times in P buffer. The

¹ Supported by grants from Federation Française des Centres de Lutte Contre le Cancer and Faculté de Médecine de Lille.

² To whom requests for reprints should be addressed.

³ The abbreviations used are: ERC, cytoplasmic estrogen receptors; PGR, progesterone receptors; PGRC, cytoplasmic progesterone receptors; [³H]estradiol, 17β-[2,4,6,7,16,17-³H]estradiol; [¹²⁵I]-estradiol, 16α-iodo-3,17β-estradiol; [³H]R 5020, [17α-methyl-³H]promegestone; R 5020, promegestone; DES, diethylstilbestrol; P buffer, 5 mM sodium phosphate-1 mM monothioglycerol-10% (v/v) glycerol, pH 7.4; TK buffer, 10 mM Tris-HCl-0.6 M potassium chloride-1 mM monothioglycerol-10% (v/v) glycerol, pH 8.5; TP buffer, 50 mM Tris-10 mM KH₂PO₄, pH 7.2; N₁ buffer, 1 mM KH₂PO₄-3 mM MgCl₂-0.32 M sucrose-0.25% Triton X-100, pH 6.5; N₂ buffer, 1 mM KH₂PO₄-1 mM MgCl₂-2.2 M sucrose; HAP, hydroxylapatite; TNR, total nuclear receptors; BNR, type B nuclear receptors; ANR, type A nuclear receptors.

Received March 30, 1982; accepted May 11, 1983.

supernatants were ultracentrifuged in a Beckman L5-50 ultracentrifuge at $105,000 \times g$ for 30 min to yield the cytosol, from which a thin layer of fat was aspirated. The washed nuclear pellet was extracted with 4 volumes of TK buffer under agitation for 60 min and then ultracentrifuged at $105,000 \times g$ for 30 min in order to obtain the supernatant nuclear extract.

Preparation of Purified Nuclei

Tissues were homogenized in N_1 buffer. Purified nuclear pellets were prepared from these homogenates according to the method of McEwen and Zigmond (21); this involves 3 additional washes in N_1 buffer without Triton X-100, followed by centrifugation at $60,000 \times g$ for 1 hr in 2.2 M sucrose (N_2 buffer).

Characteristics of [3H]Estradiol Binding to Nuclear Receptors

Association Studies. Samples of the HAP-precipitated nuclear extracts were incubated for various times at 4° or at 30° with 5 nM [3H]estradiol in the presence or absence of a 300-fold excess of DES.

Dissociation Studies. The HAP-precipitated nuclear extracts were equilibrated with [3H]estradiol in the presence or in the absence of a 300-fold molar excess of DES. Free steroids were removed by centrifugation and 4 washes with P buffer. Dilutions of the pellet were performed in either the absence or the presence of unlabeled estradiol. Dissociation of the complexes was monitored for 6 hr under conditions in which the rebinding of dissociating radioactive hormone to the receptor was not possible. Amounts of specific binding remaining on HAP were compared to the amounts at $T = 0$ hr.

Analysis of Nuclear Extracts on Sephadex G-200 Columns. Sephadex G-200 (5 g, bead form) was suspended in TP buffer and allowed to swell at 4° for 3 weeks. Gel was packed into column (100 x 1.6 cm) and equilibrated in TP buffer. Samples of each nuclear extract incubation product (300 μ l) were first applied to a column (6 x 0.5 cm) of Sephadex LH-20 equilibrated in TP buffer in order to separate macromolecular bound and free estradiol. The macromolecular bound estradiol was placed directly on the column of Sephadex G-200. Elution was conducted at 4° with TP buffer at a rate of 7.5 ml/hr, and 1.6-ml fractions were collected. Elution profiles were monitored by absorption of the column effluent at 280 nm for standard proteins of known molecular weight.

Receptor Assays

ERC and PGRC Levels. [3H]Estradiol and [3H]R 5020 bindings were measured using dextran-coated charcoal assays (8). Increasing masses of [3H]estradiol (0.25 to 10 nM final concentrations) or [3H]R 5020 (0.5 to 20 nM final concentrations) were incubated in duplicate at 4° for 16 hr with cytosol aliquots. Nonspecific binding was accounted for by preparing the same incubation series with the addition of a 200-fold excess of DES as estrogen competitor and a 200-fold excess of R 5020 as progesterone competitor. After adsorption of free hormones on dextran-coated charcoal, the number of binding sites and the dissociation constant (K_d) were calculated by Scatchard analysis of specific bound hormones (36). The results were expressed in fmol/mg protein; ERC and PGRC were considered as positive when greater than 3 and 25 fmol/mg protein, respectively.

Nuclear Estrogen Receptor Levels. The procedure is a modification of the methods described by Erdos *et al.* (9) and Garola and McGuire (12); 200 μ l of the nuclear extract were first adsorbed on 250 μ l of HAP slurry for 30 min and centrifuged at $1500 \times g$ for 2 min; then incubations of the pellet with 50 μ l of [3H]estradiol with or without a 300-fold excess of DES were performed for 4 hr at 30° and for 16 hr at 4° . In each experiment, the nonspecific binding of [3H]estradiol to HAP or plastic tubes was estimated when bovine serum albumin standard solution replaced nuclear extracts. In order to confirm specificity, Scatchard analyses were also carried out with unlabeled progesterone and with unlabeled testosterone present in buffer. After incubation and centrifugation, free hormones were discarded, and the pellets were washed 4

times with P buffer containing 1% Tween 80 and extracted overnight with 2 ml ethanol. Binding parameters were analyzed by the method of Scatchard; the concentration of binding sites and the equilibrium dissociation constant of each component of the binding system were determined by the method of Rosenthal (34). Specific binding sites that were measured at 30° were termed TNR, while those measured at 4° were termed BNR. The difference, TNR-BNR, was designated as ANR and was considered as positive when higher than 10 fmol/mg protein.

When large samples were available, binding studies were performed with a 0.1 to 100 nM concentration range. Routinely, single-dose assays were performed in 134 breast tumors with 5 nM [3H]estradiol for 4 hr at 4° and 30° .

Other Analytical Methods

Protein concentrations were determined in cytosol by the method of Lowry *et al.* (20) and in nuclear extract by the Bio-Rad protein assay. [3H]Estradiol and ^{125}I -estradiol were counted using a Beckman LS 6800 liquid scintillation spectrometer and a Beckman gamma 5500 counter, respectively. Counting efficiencies were 70% for ^{125}I -estradiol and 30 to 50% for [3H]estradiol.

The significance of differences between results was determined using Spearman's test. All analyses were carried out using a programmable CBM Model 8032 Commodore calculator.

RESULTS

Validity of the Method

To eliminate the possibility of cytosolic contamination in the nuclear preparations, the nuclear receptor content before and after purification of the nuclei was determined in 10 experiments. In the method involving purified nuclei, the inclusion of 0.25% Triton X-100 in the homogenization buffer strips away the outer membrane, reducing the possibility of contamination by cytoplasmic receptor; then a partial purification of nuclear preparation is achieved by suspension in 2.2 M sucrose and centrifugation at $60,000 \times g$ for 1 hr. The mean values obtained per mg protein from the 2 methods were not significantly different ($p < 0.001$; $n = 10$), showing that nuclear receptors could not be attributed to cytosolic contamination.

In order to ascertain that estrogen cannot bind to HAP and mimic specific binding at any estradiol concentration used, a bovine serum albumin standard solution in TK buffer was precipitated on HAP, and [3H]estradiol, with and without a 300-fold excess of unlabeled DES, was added over a range of 0.1 to 100 nM estradiol; incubations were performed at 30° for 4 hr and at 4° for 16 hr. Results are plotted in Chart 1; no "specific binding" was observed at any estradiol concentration used.

Association Studies. The effect of incubation time of the binding of [3H]estradiol at 4° and 30° to binding sites in the nuclear extracts is shown in Chart 2. At 30° , the binding was complete after incubation for 3 hr, but values dropped after 5 hr, this presumably being due to a temperature-dependent destruction of the nuclear receptor by the proteolytic enzyme described by Garola and MacGuire (11). At 4° , the binding was nearly complete after incubation for 4 hr, and the estradiol-binding material remained stable after incubation for up to 24 hr.

Saturation Analysis. The results of saturation analysis over a wide range of [3H]estradiol concentrations (0.1 to 100 nM) in HAP-precipitated nuclear extracts are shown in Chart 3. When incubations were performed at 30° , a biphasic curve consisting of 2 apparently linear parts was obtained. The concentration of

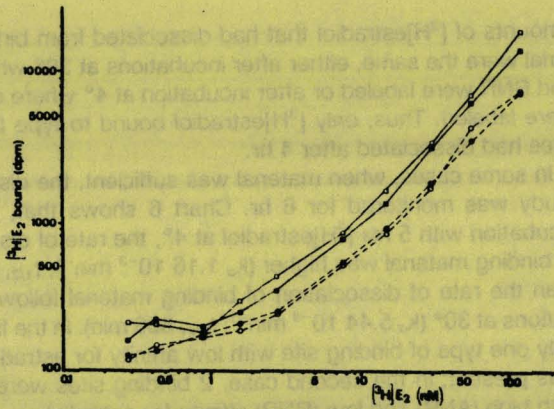


Chart 1. Analysis of [³H]estradiol ([³H]E₂) binding to HAP. Bindings were measured on HAP-precipitated bovine serum albumin solution (1 mg/ml TK buffer). Incubations were performed at 30° using [³H]estradiol (□) and [³H]estradiol with a 300-fold excess of DES (■) and at 4° using [³H]estradiol (○) and [³H]estradiol with a 300-fold excess of DES (●).

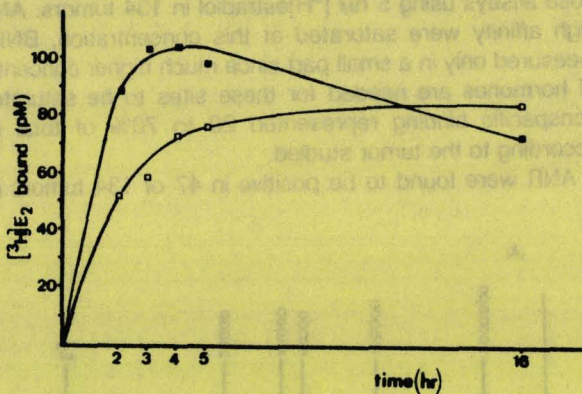


Chart 2. Binding of [³H]estradiol ([³H]E₂) to HAP-precipitated nuclear extract as a function of time and temperature. Binding sites were measured at 4° (□) and at 30° (■) by single-dose assays as described under "Materials and Methods." Values have been corrected for nonspecific binding.

binding sites and the equilibrium dissociation constant of each component of the binding system were determined by the method of Rosenthal: the first part, corresponding to low estradiol concentrations, is a steep curve, indicating high affinity ($K_d \approx 1$ nM) and a limited number of sites (ANR sites); the second part, corresponding to higher estradiol concentration, is less steep, indicating low affinity and a very high number of sites (BNR sites). In order to confirm that the lower-affinity binding component was not due to binding of [³H]estradiol to progesterone or androgen receptors, the Scatchard analyses were repeated in the presence of excess of unlabeled progesterone and dihydrotestosterone. The results were identical to those obtained in the absence of such unlabeled hormones. Contrary to these results, the Scatchard plots of experiments carried out at 4° for 16 hr show only the more horizontal curve with apparent positive cooperativity, and only one type of binding site with high capacity and low affinity ($K_d \approx 30$ nM) was exhibited. They were similar to the BNR sites with high capacity and low affinity observed on the plotting obtained from the 30° analysis (Chart 4).

Specificity of Nuclear Binding Sites

The specificity of [³H]estradiol binding to nuclear binding sites was determined by measuring the ability of various hormones to compete for binding with [³H]estradiol. Competition studies for

binding of 5 nM [³H]estradiol on ANR sites were carried out at 30° for 3 hr, i.e., on tumors that did not bind estradiol at 4° so that only type A was present, while competition studies for binding of 50 nM [³H]estradiol or 5 nM [³H]estradiol on BNR sites only were carried out at 4° for 16 hr, i.e., on tumors that bound the same amount of [³H]estradiol at 4° as at 30°; therefore, only

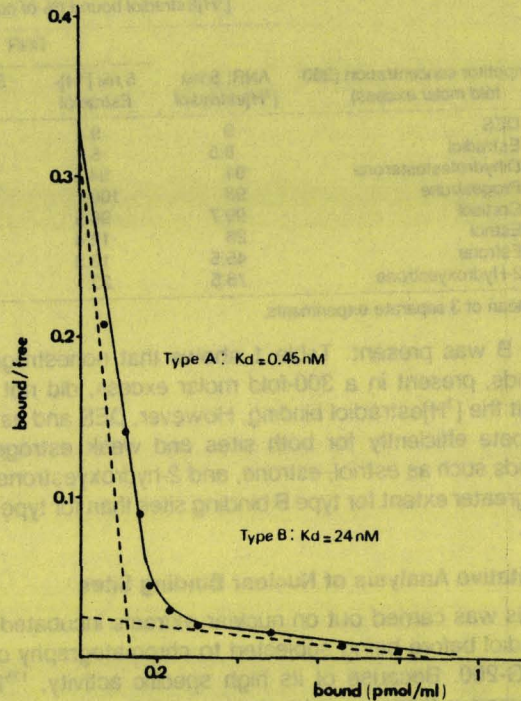


Chart 3. Scatchard analysis of binding data from HAP assay. The HAP-precipitated nuclear extracts were incubated at 30° for 4 hr with a 0.1 to 100 nM [³H]-estradiol concentration range. The plot is the average of 7 experiments, 4 pooled extracts and 3 individual tumors. $K_{dA} = 0.45 \pm 0.5$ (S.D.) nM; $K_{dB} = 24 \pm 8$ nM. The K_d of each component was established by using the graphic solution of the biphasic curves (---) as described by Rosenthal.

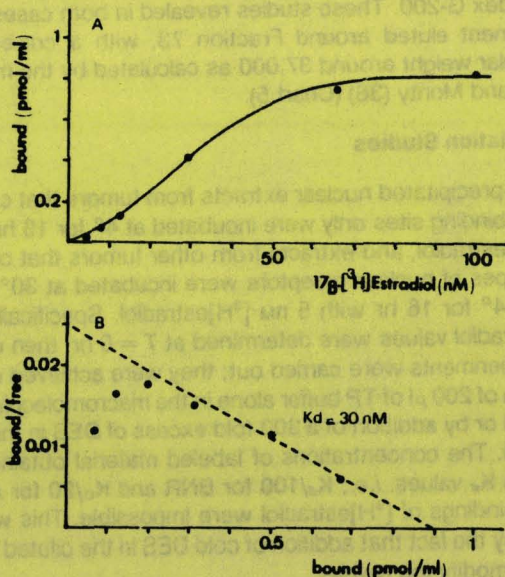


Chart 4. A, saturation analysis of [³H]estradiol binding to HAP-precipitated nuclear fraction. The HAP assays were performed at 4° for 16 hr with a 0.1 to 100 nM [³H]estradiol concentration range. The plot is the average of 9 experiments, 4 pooled extracts, and 5 individual tumors, 2 of which contained only type B receptors. B, Scatchard analysis of the data in A; $K_{dB} = 30 \pm 10$ nM.

Table 1
Hormonal specificity of nuclear estrogen binding sites

Competition of a 300-fold excess of unlabeled DES, estradiol, estrone, estriol, 2-hydroxyestrone, cortisol, progesterone, and dihydrotestosterone for binding of 5 nM (for type A) and 5 nM and 50 nM (for type B) [³H]estradiol on HAP-precipitated nuclear extracts. See "Materials and Methods" for incubation conditions. Results are expressed as the percentage of [³H]estradiol bound when no competitor is present.

Competitor concentration (300-fold molar excess)	[³ H]Estradiol bound (% of control) ^a		
	ANR: 5 nM [³ H]estradiol	5 nM [³ H]-Estradiol	50 nM [³ H]-Estradiol
DES	9	9.1	19
Estradiol	8.5	5.7	7.3
Dihydrotestosterone	91	94.5	93
Progesterone	93	100	100
Cortisol	99.7	96.5	100
Estriol	28	12.4	14.7
Estrone	45.5	12.3	29.5
2-Hydroxyestrone	76.5	23.1	30.8

^a Mean of 3 separate experiments.

type B was present. Table 1 shows that nonestrogenic compounds, present in a 300-fold molar excess, did not markedly inhibit the [³H]estradiol binding. However, DES and estradiol did compete efficiently for both sites and weak estrogenic compounds such as estriol, estrone, and 2-hydroxyestrone compete to a greater extent for type B binding sites than for type A binding sites.

Qualitative Analysis of Nuclear Binding Sites

This was carried out on nuclear extracts incubated with ¹²⁵I-estradiol before being subjected to chromatography on Sephadex G-200. Because of its high specific activity, ¹²⁵I-estradiol was used in these experiments in order to obtain more reliable determinations of the counts present in each fraction from the chromatography effluent. Incubations were performed at 30° for 3 hr for ANR sites and at 4° for 16 hr from BNR sites. Samples of macromolecular bound ¹²⁵I-estradiol obtained by exclusion chromatography on Sephadex LH-20 were passed through Sephadex G-200. These studies revealed in both cases a major component eluted around Fraction 73, with a corresponding molecular weight around 37,000 as calculated by the method of Siegel and Monty (38) (Chart 5).

Dissociation Studies

HAP-precipitated nuclear extracts from tumors that contained type B binding sites only were incubated at 4° for 16 hr with 30 nM [³H]estradiol, and extracts from other tumors that contained both types of nuclear receptors were incubated at 30° for 3 hr and at 4° for 16 hr with 5 nM [³H]estradiol. Specifically bound [³H]estradiol values were determined at T = 0 hr; then dissociation experiments were carried out; they were achieved either by addition of 200 μl of TP buffer alone in the macromolecular bound material or by addition of a 300-fold excess of DES in the diluted material. The concentrations of labeled material obtained were far from K_d values, i.e., K_d/100 for BNR and K_d/20 for ANR, so that rebindings of [³H]estradiol were impossible. This was confirmed by the fact that addition of cold DES in the diluted material did not modify the results.

The results in Table 2 show that, after 4 hr, approximately 50% of bound [³H]estradiol had dissociated from BNR sites in Tumor 1, which contained only type B binding sites. In Tumors 2 and 3, which contained type A and type B binding sites, the

amounts of [³H]estradiol that had dissociated from binding material were the same, either after incubations at 30° where ANR and BNR were labeled or after incubation at 4° where only BNR were labeled. Thus, only [³H]estradiol bound to type B binding sites had dissociated after 4 hr.

In some cases, when material was sufficient, the dissociation study was monitored for 6 hr. Chart 6 shows that, following incubation with 5 nM [³H]estradiol at 4°, the rate of dissociation of binding material was higher (k_d 1.16 10⁻³ min⁻¹; t_{1/2}, 269 min) than the rate of dissociation of binding material following incubations at 30° (k_d 5.44 10⁻⁴ min⁻¹; t_{1/2}, 553 min). In the first case, only one type of binding site with low affinity for estradiol (BNR) was present; in the second case, 2 binding sites were present with high (ANR) and low (BNR) affinity for estradiol.

Single-Dose Assays

Both types of nuclear receptors have been measured by single-dose assays using 5 nM [³H]estradiol in 134 tumors. ANR with high affinity were saturated at this concentration, BNR were measured only in a small part since much higher concentrations of hormones are needed for these sites to be saturated; the nonspecific binding represented 20 to 70% of total binding according to the tumor studied.

ANR were found to be positive in 47 of 134 tumors (35.1%

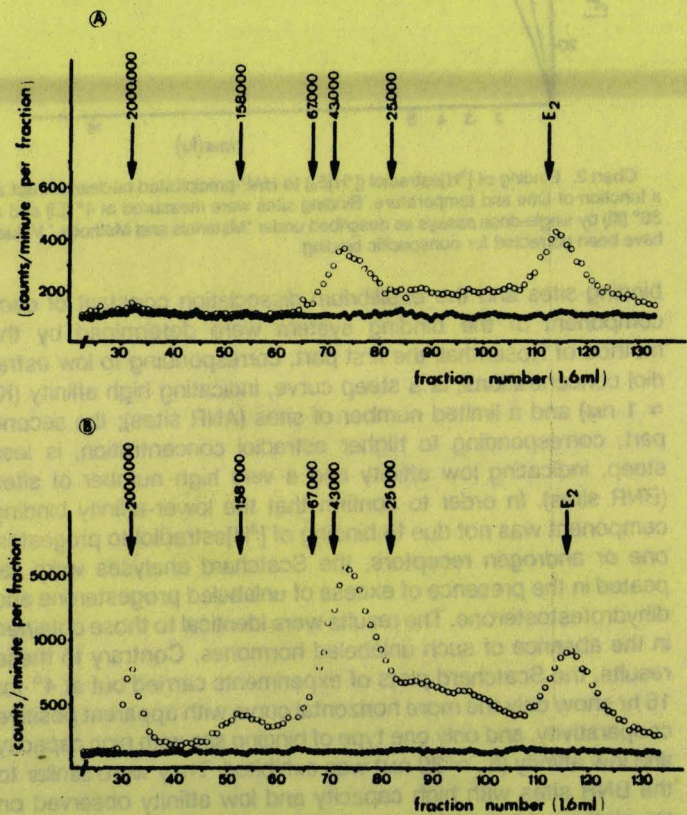


Chart 5. Qualitative analysis of ANR and BNR. Elution patterns from Sephadex G-200. A, macromolecular bound estradiol (E₂) from nuclear extract of tumor containing only type A binding sites; the incubations were performed at 30° with ¹²⁵I-estradiol with or without a 300-fold molar excess of DES. B, macromolecular bound estradiol from nuclear extract of tumor containing only type B binding sites; the incubations were performed at 4° with ¹²⁵I-estradiol with or without a 300-fold excess of DES. Gel filtration was carried out in TP buffer at 4° at a rate of 7.5 ml/hr; ○, total binding; ●, nonspecific binding.

Table 2
Dissociation studies of labeled nuclear binding sites

HAP-precipitated nuclear extracts were equilibrated with various concentrations of [³H]estradiol; the macromolecular bound material was then diluted, and dissociation experiments were carried out for 4 hr at 4°.

Tumor	[³ H]Estradiol bound (pM) at following dissociation times			% of dissociated material	
	0 hr	4 hr	B ₀ - B ₄	$\frac{B_0^b - B_4^b}{B_0^b} \times 100$	$\frac{B_0^c - B_4^c}{B_0^b} \times 100$
1 ^d	80.4 ^b	41.8 ^b	38.6 ^b	48	
2 ^e	12.4 ^c	9.8 ^c	2.6 ^c		32.6
	8.1 ^b	5.4 ^b	2.7 ^b	33.3	
3 ^e	2.7 ^c	2.1 ^c	0.6 ^c		58.5
	1 ^b	0.4 ^b	0.6 ^b	59.4	

^a B, binding material.
^b Incubations were performed at 4°.
^c Incubations were performed at 30°.
^d Tumor that contained only type B receptors incubated with 30 nM [³H]estradiol for 16 hr prior to dissociation studies at 4°.
^e Tumor that contained type A and type B receptors, incubated with 5 nM [³H]estradiol for 4 hr prior to dissociation studies at 4°.

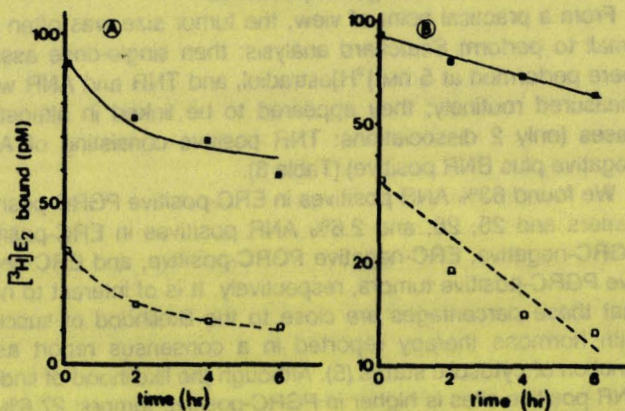


Chart 6. Rates of dissociation of [³H]estradiol ([³H]E₂) from diluted receptors. —, both ANR and BNR were labeled by incubation at 30° prior to dissociation experiment. - - -, only BNR were labeled by incubation at 4° prior to dissociation experiment. Ordinate: A, normal scale; B, logarithmic scale.

Table 3
Distribution of nuclear receptors in 134 breast cancers

BNR were measured by single-dose assays with 5 nM [³H]estradiol at 4° for 4 hr. TNR were measured by single-dose assays with 5 nM [³H]estradiol at 30° for 4 hr. ANR were determined by the difference between TNR and BNR. TNR-positive, >20 fmol/mg nuclear protein; ANR-positive, >10 fmol/mg nuclear protein.

Nuclear binding sites	No. of patients	% of total
AMR positive	47	35.1
BNR positive	42	31.3
ANR positive BNR positive	40	29.8
ANR positive BNR negative	7	5.2
ANR negative BNR positive	2	1.5
ANR negative BNR negative	85	63.5
TNR positive	49	36.5
TNR negative	85	63.5

ANR positive). The presence of BNR was often linked to ANR positivity; few tumors contained only one of both types of binding sites (ANR positive, BNR negative, 5.2%; ANR negative, BNR positive, 1.5%) (Table 3).

Nuclear receptors were studied as a function of cytosolic status; there were good correlations between ANR and ERC and between ANR and PGRC (*p* < 0.001). No significant difference (*p* < 0.01) was found between ERC-positive and PGRC-negative tumors in the mean level of ANR (Table 4). However, it

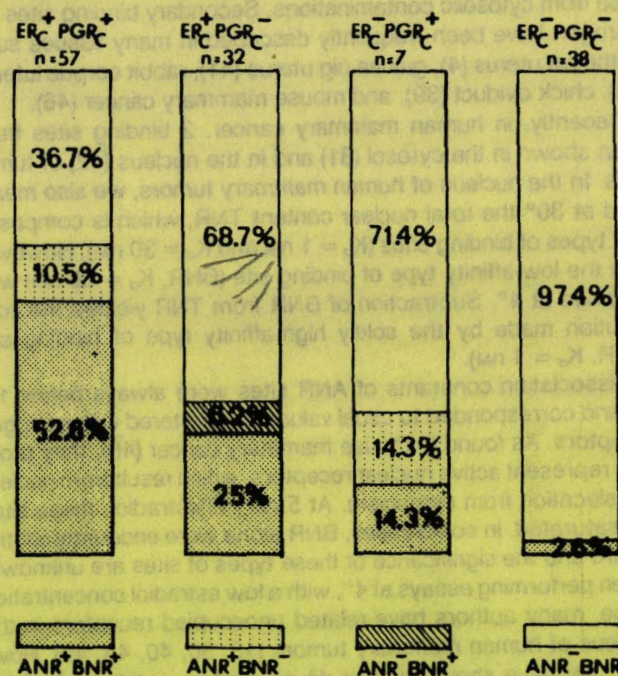


Chart 7. Nuclear binding sites, single-dose assays 5 nM [³H]estradiol. Relationship to ERC and PGRC in 134 human breast tumors.

is noteworthy that among the 87 ANR-negative tumors, 24 were PGRC positive (27.6%).

In 4 classifications of tumors, according to the cytosolic status (ERC positive PGRC positive; ERC positive PGRC negative; ERC negative PGRC positive; ERC positive PGRC negative), it appeared that 36.8% of ERC-positive PGRC-negative tumors were devoid of both kinds of nuclear receptor. The percentage was higher in the ERC-positive PGRC-positive tumors (68.7%) and in the ERC-negative PGRC-positive tumors (71.4%). In ERC-negative PGRC-negative tumors, 2.6% only were nuclear estradiol positive (Chart 7).

Analysis of the different hormone binding parameters showed that ANR and TNR values were significantly higher (*p* < 0.001) in ERC-positive, PGRC-positive tumors when compared to values from other positive cytosolic classes (Table 4).

Table 4
Steroid receptors in 134 human breast cancers

ERC, PGRC, TNR, and ANR were measured as described in "Materials and Methods." ERC was considered positive at >3 fmol/mg cytosol protein. PGRC was considered positive at >25 fmol/mg cytosol protein. TNR and ANR binding sites were measured by single-dose assays at 5 nM [³H]estradiol.

	ERC		PGRC		fmol/mg nuclear protein	
	fmol/mg cytosol protein	K _d (nM)	fmol/mg cytosol protein	K _d (nM)	TNR	ANR
ERC positive (n = 89)	208 ± 34 ^a	0.66 ± 0.03			33.4 ± 3.6	20.9 ± 2.4
PGRC positive (n = 64)			299 ± 58	1.25 ± 0.13	37.2 ± 4.2	24.3 ± 2.9
ERC positive PGRC positive (n = 57)	226 ± 44	0.63 ± 0.084	337 ± 68	0.99 ± 0.097	41.9 ± 4	27.4 ± 3.1
ERC positive PGRC negative (n = 32)	170 ± 53	0.71 ± 0.17			18.1 ± 4.5	9.1 ± 2.3
ERC negative PGRC positive (n = 7)			78 ± 60	1.37 ± 0.39	21 ± 15	14.1 ± 10.1
ERC negative PGRC negative (n = 38)					3.5 ± 1.3	2.9 ± 1.1

^a Mean ± S.E.

DISCUSSION

We measured 2 types of binding sites in the nucleus of human mammary tumors. Our experiments on purified nuclear preparations have discounted the possibility that nuclear receptors arise from cytosolic contaminations. Secondary binding sites for estrogen have been frequently described in many tissues such as the rat uterus (4), guinea pig uterus (41), rabbit corpus luteum (48), chick oviduct (39), and mouse mammary cancer (46).

Recently, in human mammary cancer, 2 binding sites have been shown in the cytosol (31) and in the nucleus (42) of tumor cells. In the nucleus of human mammary tumors, we also measured at 30° the total nuclear content TNR, which is composed of 2 types of binding sites (K_d ≈ 1 nM and K_d ≈ 30 nM). However, only the low-affinity type of binding site (BNR, K_d ≈ 30 nM) was obtained at 4°. Subtraction of BNR from TNR yielded the contribution made by the solely high-affinity type of binding site (ANR, K_d ≈ 1 nM).

Dissociation constants of ANR sites were always below 1.5 nM and corresponded to usual values encountered with estrogen receptors. As found in mouse mammary cancer (46), they probably represent active nuclear receptors, which result from nuclear translocation from cytoplasm. At 5 nM [³H]estradiol, these sites are saturated. In some cases, BNR alone were encountered; the nature and the significance of these types of sites are unknown. When performing assays at 4°, with a low estradiol concentration range, many authors have related unoccupied receptors in the nucleus of human mammary tumors (13, 30, 40, 43, 49). However, we have shown that at 4° an exchange takes place on these sites. Like ANR sites, the BNR sites have a molecular weight of about 37,000; they are moreover estrogen specific. It is worth noting that competition by weak estrogens such as estrone, estriol, and 2-hydroxyestrone for BNR binding sites is more important than competition for ANR binding sites. We have shown that estradiol complexed to the BNR sites dissociates rapidly at 4°, whereas estradiol complexed to ANR sites is stable at 4° at least during 6 hr. Thus, the dissociation constant of BNR sites obtained by dissociation studies as well as the Scatchard plot is high. The possibility that these sites are complexed to estrogens with low affinity and rapid rates of dissociation was discounted by Levy *et al.* (19), at least in human uterine tissues. In human mammary tumors, they could represent *in vivo* a lower-affinity ligand such as catechol estrogens, which may be present at high cellular concentrations, but which dissociate rapidly from the receptor binding sites. The levels of these receptors might be regulated directly or indirectly by the intranuclear content of

receptors with high affinity for estradiol. However, these nuclear sites with low affinity for estradiol are thought to reflect the estrogen-responsive state of tissues in mouse mammary carcinoma (46). Thus, they may represent an additional indicator for the assessment of estrogen dependence.

From a practical point of view, the tumor size was often too small to perform Scatchard analysis; then single-dose assays were performed at 5 nM [³H]estradiol, and TNR and ANR were measured routinely; they appeared to be linked in almost all cases (only 2 dissociations: TNR positive consisting of ANR negative plus BNR positive) (Table 3).

We found 63% ANR positives in ERC-positive PGRC-positive tumors and 25, 28, and 2.6% ANR positives in ERC-positive PGRC-negative, ERC-negative PGRC-positive, and ERC-negative PGRC-positive tumors, respectively. It is of interest to note that these percentages are close to the likelihood of success with hormone therapy reported in a consensus report as a function of cytosolic status (5). Although the likelihood of finding ANR positive sites is higher in PGRC-positive tumors, 27.6% of our tumors lacking ANR were PGRC positive. It can be argued that our assays could yield false-negative ANR results since they do not take into account the nonextractable nuclear binding sites; we are, in addition, attempting to perform more complete extraction using NaSCN. Although this possibility cannot be ruled out, other factors should be considered such as the action of hormones other than estradiol which could determine the presence of PGRC. In the chick oviduct, it has been demonstrated that the coefficient of sedimentation of the PGR is 4 to 5S in cytosol from unstimulated glands but is 6 to 7S after estrogen stimulation (45). These findings imply that 2 species of PGR may be encountered and that molecular aggregates constitute a physiologically significant occurrence depending upon estrogen stimulation. Thus, we could suggest as found in cancer cell lines that, among PGR receptors, some are estrogen independent (26) and differ from other receptors by their molecular size (44).

Other factors that could be involved in growth regulation have thus to be selected. Among them, prolactin is of particular interest because of its key position in controlling the growth of hormone-dependent mammary tumors (6, 25). Interplay between prolactin and estradiol has recently been studied in normal mammary tissue (27). In this model, prolactin dramatically enhances nuclear translocation of ERC induced by estradiol. Therefore, nuclear receptors are believed to reflect the final step of the action of all hormones involved in the promotion of tumor growth. We are now establishing clinical correlations between the presence of nuclear receptor binding sites and response to

endocrine therapy with the aim of verifying the value of these receptor measurements in predicting tumor responsiveness.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the expert technical assistance of Louis Hornez, Joelle Fournier, and Marie-Michele Delepierre, and the secretarial assistance of Yvette Vendel. They thank Dr. Pierre Formstecher and Dr. Paul A. Kelly for advice and criticism.

REFERENCES

- Barnes, D. M., Skinner, L. G., and Ribeiro, G. G. Triple hormones receptor assay a more accurate predictive tool for the treatment of advanced breast cancer. *Br. J. Cancer*, **40**: 862-865, 1979.
- Bloom, N., Tobin, E., and Degensheim, G. A. Clinical correlation of endocrine ablation with estrogen and progesterone receptors in advanced breast cancer. In: W. L. McGuire, J. P. Raynaud, and E. E. Baulieu (eds.), *Progesterone Receptors in Normal and Neoplastic Tissues*, pp. 125-139. New York: Raven Press, 1977.
- Bonnerre, J., Peyrat, J. P., Vandewalle, B., Beuscart, R., Vie, M. C., and Cappelaere, P. Prolactin receptors in human breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **18**: 1157-1162, 1982.
- Clark, J. H., Hardin, J. W., Upchurch, S., and Eriksson, H. Heterogeneity of estrogen binding sites in the cytosol of rat uterus. *J. Biol. Chem.*, **253**: 7630-7634, 1978.
- De Sombre, E. R. Breast cancer: hormone receptors prognosis and therapy. *Clin. Oncol.*, **1**: 191-215, 1982.
- De Souza, I., Morgan, L., Lewis, V. J., Raggatt, P. R., Salik, H., and Hobbs, J. R. Growth hormone dependence among human breast cancers. *Lancet*, **2**: 182-184, 1974.
- Edwards, D. P., Adams, D. J., Savage, N., and McGuire, W. L. Estrogen induced synthesis of specific proteins in human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**: 804-812, 1980.
- EORTC Breast Cooperative Group. Standards for the assessment of estrogen receptors in human breast cancer. *Eur. J. Cancer*, **9**: 379-381, 1973.
- Erdos, T., Best-Belpomme, M., and Bessada, R. A rapid assay for binding estradiol to uterine receptors. *Anal. Biochem.*, **37**: 244-252, 1970.
- Fazekas, A. G., and McFarlane, J. K. Studies on cytosol and nuclear binding of estradiol in human breast cancer. *J. Steroid. Biochem.*, **13**: 613-622, 1980.
- Garola, R. E., and McGuire, W. L. Estrogen receptor and proteolytic activity in human breast tumor nuclei. *Cancer Res.*, **37**: 3329-3332, 1977.
- Garola, R. E., and McGuire, W. L. An improved assay for nuclear estrogen receptor in experimental and human breast cancer. *Cancer Res.*, **37**: 3333-3337, 1977.
- Hähnel, R., Partridge, R. K., Gavet, L., Twaddle, E., and Ratajczak, T. Nuclear and cytoplasmic estrogen receptors and progesterone receptors in breast cancer. *Eur. J. Cancer*, **16**: 1027-1033, 1981.
- Horwitz, K. B., Costlow, M. E., and McGuire, W. L. MCF-7: a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone and glucocorticoid receptors. *Steroids*, **26**: 785-795, 1975.
- Horwitz, K. B., and McGuire, W. L. Estrogen control of progesterone receptor induction in human breast cancer: role of nuclear estrogen receptor. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **117**: 95-110, 1979.
- Jensen, E. V., Block, G. E., Smith, S., Kyser, K., and DeSombre, E. R. Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **34**: 55-70, 1971.
- Jensen, E. V., Polley, T. Z., Smith, S., Block, G. E., Ferguson, D. T., and DeSombre, E. R. Prediction of hormone dependence in human breast cancer. In: W. L. McGuire, P. P. Carbone, and E. P. Vollner (eds.), *Estrogen Receptors in Human Breast Cancer*, pp. 37-56. New York: Raven Press, 1975.
- Leavitt, W. W., Chen, T. J., and Allen, T. C. Regulation of progesterone receptor formation by estrogen action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **286**: 210-225, 1977.
- Levy, C., Mortel, R., Eychenne, B., Robel, P., and Beaulieu, E. E. Unoccupied nuclear estradiol receptor sites in normal human endometrium. *Biochem. J.*, **185**: 733-734, 1980.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275, 1951.
- McEwen, B. S., and Zigmond, R. E. Isolation of brain cell nuclei. In: N. Marks and R. Rodnight (eds.), *Research Methods in Neurochemistry*, pp. 139-161. New York: Plenum Publishing Corp., 1972.
- McGuire, W. L., Horwitz, K. B., Pearson, O. H., and Segaloff, A. Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer (Phila.)*, **39**: 2934-2947, 1977.
- McGuire, W. L., Horwitz, K. B., Zava, D. T., Garola, R. E., and Chamness, G. C. Hormones in breast cancer: update 1978. *Metab. Clin. Exp.*, **27**: 487-501, 1978.
- McGuire, W. L., Julian, J. A., and Chamness, G. C. A dissociation between ovarian dependent growth and estrogen sensitivity in mammary carcinoma. *Endocrinology*, **89**: 969-973, 1971.
- McLeod, R. M., Allen, M. S., and Hollander, V. P. Hormonal requirements for the growth of mammary adenocarcinoma (MTW-9) in rats. *Endocrinology*, **75**: 249-258, 1964.
- Mockus, M. B., Lessey, B. A., Bower, M. A., and Horwitz, K. B. Estrogen insensitive progesterone receptors in a human breast cancer cell line: characterization of receptors and of a ligand exchange assay. *Endocrinology*, **110**: 1564-1571, 1982.
- Muldoon, T. G. Interplay between estradiol and prolactin in the regulation of steroid hormone receptor levels, nature and functionality in normal mouse mammary tissue. *Endocrinology*, **109**: 1339-1346, 1981.
- O'Connell, M., McDonnell, L., and Duffy, M. J. Studies on nuclear estradiol receptors in human mammary carcinomas. *Clin. Chim. Acta*, **119**: 285-289, 1982.
- Osborne, C. K., and McGuire, W. L. The use of steroid hormone receptors in the treatment of human breast cancer: a review. *Bull. Cancer (Paris)*, **66**: 203-210, 1979.
- Panko, W. B., and McLeod, R. M. Uncharged nuclear receptors in breast cancer. *Cancer Res.*, **38**: 1948-1951, 1978.
- Panko, W. B., Watson, C. S., and Clark, J. H. Heterogeneity of estradiol binding sites in human breast cancer. *J. Steroid Biochem.*, **14**: 1311-1316, 1981.
- Peel, J. R., and Shih, Y. Estrogen inducible uterine progesterone receptors characteristics in the ovariectomized immature and adult hamster. *Acta Endocrinol.*, **80**: 344-354, 1975.
- Peyrat, J. P., Dewailly, D., Djiane, J., Kelly, P. A., Vandewalle, B., Bonnerre, J., and Lefebvre, J. Total prolactin binding sites in human breast cancer biopsies. *Breast Cancer Res. Treat.*, **1**: 369-373, 1981.
- Rosenthal, H. E. A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. *Anal. Biochem.*, **20**: 525-532, 1967.
- Sasaki, G. H., and Leung, B. S. Prolactin stimulation of estrogen receptor *in vitro* in 7-12 dimethylbenzanthracene-induced mammary tumor. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **8**: 409-412, 1974.
- Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**: 600-672, 1949.
- Shafie, S., and Brooks, S. C. Effect of prolactin in growth and the estrogen receptor level of human breast cancer cells (MCF-7). *Cancer Res.*, **37**: 792-799, 1977.
- Siegel, L. M., and Monty, K. J. Determination of molecular weights and functional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. *Biochim. Biophys. Acta*, **112**: 342-362, 1966.
- Smith, R. G., Clarke, S. G., Zalta, E., and Taylor, R. N. Two estrogen receptors in reproductive tissue. *J. Steroid Biochem.*, **10**: 31-35, 1979.
- Stojkovic, R. R., and Gamulin, S. Relationship of cytoplasmic and nuclear estrogen receptors and progesterone receptors in human breast cancer. *Cancer Res.*, **40**: 4821-4825, 1980.
- Sumida, C., and Pasqualini, J. R. Determination of cytosol and nuclear estradiol binding sites in fetal guinea pig uterus by (³H) estradiol exchanged. *Endocrinology*, **105**: 406-413, 1979.
- Syne, J. S., Markaverich, B. M., Clark, J. H., and Panko, W. B. Estrogen binding sites in the nucleus of normal and malignant human tissue: characteristics of the multiple nuclear binding sites. *Cancer Res.*, **42**: 4449-4454, 1982.
- Thorsen, T. Occupied and unoccupied nuclear estradiol receptor in human breast tumors: relation to estradiol and progesterone cytosol receptors. *J. Steroid. Biochem.*, **10**: 661-668, 1979.
- Thorsen, T. Interaction with the cytosol progesterone receptor from human mammary tumours: separate estimation of the 4s and 7s binding components with a single dextran-charcoal assay. *J. Steroid Biochem.*, **14**: 221-227, 1980.
- Toft, D. O., and O'Malley, B. W. Target tissue receptors for progesterone: the influence of estrogen treatment. *Endocrinology*, **90**: 1041-1045, 1972.
- Watson, C. S., and Clark, J. H. Heterogeneity of estrogen binding sites in mouse mammary cancer. *J. Recep. Res.*, **1**: 91-111, 1980.
- Westley, B., and Rochefort, H. Estradiol induced proteins in the MCF-7 human breast cancer cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**: 410-416, 1979.
- Yuh, K. C., and Keyes, P. L. Properties of nuclear and cytoplasm estrogen receptor in the rabbit corpus luteum: evidence for translocation. *Endocrinology*, **105**: 690-696, 1979.
- Zava, D. T., and McGuire, W. L. Estrogen receptor, unoccupied sites in nuclei of breast tumor cell line. *J. Biol. Chem.*, **252**: 3703-3708, 1977.

D - REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES

Les complexes hormone-récepteur (HR) sont présumés se fixer sur de courtes séquences de nucléotides situées près du gène qu'elles régulent, appelées régions régulatrices. De cette fixation résulte des altérations dans la chromatine.

Comme suggéré par YAMAMOTO (1976), ces altérations pourraient se propager, rendant d'autres régions plus accessibles aux facteurs de transcription ou à l'ARN polymérase elle-même. Dans tous les cas, les effets de la liaison du complexe HR pourraient être propagés sur de larges distances et effectuer des altérations dans l'organisation du promoteur. Les sites de haute affinité pour le complexe estrogène-récepteur ont été décrits sur des gènes clonés régulés par les récepteurs, en amont du site d'initiation de la transcription, entre les paires de bases -135 et -189. D'autres sites multiples ont été décrits plus en amont vers les régions -550 et -660 et auraient une affinité plus faible (RINGOLD, 1985).

Des expériences de génie génétique sur des gènes chimériques (NAVINS, 1983) ont montré que les régions régulatrices étaient spécifiques du tissu et de l'espèce mais qu'elles pouvaient fonctionner avec différents promoteurs, que l'espace entre la région régulatrice et le promoteur n'était pas obligatoirement constant et qu'enfin la région régulatrice pouvait indifféremment être située en amont ou en aval du promoteur, même à des distances de 1000 paires de bases.

Différentes hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer les mécanismes de stimulation de la transcription :

- 1° Le complexe HR pourrait annuler les effets négatifs de la région régulatrice sur le promoteur. Il serait antagoniste d'une protéine répressive ;
- 2° Le complexe HR induirait une altération de la conformation de l'ADN des régions régulatrices et pourrait selon RINGOLD (1985) initier l'action d'une protéine ayant l'effet de gyrase, d'où la formation de supertours négatifs dans l'ADN. Cette modification pourrait se propager vers le promoteur et faciliter la liaison de la polymérase.

La séquence d'ADN de la région régulatrice, encore appelée élément régulateur, est assez courte (quelques dizaines de bases) et se comporte comme un "enhancer" hormono-dépendant : sa liaison au complexe hormone-récepteur provoque une activation de la transcription. Dans d'autres cas, le résultat est au contraire une inhibition de la transcription, l'élément régulateur se comportant alors comme un "silencer" hormono-dépendant.

Cette hypothèse semble correspondre à la plupart des travaux qui corrobore le schéma suivant : liaison du complexe HR à la région régulatrice entraînant une modification de la structure de la chromatine dont les effets se propagent et provoquent l'altération de l'organisation de l'ARN polymérase II conduisant à la transcription.

Dans le noyau, l'action hormonale peut s'exercer aussi au niveau de la maturation et de la stabilité des transcrits primitifs des gènes ainsi que sur le transport de transcrits ayant subi une maturation normale au travers de la membrane nucléaire. Les mécanismes mis en cause sont ici presque inconnus.

L'action hormonale pourrait enfin s'exercer par l'intermédiaire de protéines d'apparition très précoce qui réguleraient une étape post-transcriptionnelle, se traduisant par exemple par une accélération de la lecture

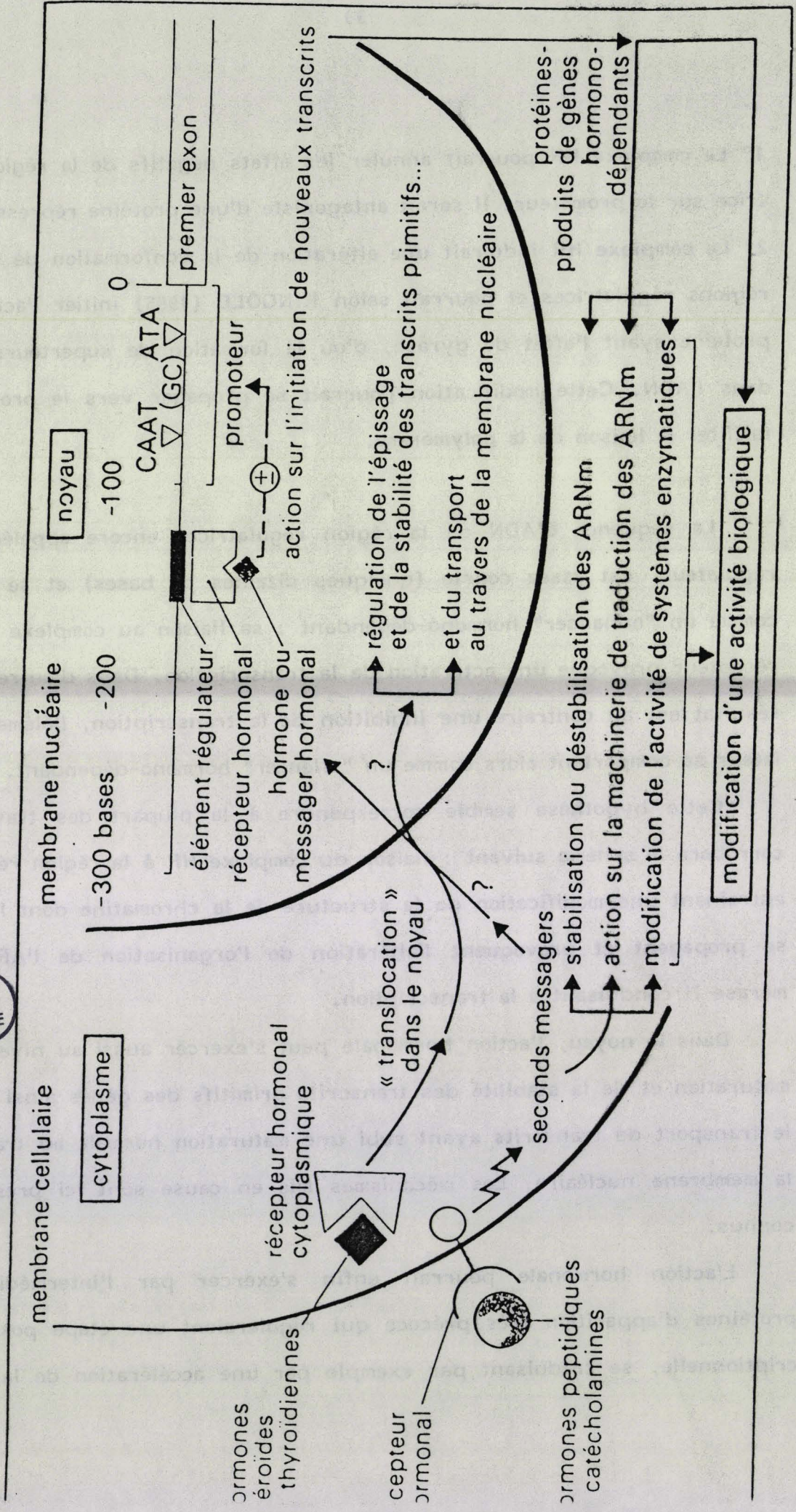


Figure 10 - Contrôle hormonal de l'expression des gènes (KAHN, 1986)

des ARNm provoquant une amplification de la réponse. L'action hormonale via un deuxième site de faible affinité, telle que nous l'avons décrite, pourrait s'effectuer par un tel mécanisme.

L'action d'une hormone sur l'expression d'un même gène fait donc habituellement intervenir de multiples niveaux de contrôle : transcriptionnels, post-transcriptionnels (maturation, transport et stabilité des ARNm), parfois traductionnels (efficacité de la traduction des ARNm) et post-traductionnels (régulation de l'activité biologique d'une protéine pré-existante) (Figure 10).

IMPLICATION DES OESTROGENES DANS LA SECRETION DE PROTEINES SPECIFIQUES

Un des aspects de l'expression génique induite par les oestrogènes est la formation de protéines spécifiques sécrétées par les cellules oestrogénosensibles qui peuvent avoir des effets directs ou indirects sur la croissance ou la différenciation cellulaire.

A - EFFET SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE

L'oestradiol stimule une quantité d'enzymes impliquées dans la synthèse d'acides nucléiques comme l'ADN polymérase, les thymidine et uridine kinases, la thymidilate synthetase, l'aspartate transcarbamylyase et la dihydrofolate reductase. Leur stimulation se situe généralement au niveau transcriptionnel (AITKEN, 1982).

S'il est admis que les oestrogènes, comme d'autres hormones à effet trophique, stimulent la croissance tumorale *in vivo*, *in vitro* la réalité de leurs effets directs sur la croissance cellulaire a été controversée par plusieurs auteurs (SHAFIE, 1980 ; SONNENSCHIN, 1980 ; BUTLER, 1981 ; BRIAND, 1984) qui ont été incapables de montrer un rôle quelconque de l'oestradiol sur la croissance de cellules en culture, contrairement aux résultats positifs obtenus par d'autres (LIPPMAN, 1976 ; ALLEGRA, 1980 ; LEUNG, 1982 ; VIGNON, 1983 ; DARBRE, 1983 ; KATZENELLENBOGEN, 1984). Cette discordance observée entre les systèmes *in vivo* et *in vitro* a amené certains auteurs à formuler l'hypothèse que les oestrogènes agiraient de façon indirecte sur la croissance cellulaire. SIRBASKU (1978) a proposé qu'une première réponse de l'action des oestrogènes serait la libération de facteurs de croissance. Ces facteurs de croissance (oestromédines), libérés

par différents organes cibles des oestrogènes comme l'utérus, les reins ou l'hypophyse, pourraient exercer une régulation de type endocrine ou paracrine sur la croissance des cellules mammaires. Les cellules du stroma pourraient aussi sécréter des facteurs paracrines influençant la croissance des cellules épithéliales voisines (Mc GRATH, 1983).

Une autre hypothèse avancée est que la croissance des cellules mammaires serait sous contrôle négatif permanent et que l'oestradiol favoriserait la prolifération cellulaire en contrôlant les taux plasmatiques ou l'action de ces facteurs inhibiteurs dans la cellule cible (SHAFIE, 1980 ; SOTO, 1987).

Dans les cellules tumorales mammaires, il semble cependant de plus en plus évident que certaines protéines sécrétées par les cellules ont des effets directs sur la cellule elle-même. Il est en effet établi que les milieux de culture collectés après plusieurs jours sont capables de stimuler une nouvelle série de cellules. Les effets observés comprennent aussi bien l'initiation de la croissance des cellules quiescentes que la stimulation de cellules qui sont déjà dans le cycle ou l'induction de la sécrétion de facteurs capables de transformer des cellules normales en cellules malignes (DICKSON, 1986a).

Les cellules MCF-7 sécrètent par exemple des facteurs de transformation, comme le TGF-alpha (Transforming Growth Factor), qui est défini par son aptitude à induire la croissance sans ancrage (anchorage-independent) des lignées non transformées comme les fibroblastes. Le TGF-alpha est augmenté par addition d'oestradiol. Des facteurs de croissance comme l'Epidermal Growth Factor (EGF) et l'Insulin-like Growth Factor (IGF-1) sont aussi stimulés par l'oestradiol et l'insuline alors qu'ils sont inhibés dans les

cellules MCF-7 par les glucocorticoïdes. Inversement le Transforming Growth Factor-bêta (TGF-bêta), inhibant la croissance des cellules MCF-7, est stimulé par les glucocorticoïdes ou les anti-oestrogènes mais inhibé par l'oestradiol et l'insuline (LIPPMAN, 1986 ; DICKSON, 1986b, 1987).

En plus d'un effet stimulant sur la sécrétion d'enzymes et de protéines impliquées dans la croissance, les oestrogènes altèrent aussi l'activité de plusieurs autres protéines dont la fonction demeure encore mal définie. L'oestradiol induit en effet dans les cellules MCF-7 la synthèse de protéines marqueurs comme l'activateur du plasminogène (BUTLER, 1979), le récepteur de la laminine (ALBINI, 1986), la protéine intracellulaire de 24 Kda (EDWARDS, 1980), ou de protéines sécrétées telles celles de 52 Kda et 160 Kda décrites par WESTLEY (1980) ou celle de 7 Kda, identifiée par JAKO-LEW (1984) par la détection de son ARMm (pS2) très spécifique du tissu mammaire. L'oestradiol diminue aussi dans les cellules MCF-7, la sécrétion d'une protéine 39 Kda (BRONZERT, 1987). L'identité et la fonction biologique de ces protéines restent à définir clairement ; l'activité protéolytique de certaines d'entre elles pourrait rendre compte des processus métastatiques induits par les oestrogènes.

Ces protéines sont distinctes des protéines du lait dont les poids moléculaires sont différents et qui ne sont pas impliquées dans les mécanismes de croissance cellulaire.

B - EFFET SUR LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE

Les cellules épithéliales du sein produisent des protéines du lait. La production de ces protéines nécessite la maintenance du matériel de synthèse. Ces protéines sont donc des marqueurs de la différenciation cellulaire

dans les cancers du sein. L'une d'elles, l'alpha-lactalbumine, a une production plus faible dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales du sein. Cependant, SCHULTZ (1977) a rapporté que 76 % des cytosols de cancer du sein contenaient l'alpha-lactalbumine souvent présente dans les tumeurs différenciées. Dans une étude ultérieure WOODS (1979) n'a détecté l'alpha-lactalbumine que dans 38 % des cytosols de cancer du sein, sa présence étant associée à celle des récepteurs de l'oestradiol et constituant un critère d'hormonosensibilité. Récemment, LE DOUSSAL (1984) a révélé, par méthode immunohistochimique, la présence d'alpha-lactalbumine dans l'épithélium de tous les cancers lobulaires et dans l'épithélium de 76 % des autres types de cancer mammaire. La fréquence de positivité était de 90 % lorsque les tumeurs possédaient des récepteurs de l'oestradiol et de la progestérone.

Une autre protéine sécrétée par le sein est la glycoprotéine décrite par JIRKA (1968). Elle est présente dans un grand nombre de sécrétions externes : lait, salive, larmes, sueur et surtout liquide de kyste du sein, d'où son nom, donné par HAAGENSEN (1977) qui l'a beaucoup étudiée : Gross Cystic Disease Fluid Protein (GCDFP-15Kda). Son rôle biologique est encore inconnu. Sa sécrétion survient lors de la différenciation métaplasique des cellules mammaires. Dans les tumeurs du sein, une analyse immunohistochimique (LE DOUSSAL, 1985) a montré que le pourcentage de tumeurs positives en GCDFP-15 était plus élevé dans les tumeurs plus différenciées de grade I que dans celles de grade III indifférenciées (grade de Scarff et Bloom qui prend en compte la différenciation cellulaire, le polymorphisme nucléaire et l'activité mitotique), et que le pourcentage de cellules positives était corrélé à la concentration en récepteurs de la progestérone.

Ces protéines pourraient être un index de l'activité de sécrétion du sein quand un climat hormonal particulièrement favorable permet aux cellules mammaires de synthétiser et sécréter des produits dans les tubules mammaires.

EFFETS OESTROGENIQUES NON MEDIÉS PAR LES RECEPTEURS

Les effets d'une hormone agissant par l'intermédiaire de son récepteur sont des effets "génomiques" dont l'activation peut être bloquée au niveau de la transcription par l'actinomycine D (VI, 1963).

L'oestradiol peut aussi induire des processus qui ne peuvent être bloqués au niveau génétique telles que la modification de la composition membranaire et la modulation du transport des protéines à travers la membrane. Les altérations se traduisent, par exemple, par l'augmentation de la captation des inhibiteurs des protéases (FINLAY, 1971) ou par des modifications de la répartition ionique, comme l'augmentation de la captation du sodium. La stimulation des prostaglandines par l'oestradiol ne résulte pas non plus d'une action sur son récepteur (CASTRACANE, 1976).

L'interaction de l'oestradiol avec la membrane cellulaire peut modifier aussi certains de ses composants spécifiques comme les récepteurs membranaires. L'oestradiol et l'oestrone (10^{-6} M) diminuent la liaison de la dopamine et de la noradrénaline aux récepteurs membranaires synaptiques du cerveau de rat (INABA, 1979). L'oestradiol peut aussi induire une diminution de l'affinité des agonistes muscariniques pour leur récepteur (SOKOLOVSKY, 1981).

Il apparaît par ailleurs, que dans certaines conditions, les stéroïdes soient nécessaires à l'expression d'autres activités hormonales, particulièrement celles dans lesquelles l'AMPc est impliquée (TCHERNITCHIN, 1977). L'administration d'AMPc exogène provoque, tout comme l'oestradiol, l'induction d'une enzyme glycolytique dans l'utérus et d'un antigène cervico-vaginal, inductions qui peuvent être bloquées par le propranolol, un antagoniste des récepteurs bêta-adrénergiques, incapable d'interférer avec les paramètres génomiques régulés par l'oestradiol.

En ce qui concerne la croissance, des liens étroits entre l'oestradiol et l'AMPc ont été décrits (GOTTESMAN, 1986). L'addition d'AMPc aux cellules en culture induit des réponses spectaculaires sur leur croissance. Des effets positifs et négatifs ont tour à tour été démontrés selon le type cellulaire envisagé, la dose d'AMPc utilisée et l'environnement cellulaire.

Dès 1971, HSIE décrit un effet négatif des analogues de l'AMPc sur la croissance des fibroblastes, d'ovaires de hamster (cellules CHO). Les travaux plus récents de plusieurs laboratoires apportent la confirmation que la plupart des fibroblastes et quelques autres types cellulaires comme les cellules lymphoïdes (S49) sont inhibés par l'AMPc. Inversement, l'AMPc favorise la croissance d'autres types cellulaires comme les mélanocytes, les cellules de Schwann (GREEN, 1978 ; EISINGER, 1982), les cellules CHO transformées par le sarcome de Rous, et une variété de cellules de mélanome humain (GOTTESMAN, 1984). Des exemples ambivalents sont même rapportés: les cellules mammaires normales en cultures organotypiques (TAYLOR, 1980) et "in situ" (SILBERSTEIN, 1984) ont leur croissance stimulée par l'AMPc, tandis que les cellules tumorales mammaires (MCF-7) sont inhibées par ce même AMPc (CHO-CHUNG, 1981) ; dans les lymphocytes et les cellules de mélanomes, la croissance est inhibée par de fortes concentrations d'AMPc (10^{-4} à 10^{-3} M) alors que des concentrations plus faibles (10^{-5} à 10^{-8} M) les stimulent. L'action de l'AMPc est ainsi loin d'être univoque.

A - AMPc ET GLANDE MAMMAIRE

L'AMPc semble jouer un rôle dans la différenciation fonctionnelle de la glande mammaire et exercerait un contrôle négatif dans l'induction de la synthèse des protéines du lait par les explants de glande mammaire de souris (PERRY, 1980).

B - AMPc ET CROISSANCE DES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES

Dans les carcinomes mammaires hormono-dépendants, l'AMPc et les oestrogènes exercent des effets antagonistes sur le mécanisme de contrôle de la croissance.

Dans les tumeurs induites par le DMBA, l'ovariectomie provoque une augmentation de l'AMPc tout comme les agents inhibant la croissance cellulaire tels que les antioestrogènes, l'oestradiol à forte dose, l'inhibition de la sécrétion de prolactine ou le dibutyryl adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (DBc AMP). L'activité de l'AMPc augmente tandis que la liaison des oestrogènes sur les récepteurs diminue (BODWIN, 1978).

La croissance des cellules MCF-7 est aussi stoppée par l'addition du DBc AMP (10^{-4} M). L'arrêt de croissance a lieu 2 jours après le début du traitement et il est précédé par une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase et une diminution de la liaison des oestrogènes (SHAFIE, 1977).

a) Interaction entre oestrogènes et AMPc

L'implication simultanée de la protéine réceptrice de l'AMPc et des récepteurs des oestrogènes dans la croissance des tumeurs mammaires hormono-dépendantes, a été décrite par CHO-CHUNG (1979).

Au cours de la croissance, un antagonisme est constaté entre ces récepteurs : hauts niveaux des récepteurs de l'oestradiol associés aux faibles niveaux des protéines réceptrices de l'AMPc. Le rapport entre ces deux paramètres a même été proposé comme meilleur indicateur de l'hormono-dépendance des tumeurs (KVINNSLAND, 1983).

L'AMPc a une protéine réceptrice qui est la sous-unité régulatrice de la protéine kinase dépendant de l'AMPc (KREBS, 1972). Pendant la régression des tumeurs mammaires induites par le DBc AMP, cette protéine récep-

trice (56 Kda) s'accumule dans le noyau (CHO-CHUNG, 1977). Dans les tumeurs qui ne répondent pas à l'AMPc, cette accumulation n'a pas lieu en raison vraisemblablement d'un défaut de la protéine.

CHO-CHUNG (1980) postule que la protéine réceptrice de l'AMPc trouvée dans les tumeurs hormono-indépendantes, a perdu la faculté d'être phosphorylée, ce qui empêche sa pénétration dans le noyau. Cependant ce modèle peut souffrir des exceptions, car dans certaines tumeurs mammaires hormono-indépendantes induites par le DMBA, le DBc AMP provoque un arrêt de croissance. Cet arrêt est lié à la phosphorylation dans le noyau d'une protéine 76 Kda appelée Regression Associated Protein (RAP) qui fait suite à la pénétration dans le noyau de la protéine 56 Kda liant l'AMPc.

b) Régulation de l'expression des gènes

Puisque la protéine liant l'AMPc pénètre dans le noyau, elle peut vraisemblablement avoir une action au niveau génétique. HUANG (1982) s'est demandé si la régression de la croissance des tumeurs hormono-dépendantes induite par l'ovariectomie ou le DBc AMP répondait aux mêmes mécanismes. Les ARN isolés de tumeurs en phase de croissance ou de régression ont été traduits dans des systèmes de synthèse de protéines, les produits formés ont été analysés sur gel de polyacrylamide. Après traitement par DBc AMP, la concentration d'une protéine 20,5 Kda augmente tandis que celles de deux autres protéines 22 Kda et 35 Kda diminuent. Si la régression est induite par ovariectomie, les mêmes profils sont obtenus. Les résultats de HUANG suggèrent que la croissance des tumeurs mammaires fait l'objet d'une régulation génomique. Il est probable que les actions antagonistes de l'AMPc et de l'oestradiol impliquent des gènes communs qui sont soit stimulés ou inhibés.

c) Relation avec l'expression des oncogènes

La protéine 22 Kda, dont l'expression est réduite dans les tumeurs en voie de régression, a été comparée à la protéine 21 Kda (p21), codée par le proto-oncogène ras (c-ras) (SHIH, 1979). A cette fin, un anticorps monoclonal anti-p21 a été utilisé (FURTH, 1982). CHO-CHUNG (1984) a montré qu'il y avait analogie entre les deux produits. Ces résultats suggèrent que l'expression accrue de l'oncogène cellulaire ras est associée à la croissance des carcinomes mammaires et que l'AMPc peut jouer un rôle dans sa répression.

Comme les gènes ras sont les membres d'une famille de gènes également trouvés dans l'espèce humaine, il est possible que les observations faites dans les tumeurs mammaires de rate puissent être extrapolées à l'espèce humaine et que cet oncogène joue un rôle dans la croissance des tumeurs du sein. Les travaux de WILLIGHAN (1980) suggèrent que la protéine ras pourrait appartenir à la famille des protéines impliquées dans les mécanismes de transduction des signaux. Dans les cellules normales, l'oncogène ras serait réprimé par les niveaux élevés d'AMPc.

C - CONCLUSION

Les mécanismes qui contrôlent la croissance de cellules tumorales mammaires sont, comme ces études le démontrent, d'une complexité extrême. Si l'on s'en tient au seul effet de l'oestradiol, bien des inconnues restent à résoudre à différentes étapes de son mécanisme d'action :

- sa liaison au récepteur : rôle des phosphorylations du (des) récepteur(s) et rôle de l'AMPc dans la régulation de la liaison ? rôle des sites spécifiques de faible affinité dans les processus de croissance cellulaire

- liaison du (des) complexe(s) oestradiol-récepteur au(x) site(s) accepteur(s) : existe-t-il sur le gène plusieurs régions régulatrices d'affinité différente pour ces complexes ? quels sont les processus précis impliqués dans le déclenchement des synthèses protéiques ?
- protéines induites : les oestrogènes peuvent exercer "in vitro" certains de leurs effets sur la croissance par la modulation de facteurs "autostimulants" comme le TGF-alpha ou de facteurs "auto-inhibants" comme le TGF-bêta. Cependant, la régulation de la croissance tumorale "in vivo" est probablement un phénomène bien plus complexe résultant de l'interaction entre facteurs produits par l'hôte et la tumeur. Les nouvelles méthodes thérapeutiques utilisant des anticorps dirigés contre les facteurs de croissance devront donc tenir compte aussi bien des facteurs autocrines que des facteurs paracrines. Actuellement la masse considérable d'études publiées sur les facteurs de croissance et le contrôle, hormonal ou non, de leur libération permet d'envisager une meilleure compréhension des mécanismes et une application thérapeutique potentielle (DICKSON, 1987b).

**CATECHOLOESTROGENES
ET
CANCERS DU SEIN**

Le métabolisme de nombreuses hormones gonadiques par les tissus cibles est souvent d'une importance capitale dans l'expression de l'action physiologique de ces hormones. Citons, à titre d'exemple, le métabolisme de la testostérone en dihydrotestostérone dans les tissus androgénodépendants, l'aromatisation de la testostérone en oestrogène et la réduction de la progestérone en 5-alpha-dihydroprogestérone. Jusqu'à présent, en ce qui concerne les oestrogènes, il n'a pas été rapporté "d'activation" métabolique, et l'on présume que leur action physiologique résulte de l'action de l'oestrogène parent, c'est-à-dire l'oestradiol-17-bêta. Cependant, les effets biologiques attribués aux oestrogènes sont si variés (modulation de la fonction utérine, du comportement sexuel, de la synthèse des gonadotrophines, de la lactation, de l'érythropoïèse, de la thermogénèse, du métabolisme des protéines et de la fonction hépatique), qu'ils ont incité plusieurs laboratoires à étudier récemment la conversion métabolique éventuelle des oestrogènes parents en métabolites physiologiquement actifs.

Nous nous sommes pour notre part intéressés à la transformation des oestrogènes dans les cancers du sein, pour tenter de répondre à la question : les métabolites des oestrogènes de type catéchol participent-ils à la différenciation et/ou à la croissance mammaire ?

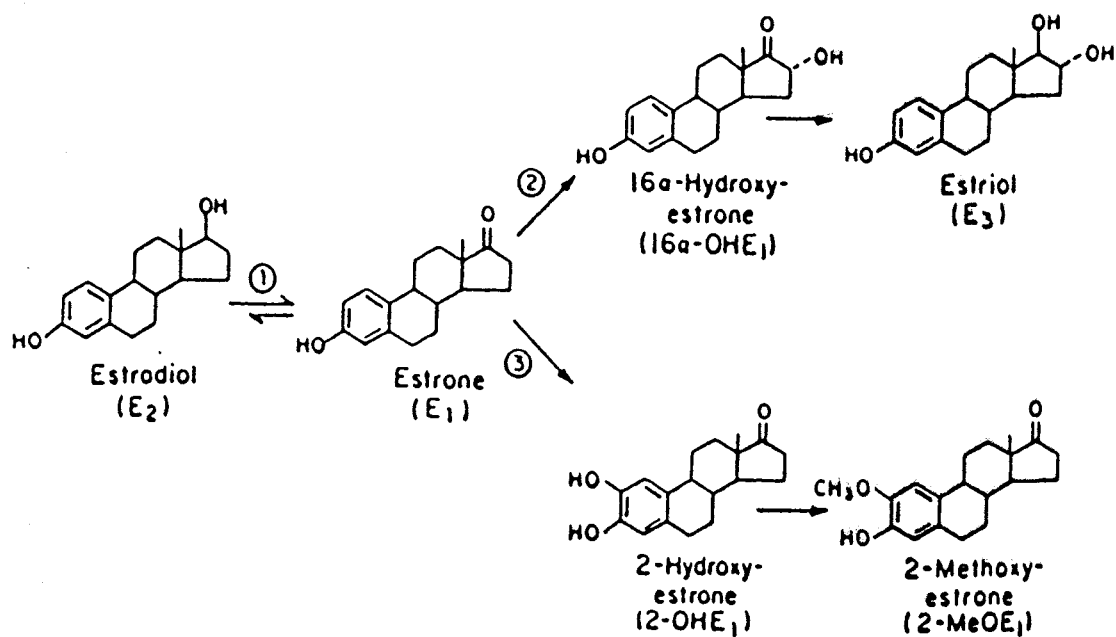


Figure 11 - Transformation oxydative de l'oestradiol chez la femme
(FISHMAN, 1960)

1 : 17-oxydation

2 : 16- α -hydroxylation

3 : 2-hydroxylation

RAPPEL DU METABOLISME

A - METABOLISME DE L'OESTRADIOL

Le métabolisme de l'oestradiol consiste toujours en une première étape oxydative conduisant à l'oestrone qui est ensuite hydroxylé (Figure 11).

a) Hydroxylation des oestrogènes

En théorie, l'hydroxylation des stéroïdes phénoliques à 18 atomes de carbone peut avoir lieu sur les carbones en position 2, 4, 6, 7, 11, 14, 15, 16 et 18. Il existe en réalité de grandes variations dans les métabolites formés d'une espèce et d'un tissu à l'autre. L'homme, le rat, la souris sont capables de former un grand nombre de ces métabolites, tandis que le hamster, le cochon d'inde en produisent très peu et que le lapin est incapable d'en former. On peut penser que certains de ces stéroïdes sont donc nécessaires à une espèce donnée et non à une autre. Dans l'espèce humaine, on note des hydroxylation en C6 dans le placenta (CEDARD, 1965) et l'ovaire (DEHENNIN, 1984), en C-2, C-17-alpha, C-15-alpha dans les glandes surrénales foetales (STARKA, 1973). Une hydroxylation mineure en C-4 a lieu dans les microsomes de quelques tissus. Les deux métabolites majeurs résultent de l'hydroxylation en C-2 et C-16-alpha. A l'exception de ces deux derniers, il existe très peu d'informations concernant la fonction biologique des dérivés hydroxylés naturels.

. Hydroxylation en C-16-alpha :

L'hydroxylation en 16-alpha a lieu principalement sur l'oestrone et suit la première étape d'oxydation de l'oestradiol. Les produits formés sont la 16hydroxyoestrone et principalement l'oestriol. Une hydroxylation directe de l'oestradiol paraît également possible mais mineure.

Bien que l'oestriol ait été le premier métabolite isolé, en 1930, on n'est pas encore sûr de sa fonction précise. L'hydroxylation en 16-alpha est principalement associée à l'activité hépatique, surtout au cours de la grossesse par le foie foetal, où elle représente une voie majeure (DIC-FALUSY, 1969). Les autres tissus impliqués, pour une faible part, par l'hydroxylation en 16-alpha, sont l'ovaire (AXELROD, 1965), la glande surrénale (KNUPPEN, 1962) et le myomètre (LISBOA, 1975).

Des travaux récents indiquent que l'oestriol, considéré généralement comme un oestrogène faible peut, dans certaines conditions de stimulation continue, agir activement dans l'utérus. Ces observations peuvent être dues au fait que la demi-vie de l'oestriol est plus courte que celle de l'oestradiol, que son affinité pour le récepteur des oestrogènes est plus faible que celle de l'oestradiol (SHYAMALA, 1969 ; SASSON, 1983) et que sa rétention nucléaire est plus courte (CLARK, 1977). Ces informations permettent de considérer l'oestriol comme un oestrogène potentiellement actif dans certaines conditions.

Dans le cancer du sein, SCHNEIDER (1982) a mis en évidence, par méthode radiométrique *in vivo*, une augmentation de 50 % de la 16-alpha-hydroxylation conduisant à une production accrue d'oestriol périphérique. La conséquence d'une telle augmentation est la prolongation de l'effet oestrogénique de l'hormone endogène, l'oestradiol. Ces résultats sont corroborés par des expériences faites chez la souris (BRADLOW, 1985) qui montrent une étroite corrélation entre l'incidence de tumeurs mammaires et la 16-alpha-hydroxylation de l'oestradiol.

. Hydroxylation en C2 :

L'hydroxylation en C2 conduit à la formation de catécholoestrogènes. Dans l'espèce humaine, elle est reconnue comme étant supérieure à toutes les autres hydroxylations (ZUMOFF, 1968 ; FISHMAN, 1969 ; BALL, 1976). La première démonstration de la formation biologique de catécholoestrogènes provient du laboratoire de Gallagher (KRAYCHY, 1957). Ses travaux l'ont conduit à isoler un métabolite encore inconnu présent en grande quantité dans l'urine : la 2-méthoxyoestrone. L'identification de son précurseur direct, la 2-hydroxyoestrone, comme étant un produit du métabolisme de l'oestradiol a ensuite été réalisée (FISHMAN, 1960).

La 2-hydroxylase est associée à la fraction microsomiale des cellules. Elle est dépendante du cytochrome P450 (PAUL, 1977a ; BALL, 1980). Elle a d'abord été localisée dans le foie (KING, 1961). On la trouve dans beaucoup de tissus tels que le cerveau (FISHMAN, 1975, 1976a), les testicules, la prostate (ACEVEDO, 1965), les glandes surrénales (STARKA, 1973), le placenta (FISHMAN, 1967), l'ovaire (DEHENNIN, 1984), ainsi que dans certains tissus pathologiques, les phéochromocytomes (ACEVEDO, 1965) et les tumeurs bénignes et malignes du sein (HOFFMAN, 1979). Aucune trace de 2-hydroxylase n'a pu être détectée dans le sein normal. La 2-hydroxylase est aussi capable de transformer les oestrogènes synthétiques tels que le diéthylstilboestrol et l'éthinyloestradiol.

b) Contrôle de l'activité des hydroxylases

La voie métabolique des oestrogènes par hydroxylation en C2 (formation de catécholoestrogènes) est supérieure à celle en C-16-alpha (formation d'oestriol) que l'on croyait prédominante il y a 20 ans (FISHMAN, 1963).

Dans l'espèce humaine, les biotransformations sont de plus compétitives et la balance entre les deux produits formés, 2-hydroxyoestrone et oestriol, est affectée par des facteurs physiologiques et pharmacologiques.

L'hormone thyroïdienne augmente la sécrétion de la 2-hydroxylase. Il en résulte une diminution parallèle de la 16-alpha-hydroxylase (FISHMAN, 1962, 1965). Une association entre hypothyroïdie et cancer du sein a d'ailleurs été signalée depuis plusieurs années (GORMAN, 1977) : la diminution de la 2-hydroxylase au cours de l'hypothyroïdie pourrait en rendre compte.

Dans l'anorexie mentale et les malnutritions, il y a une augmentation de la 2-hydroxylase (FISHMAN, 1976b). A l'opposé, on trouve une diminution très significative de la 2-hydroxylation et une augmentation inverse de la 16-hydroxylation chez les obèses (SCHNEIDER, 1983). Dans le foie, l'activité de la 2-hydroxylase est beaucoup plus forte chez l'homme que chez la femme et son activité est diminuée après orchidectomie et hypophysectomie (FISHMAN, 1980a). La 2-hydroxylation est contrôlée par les hormones stéroïdiennes (JELLINCK, 1969 ; SHIVERIK, 1983). Elle est augmentée par l'administration d'oestrogènes exogènes qui semblent activer leur propre métabolisme, la formation des catécholoestrogènes pourrait bien être régulée par la concentration en substrat (BRUGGEMEIER, 1981). La 2-hydroxylase est aussi stimulée par la fumée de cigarette (MICHNOVICZ, 1976) et un récent rapport de LESKO (1985) indique que le risque de cancer de l'endomètre est diminué de moitié chez les femmes fumant plus de 15 cigarettes par jour. La morphine inhibe l'activité de la 2-hydroxylase dont l'effet peut être restauré par un antagoniste, la naxolone. FISHMAN (1980b) a émis l'hypothèse qu'il pourrait ainsi exister une relation entre les oestrogènes et les opiacés endogènes, en particulier dans le contrôle de la sécrétion des gonadotrophines.

Tableau I - Concentration plasmatique des catécholoestrogènes

Plasma catechol estrogens^a

Estrogen	Women			Men (N = 10)
	Cycling (Follicular and luteal) (N = 9)	Pregnant (Third trimester) (N = 3)	Postmenopausal (N = 7)	
2-OHE ₁	<20	134 ± 24 ^b	<10	<10
2-MeOE ₁	28 ± 7	6,400 ± 1,000	17 ± 4	34 ± 3

^apg/ml.^bSEM.

(FISHMAN, 1976b)



En résumé, le métabolisme de l'oestradiol se distingue par l'existence de deux voies d'hydroxylation différentes dans l'espèce humaine, en 2 et en 16, qui sont en grande partie exclusives.

B - CATABOLISME DES CATECHOLOESTROGENES

A côté de la conjugaison avec les acides glucuronique et sulfurique, voie mineure, le devenir métabolique de toute substance, naturelle ou synthétique, ayant une structure catéchol est principalement la O-méthylation avec formation de 2-méthoxyoestrogènes. La réaction est catalysée par la catéchol-o-méthyltransférase (COMT), l'enzyme également responsable de la méthylation des catécholamines (BALL, 1972). In vitro, la méthylation peut avoir lieu en position 2 et 3 alors qu'in vivo, elle a principalement lieu en position 2.

La COMT est une enzyme très largement distribuée (AXELROD, 1958), présente dans le foie, le placenta, l'utérus, le testicule, les glandes surrénales, le rein, la rate, le poumon, l'intestin, l'hypophyse et le cerveau. Bien que la méthylation par COMT ne soit pas réversible, une déméthylation intense est en fait observée in vitro et in vivo sous l'influence d'une enzyme, la déméthylase (HOFFMAN, 1980). A l'inverse de la COMT, la déméthylase semble avoir une spécificité tissulaire. La 2-méthoxyoestrone, peu active biologiquement, peut ainsi servir de réservoir de 2-hydroxyoestrone potentiellement active (LONGCOPE, 1983) (Tableau I).

INTERACTION DES CATECHOLOESTROGENES AVEC LES COMPOSANTS TISSULAIRES ET PLASMATIQUES

Les catécholoestrogènes sont à la fois des stéroïdes et des catéchols, ce qui leur permet d'agir sur les voies de la biosynthèse et du métabolisme des catécholamines et de se lier aux sites de liaison cellulaire et extra-cellulaire des oestrogènes.

A - INTERACTION AVEC LES ENZYMES

Les catécholoestrogènes étant de bons substrats pour la COMT, sont des inhibiteurs compétitifs de la méthylation des catécholamines. L'inhibition du catabolisme des catécholamines est la cause d'une prolongation et d'une potentialisation de leur action physiologique (AXELROD, 1958). L'effet est particulièrement sensible sur la pression sanguine et la libération des gonadotrophines. Les 2-hydroxyoestrogènes peuvent de plus inhiber l'activité de la tyrosine hydroxylase par action sur son cofacteur, la ptérine (FOREMAN, 1980). Dans l'hypothalamus de cobaye, 2OH-E1 diminue l'activité adénylcyclasique induite par la norépinéphrine (ETCHEGOYEN, 1986).

Par leur propriété anti-oxydante, les catécholoestrogènes sont des inhibiteurs de la peroxydation des phospholipides dans les microsomes (NAKANO, 1987).

Une autre caractéristique des catécholoestrogènes est leur faculté de se complexer aux métaux de transition comme le fer, le cuivre, le manganèse. Les complexes formés sont lipophiles et pourraient constituer le groupement prosthétique des prostaglandines synthétases.

B - INTERACTION AVEC LES PROTEINES CIRCULANTES

DUNN (1981) a signalé que les dérivés hydroxylés et méthoxylés de l'oestradiol étaient très fortement liés à la TeBG (Testosterone estradiol Binding Globulin) avec une affinité parfois supérieure à celle de la testostérone. Chez le rat, une très forte liaison avec l'alpha-foetoprotéine a aussi été décrite (FISHMAN, 1978).

C - INTERACTION AVEC LES STRUCTURES SUBCELLULAIRES

Les catécholoestrogènes peuvent se lier dans le cytosol aux sites récepteurs des oestrogènes. Jusqu'à présent, aucune liaison n'a été mise en évidence chez l'homme, tandis que chez le rat et la brebis, des liaisons ont été décrites dans l'hypophyse, l'hypothalamus (DAVIES, 1975 ; KIRCHHOFF, 1981) et dans l'utérus (CLARKE, 1981 ; MARTUCCI, 1976). Les constantes de dissociation sont en général plus fortes que celles des oestrogènes dont ils dérivent (Tableau II).

Tableau II - Affinité relative de liaison (RBA) des métabolites de l'oestradiol aux récepteurs cytosoliques de l'oestradiol dans l'utérus de rat (MARTUCCI, 1976)

Composé	RBA
E2-17 bêta	100
4-OHE2	45
2-OHE2	24
E1	11
4-OHE1	11
2-OHE1	1,9
E3	10
4-Méthoxy-oestradiol	1,3
4-Hydroxy-oestradiol-3-méthyl-éther	0,6
2-Méthoxy-oestradiol	0,05
2-Méthoxyestrone	0,01

Tandis que l'hydroxylation en 4 provoque peu de changement d'affinité pour le récepteur de l'oestradiol, l'hydroxylation en 2 a pour effet de réduire sensiblement l'affinité pour ce récepteur : dans l'utérus de rate, l'affinité relative de 2OH-E1 pour le récepteur des oestrogènes est 50 fois plus faible que celle de l'oestradiol. Elle est à peu près 20 fois plus faible chez la brebis, (MARTUCCI, 1976). La méthylation des catécholoestrogènes réduit toute activité de liaison sur le récepteur des oestrogènes. Ceci est d'une importance physiologique considérable, puisque la méthylation représente la voie métabolique prépondérante des catécholoestrogènes. D'autres travaux issus de plusieurs laboratoires (ABUL-HAJJ, 1979a ; KIRCHHOFF, 1981) ont montré une liaison nucléaire des catécholoestrogènes dans l'utérus ou l'hypothalamus de rat. De plus JELLINCK (1971) a noté que ces liaisons étaient réversibles contrairement à celles existant entre les 2-hydroxyoestrogènes et les protéines du foie (MARKS, 1969). Une liaison membranaire des 2-hydroxyoestrogènes a été aussi décrite dans les cellules de l'hypophyse de rat (SHAEFFER, 1980).

EFFETS BIOLOGIQUES DES CATECHOLOESTROGENES

Bien que les premières études concernant l'action des catécholoestrogènes remontent à 30 ans, leurs effets biologiques sont encore très mal connus et font l'objet de nombreux travaux. Deux problèmes majeurs ont limité les progrès en ce domaine : la difficulté d'évaluer le rôle propre des catécholoestrogènes *in vivo* en raison de leur synthèse et de leur métabolisme rapides et celle d'obtenir des produits commerciaux purs.

Les résultats les plus probants ont été obtenus par MARTUCCI (1977) qui testait l'action utérotrophique de différents oestrogènes sur des rats immatures femelles. Les substances à tester étaient incorporées dans des implants de paraffine, en quantité suffisante pour assurer une libération de produits pendant 72 heures. Les animaux étaient sacrifiés à différents temps après implantation et le poids de l'utérus était déterminé (Tableau III).

Tableau III - Effets utérotrophiques de différents oestrogènes
(MARTUCCI, 1977)

	Heures après implantation			
	0	24	48	72
	Poids de l'utérus (mg)			
Contrôle	36	40	52	48
Oestradiol		84	126	171
Oestrone		72	128	171
Oestriol		73	137	147
2-Hydroxyoestrone		42	48	48
2-Hydroxyoestradiol		84	101	83
2-Méthoxyoestrone		39	38	38



Les résultats de cette expérience démontrèrent que 2OH-E1 n'avait aucun effet oestrogénique sur l'utérus. Depuis une quantité d'autres expériences ont été effectuées dans différents systèmes et sont résumées dans le tableau IV.



Tableau IV - Activité biologique de 2-OH E1

Type d'action	Sujet	Voie d'administration	Effet	Références
- <u>Poids de l'utérus</u>	rate	implant sous-cutané	nul (\neq E2)	Martucci, 1977, 197
- <u>Effets biochimiques dans l'utérus</u>				
. protéines induites	rate	incubation in vitro endomètre	augmentation (= E2)	Kelly, 1979 Hersey, 1982
. production des prostaglandines	rate	incubation in vitro endomètre	synthèse (\neq E2)	Hersey, 1982
- <u>Sécrétion des gonadotrophines</u>	rat	injection sous-cutanée	LH augmentée	Naftolin, 1975 Morishita, 1976
	rate	une seule injection 100 μ g	inhibition du pic pré-ovulatoire de LH quand 2OH-E1 injecté quelques heures avant	Katayama, 1983 Okatani, 1986
	femme ménopausée	perfusion	LH diminuée	Schinfeld, 1979
	femme hypogonadique	injection intra-veineuse . + éthynyl estradiol	LH, FSH augmentées transitoirement puis diminuées	Adashi, 1979
	femme hypogonadique	. - éthynyl estradiol injection intra-veineuse	nul nul	Schinfeld, 1979
- <u>Sécrétion de prolactine</u>	femme jeune	perfusion 4 heures	diminution	Fishman, 1980c
	" hyperprolactinique	perfusion 4 heures	nul	Franks, 1981
	cellules hypophysaires en culture	10^{-8} M 10^{-6} M	augmentation (= E2) diminution (\neq E2)	Shupnik, 1985
	cellules hypophysaires en culture	10^{-6} M	diminution de la production diminution de la croissance	Lamberts, 1985
	homme	perfusion, dose élevée	augmentation prolactine (= E2) augmentation LH (= E2)	Merriam, 1983

Du résumé des effets biologiques de 2OH-E1, un consensus sur le mécanisme d'action peut difficilement être établi en raison du large éventail de modèles expérimentaux et des voies d'administration choisies. A cause de son métabolisme rapide par les enzymes érythrocytaires (COMT) et de la durée variable de sa liaison aux récepteurs, une partie très réduite de la quantité de 2OH-E1 administrée atteint les tissus cibles. Les effets d'une injection intraveineuse et d'une perfusion peuvent aussi être différents. Les résultats contradictoires en ce qui concerne les effets des catécholoestrogènes par rapport à ceux des oestrogènes peuvent être dus à leur ambivalence moléculaire.

En ce qui concerne les sécrétions de gonadotrophines et de prolactine, les catécholoestrogènes ne peuvent les modifier que lorsqu'ils sont administrés à des doses équivalentes à celles retrouvées en fin de grossesse. A ces taux, 2OH-E1 peut agir comme antagoniste des oestrogènes ou modifier l'action des catécholamines, les deux composés étant impliqués dans le rétro-contrôle négatif du LHRH hypothalamique. Aux taux circulants chez l'homme et la femme non enceinte, il semble que les catécholoestrogènes soient incapables de moduler les sécrétions de gonadotrophines et de prolactine.

Il est donc plus logique d'envisager une action des catécholoestrogènes de type paracrine, là où une forte production locale "in situ" résultant de l'hydroxylation des oestrogènes parents est réalisée. Il existe en effet des tissus, comme le système nerveux central, où les taux de catécholoestrogènes sont bien supérieurs à ceux des oestrogènes (FISHMAN, 1976a ; PAUL, 1977b). Dans ces tissus, l'association d'une action cérébrale et d'une absence d'action utérotrophique peut conférer aux catécholoestrogènes un rôle sélectif dans la régulation des gonadotrophines à l'exclusion de toute activité périphérique. PAUL (1977c) a ainsi montré que, dans l'hypothalamus de rat, les catécholoestrogènes empêchaient l'accumulation d'AMPc provoquée par l'oestradiol, suggérant un rôle anti-oestrogénique endogène.

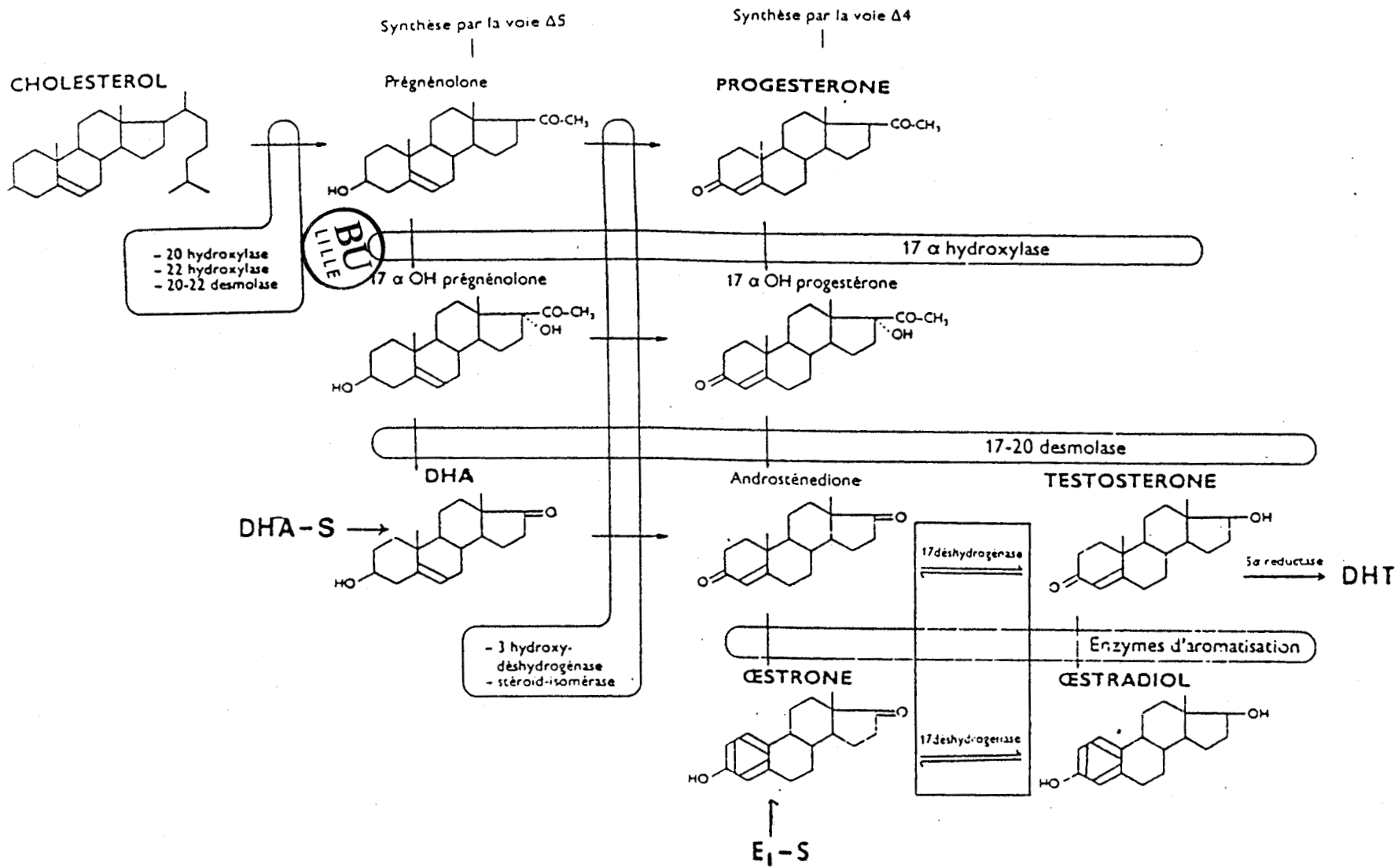


Figure 12 - Différentes voies de synthèse des oestrogènes

ETUDE DES CATECHOLOESTROGENES DANS LE CANCER DU SEIN

A - FORMATION DES CATECHOLOESTROGENES

Dans le sein cancéreux, tous les facteurs qui favorisent la formation et la dégradation des catécholoestrogènes sont réunis. Comme décrit précédemment, la voie métabolique de synthèse des CE passe par l'oxydation préalable de l'oestradiol en oestrone. Rappelons que les tumeurs du sein ont la capacité de synthétiser les oestrogènes par différentes voies (Figure 12). La synthèse peut résulter de l'aromatisation de la testostérone ou de l'androstènedione. Cette transformation est sans relation avec la présence ou l'absence de récepteurs d'oestrogènes, elle n'a pas lieu dans les tumeurs bénignes mais est très importante dans le tissu adipeux. Chez les femmes âgées, l'aromatisation favorise la formation d'oestrone par rapport à celle d'oestradiol (VARELA, 1978 ; ADAMS, 1975). Ces résultats ont été confirmés par MAC-INDOE (1979) qui montre dans les lignées cellulaires MCF-7 (hormonosensibles) et MDA-MB-231 (hormono-insensibles) une synthèse d'oestradiol à partir de testostérone ; l'oestradiol formé pouvant atteindre des concentrations de l'ordre de 10^{-9} M. Pas de synthèse n'a lieu dans les cellules HBL-100 considérées comme normales.

La synthèse de l'oestradiol peut avoir lieu d'autre part par hydrolyse des sulfates d'oestrone, les sulfatases étant présentes aussi bien dans les tumeurs bénignes que les tumeurs malignes. Le rapport des taux d'oestradiol et d'oestrone formés est dans ce cas encore plus faible chez les femmes âgées que chez les femmes jeunes (WILKING, 1980). La DHA et son sulfate

Tableau V

Estrogen 2-hydroxylase activity in normal and neoplastic breast tissue microsomes

Tissue	No. of samples	No. of samples with detectable activity	Estrogen 2-hydroxylase activity (pmol 2-methoxyestradiol formed/10 min/mg microsomal protein) in those samples with detectable activity	Range of activity (pmol 2-methoxyestradiol formed/10 min/mg microsomal protein)
Normal	12	0		
Benign tumor	22	7	1.7 ± 0.4^a	0.5-5.2
Malignant tumor	21	10	11.9 ± 5.5^b	0.5-57.7

^a Mean \pm S.E.

^b Not significantly different from the activity in benign tumors.

(HOFFMAN, 1979)

Tableau VI



Catechol-O-methyltransferase activity in normal and abnormal human breast tissues

Tissue	No. samples	COMT activity (mean \pm S.E.M.)
Normal breast	32	344 ± 83
Benign tumor	18	$570 \pm 155^*$
Carcinoma (Grade I)	13	$555 \pm 152^*$
Carcinoma (Grade II)	32	1538 ± 328
Carcinoma (Grade III)	33	1716 ± 450

COMT activity is expressed as pmole of radioactive metanephrine formed per 20 min per mg of cytosol protein.

*Not significantly different ($P < 0.02$ —Student's *t*-test) compared with normal breast.

(ASSICOT, 1977)

sont aussi des précurseurs des oestrogènes dans les tumeurs (MAYNARD, 1977). En conséquence, il résulte de ces processus une concentration accrue d'oestradiol et d'oestrone dans les tissus cancéreux par rapport au tissu normal (VAN LANDEGHEM, 1985 ; Mc NEILL, 1986). Les taux d'oestradiol formés étant plus importants dans les tumeurs contenant des récepteurs d'oestrogènes que dans celles n'en possédant pas (FISHMAN, 1977 ; ABUL-HAJJ, 1979b ; EDERY, 1981 ; THORSEN, 1982).

L'inter-conversion oestradiol-oestrone est catalysée par la 17- β -hydroxystéroïde déhydrogénase (17- β HSD). Des résultats discordants sont rapportés dans la littérature, mais la majorité des travaux montrent que l'oxydation de l'oestradiol en oestrone est plus importante dans le sein normal que dans le sein cancéreux (POLLOW, 1977 ; JAMES, 1986) et que dans cette dernière catégorie l'activité enzymatique est significativement plus élevée dans les tumeurs positives en récepteurs de l'oestradiol que dans les tumeurs négatives (PRUDHOMME, 1984 ; FOURNIER, 1985 ; VERMEULEN, 1986).

La 2-hydroxylase, responsable de la transformation des oestrogènes en catécholoestrogènes, a été détectée dans 48 % des tumeurs du sein et dans 32 % des tumeurs bénignes, les taux étant très significativement plus élevés dans les tumeurs malignes. Les tissus de sein normaux ne possèdent par contre pas de 2-hydroxylase (HOFFMAN, 1979) (Tableau V).

L'enzyme qui inactive les catécholoestrogènes, la COMT, est elle aussi présente à des taux plus élevés dans les cytosols de cancers du sein que dans ceux des tumeurs bénignes ou de sein normal (ASSICOT, 1977). Il n'existe pas de différence significative entre les taux de COMT mesurés dans le sein normal et les tumeurs bénignes. L'activité de la COMT a été

étudiée dans différents groupes de carcinomes classés selon leur grade histologique en utilisant le système de gradation de BLOOM (1957). Dans les tumeurs les plus différenciées de grade I, l'activité n'est pas significativement différente de celle mesurée dans le sein normal, tandis qu'elle est significativement plus élevée dans les tumeurs de grades II et III les plus indifférenciées (Tableau VI). Aucune relation n'a été mise en évidence entre l'activité de la COMT et la présence de récepteurs, liée, elle aussi, à la différenciation de la tumeur. L'activité de la COMT est également détectable dans la fraction microsomiale des cellules.

De ces données de la littérature, on peut conclure qu'une accumulation locale de catécholoestrogènes est possible dans les cancers du sein. Nous avons donc entrepris une étude de la fixation de 2OH-E1 dans les tumeurs du sein et dans les cellules issues de carcinome mammaire. Une partie de l'étude fait l'objet de l'article III.

B - LIAISON DES CATECHOLOESTROGENES DANS LES CANCERS DU SEIN

a) Sites de liaison cytosoliques

Nous avons montré que les tumeurs du sein fixaient 2OH-E1 d'une manière spécifique. C'est à notre connaissance, la première fois qu'une fixation de catécholoestrogènes a été mise en évidence dans un tissu humain. Il y a compétition des catécholoestrogènes avec les oestrogènes pour les sites de liaison des récepteurs cytosoliques de l'oestradiol. Dans une même série de tumeurs, nous avons constaté que l'affinité de 2OH-E1 pour les sites cytosoliques ($K_D = 0.54 \pm 0.10$ nM) n'était pas beaucoup plus faible que celle de l'oestradiol ($K_D = 0.15 \pm 0.13$).

Cependant, ce récepteur ne semble pas être le seul site de fixation des catécholoestrogènes dans le cytosol :

- . après saturation des sites récepteurs de l'oestradiol par une concentration saturante (10^{-6} M) d'oestradiol froid, il est encore possible de fixer spécifiquement la 2OH-E1 sur des sites cytosoliques (Tableaux 5 et 6, article III).
- . dans une série de 62 tumeurs du sein, nous avons estimé parallèlement la fixation de l'oestradiol, de l'oestriol et du 2OH-E1 dans les cytosols. Les résultats figurent sur le tableau VII.

Tableau VII - Corrélation entre les capacités de fixation (fmol/mg protéines) de différents stéroïdes dans le cytosol

Paramètres comparés	Nb de couples	Coefficient de Spearman	
2-OH E1 et E2	62	0,19	p>0,1
E3 et E2	62	0,77	p<0,001
2-OH E1 et E3	62	0,32	0,01<p<0,02
2-OH E1 et E2 (ménopause)	39	0,13	p>0,1
2 OH E1 et E2 (act. génitale)	23	0,33	p>0,1

La fixation de l'oestriol, oestrogène agoniste de faible activité, est parfaitement corrélée à celle de l'oestradiol, tandis qu'il n'y a pas de corrélation entre la fixation de la 2-hydroxyoestrone et celle de l'oestradiol.

Une étude de la spécificité de liaison de E2 et 2OH-E1 aux sites récepteurs cytosoliques met en évidence des différences entre les deux ligands (Tableau 3, article III) : tandis que les catécholoestrogènes (2OH-E1, 2OH-E2, 4OH-E1, 4OH-E2) sont de bons compétiteurs de la liaison de E2, les oestrogènes (E1, E2, E3, DES) semblent être par contre des compétiteurs faibles de la liaison de 2OH-E1. Ces constatations fournissent une indication supplémentaire à l'existence de sites de liaison de 2OH-E1 indépendants du récepteur de l'oestradiol.

Nous avons vérifié que cette liaison supplémentaire était sans relation avec un site enzymatique comme celui de la COMT, puisque aucune relation entre liaison de 2OH-E1 et l'activité enzymatique n'a pu être montrée (Tableau 7, article III).

La dissociation des complexes récepteurs-2OH-E1 est très rapide. Les constantes de vitesse de dissociation mesurées dans le cancer du sein $k_{-1} = 3,30 \text{ h}^{-1}$ à 4° (Figure 2, article III) sont du même ordre que celles trouvées au niveau de l'utérus de rate par BARNEA (1984).

b) Sites de liaison non cytosoliques

Après fractionnement subcellulaire, nous avons montré que 2OH-E1 se fixait sur des sites microsomaux spécifiques avec une bonne affinité ($K_D = 3,36 \pm 1,32 \text{ nM}$), et une capacité de 0 à 320 fm/mg protéines. Dans cette même fraction microsomiale, nous n'avons pas observé de sites de fixation de l'oestradiol.

2OH-E1 est aussi capable de se lier à la fraction membranaire avec cependant une affinité plus faible ($K_d = 10,6 \pm 2,8$).

ARTICLE III

CATECHOLESTROGEN BINDING SITES IN BREAST CANCER

BRIGITTE VANDEWALLE, JEAN-PHILIPPE PEYRAT, JACQUES BONNETERRE and JEAN LEFEBVRE

Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale, Centre de Lutte Contre le Cancer du Nord de la France,
Rue F. Combemale—BP 307, 59020 Lille Cédex, France

(Received 10 October 1984)

Summary—The binding of 2-hydroxyestrone (2OH E₁), a catecholestrogen which is the main end product of the 2-hydroxylation of estrogen, was investigated in breast cancers. 2OH E₁-specific bindings were found in the cytosol ($K_d = 0.54 \pm 0.10$ nM) and in the endoplasmic reticulum ($K_d = 3.36 \pm 1.32$ nM). The dissociation rate constants of complexes between [³H]2OH E₁ and cytosol or membrane binding sites were 3.30 h⁻¹ and 8.30 h⁻¹ respectively. Qualitative analysis of [³H]2OH E₁ cytosolic complexes demonstrated a specific binding component with a mol. wt of 330,000 Daltons. Specificity experiments showed that nonestrogenic hormones were unable to compete with 2OH E₁ for its binding sites, whereas triphenylethylene derivatives and catecholamines were potent 2OH E₁ competitors. The presence of 2OH E₁ specific bindings suggests a potential role of catecholestrogen in breast cancer.

INTRODUCTION

The main pathways of estradiol metabolism consist of the initial oxidation of the 17β-hydroxy group to the 17 ketone, followed by subsequent hydroxylations at either the C₂ or C₄ (catecholestrogen; CE) or 16α positions (estriol, and 16α-hydroxyestrone) [1]. The CE, and especially 2-hydroxy substituted estrogens, are now thought to be the main metabolites of endogenous estrogens [2]. The enzyme system catalyzing their synthesis is a cytochrome P450-dependent monooxygenase which is mainly localized in the microsomal fraction of the liver. This enzyme is also found in numerous estrogen-sensitive mammalian tissues [3,4], and especially in both benign and malignant mammary tumors, but not in normal breast tissue [5]. *In vivo* hydroxylation of estradiol at C₂ exceeds that at C₄ [6,7] and therefore the biological contribution of the 4-hydroxyestrogens may be quite limited. Catechol-*o*-methyltransferase (COMT), the enzyme catabolizing the CE, is also detected in breast tissues and has been found to be significantly more concentrated in the cytosol of malignant tumor cells than in the cytosol of benign tumor cells or normal tissue cells [8]. Thus, the enzymes responsible for synthesis and metabolism of CE are present in some breast tumor specimens, suggesting that in such tissues these metabolites may be formed *in vivo*. Furthermore, some synthetic estrogens, including 17α ethinyl estradiol and diethylstilbestrol, can be metabolized by these enzymes [9] so that CE levels may increase when these drugs are administered under pharmacological conditions.

In the present study, we demonstrate in human breast cancer cells the interaction between 2-hydroxyestrone and estrogen receptors of a magnitude which could be biologically relevant. Moreover, our results provide additional evidence for the

separate existence of a specific CE-binding protein, the significance of which remains to be defined.

EXPERIMENTAL

Reagents and buffers

17β-[2,4,6,7,16,17-³H]estradiol, [³H]E₂, 160 Ci/mmol; 16α-[¹²⁵I]iodoestradiol: [¹²⁵I]E₂, 1500 Ci/mmol; 2-[6,7-³H]hydroxyestrone, [³H]2OH E₁, 40–50 Ci/mmol; adenosyl-L-methionine, S[methyl-¹⁴C], 59.8 mCi/mmol were purchased from New England Nuclear (Boston, Mass.). Cortisol, dihydrotestosterone, progesterone, estradiol, estrone, 2-hydroxyestrone (2OH E₁), 4-hydroxyestrone (4OH E₁), 2 hydroxyestradiol (2OH E₂), 4 hydroxyestradiol (4OH E₂), estriol (E₃), diethylstilbestrol (DES), 16 epiestriol were from Steraloids Inc. (Pawling, N.J.). Tamoxifen 1-(4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl)-1,2-diphenylbut-1-ene (Tam) and 4 hydroxytamoxifen (4OH Tam) were kindly supplied by ICI Pharmaceuticals (Macclesfield, England). The steroids were kept in ethanolic solution except for CE which are susceptible to autooxidative decomposition and were therefore diluted in methanol-acetic acid (98:2) containing 0.78% w/v ascorbic acid, their purity was checked by isocratic high performance liquid chromatography [10]. The standard protein calibration kit was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Adrenaline and noradrenaline were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, U.S.A.).

The buffers used were buffer A: Tris-HCl 0.02 M, EDTA 3 mM, DTT 1 mM, NaN₃ 0.01%, pH 7.4; buffer B consisting of buffer A with 0.015% w/v ascorbic acid and buffer C: 0.25 M sucrose, 5 mM Tris-HCl, 0.5 mM CaCl₂, 5 mM mercaptoethanol, pH 7.4.

All sucrose solutions were made up in 5 mM Tris-HCl, pH 7.4; the sucrose concentrations in percent were based on the total weight of the final solution.

Tissue processing and cell fractionation

The mammary tumor specimens were adenocarcinomas. On collection, fat was removed and samples were divided into two pieces; one was submitted for histological studies and the other was frozen and stored in liquid nitrogen until assays were performed.

All procedures were carried out at 4°C. The frozen tissues were weighed and then pulverized with a tissue pulverizer (Spex Industries Inc., Metuchen, N.J.).

The method for cell fractionation derived from those of Aronson and Touster[11] and Takeuchi and Terayama[12]. It allowed separation of cell surface membrane fragments from either the nuclear or microsomal portion of the tissue homogenate. Three volumes of ice-cold buffer C were added to the pulverized tissue. Homogenization was carried out using a Dounce homogenizer, and the homogenate was filtered through six layered gauze.

Preparation of nuclear and cytosolic fractions and gradient separation of membranes:

After centrifugation of the filtrate at 1000 *g* for 10 min, the pellet, which consisted mainly of nuclei and cell membranes with a small portion of mitochondria contamination, was resuspended in the same initial volume of buffer C and layered over 25 ml of 0.34 M sucrose solution and centrifuged at 1000 *g* for 10 min. The nuclear fraction was again separated three times as before and the combined supernatant solutions were saved and processed as described below.

The nuclear pellet was resuspended in buffer C to which an adequate volume of 67% sucrose was added to make a final 48% sucrose solution ($d = 1.22$). Four ml of this nuclear suspension in heavy sucrose were transferred into a centrifuge tube then 4 ml of 45% sucrose ($d = 1.20$), 4 ml of 41% sucrose ($d = 1.18$) and 4 ml of 37% sucrose ($d = 1.16$) were layered over successively and centrifuged at 27,000 rpm for 2 h. The plasma membranes obtained in these respective layers were called N1, N2, N3, N4, N5.

The pooled supernatants were centrifuged at 40,000 rpm for 30 min. The resulting final supernatant fraction (cytosol) was saved, and the pellet was resuspended in buffer C plus 67% sucrose solution to achieve a final concentration of 48% sucrose. The gradient was then performed exactly as described above, in order to obtain membrane fractions called P1, P2, P3, P4, P5.

Characterization of catecholesterogen binding sites

Association studies

Samples of cytosol or membrane fractions were incubated for various periods of time at 4°C with 5 nM [³H]2OH E₁ in the presence or absence of a

200-fold excess of the equivalent nonlabeled steroid. Cortisol and DHT (2.10⁻⁶ M each) were added to the labeled solutions in order to prevent steroid bindings on sex binding protein or androgen and glucocorticoid receptors.

Binding assays

Cytoplasmic binding. E₂ binding was measured using dextran-coated charcoal (DCC) assays [13]. Increasing concentrations of [³H]E₂ (0.25 to 10 nM final concentrations) were incubated in duplicate at 4°C for 16 h with cytosol aliquots. The same incubation series with the addition of a 200-fold excess of DES were performed to assess [³H]steroid binding to estrogen specific receptor sites.

CE binding assays were performed with increasing concentrations of [³H]2OH E₁ (0.25–10 nM final concentrations) plus DHT and cortisol (2.10⁻⁶ M) in buffer B. The incubations were carried out in duplicate at 4°C for 1 h. Nonspecific binding was accounted for by preparing the same incubation series with the addition of a 200-fold excess of nonlabeled 2OH E₁. Bound hormones were obtained after adsorption of free hormones on DCC and counted in a liquid scintillation spectrometer.

Membrane binding. Membrane preparations suspended in buffer B (approx. 1 mg of protein/ml) were incubated at 4°C for 16 h under agitation. Hormone concentrations were the same as in the cytosol. The incubations were terminated by rapid filtration over Whatman GF/B filters and rinsed with 5 × 2 ml of ice-cold buffer B. The radioactivity on the filter was determined by liquid scintillation spectrometry.

The dissociation constants (K_d) and maximal capacities were calculated by Scatchard analyses of specific bound hormones [14]. The results were expressed in fmol/mg protein.

Dissociation studies

Cytosol or membrane preparations were incubated as described above. Specifically bound [³H]2OH E₁ values were determined at $t = 0$, then dissociation experiments were carried out, achieved by addition of a 200-fold excess of cold hormone in the incubate diluted with 300 μl of buffer B. Protein-bound radioactivity was measured at various intervals of time up to 30 min and compared to that at $t = 0$.

Double labeling assay

Twenty-five μl of aqueous solutions of [¹²⁵I]E₂ and [³H]2OH E₁ (both 5 nM final concentration), were pipetted into the same glass tube alone (total binding) or in the presence of a 200-fold excess DES (E₂ nonspecific binding), or in the presence of a 200-fold excess 2OH E₁ (2OH E₁ nonspecific binding). Then 100 μl of cytosol were added to the solutions. Bound hormone concentrations were determined using a double labeling program [15].

High performance liquid chromatography (HPLC) analysis

HPLC analysis was performed on size exclusion column at 4°C. 200 μ l of cytosol were incubated with 100 μ l [3 H]steroid, with or without a 200-fold excess of the unlabeled counterpart, to give a final concentration of 5 nM. Incubates were injected into a Protein Pak column 300 SW (300 \times 7.5 mm) fitted with a 22 mm pre-column (Waters SA, Paris, France) using a model U6K universal liquid chromatography injector (Waters). Proteins were eluted with buffer B containing 10 mM sodium molybdate at a rate of 1 ml per min and each fraction was collected for 30 s.

Other analytical methods

Enzyme assays: 5'Nucleotidase (plasma membrane marker) and glucose 6-phosphatase (microsome marker) activities were measured according to the method of Aronson and Touster[11]. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (cell cytoplasm marker) activity was determined as described by Cohen and Rosenmeyer[16]. COMT activity was estimated at pH 7.8 in the cytosol according to Assicot *et al.*[8] and at pH 7.0 in the membrane fractions according to Inscow *et al.*[17].

Protein concentrations were determined by the method of Lowry[18]. 3 H-Steroids were counted using a Beckman LS 6800 liquid scintillation spectrometer with 30–50% counting efficiency. All calculations were carried out using a CBM model 8096 Commodore microcomputer.

RESULTS

Cell fractionation

Gradient separation of the plasma membranes from the nuclear fraction. The plasma membrane layer appeared at the interface between 37 and 41% sucrose (N_2 , $d = 1.16$) in the form of a thin compact sheet. The materials banding at the interface between 41–45% (N_3 , $d = 1.18$) and 45–48% (N_4 , $d = 1.20$) sucrose layers were mainly mitochondria and the other cell particulates but excluding the nuclei which form a pellet (N_5) at the bottom of the centrifuge tube.

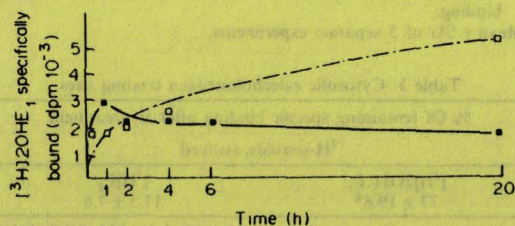


Fig. 1. Binding of 3 H-steroid to cytosol (—) and membrane (---) fractions as a function of time. Binding sites were measured at 4°C using 5 nM 3 H-steroid as described in the Experimental section. Values have been corrected for nonspecific binding.

Gradient separation of the post-nuclear extract pellet. The membrane fraction (P_2) was a thick band of white material appearing between the 37 and 41% sucrose ($d = 1.16$) which was similar to plasma membrane N_2 . The membrane fraction P_4 banding at the interface between 45 and 48% sucrose ($d = 1.20$) contains, according to enzymatic estimation, the bulk of the membranes derived from the endoplasmic reticulum.

Time course of association

The time course of association of [3 H]2OH E_1 to binding sites in breast cancer is shown in Fig. 1. In the cytosol, the 2OH E_1 binding was maximal after incubation for 1 h; then the values dropped, presumably in relation to an auto-oxidative decomposition. In the membrane fraction, the binding of 2OH E_1 reached a maximum after incubation for 6 h and the binding material was then quite stable up to 24 h. No binding of E_2 could be observed in the membrane fractions.

Saturation analyses

Table 1 shows that 2OH E_1 had affinity for cytosolic binding sites which was in the same order of magnitude as those of parent compounds. Among all the membrane fractions studied, the only ones which specifically bound this CE, were N_2 and P_2 (plasma membranes), N_5 (nuclei) and P_4 (endoplasmic reticulum). The K_d values were generally higher in the membranes than in the cytosol. It is worth noting that none of these membrane fractions, except N_5 (nuclear fraction) could bind E_2 .

Specificity of the CE binding sites

The specificity of binding was studied by investigating 2OH E_1 binding to weak or nonestrogenic target tissues such as human prostate or testis. In none of these cases could specific 2OH E_1 or E_2 binding be demonstrated either in the cytosol or in the endoplasmic reticulum. In the same way, no "specific" binding could be seen using a protein solution of human serum albumin (2 mg/ml).

In breast tissues obtained from patients with hypermastia after plastic surgery, no specific 2OH E_1 or

Table 1. Saturation analyses

Cell fractions	Dissociation constants: K_d (nM)	
	[3 H] E_2	[3 H]2OH E_1
Cytosol	0.15 \pm 0.13*	0.54 \pm 0.10
Fraction P4: endoplasmic reticulum	NB†	3.36 \pm 1.32
Fraction P2 + N2: plasma membranes	NB	10.6 \pm 2.8

Saturation analyses were performed in different fractions of breast cancer tissue using estrogen and estrogen metabolite as tracer as described in the Experimental section. Dissociation constants were expressed in nM.

*Mean \pm SD of 5 experiments.

†NB: no binding.

Table 2. Representative bindings of 2OH E₁ to 11 individual cytosol or endoplasmic reticulum fractions from breast tumor cells

Cytosol		Endoplasmic reticulum	
Total binding	Nonspecific binding	Total binding	Nonspecific binding
5479	3154 (57)	25,846	12,034 (46)
10,816	6902 (33)	7344	3741 (51)
1986	1162 (58)	15,513	12,467 (80)
2853	648 (23)	3645	2313 (63)
9649	7162 (74)	18,785	12,384 (66)
15,670	6352 (40)	11,531	7811 (68)
3782	1690 (45)	12,955	5768 (44)
4506	2396 (53)	7599	3085 (40)
3033	1742 (57)	17,990	4463 (25)
4184	2263 (54)	5213	2120 (41)
2374	1628 (68)	2651	832 (31)

The bindings of [³H]2OH E₁ were performed as described in the Experimental section. Results are expressed as dpm/tube. Values in parentheses represent the percentage of nonspecific binding versus total binding.

E₂ binding could be observed in the cytosol but a slight specific 2OH E₁ binding in the endoplasmic reticulum (5–22 fmol/mg protein *n* = 7).

In human mammary tumors, the ranges of specific binding in 52 tumors assayed were 0–285 fmol/mg protein in the cytosol and 0–320 fmol/mg protein in the endoplasmic reticulum. Representative bindings of 2OH E₁ to breast tumor fractions are specified in Table 2. The data show that the percentages of nonspecific bindings were often high and represented 49 ± 17% (mean ± SD, *n* = 52) of total bindings.

The specificity of [³H]estrogen bindings to cytosolic binding sites was determined by measuring the ability of various hormones and compounds having a dihydroxyphenolic moiety such as adrenaline and noradrenaline, to compete for binding with [³H]E₂ or [³H]2OH E₁. Table 3 shows that nonestrogenic hormones such as progesterone present in a 200-fold molar excess did not markedly inhibit the binding of

the two tritiated components. Because they were present in the buffer, DHT and cortisol had not been assayed as competitors for [³H]2OH E₁ binding. It is noteworthy that CE competed almost to the same extent as E₂ and DES for [³H]E₂ binding sites, but E₁, E₂, E₃, DES were weak competitors for [³H]2OH E₁ binding sites, and surprisingly two triphenylethylene derivatives tested (Tam and especially 4OH Tam) were efficient competitors for these sites.

In order to focus on possible CE-specific binding sites in the cytosol, binding assays were performed using 5 nM [³H]2OH E₁ after pre-incubation for 3 h at 4°C with 2.10⁻⁶ M E₂ to saturate estrogen receptor sites. The results are shown in Table 5. The CE were still able to bind to cytosolic sites after incubation

Table 3. Specificity of cytosolic estrogen and cytosolic estrogen metabolite binding sites

Competitor concentration (200-fold molar excess)	% Of inhibition of specific ³ H-steroid binding*	
	[³ H]E ₂	[³ H]2OH E ₁
E ₁	98	35.7
E ₂	100	33.3
E ₃	88.1	21.4
DES	96	27.4
2OH E ₁	94.7	100
2OH E ₂	91.8	79.5
2OH E ₃	78.7	82.1
4OH E ₁	93.4	87.4
4OH E ₂	97	85.5
Progesterone	6.2	0.47
16-epiestriol	93.2	87.4
Dihydrotestosterone	16.1	
Cortisol	5.6	
Tam	91.1	78.6
4OH Tam	93.9	87.1
Adrenaline	0.8	12.1
Noradrenaline	2.6	9.2

Competition of a 200-fold excess of unlabeled compounds for binding of 5 nM [³H] E₂ or 5 nM [³H] 2OH E₁ on cytosol binding sites. See the Experimental section for incubation conditions. Results are expressed as percentage of inhibition of specific ³H-steroid binding.

*Mean of 2 separate experiments on particularly large tumors.

Table 4. Specificity of catecholesterogen binding sites in the P4 membrane fraction (endoplasmic reticulum)

% Of inhibition of specific ³ H-steroid binding*	
Competitor concentration (200-fold molar excess)	[³ H]2OH E ₁
E ₂	0.4 ± 0.6
E ₃	13.9 ± 2.5
4OH E ₁	89.4 ± 5.7
2OH E ₁	100
Tam	37.6 ± 22.1
4OH Tam	67.9 ± 10.2
Adrenaline	38.2 ± 15.4
Noradrenaline	25.3 ± 13.2

Competition of a 200-fold excess of unlabeled compounds for binding of 5 nM [³H]2OH E₁ on membrane binding sites. See the Experimental section for incubation conditions. Results are expressed as percentage of inhibition of specific ³H-steroid binding.

*Mean ± SD of 5 separate experiments.

Table 5. Cytosolic catecholesterogen binding sites

% Of remaining specific binding after E ₂ treatment	
³ H-steroids assayed	
[³ H]2OH E ₁	[³ H]E ₂
77 ± 19.8*	11.5 ± 7.8

Cytosol was incubated at 4°C for 3 h with 2.10⁻⁶ M unlabeled E₂ before assays of specific bindings using 5 nM of appropriate ³H-steroids. See the Experimental section for incubation conditions. Results are expressed as the percentage of the remaining specific binding after E₂ treatment. *Mean ± SD of 5 separate experiments.

Table 6. Double labeling assay

	Specific binding (fmol/ml cytosol)	
	Channel I [³ H]2OH E ₁	Channel II [¹²⁵ I]E ₂
Without pre-incubation with 2.10 ⁻⁶ M E ₂	198	625
With pre-incubation with 2.10 ⁻⁶ M E ₂	91	2.2

Cytosol was incubated together with 5 nM [¹²⁵I]E₂ and 5 nM [³H]2OH E₁. Specific bindings of each steroid were determined with or without pre-incubation with 2.10⁻⁶ M E₂. Correct adjustment of the counting channels was set after determination of the energy spectra of iodine-125 and tritium. Channel I: tritium (lower limit 0, upper limit 390 U), Channel II: iodine-125 (lower limit 390, upper limit 600 U). By dynamic adjustment of the channels for each samples, the spill over of iodine-125 in the tritium channel was prevented. Moreover, owing to an automatic quench compensation the ¹²⁵I-counting efficiency remained fairly high.

with E₂, suggesting that other CE binding sites might exist. A similar type of experiment was performed adding the two tracers simultaneously, 5 nM [³H]2OH E₁ plus 5 nM [¹²⁵I]E₂, in the incubation medium after pre-incubation with 2.10⁻⁶ M E₂. Only traces of specific E₂ binding was found in contrast to specific 2OH E₁ binding which was still significant (Table 6).

Competitive effects of the main competitors on [³H]2OH E₁ binding in the endoplasmic reticulum are shown in Table 4. E₂ was unable to compete for CE binding sites in this membrane fraction, however, as in the cytosol, triphenylethylene derivative 4OH Tam was an efficient competitor for these CE binding sites.

In the two competition experiments, in the soluble as well as in the membrane fractions, compounds having dihydroxyphenolic moiety were potent inhibitors for CE binding sites, and inhibition was more significant in the membrane fraction.

To investigate the possibility of [³H]2OH E₁ binding to catechol-binding proteins such as COMT, enzymatic activities were assayed in breast tumor cytosol or endoplasmic reticulum. A significant COMT activity was demonstrated in all samples, and large variations were observed among the tumors (Table 7). Besides, [³H]2OH E₁ binding was estimated in the same samples: no specific binding was found in 21 out of the 38 (55%) cytosol and in 4 out of the 20 (20%) endoplasmic reticulum fractions assayed. Therefore, whatever the fractions studied, no correlation was noted between COMT activity and 2OH E₁ binding.

Table 7. Correlations between COMT activity and 2OH E₁ binding in breast tumor fractions

Tissue fraction	No. of tumors	COMT activity* (range)	[³ H]2OH E ₁ binding† (range)	Coefficient of correlation
Cytosol	38	8.4-107	0-138	r = 0.105, NS‡
Endoplasmic reticulum	20	11-337	0-148	r = 0.18, NS

*COMT activity is expressed as pmole of radioactive 2-methoxyestron formed per 20 min per mg protein.

†[³H]2OH E₁ binding is expressed as fmol per mg protein.

‡NS: not significant.

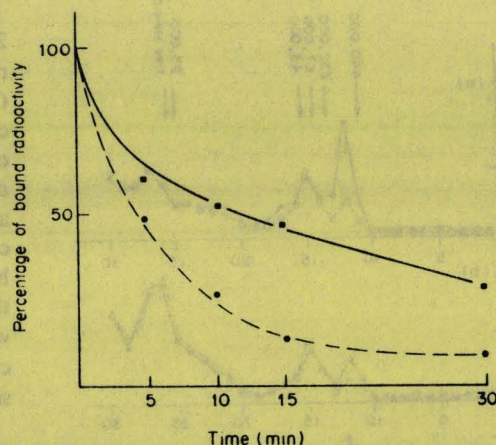


Fig. 2. Rate of dissociation of complexes between ³H (CE) and breast cancer cytosol or membrane binding sites. Cytosol and membrane were labeled by incubation with [³H]2OH E₁, at 4°C prior to dissociation experiments carried out on the diluted materials. See the Experimental section for the specific conditions. Results are expressed in term of percentage of bound radioactivity remaining at each time point. — [³H]2OH E₁ cytosol complex, --- [³H]2OH E₁ P4 membrane complex.

Dissociation studies

Figure 2 shows that in the cytosol approx 50% of bound [³H]2OH E₁ had dissociated from cytosolic sites within 10 min. In the P4 membrane fraction, the dissociation was more rapid and was nearly complete after 15 min. The dissociation rate constants were 3.30 h⁻¹ and 8.30 h⁻¹ respectively.

Qualitative analysis of cytosolic complexes

Because of the rapid dissociation of the CE complexes, the experiments were carried out within the shortest time possible i.e. 15 min. The chromatographic (HPLC) studies of CE complexes revealed one specific high-molecular weight component, eluting just after the void volume. A mol. wt around 330,000 Daltons was calculated by the method of Siegel and Monty[19], this CE complex is apparently analogous to the 8-9 S form observed with E₂ complexes using the sucrose gradient method (Fig. 3a). The preparation exhibited moreover a large peak of unbound ligand in fractions from 26 on.

When cytosol was preincubated with 2.10⁻⁶ M cold E₂ before incubation with [³H]2OH E₁, the specific

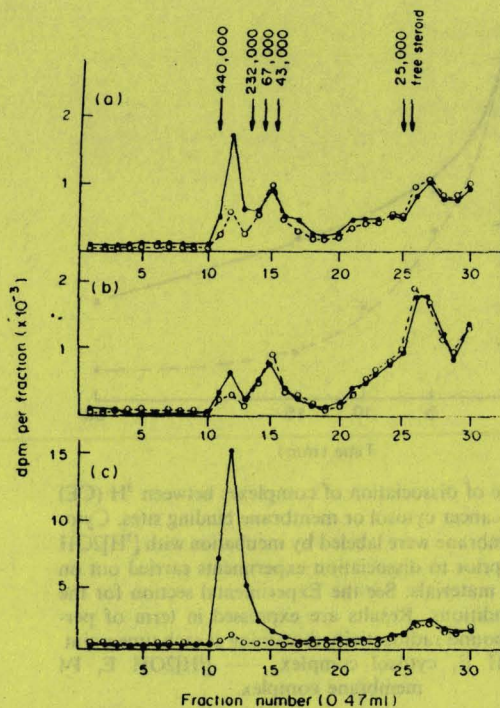


Fig. 3. HPLC analyses of cytosolic 2OH E₁ and E₂ binding components. Analyses were carried out with the same cytosol on Protein Pak 300 column using buffer B plus 10 mM sodium molybdate as eluant at a flow-rate of 1 ml/min. See the Experimental section for the specific conditions. ●—● total binding, ○—○ non specific binding. a, 2OH E₁ binding component; b, 2OH E₁ binding component after saturation with 2.10⁻⁶ M cold E₂; c, E₂ binding component.

high molecular weight component was reduced but not abolished (Fig. 3b).

E₂ complex was analysed under the same conditions. Virtually all the specific binding was exhibited by high molecular weight species (mol. wt 330,000 Daltons). Lower molecular-weight species were rarely observed perhaps due to the rapid separation afforded by HPLC (Fig. 3c).

DISCUSSION

This paper is focused on binding of 2OH E₁, the most prevalent E₂ metabolite in breast cancer. We first investigated the specificity of binding and reported no 2OH E₁ binding in nonestrogenic target tissues (prostate, testis), either in the cytosol or in the endoplasmic reticulum. In the cytosol of normal breast tissue, we were likewise unable to demonstrate any 2OH E₁ binding as well as no E₂ binding assayed as a comparison. This finding also reported by others [20, 21] may be due to the relatively high concentration of adipose cells and connective tissues as well as the comparatively low number of epithelial cells in these specimens. In the endoplasmic reticulum, however, we measured a slight 2OH E₁ binding and no E₂ binding.

In breast cancer, the present data show specific 2OH E₁ cytosolic binding sites. Their dissociation rate (3.30 h⁻¹) was very rapid as has been shown for CE binding in the uterus [22]. Their dissociation constants (0.54 ± 0.10 nM) were within the same order of magnitude of those reported in the cytosol of rat hypothalamus [24, 25]. 2OH E₁ was found to be a potent competitor for E₂ cytosolic receptors and, conversely, E₂ was a weak competitor for 2OH E₁ binding sites in comparison with CE and even with the triphenylene derivative 4 OH Tam. In the nucleus, we had previously demonstrated that CE were potent competitors especially for the second nuclear binding sites with low affinity for E₂ [23].

In the membrane fractions, we demonstrate CE binding sites which cannot be accounted for by cytosolic contamination since cytoplasmic enzymatic marker was absent in these fractions. 2OH E₁ specific binding was found in P4 membrane fraction which corresponds to the endoplasmic reticulum; the K_d values (K_d = 3.36 ± 1.32 nM) were in a similar range to that usually observed with hormone receptors and the dissociation rate was very fast (8.30 h⁻¹). Moreover, antiestrogens and catecholamines but not estrogens were competitors for these CE binding sites.

The fractions P₂ + N₂, corresponding to the plasma membranes, were not considered further in subsequent studies because of their high K_d values.

The precise biochemical mechanism by which CE exert their effects is not fully understood. Most of the experimental data suggests that CE occupy estrogen receptors of the brain [26] and the uterus [27], and are translocated to the nucleus [28].

Depending on the system studied, their biological activities have been shown to be estrogenic, nonestrogenic and even antiestrogenic. Kirchoff *et al.* have proposed [29] that the antiestrogenic properties of the 2OH estrogens were the result of a highly reduced intrinsic activity of nuclear estrogen receptors complexed with CE. The specific antiestrogenic properties of dihydroxysubstituted steroids have been studied by Schneider *et al.* [30–31]. They demonstrated that a shift of the hydroxy groups from the para position to the meta position in DES leads to a compound with antiuterotropic and mammary tumor inhibiting properties. Recently, in the human breast cancer cell line MCF-7, 2OH E₁ added to culture medium has been shown to suppress tumor cell proliferation both under control and estradiol stimulatory conditions [32].

In addition to a binding to cytosolic estradiol receptors, the present results demonstrate that CE could be found associated with binding sites that were distinct from the estrogen receptors. It can be argued that the binding may be related to some extent to the enzyme COMT which is present in breast tissue [8]. Indeed, CE are known to be good substrates for COMT with affinity constants (i.e. K_m 2OH E₁ = 20 μM) which are the tenth of that reported for catecholamines (i.e. K_m noradrenaline = 200 μM)

[33]. However, this does not rule out the possibility of other types of binding sites, e.g. the specific CE binding sites described by Schaeffer *et al.* [34] in the membranes of rat pituitary cells. In fact, the present data do not agree with a sole binding of 2OH E₁ on enzymatic sites because no correlation between COMT activity and 2OH E₁ binding was noted, in addition the measured K_d for 2OH E₁ binding are much lower than the K_m reported in the literature for CE and analogues. These findings are particularly relevant for the endoplasmic reticulum, where estradiol receptors do not account for CE binding sites.

If CE act as antiestrogens, analogies with triphenylethylene derivatives may be suggested. Many reports [35, 36, 37] have now provided evidence of subcellular distribution and ligand binding specificity of triphenylethylene derivatives different from those of the estrogen receptors. Moreover, it has been shown that breast tumoral cell lines devoid of estrogen receptors were able to bind antiestrogens [38]. In fact, although the inhibitory action of triphenylene derivatives on cancer growth has been suggested to be mediated by competition for the estrogen receptor [39], the exclusive role of the estrogen receptor in *in vitro* systems is still controversial [40, 41, 42]. Recently, an interaction of triphenylethylene derivatives with dopamine receptor binding has been described in membrane preparation from rat brain [43].

Our results demonstrate the interaction between CE and estrogen receptors in human mammary tumors and suggest that the action of CE, which is still ill-defined, could also be mediated through mechanisms other than those linked to estradiol receptors.

Acknowledgements—Supported in part by grant from "La Ligue Française Contre le Cancer". We gratefully acknowledge the help of Louis Hornez, Marie-Michèle Delepierre, Joelle Fournier for expert technical assistance and Yvette Vendel for careful manuscript preparation.

REFERENCES

1. Fishman J., Bradlow H. J. L. and Gallagher T. F.: Oxidative metabolism of estradiol. *J. biol. Chem.* **235** (1960) 3104-3107.
2. Ball P., Hoppen H. O. and Knuppen R.: Metabolism of estradiol-17- β and 2-hydroxyestradiol-17 β in rat liver slices. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **335** (1974) 1451-1462.
3. Ball P. and Knuppen R.: Catecholestrogens (2- and 4-hydroxy estrogens). Chemistry, biogenesis, metabolism, occurrences and physiological significance. *Acta endocr., Copenh.* **93**, Suppl. 232 (1980) 1-127.
4. Paul S. M., Hoffman A. R. and Axelrod J.: Catecholestrogens: synthesis and metabolism in brain and other endocrine tissues. *Front. Neuroendocr.* **6** (1980) 203-217.
5. Hoffman A. R., Paul S. M. and Axelrod J.: Catecholestrogen synthesis and metabolism by human breast tumors *in vitro*. *Cancer Res.* **39** (1979) 3584-3587.
6. Hoffman A. R., Paul S. M. and Axelrod J.: Catecholestrogen synthesis in rat tissues *in vitro*. *Endocrinology* **104** (1979) 209A.
7. Purdy R. H., Moore P. H., Williams M. C., Goldzicher J. W. and Paul S. M.: Relative rates of 2 and 4-hydroxyestrogen synthesis are dependent on both substrate and tissue. *FEBS Lett.* **138** (1982) 40-44.
8. Assicot M., Contesso G. and Bohuon C.: Catechol-*o*-methyltransferase in human breast cancer. *Eur. J. Cancer* **13** (1977) 961-966.
9. Paul S. M., Axelrod J. and Diliberto E. J.: Catecholestrogen-forming enzymes of brain: demonstration of a cytochrome P450 monooxygenase. *Endocrinology* **101** (1977) 1604-1610.
10. Aten R. F., Eisenfeld A. J., Machishy N. J. and Hochberg R. B.: Separation of steroidal estrogens and their major unconjugated metabolites by high performance liquid chromatography. *J. steroid Biochem.* **16** (1982) 447-449.
11. Aronson N. N. and Touster O.: Isolation of rat liver plasma membrane fragments in isotonic sucrose. *Meth. Enzym.* **31** (1974) 90-102.
12. Takeuchi M. and Terayama H.: Preparation and chemical composition of rat liver cell membranes. *Expl cell Res.* **40** (1965) 32-44.
13. EORTC Breast Cooperative Group Standards for the assessment of estrogen receptors in human breast cancer. *Eur. J. Cancer* **9** (1973) 379-381.
14. Scatchard G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51** (1949) 600-672.
15. Grill H. J., Manz B., Belovsky O. and Pollow K.: Criteria for the establishment of a double-labelling assay for simultaneous determination of estrogen and progesterone receptors. *Oncology* **41** (1984) 25-32.
16. Cohen P. and Rosemeyer M. A.: Human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Purification of the erythrocyte enzyme and the influence of ions on its activity. *Eur. J. Biochem.* **8** (1969) 1-7.
17. Inscoe J. K., Daly J. and Axelrod J.: Factors affecting the enzymatic formation of *o*-methylated dihydroxy derivatives. *Biochem. Pharmac.* **14** (1965) 1257-1263.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193** (1951) 265-275.
19. Siegel L. M. and Monty K. J.: Determination of molecular weights and functional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. *Biochim. biophys. Acta* **112** (1966) 342-362.
20. Wittliff J. L., Hilf R., Brochs W. F., Savlov E. D., Hall T. C. and Orlando R. A.: Specific estrogen-binding capacity of the cytoplasmic receptor in normal and neoplastic breast tissues of humans. *Cancer Res.* **32** (1971) 1983-1992.
21. Isotalo H., Tryggvason K., Vierikko P., Kauppila A. and Vikko R.: Plasminogen activators and steroid receptor concentrations in normal, benign, and malignant breast and ovarian tissues. *Anticancer Res.* **3** (1983) 331-336.
22. Barnea E. R., MacLusky N. J. and Naftolin F.: Kinetics of catechol-estrogen receptor dissociation: a possible factor underlying differences in catecholestrogen biological activity. *Steroids* **41** (1984) 643-656.
23. Vandewalle B., Peyrat J. P., Bonnetterre J., Hecquet B., Dewailly D. and Lefebvre J.: Nuclear estradiol binding sites in human breast cancer. *Cancer Res.* **43** (1983) 4497-4503.
24. Merriam G. R., MacLusky N. J., Picard M. K. and Naftolin F.: Comparative properties of the catecholestrogens. I: Methylation by catechol-*o*-methyltransferase and binding to cytosol estrogen receptors. *Steroids* **36** (1980) 1-11.
25. Davies I. J., Naftolin F., Ryan K. J., Fishman J. and Sin J.: The affinity of catecholestrogens for estrogen receptors in the pituitary and anterior hypothalamus of the rat. *Endocrinology* **97** (1979) 554-557.

26. Paul S. M. and Axelrod J.: Catecholestrogens: presence in brain and endocrine tissues. *Science* **197** (1977) 657-659.

27. Martucci C. and Fishman J.: Uterine estrogen receptor binding of catecholestrogens and of estriol. *Steroids* **27** (1976) 325-352.

28. Kirchhoff J., Hornung E., Ghraf R., Ball P. and Knuppen R.: Interactions of catecholestrogens with cytoplasmic and nuclear estrogen receptors in rat pituitary gland and hypothalamus. *J. Neurochem.* **37** (1981) 1540-1547.

29. Kirchhoff J., Hoffman B. and Ghraf R.: Estrogen receptor translocation and replenishment in rat hypothalamus and pituitary gland after the application of catecholestrogen or nonsteroidal antiestrogen. *J. steroid Biochem.* **18** (1983) 631-633.

30. Kranzfelder G., Schneider M. R., Angerer E. V. and Schönenberger H.: Entwicklung neuer antiöstrogene vom typ des 3,3'-dihydroxydiethylstilbens und ihre prüfung am DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammacarcinom der Ratte. *J. Cancer Res. clin. Oncol.* **97** (1980) 167-186.

31. Schneider M. R., Schönenberger H., Michel R. Th. and Fortmey H. P.: Synthesis and evaluation of catechol analogs of diethylstilbestrol on a hormone dependent human mammary carcinoma implanted in nude mice. *J. Cancer Res. clin. Oncol.* **104** (1982) 219-227.

32. Schneider J., Huh M. M., Bradlow L. and Fishman J.: Antiestrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells. *J. biol. Chem.* **259** (1984) 4840-4845.

33. Ball P., Knuppen R., Haupt M. and Brener H.: Interactions between estrogens and catecholamines. Studies on the methylation of catecholestrogens, catecholamines and other catechols by catechol-o-methyltransferase of human liver. *J. clin. Endocr. Metab.* **34** (1972) 736-746.

34. Shaeffer J. M., Stevens S., Smith R. G. and Hsueh A.: Binding of 2-hydroxyestradiol to rat anterior pituitary cell membranes. *J. biol. Chem.* **256** (1980) 9838-9843.

35. Katzenellenbogen B. S., Miller M. A., Eckert R. L. and Sudo K.: Antiestrogen pharmacology and mechanism of action. *J. steroid Biochem.* **19** (1983) 59-68.

36. Sudo K., Monsma F. J. and Katzenellenbogen B. S.: Antiestrogen binding sites distinct from the estrogen receptor: subcellular localisation, ligand specificity and distribution in tissues of the rat. *Endocrinology* **112** (1983) 425-434.

37. Watts C. K. W. and Sutherland R. L.: High affinity specific antiestrogen binding sites are concentrated in rough microsomal membranes of rat liver. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **120** (1984) 109-115.

38. Chouvet C. and Saez S.: High affinity cytosol binding site(s) for antiestrogen in two human breast cancer cell lines and biopsy specimens devoid of estrogen receptors. *J. steroid Biochem.* **21** (1984) 775-761.

39. Coezy E., Borgna J. L. and Rochefort H.: Tamoxifen and metabolites in MCF-7 cells: correlation between binding to estrogen receptors and inhibition of cell growth. *Cancer Res.* **42** (1982) 317-323.

40. Edwards D. P., Murphy S. R. and McGuire W. L.: Estrogen and antiestrogen effect on DNA polymerase in human breast cancer. *Cancer Res.* **40** (1980) 1722-1726.

41. Winnecker R. C. and Clark J. H.: Estrogenic stimulation of the antiestrogen specific binding site in rat uterus and liver. *Endocrinology* **112** (1983) 1910-1915.

42. Gulino A. and Pasqualini J. P.: Heterogeneity of binding sites for tamoxifen and tamoxifen derivatives in estrogen target and non target organs of guinea pig. *Cancer Res.* **42** (1982) 1913-1921.

43. Hiemke C. and Ghraf R.: Interaction of non-steroidal antiestrogens with dopamine receptor binding. *J. steroid Biochem.* **21** (1984) 663-667.

REFERENCES

1. Fehrer J., Haindl H. J. and Callaghan T. J.: Qualitative estimation of estradiol. *J. Clin. Chem.* **185** (1970) 104-105.

2. Hill R., Hoppen H. E. and Knuppen R.: Metabolism of diethylstilbestrol (DES) and 2-hydroxydiethylstilbestrol (HDES) in the liver. *J. Steroid Biochem.* **12** (1978) 147-162.

3. Hill R. and Knuppen R.: Catecholestrogens (5- and 4-hydroxy estrone), chemical, biological, pharmacological, and physiological significance. *J. Steroid Biochem.* **12** (1978) 163-172.

4. Paul S. M., Hoffman A. M. and Axelson J.: Catechol dihydroxy estrogens and metabolism in man and other mammalian species. *J. Steroid Biochem.* **4** (1966) 303-317.

5. Hoffman A. R., Paul S. M. and Axelson J.: Catecholestrogen synthesis and metabolism by human placenta. *J. Clin. Chem.* **39** (1957) 1584-1587.

6. Hoffman A. R., Paul S. M. and Axelson J.: Catecholestrogen synthesis in rat tissues. *J. Clin. Chem.* **39** (1957) 1588-1591.

7. Paul S. M., Moore F. H., Williams M. E., Callaghan T. J. W. and Paul S. M.: Relative rates of 5- and

C - CATECHOLOESTROGENES ET LIGNEES CELLULAIRES MAMMAIRES

Nous avons entrepris une étude de la caractérisation des sites de fixation des catécholoestrogènes aux microsomes de cellules cancéreuses mammaires. Afin d'uniformiser les résultats, les expériences ont été effectuées sur des cellules en culture. Chaque expérience a été faite à partir de cellules qui ont été homogénéisées et fractionnées selon le protocole décrit dans l'article III.

a) Activités enzymatiques

Nous avons vérifié que les lignées issues de carcinome mammaire possédaient les enzymes nécessaires à la formation et la dégradation des catécholoestrogènes. Le dosage de la COMT dans les microsomes a été effectué selon INSCOE (1965) au pH optimum 7. La S-adénosylméthionine marquée au carbone 14 est le donneur de méthyle et le substrat 2OH-E1. Après réaction, les dérivés méthylés formés sont extraits par l'acétate d'éthyle et comptés.

Le dosage de la 2-hydroxylase a été réalisé selon PAUL (1977a) par une réaction en deux étapes : la transformation de E1 en catécholoestrogènes est réalisée dans un premier temps en présence de NADPH par les hydroxylases endogènes, une transformation secondaire en dérivés méthylés a lieu en présence de COMT et de S-adénosylméthionine marquée. Les dérivés méthylés sont ensuite extraits et comptés de la même façon que précédemment. Les résultats figurent sur le tableau VIII.

Tableau VIII

lignée	Activité 2-hydroxylase (pmoles de méthoxyoestrone formé/20min/mg protéines)	Activité COMT
MCF-7	20	77
MDA-MB-231	32	141
BT-20	37	188
VHB-1	27	109
HBL-100	5	30

Toutes les lignées, même celles qui ne contiennent pas de récepteurs stéroïdiens comme la lignée MDA-MB-231 et la lignée BT-20, ajoutée à titre de comparaison, possèdent les enzymes capables de synthétiser et métaboliser les oestrogènes. La lignée HBL-100, considérée comme sensiblement normale, contient des taux très faibles d'enzymes.

b) Caractérisation des sites de liaison de 2OH-E1 dans les microsomes

Nous avons étudié la liaison de 2OH-E1 dans 2 lignées hormonosensibles MCF-7, VHB-1 et une lignée hormono-insensible MDA-MB-231. Toutes les trois sont capables de lier spécifiquement 2OH-E1 sur les microsomes, la capacité de fixation est cependant plus faible dans la lignée oestrogéno-insensible (Tableau IX).

Tableau IX - Capacité de fixation moyenne
de 2OH-E1 dans différentes lignées épithéliales mammaires

Lignée	fmol/mg de protéines *	Sites/cellule
MCF-7	24,7 ± 8,9	2114 ± 761
VHB-1	39,7 ± 14,3	3385 ± 1219
MDA-MB-231	14,4 ± 7,5	1243 ± 647

* moyenne ± écart type (n=10)

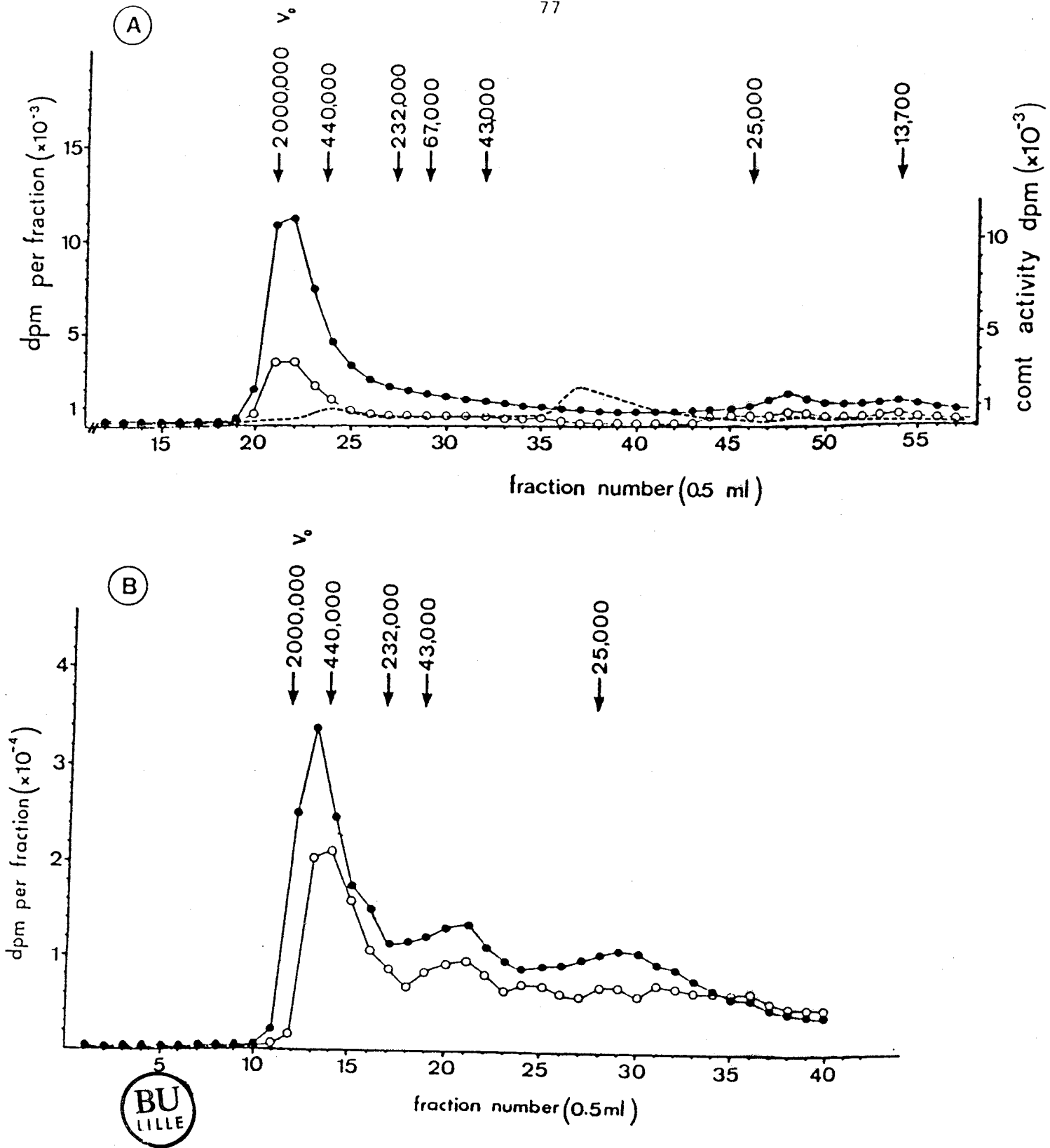


Figure 13 - Chromatographie haute performance (HPLC) du complexe 20H-E1 - protéine solubilisé

- Liaison totale ●—●
- Liaison non spécifique ○—○
- Activité COMT -----
- A : Cellules VHB-1
- B : Cellules MCF-7

La liaison spécifique de 2 OH-E1 implique la mise en jeu de systèmes protéiques puisque les traitements par des protéases (pronase ou trypsine : 400 µg/mg de protéines, 2 heures à 37°) l'abolissent à 70-75 %. Le traitement par la ribonucléase (100 µg/mg de protéines) est par contre sans effet sur cette liaison qui, contrairement aux récepteurs cytosoliques est stable à la chaleur (37° pendant 150 minutes) ; une réduction de liaison est seulement notée à la suite d'un chauffage à 50° pendant 2 heures.

Nous avons solubilisé les complexes protéine-2OH-E1 par un détergent non ionique, la digitonine, en utilisant un rapport détergent- protéine de 5:1, selon la technique décrite par GRAHAM (1982) pour la solubilisation des récepteurs alpha-adrénergiques. Les complexes solubilisés conservent leur capacité de lier 2OH-E1 d'une manière spécifique et le rendement est de l'ordre de 40-60%. La constante de dissociation apparente est de l'ordre de $8 \cdot 10^{-9}$ M.

Le complexe a été analysé par chromatographie haute performance d'exclusion de taille sur colonne Protein Pak Column 300 SW (Waters, France) et les protéines ont été éluées par un tampon (Tris-HCl 0,15 M, EDTA 3 mM, DTT 1 mM, PMSF 10^{-4} M, pH 7) contenant 0,01 % digitonine.

L'analyse chromatographique met en évidence un large pic de poids moléculaire supérieur à 440 Kda inhibé par l'addition de 2-hydroxyoestrone froid (x 200 fois) (Figure 13).

L'activité COMT a été estimée dans l'éluat de chromatographie, elle est détectable dans les fractions 35 à 40 correspondant à un poids moléculaire d'environ 30 Kda.

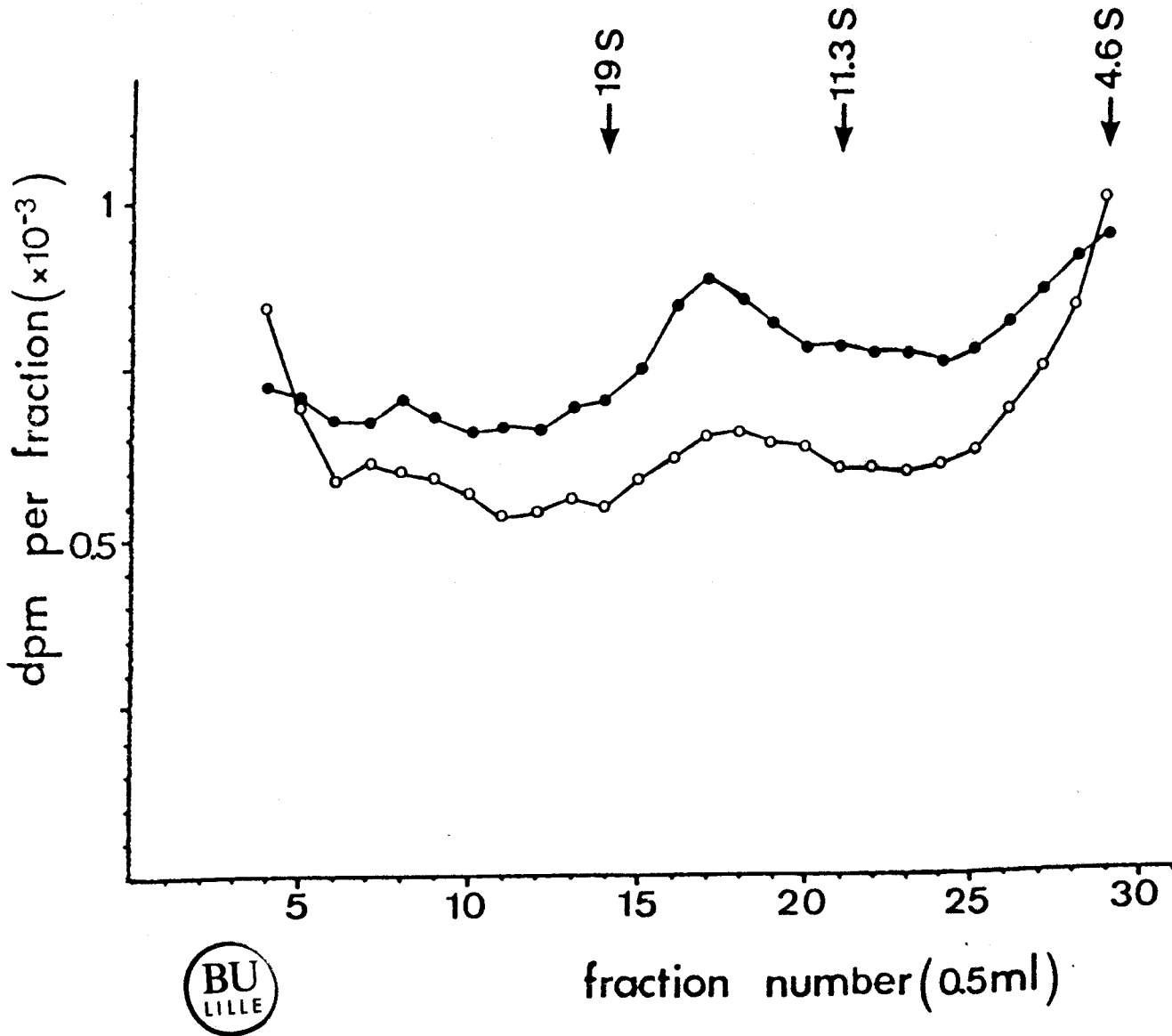


Figure 14 - Gradient de sucrose (5-15 %) du complexe 20H-E1 -
protéine solubilisé
(cellules VHB-1)

Liaison totale ●—●

Liaison non spécifique ○—○

Le complexe solubilisé a ensuite été analysé sur gradient de sucrose 5-15 % et ultracentrifugé à 27 000 tours/min pendant 24 heures, dans un rotor Beckman SW-27. L'analyse montre un pic spécifique mal défini, principalement localisé entre 11,3 S et 19 S. La solubilisation effectuée ne permet donc pas d'obtenir, en ce cas, une solution tout à fait homogène. C'est cependant celle qui a été retenue, car les essais pratiqués avec le CHAPS 0,5 % et le triton 1 %, se sont révélés négatifs : aucune liaison avec 2OH-E1 ne pouvait être observée (figure 14).

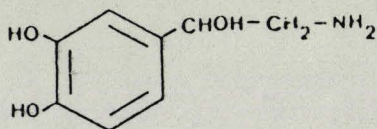
c) Spécificité de la liaison de 2OH-E1 au complexe solubilisé

En plus des oestrogènes naturels, nous avons testé différentes catégories de compétiteurs potentiels tels que les anti-oestrogènes du type triphényléthylène, les composés adrénérgiques en raison de leur parenté structurale avec les catécholoestrogènes et les antihistaminiques puisque des travaux récents montrent que les sites de liaison des anti-oestrogènes pourraient être des récepteurs "histamine like" (BRANDES, 1984, 1984b, 1985).

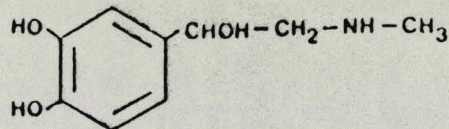
Tableau X - Spécificité des sites de liaison de 2OH-E1
sur les microsomes de cellules VHB-1

Concentration de compétiteur (excès x 200)	% d'inhibition de la ₃ liaison spécifique de ³ H (2OH-E1)
2OH-E1	100
4OH-E1	59
Oestradiol	0
Oestriol	2
Progestérone	0
4OH-tamoxifène	36,9
Tamoxifène	35
Hydroxyzine (1)	43,9
Phényltoloxamine (1)	33,6
Cimétidine (2)	0
Ranitidine (2)	0
Epinéphrine	47

4OH-E1 : 4-hydroxyestrone, (1) : H1-antagoniste, (2) : H2-antagoniste

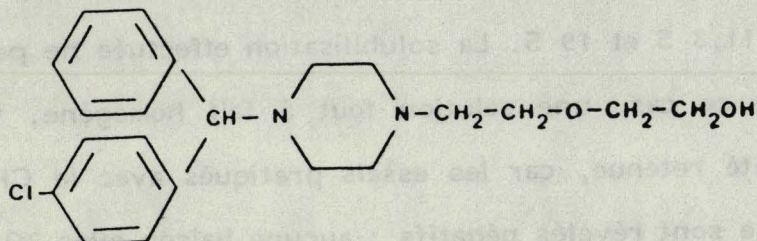


Norépinéphrine

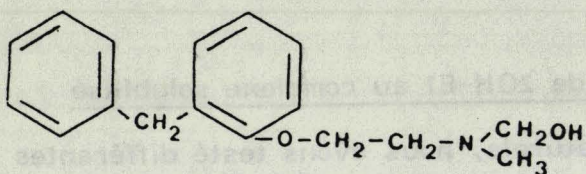


Epinéphrine

ANTI-HISTAMINIQUE H₁

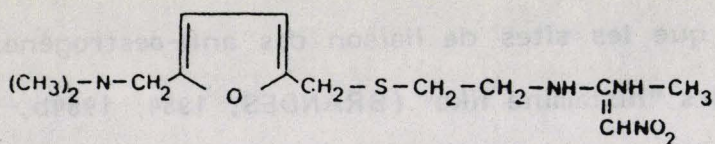


Hydroxyzine

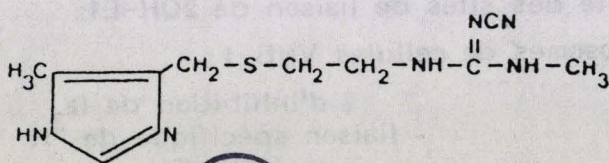


Phényltoloxamine

ANTI-HISTAMINIQUE H₂



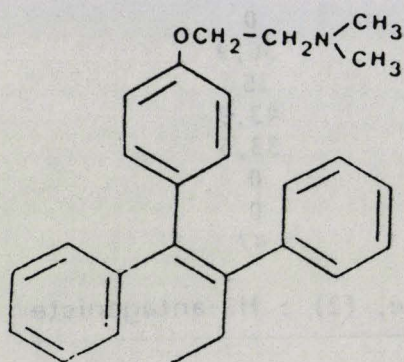
Ranitidine



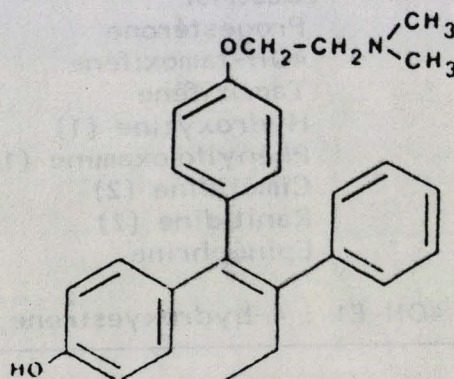
Cimétidine



ANTI-OESTROGENES



Tamoxifène



4-Hydroxytamoxifène

Les résultats montrent la spécificité de la liaison des catécholestrogènes: les oestrogènes parents n'entrent pas en compétition pour ces sites. Les composés anti-oestrogéniques de type triphényléthylène, tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène, sont des compétiteurs pour ces sites de même que les anti-histaminiques de type H1, et les composés à structure catéchol comme l'épinéphrine.

Les résultats rapportés plus haut concernent principalement la lignée VHB-1, choisie en raison de ses taux de liaison plus élevés, mais des résultats identiques ont été trouvés dans les deux autres lignées étudiées.

Les caractéristiques de fixation de 2OH-E1 et la spécificité de sa liaison montrent plusieurs points de convergence avec les composés anti-oestrogéniques. Un bref résumé des connaissances actuelles sur le mode de fixation et d'action des anti-oestrogènes est ainsi nécessaire à une meilleure interprétation des résultats.

D - COMPARAISON AVEC LES SITES DE LIAISON DES ANTI-OESTROGENES

Les anti-oestrogènes non stéroïdiens sont des produits de synthèse dérivant du triphényléthylène (Figure 15).

Il est largement démontré que les anti-oestrogènes inhibent compétitivement l'interaction des oestrogènes avec leurs récepteurs (SUTHERLAND et JORDAN, 1981 ; SUTHERLAND et MURPHY, 1982 ; KATZENELLENBOGEN, 1983 ; JORDAN, 1984). Le Tamoxifène est métabolisé "in vivo" en de nombreux dérivés. Deux métabolites, le 4-hydroxy-tamoxifène et le N-des-méthyltamoxifène, sont particulièrement importants dans son action biologique. Les différents dérivés du triphényléthylène et leurs métabolites ont une affinité variable dans la compétition pour la liaison aux sites récepteurs

de l'oestradiol. Aux doses thérapeutiques utilisées, qui correspondent à environ $2 \cdot 10^{-6}$ M, les concentrations plasmatiques et tissulaires du tamoxifène et de ses métabolites sont très élevées par rapport aux concentrations physiologiques d'oestrogènes. Elles sont largement suffisantes pour inhiber totalement l'interaction des oestrogènes avec leur récepteur, surtout pour les métabolites hydroxylés du type 4-hydroxy-tamoxifène dont l'affinité pour le récepteur des oestrogènes, sensiblement égale à celle de l'oestradiol, est environ 300 fois plus élevée que celle du tamoxifène et du N-desméthyltamoxifène. L'effet cellulaire induit par les anti-oestrogènes est très variable, depuis l'effet pseudo-oestrogénique, comme la synthèse du récepteur de la progestérone jusqu'à l'effet anti-oestrogénique pur. La généralisation est difficile car l'effet varie suivant l'organe considéré, l'espèce et le degré de maturité de l'individu.

L'activité biologique réduite des complexes récepteurs-antioestrogènes (activité agoniste faible ou nulle) s'explique par le fait que la fixation d'une anti-hormone sur le récepteur induit des modifications physico-chimiques différentes de celles constatées avec l'hormone, telles les sédimentations en 4S pour le complexe oestradiol-récepteur, et en 5,5S pour le complexe anti-hormone-récepteur (ECKERT, 1982 ; EVANS, 1982 ; KATZENELLENBOGEN, 1985). Ces modifications entraînent à leur tour, des altérations dans certains domaines de fixation avec la chromatine : les expériences de SINGH (1986) qui ont consisté à déprotéiniser la chromatine par de la guanidine de 0 à 8 M ont montré que les récepteurs liés à l'oestradiol étaient extraits par la guanidine 1 M et 6 M tandis que ceux liés à l'anti-hormone l'étaient par la guanidine 1 M et 4 M. Il pourrait donc exister sur la chromatine des régions propres à la liaison du récepteur avec l'hormone ou à l'anti-hormone et des régions communes aux deux.

De l'ensemble des travaux effectués sur les anti-oestrogènes, on peut tirer les conclusions suivantes : les anti-oestrogènes inhibent la croissance des cancers du sein en agissant directement sur les récepteurs des oestrogènes. L'addition simultanée d'oestrogènes prévient ce blocage, leur addition ultérieure permet de sauver les cellules de l'effet des anti-oestrogènes (LIPPMAN, 1986). Il existe une bonne corrélation entre activité biologique "in vitro" et affinité pour le récepteur.

D'autres travaux suggèrent cependant que certains effets des anti-oestrogènes, sur la croissance et la prolifération cellulaires, seraient plus complexes qu'une simple inhibition de liaison des oestrogènes sur leurs récepteurs (SUTHERLAND, 1981 ; FAYE, 1983).

En plus de leur liaison compétitive aux sites de l'oestradiol, le tamoxifène et les autres anti-oestrogènes à structure non stéroïdienne peuvent s'associer de façon saturable et souvent avec une forte affinité, à d'autres sites cellulaires. Ces sites sont les récepteurs muscariniques (BEN BARUCH, 1982), les récepteurs de la dopamine (HIEMKE, 1984), les récepteurs de l'histamine (BRANDES, 1983), les cytochromes P-450 (RUENITZ, 1984), la calmoduline (LAM, 1984), la protéine kinase C (O'BRIAN, 1985) et enfin un site de haute affinité dont la fonction est inconnue, appelé "Anti-Estrogen Binding Site" (AEBS) (SUTHERLAND, 1979).

Les AEBS sont peu spécifiques des tissus oestrogénosensibles puisqu'ils sont décelables dans les tissus qui ne lient pas les oestrogènes tels que le côlon, la vessie, l'oesophage, les poumons, le myomètre (KON, 1983) et les lignées cellulaires mammaires oestrogéno-insensibles comme la lignée MDA-MB 231 (MILLER, 1983 ; CHOUVET, 1984). La liaison s'effectue dans le cytosol et le noyau, mais surtout dans la fraction microsomiale des cellules (SUDO, 1983 ; WATTS, 1984b).

Ces sites sont spécifiques des dérivés du triphényléthylène, qui les lient avec une bonne affinité (K_d 1-7 nM). La liaison ne peut être déplacée par les oestrogènes. Leur coefficient de sédimentation est très hétérogène, allant de 10 à 40 S et leur poids moléculaire donnant un pic assez mal défini en gel filtration (67 à 700 Kda), culminant à 440 Kda (WATTS, 1986).

L'affinité des différents anti-oestrogènes pour les sites AEBS n'est pas parallèle à leur affinité pour les récepteurs des oestrogènes ni dans la plupart des cas à leur efficacité en tant qu'anti-oestrogènes. Le cistamoxifène, par exemple, a peu d'activité anti-oestrogénique et se lie avec autant d'affinité aux AEBS que le trans-tamoxifène (SUTHERLAND, 1984). Cependant, MURPHY (1983) a montré qu'*in vivo*, les analogues ayant une bonne affinité pour RE et une forte affinité pour les sites AEBS ont sur les cellules cancéreuses mammaires des effets antiprolifératifs plus importants que les analogues ayant la même affinité pour RE et une faible affinité pour AEBS. D'autre part, FAYE (1983) a mis en évidence que des variants des cellules MCF-7, les cellules RTx6, résistantes aux anti-oestrogènes, ont des taux d'AEBS pratiquement indétectables.

Ces sites semblent être soumis à une régulation par l'oestradiol car dans l'utérus et le foie de rate, leur concentration varie en fonction du cycle oestrien, le pic se situant le jour de l'oestrus. De plus, chez les rates ovariectomisées, le traitement par l'oestradiol double les taux d'AEBS dans le foie et l'utérus mimant ainsi le pic de l'oestrus (FAYE, 1980). Il est intéressant de noter que le traitement par le tamoxifène provoque aussi une légère augmentation transitoire des sites dans l'utérus, suggérant en ce cas une action de type oestrogénique (WINNEKER, 1983).

Dans les lignées cellulaires issues de cancer du sein, des sites AEBS microsomiaux ont été caractérisés dans toutes les cellules, qu'elles soient oestrogéno-sensibles ou insensibles (MILLER, 1983), les taux les plus faibles étant dosés dans les cellules oestrogéno-insensibles. Les antioestrogènes inhibent la croissance des cellules oestrogéno-sensibles par un mécanisme qui provoque une diminution des cellules en phase S avec accumulation parallèle de cellules en phase G₀-G₁ (OSBORNE, 1984).

La croissance des cellules oestrogéno-insensibles, bien qu'à des degrés moindres (réduction de sensibilité de 4 à 75 fois), est également inhibée par le tamoxifène. Cette inhibition résulterait en ce cas de mécanismes différents (REDDEL, 1985).

Les mécanismes par lesquels les anti-oestrogènes exercent leurs effets aux fortes concentrations (1-10 μ M) font actuellement l'objet de nombreux travaux. Les mécanismes faisant intervenir la calmoduline et la protéine-kinase C sont particulièrement prometteurs (SUTHERLAND, 1986).

E - CONCLUSION

De cette brève revue sur les anti-oestrogènes peuvent être dégagés quelques points de convergence avec le catécholoestrogène étudié :

- . modes de fixation identiques : liaison sur les récepteurs des oestrogènes avec compétition pour l'occupation de ces sites et liaison supplémentaire à d'autres types de sites que l'on détecte dans le cytosol mais surtout dans les microsomes ; ces sites de liaison sont de nature protéique.
- . distribution et spécificité différentes de celles des récepteurs de l'oestradiol : les sites microsomiaux sont notamment détectables dans les cellules oestrogéno-insensibles, l'oestradiol et les oestrogènes ne sont pas compétiteurs de la liaison de 2OH-E₁ à ces sites tandis que des molécules de structure très variées le sont.

L'existence de sites de liaison des catécholoestrogènes dans les cellules tumorales mammaires, qui contrairement aux cellules mammaires normales peuvent synthétiser les métabolites de l'oestradiol peut être intéressante dans l'optique d'un effet propre de ces substances dans les cellules tumorales mammaires.

**ACTION COMPAREE DE L'OESTRADIOL
ET DE SON METABOLITE
2-HYDROXY-OESTRONE
SUR LES CELLULES CANCEREUSES
MAMMAIRES EN CULTURE**

PROTOCOLE D'ETUDE

A - CULTURE CELLULAIRE

a) Conditions de culture

Les cellules sont cultivées dans du milieu de Earle (MEM : minimum Earle's medium). A ce milieu de base sont ajoutées des substances destinées à stimuler la croissance des cellules et à les protéger des contaminations fongiques et bactériennes, ainsi que des variations de pH.

Substances ajoutées au MEM de base	Concentration ou quantité ajoutée pour 1 litre de milieu
L-glutamine	2 mM
Insuline	5 µg/ml
Bicarbonate de sodium 7,5 %	29,2 ml
Hepes 1 M (Acide N-2-hydroxy-éthyl-pipérazine-N1-2-éthane-sulfonique)	20 ml
Pénicilline-Streptomycine	100 µg/ml
Gentamycine	50 µg/ml
Amphotéricine	1,25 µg/ml
Sérum de veau foetal ou nouveau-né (facultatif)	50 ml

Les cellules sont cultivées dans une étuve à 37°, en monocouche dans des fioles stériles. Elles sont divisées et repiquées lorsqu'elles sont à confluence, après décollement de la monocouche par une solution de Earle contenant 5 mM EDTA. Cette solution est dépourvue de calcium et magnésium afin de favoriser la dispersion cellulaire.

Contrairement à la majorité des travaux effectués jusqu'à présent, nous avons choisi un milieu de base exempt d'indicateur coloré de pH, le rouge de phénol. Cette molécule, dont la concentration dans les milieux de culture est de 10 mg/l soit 30 µM, vient d'être décrite comme ayant des effets

oestrogéniques nets telles que la stimulation de la croissance cellulaire et l'induction de la synthèse du récepteur de la progestérone (BERTHOIS, 1986), son affinité pour le récepteur étant 0,001 % de celle de l'oestradiol, correspondant à un K_D approximatif de 2.10^{-5} M.

D'autre part, le 2OH-E1, pouvant être métabolisé à 37° en dérivés méthylés inactifs par la catéchol-o-méthyltransférase (COMT), présente dans les cellules, l'addition au milieu, d'un inhibiteur compétitif de la COMT, la quinalizarine à une concentration de 10^{-6} M, pouvait être envisagée (des expériences de contrôle ayant montré que cet inhibiteur n'avait aucun effet propre sur la croissance cellulaire). Les bénéfices tirés de l'adjonction de cet inhibiteur sont cependant minimes puisqu'ils ne se manifestent qu'au premier jour de culture comme en témoigne le tableau XI. Le principe de l'addition de cet inhibiteur n'a donc pas été retenu dans nos expériences de culture.

Tableau XI - Appréciation de l'effet inhibiteur de la quinalizarine sur l'activité de la COMT

Pourcentage	J0	J1	J2	J3	J4
. Absence de quinalizarine					
2OH-E1	100	22.1	18.9	16.7	8.8
MeO-E1	0	77.9	81.1	83.3	91.2
. Présence de quinalizarine (10^{-6} M)					
2OH-E1	100	31.1	18.8	13.4	7
MeO-E1	0	68.9	81.2	86.6	93

Expérience réalisée au jour J-1 à partir de 10^5 cellules VHB-1 cultivées dans du milieu MEM, auquel a été ajouté 2OH-E1 (10^{-7} M) marqué au tritium au jour J0. Le milieu prélevé aux jours suivants a été analysé et les pourcentages de 2OH-E1 restant et de dérivés méthylés formés ont été évalués par chromatographie sur couche mince de silice dans un système de solvant chloroforme-éthanol 95/5.

b) Stimulations hormonales

La question de savoir si l'oestradiol stimule la croissance d'une lignée cellulaire oestrogéno-sensible est, comme nous l'avons décrit en première partie, très controversée. Puisque la présence d'oestrogènes est nécessaire à la croissance des cellules MCF-7 chez les souris athymiques (SOULE, 1980), et à la croissance des cellules VHB-1 chez la souris nude (article I), une absence d'effet mitogène de l'oestradiol in vitro pourrait être expliquée par les conditions de culture, notamment celles incluant le sérum de veau : un facteur inhibant la croissance ayant, en effet, été décrit dans le sérum (SOTO, 1984).

Nous avons donc envisagé l'étude des effets de l'oestradiol et de son métabolite dans différentes conditions de culture en utilisant deux types de sérum différent :

- le sérum de veau foetal traité au charbon-dextran (charbon 1 %, dextran 0,025 % une nuit à 4° en agitation) afin d'éliminer les stéroïdes présents
- le sérum de veau nouveau-né pauvre en stéroïdes.

Une troisième condition de culture en absence de sérum a été réalisée. Les milieux ont alors été supplémentés par de la transferrine (30 µg/ml) et de la fibronectine (7,5 µg/ml). Ces milieux ont été utilisés 24 heures après repiquage des cellules dans du milieu contenant du sérum de veau traité au charbon-dextran, l'étape de traitement par le sérum étant nécessaire à l'adhésion des cellules sur le plastique.

Les stimulations hormonales ont été réalisées dans ces trois milieux. Les cellules ont étéensemencées à une concentration de 10 000/cm². 24

heures après le repiquage, les milieux ont été changés et l'addition d'hormones dans les trois milieux envisagés a été réalisée. Les effets ont été estimés aux jours 1, 2, 3 et 4 après addition d'hormones.

B - PARAMETRES D'APPRECIATION DE LA CROISSANCE CELLULAIRE

a) Nombre de cellules

Toutes les expériences ont été effectuées en 6 exemplaires dans des boîtes à cupules multiples de 9,6 cm². Après décollement, la moitié des cellules d'une cupule a été comptée dans un compteur Coulter et l'autre moitié a servi au dosage des récepteurs de la transferrine.

b) Récepteurs de la transferrine

Les récepteurs de la transferrine, primitivement décrits sur les thymocytes, sont détectés sur la membrane cytoplasmique des cellules à croissance rapide. Ils sont aussi présents dans des vésicules d'endocytose, les endosomes. Le cycle cellulaire est accompagné de fluctuation du nombre de récepteurs : les taux sont faibles en phase G1 et augmentent en phase S, G2 + M. L'augmentation coïncide avec le début de la synthèse d'ADN.

Dans une population de cellules néoplasiques, l'expression des récepteurs correspond à la fraction des cellules qui se multiplient (JUDD, 1980 ; SHINDELMAN, 1981). Elle reflète l'activité proliférative d'une population cellulaire, mais ne permet pas d'identifier les cellules individuellement, en particulier celles qui sont en dehors du cycle (MUSGROVE, 1984). Selon WALKER (1986), l'expression des récepteurs de la transferrine dans les cancers du sein est corrélée à la ploïdie des cellules, les cellules diploïdes exprimant moins de récepteurs.

Il existe une régulation rapide des récepteurs de surface et des récepteurs endogènes : tout facteur favorisant la différenciation cellulaire provoque une internalisation des récepteurs de surface : comme par exemple les esters de phorbols, qui, dans les cellules leucémiques HL-60, activent la protéine kinase C, provoquant ainsi une internalisation des récepteurs de la transferrine en association avec une phosphorylation accrue des récepteurs sur un résidu sérine (MAY, 1984). A l'inverse, les facteurs de croissance comme l'IGF, le PDGF favorisent l'externalisation des récepteurs de la transferrine dans les cellules Hela (WARD, 1986).

Une régulation à plus long terme a également lieu et implique un changement du nombre total de récepteurs par cellule avec modification de leur vitesse de synthèse ou de dégradation. Cette régulation est liée aux modifications de la teneur en fer du milieu dans lequel baignent les cellules, elle est aussi corrélée à la croissance cellulaire, la phase proliférative correspondant à une augmentation des récepteurs et la phase de quiescence à leur diminution.

Dans la publication IV, nous montrons dans les cellules de cancer du sein en culture la présence de récepteurs spécifiques de la transferrine, à raison de $7,6 \times 10^5 \pm 1,7$ sites par cellule. Une corrélation entre taux de récepteurs de la transferrine et incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN y est mise en évidence. Nous avons donc effectué systématiquement dans nos essais, en plus du comptage des cellules, une mesure des taux de récepteurs de la transferrine, cette détermination apportant des renseignements complémentaires, puisqu'elle ne détecte que les cellules en phase proliférative.

C - PARAMETRES D'APPRECIATION DE LA DIFFERENCIATION FONCTIONNELLE DES CELLULES

a) Dosage des protéines sécrétées

Les protéines sécrétées que nous avons étudiées dans le milieu de culture sont l'alpha-lactalbumine et de la GCDFP-15. Ces protéines que l'on trouve en abondance dans le lait peuvent être sécrétées par les cellules tumorales mammaires si celles-ci n'ont pas perdu leurs caractéristiques de différenciation.

Nous avons mesuré les protéines sécrétées par méthode radioimmunologique après concentration des milieux de cultures. L'alpha-lactalbumine humaine a été purifiée à partir du lait par le Docteur RIBADEAU-DUMAS de l'INRA à Jouy-en-Josas et son anticorps a été établi au laboratoire (PEY-RAT, 1986). Nous avons d'autre part établi l'anticorps spécifique anti-GCDFP-15 à partir de la protéine que nous avons isolée du liquide de kyste du sein et purifiée (publication V).

b) Dosage des récepteurs de la progestérone

La mesure des récepteurs de la progestérone sur cellules entières a été réalisée selon OLEA-SERRANO (1985). Un analogue de synthèse de la progestérone, l'ORG-2058 tritié a été utilisé comme traceur. Les cellules ont été incubées pendant 30 minutes avec le traceur à des concentrations variant de 0,5 à 10 nM ; une série parallèle de cellules, auxquelles un excès de 200 fois d'hormone froide a été ajouté au traceur, a servi à l'estimation de la liaison non spécifique. La radioactivité fixée dans les cellules a été comptée après lavage des cellules et extraction par l'alcool éthylique. La capacité maximale de liaison a été déterminée par la méthode de Scatchard.

c) Dosage des récepteurs de la prolactine

Le dosage des récepteurs de la prolactine a été réalisé selon PEYRAT (1984) dans la fraction membranaire des cellules. Le traceur utilisé est l'hGH marqué à l'iode. Les dosages ont été réalisés à une seule concentration d'hormone marquée (200 000 cpm, activité spécifique d'environ 80 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). Les récepteurs libres ainsi que les récepteurs totaux (débarrassés de l'hormone endogène par MgCl_2 3M) ont été dosés. Les liaisons spécifiques ont été estimées en pourcentage de radioactivité fixée dans les membranes par rapport à la radioactivité totale utilisée.

ARTICLE IV

Transferrin Receptors in Cultured Breast Cancer Cells

B. Vandewalle, A. M. Granier, J. P. Peyrat, J. Bonnetterre, and J. Lefebvre

Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale, Centre de Lutte Contre le Cancer du Nord de la France,
Rue Frédéric Combemale, BP 307, F-59020 Lille Cedex (France)

Summary. Transferrin receptors were demonstrated on the cell membrane of breast cancer epithelial cells in primary or long-term culture. Diferric transferrin binding was saturable, specific and was not related to DNA content or clinical and histological features of the tumour. However a good correlation ($p < 0.01$) was found between transferrin binding and thymidine incorporation. These results suggest the possibility of transferrin receptor measurement as a reflection of the proliferative activity of cultured breast tumour cells.

Key words: Breast cancer cells – Proliferative activity – Transferrin receptors

Introduction

Transferrin is the major iron-carrying compound of vertebrates and several lines of evidence show that this glycoprotein stimulates growth by binding to specific proliferation-related cell surface receptors (Jandl et al. 1961; Hamilton et al. 1979; Trowbridge and Omary 1981; Sutherland et al. 1981). The uptake of ^{59}Fe by malignant tissue of haematopoietic origin has been reported to be proportional to the number of transferrin receptors (TR) (Glass et al. 1977). Moreover, receptor antibodies can affect the cell cycle growth (Trowbridge and Lopez 1982). In fact, the TR is a molecule which is preferentially expressed by actively growing cells, such as those which have undergone malignant transformation (Judd et al. 1980; Hellstrom et al. 1982). Hence, a relation between tumour proliferation rate, tumour mass and uptake of transferrin have been shown in tumour-bearing rats (Aulbert et al. 1980). High levels of TR have been described in different malignant tissues (Faulk et al. 1980; Shindelman et al. 1981; Gatter et al. 1983) and in many in vitro human cell lines (Galbraith et al. 1980), particularly those of

haematopoietic origin (Larrick and Creswell 1979; Judd et al. 1980), but nothing to our knowledge has been devoted to TR demonstration in cultured breast cancer cells. This work was undertaken in order to demonstrate a possible relation between TR number and tumour differentiation or mitotic rate in breast cancer cells in culture.

Materials and Methods

Tissue Culture. Fresh samples of malignant human mammary tissues were obtained from surgical specimens. At the time of collection, fat was removed and the samples were divided into two pieces: one was subjected to histological studies and the second was placed in ice-cold Eagle's minimal essential medium (MEM, Seromed, Biochrom KG, Berlin-West) supplemented with penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and amphotericin B 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Clinical features of the tumour such as size and axillary metastasis as well as histological parameters, histoprognotic grading of Scarff and Torloni (1968), and Bloom and Richardson (1957), cellular density and cell differentiation were determined. Primary cultures of breast epithelial cells (Fig. 1) cleared of fibroblasts by a sedimentation fractionation procedure were performed according to Hiratsuka et al. (1982) with the following minor modifications: the medium used was MEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco Bio-Cult Ltd, Paisley, Scotland) + 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin + 100 units/ml penicillin. Cultures were sustained in 50 ml polystyrene tissue culture flasks (Corning Avon, France) at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2 , with a medium change after 3 days. The cells were grown for up to 7 days and, after two washes with Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free Earle's balanced salt solution, cells were removed from monolayers by incubation in Earle's solution containing 5 mM EDTA. MCF7 cells, derived from a metastatic human breast cancer, were maintained in monolayer culture in RPMI medium supplemented with 10% FCS + 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin + 100 units/ml penicillin, and then harvested using the same procedure. Living cultures were observed and photographed using a Leitz diavert inverted microscope equipped with a Leitz vario-orthomat photographic system.

Immunofluorescence. TR were detected by indirect immunofluorescence using two different procedures, the first one needed anti-human transferrin antibody (Pasteur, Paris, France), and the second one, a mouse monoclonal antibody against the human transferrin receptor (OKT 9 antibodies, Ortho pharmaceutical, Raritan NJ, USA). In the first procedure, the washed cells were incubated at

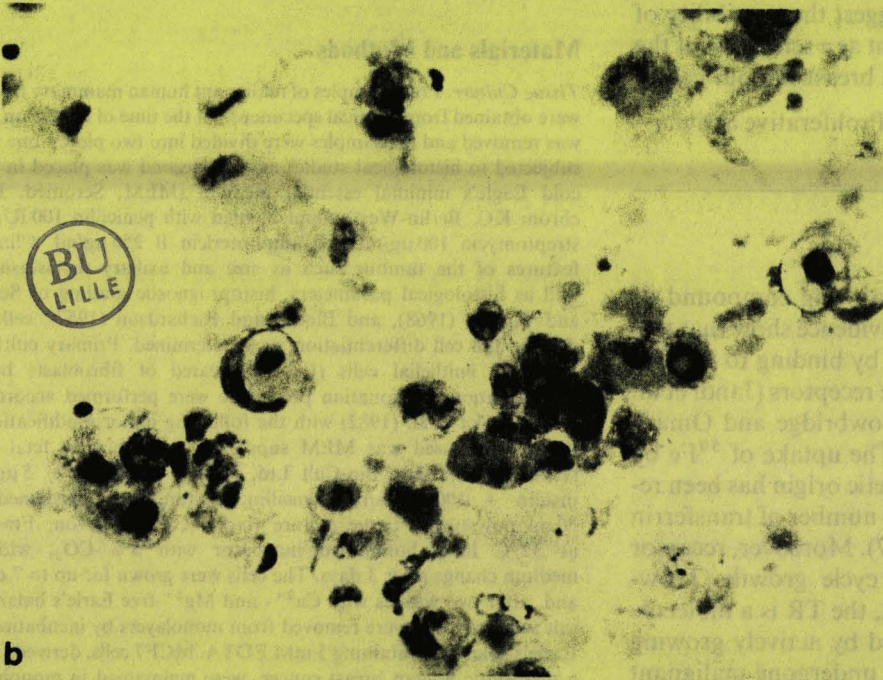
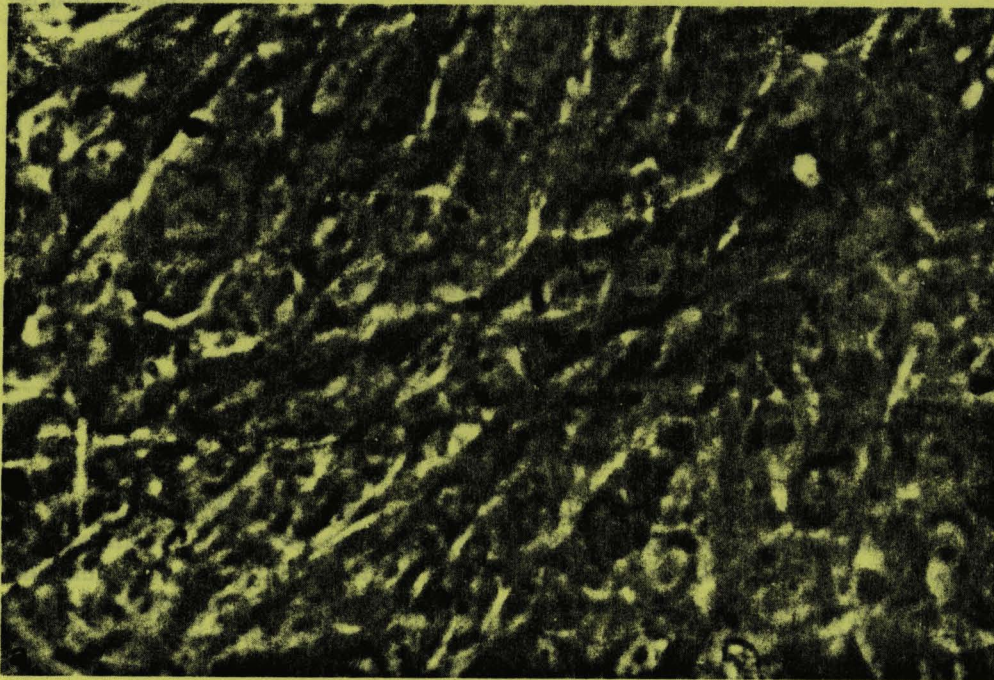


Fig. 1 a, b. 7-day culture of breast epithelial cells after cell fractionation procedure. **a** phase contrast ($\times 320$); **b** Papanicolaou staining ($\times 400$)

4 °C under agitation for 45 min with a saturating amount of diferric transferrin, and after three washes in phosphate buffer saline (PBS) the cells were again incubated for 30 min with fluorescein isothiocyanate (FITC) labelled anti-transferrin antibodies, the labelling being performed according to McKinney et al. (1964) and Wells et al. (1966), the molar ratio of conjugates being 2.45. In the second one, approximately 5×10^5 cells were incubated with 0.125 μg OKT 9 for 45 min under agitation at 4 °C and then washed three times; they were again incubated at 4 °C for 60 min with 100 μl FITC-labelled

anti-mouse immunoglobulin diluted in the range 40:1 in PBS (RAM/IgG, Nordic immunological laboratories, Tillburg, The Netherlands). After staining, all cells were washed and mounted on slides in 50% glycerol. The proportion of stained cells was scored in reflected light using a Leitz standard fluorescent microscope.

Radiolabelling of Transferrin. Purified human transferrin was purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo., USA) and diferric transferrin was produced by the method of Larrick and Cresswell

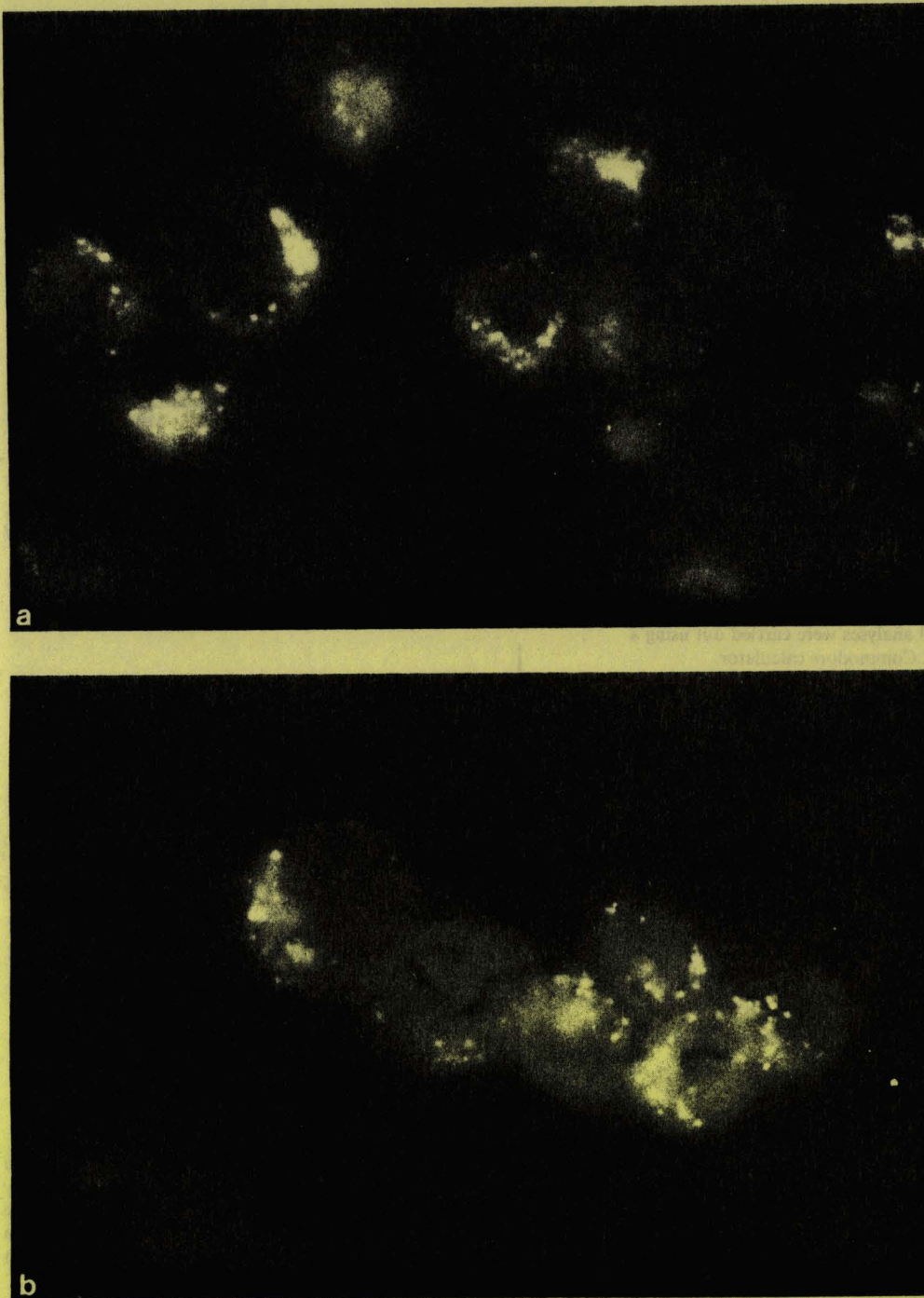


Fig. 2 a, b. Cultured breast cell reacted with FITC-labelled anti-human transferrin antibody. **a** breast cancer cells from primary culture ($\times 1,000$); **b** MCF-7 cells ($\times 1,000$)

(1979). Iron-saturated transferrin was labelled by a modification of the chloramine T procedure of Hunter and Greenwood (1962): 100 μg transferrin and 1 mCi ^{125}I iodine were incubated with 10 μl chloramine T (0.4 mg/ml) in a total volume of 20 μl 0.05 M phosphate buffer pH 7.4. After 45 s, the reaction was stopped by the addition of 10 μl sodium metabisulphite (1 mg/ml). Excess iodine was removed by desalting chromatography on Sephadex G-25. Aliquots of the final preparations were precipitated by 10% trichloroacetic acid (TCA) or by specific anti-transferrin antibody (Sigma Chemical Co).

Precipitations demonstrated that 98% of counts were protein-bound by TCA, and that 99% were anti-transferrin-bound. The specific activity was about 3 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

Transferrin Binding Assays. To assess binding of transferrin to mammary cells, increasing amounts of Fe-saturated ^{125}I -labelled transferrin were added to a constant number of cells, about 5×10^5 cells per tube, in a final volume of 300 μl PBS containing 0.2% ovalbumin. The cells were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 45 min. Non-specific bind-



ing was accounted for by preparing the same incubation series with the addition of a 200-fold excess of cold Fe-saturated transferrin. After incubation, cells were washed three times with 4 ml cold PBS and counted in a Beckman gamma 5500 counter with about 60% counting efficiency. The number of receptor sites per cell and the average receptor affinity for transferrin were calculated under equilibrium conditions according to Scatchard (1949).

Thymidine Incorporation. The cells were pulsed with ^3H thymidine ($1 \mu\text{Ci/ml}$) for 3 h. The medium was discarded and the cells were washed with Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free Earle's balanced salt solution before harvesting with 5 mM disodium EDTA. Equal aliquots of the cell suspension were taken for DNA determination, transferrin binding assay or precipitation with 10% TCA. In this latter fraction, the cells were disrupted by sonication and acid insoluble macromolecules were collected on $0.45 \mu\text{m}$ Millipore type HA filters and washed with 10% TCA. After drying, the filters were solubilized in 5 ml of HP/b Beckman scintillator. Radioactivity was counted in a Beckman LS 6800 liquid scintillation spectrometer with 30% to 50% counting efficiencies.

Other Analytical Methods. DNA was estimated by the ethidium bromide method (Karsten and Wollenberger 1977) and the cells were counted in a model ZF coulter counter (Coultronics, Andilly, France). The significance of differences between results was determined using Spearman's test. All analyses were carried out using a programmable CBM model 8032 Commodore calculator.

Results

Qualitative Study

The pattern of fluorescence was generally granular but cells varied in the intensity and distribution of fluorescent granules and in the proportion of positive cells. Whatever the procedure used, only $48.2\% \pm 11$ (mean \pm SD, $n = 5$) of the breast cancer cell population exhibited fluorescence. In the MCF-7 cell population, examined as a comparison, the results were similar: $45.3\% \pm 19.9$ (mean \pm SD, $n = 5$) of the cell population was stained (Fig. 2).

Quantitative Study

Transferrin binding assays were achieved on breast cancer epithelial cells or MCF-7 cells. The incubation of cells was performed in the presence of ^{125}I transferrin, 2–200 nM (final concentrations), with or without a 200-fold excess of cold transferrin. At 37°C , binding was found to be complete at 15–30 min (Fig. 3), thereafter an incubation time of 45 min was routinely used. Transferrin binding was also found to be specific (Table 1) and saturable. Saturation of binding occurred at about $6.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ transferrin in breast cancer epithelial cells in primary culture and the affinity constant (K_a) was $0.96 \pm 0.22 \cdot 10^8 \times \text{M}^{-1}$ (mean \pm SD, $n = 4$) (Fig. 4). In MCF-7 cells, the K_a was found to be lower $0.20 \pm 0.017 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (mean \pm SD, $n = 3$). Routinely, transferrin binding assays in breast epithelial cells from primary culture were performed under

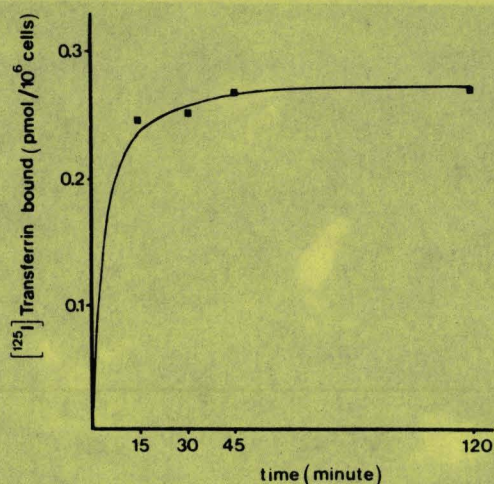


Fig. 3. Time course of binding of ^{125}I -labelled diferric transferrin to epithelial breast cancer cells from primary culture. Values have been corrected for non-specific binding as described under *Materials and Methods*

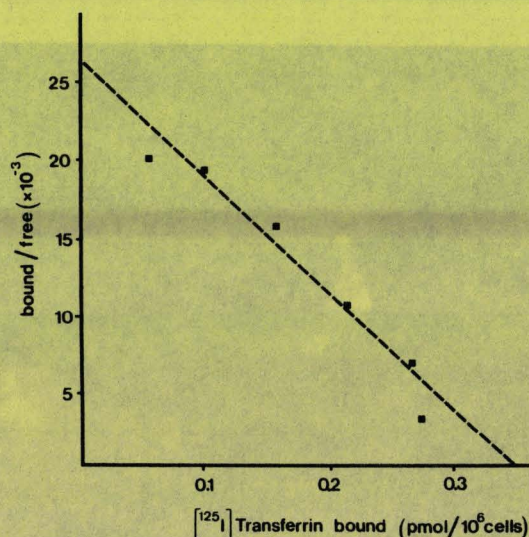


Fig. 4. Representative Scatchard analysis of binding of ^{125}I -labelled diferric transferrin to epithelial breast cancer cells from one primary culture. See *Materials and Methods* for experimental conditions. The reciprocal of the slope defined the K_d ($13 \times 10^{-9} \text{ M}$). Extrapolation of the line of the abscissa defined the binding capacity, which yielded a value of 2.1×10^5 molecules of transferrin cell $^{-1}$

Table 1. Specificity of transferrin binding to breast cancer cells

Non-labelled competitor (200-fold molar excess)	% of inhibition of specific ^{125}I diferric transferrin binding
Diferric transferrin	100
Apotransferrin	91
Bovine insulin	5
Gammaglobulin	1.3
Human serum albumin	0

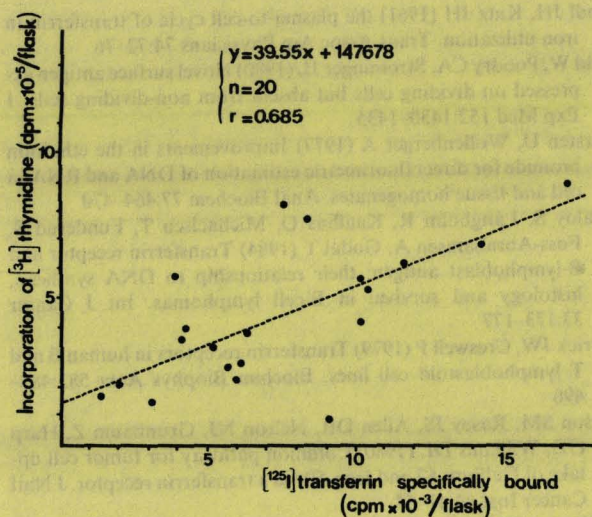


Fig. 5. Correlation between thymidine incorporation and transferrin binding in cultured breast cancer cells

saturation conditions at $8.10^{-8} \times M$ ¹²⁵I transferrin. the 7-day cultured cells were derived mostly from infiltrating ductal carcinoma ($n = 21$) and from infiltrating lobular carcinoma ($n = 2$), mucinous carcinoma ($n = 1$) and metaplastic epidermoid carcinoma ($n = 1$). Their mean binding capacity was $7.6 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$ (mean \pm SEM, $n = 25$) transferrin molecules bound per cell. Whatever the type of parameter considered, i.e. histoprognotic grading, cell density or cell differentiation, tumour size or axillary metastasis, no significant differences ($p > 0.1$) in the mean transferrin binding capacities expressed per 10^6 cells were observed. A good correlation, however, was found between transferrin binding and thymidine incorporation ($p < 0.01$, $r = 0.68$, $n = 20$) (Fig. 5), but no correlation between transferrin binding and DNA content ($p > 0.1$, $r = 0.16$, $n = 25$).

Discussion

Changes in cell surface glycoproteins and glycolipids have long been thought to be involved in malignant transformation (Marchesi 1976) and the malignancy-associated glycoprotein has been reported to be similar to the TR (Bramwell and Harris, 1978). In cultured breast cancer epithelial cells, the present data show saturable and specific transferrin binding. The affinities of breast cancer cell TR for diferric transferrin were similar to those reported in activated lymphocytes (Galbraith et al. 1980), in mitogen-stimulated human thymus derived lymphocytes (Hammarstrom et al. 1982) and in Hela cells (Ward et al. 1982), but lower than those reported in K 562 cell lines from patients with chronic myelogenous leukaemia (Testa et al. 1982) and in B and T lymphoblastoid cell lines

(Larrick and Creswell 1979). In our cell population, the transferrin binding capacities were in close agreement with those previously published concerning a variety of neoplastic cell lines (Hamilton et al. 1979; Larrick and Creswell 1979). Contrary to the reports of Habeshaw et al. (1983) and Kvaloy et al. (1984), who found a significant correlation between TR expression on B cells and histological grading in non-Hodgkin's lymphoma, we failed to demonstrate any relation between transferrin binding and tumour histological parameters. An explanation for this could be our distribution of cases, most of them being of middle or high grades, according to the histoprognotic grading classification.

When cells are in a dividing state, the incorporation of additional iron is required to cater for each daughter cell (Hemmaplardh and Morgan 1974) and ⁵⁹Fe measurement in sarcoma-like mammary tumours in BALB/C mice has been reported to be correlated to receptor-bound ⁵⁹Fe-labelled transferrin (Larson et al. 1980). It may be concluded that the presence of a high level of TR in human cells is most likely reflective of the process of cell division. In fact, factors other than cell proliferation and mitogen stimulation can regulate the expression of TR, such as intracellular iron. Ward et al. (1982) have reported that loading Hela cells with diferric transferrin, contrary to apo-transferrin, resulted in the loss of TR, and Mattia et al. (1984) that interrupting the normal intracellular iron balance by an iron chelator resulted in an increase of TR which can be accounted for by an increased rate of synthesis of the receptor. In *in vitro* studies however, such regulations cannot occur using defined media. We found a significant correlation between transferrin binding and thymidine incorporation, in contrast to DNA content measurement which does not allow distinction to be made between actively proliferating and quiescent cells. In mitogen-stimulated blood lymphocytes, a marked increase in TR expression was even demonstrated several hours prior to the onset of DNA synthesis (Galbraith et al. 1980). Determination of transferrin binding capacity may, however, be limited by the fact that receptor measurement represents the mean of a cell population and provides little information regarding the presence of possible subpopulations containing variable levels of receptor expression. In fact, Muscrove et al. (1984), using fluorescence methods which allow TR expression of individual cells within a population to be measured, found in TR expression studies on CCRF-CEM leukaemic cell lines, contrary to expectation, a uniform decrease in receptor levels in plateau phase culture. No distinct TR negative subpopulation corresponding to the increasing proportion of quiescent cells could be observed. It was concluded that TR was not a marker for

proliferative cells per se, but apparently reflected the cell population as a whole. Their study tends to validate transferrin binding measurement using a quantitative method. Primary cultures of tumour cells can be used to investigate various aspects of the tumour of origin in the hope of improving management of malignant disease. The importance of a single, rapid and simple test for detecting the growth fraction of a tumour in the assessment of the effectiveness of drug and hormone stimulation is clear.

Acknowledgements. The authors are most grateful to Louis Hornez and Michèle Louchez for excellent technical assistance and to Yvette Vendel for expert secretarial assistance. They acknowledge Doctor Leclercq (Brussel, Belgium) for providing the MCF-7 cell line.

References

- Aulbert E, Disselhoff W, Sorje H, Schulz E, Gericke D (1980) Lysosomal accumulation of ^{67}Ga -transferrin in malignant tumors in relation to their growth rate. *Eur J Cancer* 16:1217-1232
- Bloom HJG, Richardson WW (1957) Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 11:359-366
- Bramwell ME, Harris H (1978) An abnormal membrane glycoprotein associated with malignancy in a wide range of different tumours. *Proc R Soc Lond (Biol)* 201:87-106
- Faulk WP, Hsi BL, Stevens PJ (1980) Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast. *Lancet* 8191:390-392
- Galbraith GMP, Galbraith RM, Faulk WP (1980) Transferrin binding by human lymphoblastoid cell lines and other transformed cells. *Cell Immunol* 49:215-222
- Gatter KC, Brown G, Trowbridge IS, Woolston RE, Mason DY (1983) Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *J Clin Pathol* 36:539-545
- Glass J, Nunez MT, Fischer S, Lavidor LM (1977) Transferrin receptor and iron transport in normal murine erythroid precursors and Friend leukemia cells. *Fed Proc* 36:930-935
- Habeshaw JA, Lister TA, Stansfeld AG (1983) Correlation of transferrin receptor expression with histological class and outcome in non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 8323:498-501
- Hamilton TA, Wada G, Sussman HH (1979) Identification of transferrin receptors on the surface of human cultured cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 76:6406-6410
- Hammarstrom ML, Axelsson B, Ivasev M, Hammarstrom S, Perlmann P (1982) Transferrin receptors on mitogen stimulated human thymus derived lymphocytes. *Scand J Immunol* 16:355-360
- Hellstrom KE, Doolittle RF, Dreyer WJ (1982) Human melanoma associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferrin. *Nature* 296:171-173
- Hemmaplardh D, Morgan EH (1974) Transferrin and iron uptake by human cells in culture. *Exp Cell Res* 87:207-212
- Hiratsuka M, Senoo T, Kimoto T, Namba M (1982) An improved short term culture method for human mammary epithelial cells. *Gann* 73:124-128
- Hunter WM, Greenwood FC (1962) Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194:495-496
- Jandl JH, Katz JH (1961) the plasma-to-cell cycle of transferrin in iron utilization. *Trans Assoc Am Physicians* 74:72-76
- Judd W, Poodry CA, Strominger JL (1980) Novel surface antigen expressed on dividing cells but absent from non-dividing cells. *J Exp Med* 152:1430-1435
- Karsten U, Wollenberger A (1977) Improvements in the ethidium bromide for direct fluorimetric estimation of DNA and RNA in cell and tissue homogenates. *Anal Biochem* 77:464-470
- Kvaloy S, Langholm R, Kaalhus O, Michaelsen T, Funderud S, Foss-Abrahamsen A, Godal T (1984) Transferrin receptor and B-lymphoblast antigen: their relationship to DNA synthesis, histology and survival in B-cell lymphomas. *Int J Cancer* 33:173-177
- Larrick JW, Creswell P (1979) Transferrin receptors in human B and T lymphoblastoid cell lines. *Biochim Biophys Acta* 583:483-490
- Larson SM, Rasey JS, Allen DR, Nelson NJ, Grunbaum Z, Harp GD, Williams DL (1980) Common pathway for tumor cell uptake of Gallium-67 and Iron-59 via a transferrin receptor. *J Natl Cancer Inst* 64:41-54
- McKinney RM, Spillane JT, Pearce GW (1964) Factor affecting the rate of reaction of fluorescein isothiocyanate with serum proteins. *J Immunol* 93:232-234
- Marchesi VT (ed) (1976) Membrane and neoplasia: new approaches and strategies. Liss, New York
- Mattia E, Krishnamurthy R, Shapiro DS, Sussman HH, Klausner RD (1984) Biosynthetic regulation of the human transferrin receptor by desferrioxamine in K 562 cells. *J Biol Chem* 259:2689-2692
- Musgrove E, Rugg C, Taylor I, Hedley D (1984) Transferrin receptor expression during exponential and plateau phase growth of human tumour cells in culture. *J Cell Physiol* 118:6-12
- Scarff RW, Torloni H (1968) Histological typing of breast tumours. International histological classifications of tumours n° 2. World Health Organization
- Scatchard G (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51:600-672
- Shindelman JE, Ortmeyer AE, Sussman HH (1981) Demonstration of the transferrin receptor in human breast cancer tissue. Potential marker for identifying dividing cells. *Int J Cancer* 44:1301-1310
- Sutherland R, Delia D, Scheider C, Newman R, Kemshead J, Greaves M (1981) Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation associated receptor for transferrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4515-4519
- Testa U, Thomopoulos P, Vinci G, Titeux M, Bettaieb A, Vainchenker W, Rochant H (1982) Transferrin binding to K 562 cell lines. *Exp Cell Res* 140:251-260
- Trowbridge IS, Lopez F (1982) Monoclonal antibody to transferrin receptor blocks transferrin binding and inhibits tumor cell growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:1175-1179
- Trowbridge IS, Omary MB (1981) Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor of transferrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3040-3043
- Ward JH, Kushner JP, Kaplan J (1982) Regulation of HeLa cell transferrin receptors. *J Biol Chem* 257:10317-10323
- Wells AF, Miller CE, Nadel MK (1966) Rapid fluorescein and protein assay method for fluorescent antibody conjugates. *Appl Microbiol* 14:271-275

Received February 5, 1985/Accepted April 16, 1985

ARTICLE V

Research article

Further characterization of the light breast cyst fluid protein, GCDFP-15

Brigitte VANDEWALLE *, Louis HORNEZ, Philippe VENNIN, Jean-Philippe PEYRAT and Jean LEFEBVRE

Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale, Centre de Lutte Contre le Cancer, région Nord de la France, BP 307, 59020 Lille Cedex, France

(Received 22-7-1985, accepted after revision 29-1-1986)

Summary — A light protein of breast cyst fluid from women with gross cystic disease, termed GCDFP-15 in the literature, has been investigated. This light protein was purified by preparative electrophoresis on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel. Its isoelectric point has been determined as 3.75 and its molecular weight has been estimated at 17 400. The light protein was a glycoprotein containing about 163 amino acid residues; the glucidic fraction corresponded to 11% of the molecular weight. The N-terminal amino acid was blocked and the C-terminal amino acid was determined as valine. Antisera raised against this light protein have proved to be specific. In the literature, there is evidence suggesting that apocrine secretion is of prime importance in conditioning the biochemical composition of breast cyst fluid. Further information is needed to substantiate the hypothesis that in gross cystic disease the apocrine epithelium itself or some of its functional aspects are associated with the risk of neoplasia. The physicochemical characterization of the breast cyst fluid protein can contribute to the study of its biosynthesis and provide a better understanding of the physiopathology of gross cystic disease and its relationship to breast carcinoma.

breast cyst fluid / light protein GCDFP-15 characterization / apocrine secretion

Résumé — Caractérisation approfondie de la protéine légère du liquide de kyste du sein GCDFP-15. Une protéine légère, isolée du liquide de kyste du sein et appelée dans la littérature GCDFP-15 (gross cystic disease fluid protein - 15 kDa) a été caractérisée. Cette protéine a été purifiée par électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide. Son poids moléculaire a été estimé à 17 400 et son point iso-électrique à 3,75. Cette protéine légère est une glycoprotéine composée de 163 résidus d'acides aminés, dont la fraction glucidique correspond à 11% du poids moléculaire. L'acide aminé C-terminal est la valine, l'acide aminé N-terminal est bloqué. Des anticorps dirigés contre cette protéine se sont révélés spécifiques. Dans la littérature, toute une série de résultats montrent que la sécrétion apocrine est d'une importance majeure dans la composition biochimique du liquide de kyste. Des études sont cependant encore nécessaires pour étayer l'hypothèse selon laquelle, dans la maladie kystique, l'épithélium apocrine ou un de ses aspects fonctionnels sont associés au risque de cancer du sein. La caractérisation physico-chimique de la protéine de kyste du sein peut contribuer à l'étude de sa biosynthèse et à la meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie kystique et de ses relations avec le cancer du sein.

liquide de kyste du sein / protéine légère GCDFP-15 / caractérisation biochimique / sécrétion apocrine

* To whom correspondence should be addressed.

Abbreviations: BCF: breast cyst fluid; GCDFP-15: gross cystic disease fluid protein, 15 kDa; IEF: isoelectric focusing; HPLC: high-performance liquid chromatography.

Introduction

Breast cyst fluid (BCF) obtained from patients with gross cystic disease contains hormones and proteins in very different amounts from those found in plasma [1, 2]. The importance of the BCF composition is related to the observation that gross cystic breast disease has been reported by several authors to be associated with a two–four fold increased breast cancer risk [3–6]. Among the BCF proteins, two have been studied. The first one, with a molecular weight around 24 000, which represents 50% of the total BCF proteins, was found to bind progesterone by Pearlman [7]. The second one, with a lower molecular weight, which represents 10–20% of the total BCF proteins, was studied by Haagensen [8] and called GCDFP-15 (gross cystic disease fluid protein, 15 kDa). The interest of this latter light BCF protein lies in its apocrine origin, and immunohistochemical evidence of the presence of GCDFP-15 was found by Mazoujian [9] in 14 out of the 30 breast carcinomas studied, with the positive staining corresponding to the apocrine aspects of the cells. Cytosols from breast carcinoma specimens also contain the light protein in a wide range of concentrations [10], and the content was the highest in the most differentiated carcinomas. Moreover, GCDFP-15 seems to be released into the circulation in massive amounts in certain patients with metastasized breast cancer and its radioimmunoassay determination was proposed as a useful marker for follow-up [10, 11]. Furthermore, the protein can be secreted by neoplastic epithelial mammary cells into culture media [12], and just like other secreted proteins, may be useful as a differentiation marker in *in vitro* studies [13, 14]. In breast carcinoma as well as in normal apocrine glandular tissue of the body, GCDFP production has been shown to be predominantly under the inductive influence of androgens [15, 16].

In order to study the *in vitro* hormonal regulation of the light protein, we first attempted to obtain the anti-GCDFP-15 immune serum. In this paper, we described our protein purification procedure, which is shorter than that reported by Haagensen. Then we give the chemical composition of the protein monomer thus obtained, the physicochemical characteristics and antigenic properties of the protein. This further characterization of the light BCF protein could shed some light on the understanding of apocrine secretion, which is reported to be a unique secretion from breast epithelial cells, possibly in response to abnormal hormone secretion [10], and its relation to

breast carcinoma in view of a diagnostic and prognostic tool.

Materials and methods

BCF were obtained by needle aspiration from women with gross cystic disease. They were ultracentrifuged at $160\,000 \times g$ for 1 h. The cell-free supernatants were kept frozen at -25°C until processed. Supernatants were never pooled, and all replicate analyses were performed on different fluids.

Reagents

The labeled iodine (^{125}I , IMS 300) was purchased from Amersham International (Buckinghamshire, U.K.); goat antibody to rabbit γ -globulin, human serum albumin, transferrin, Cohn fraction II, complete Freund's adjuvant were from Calbiochem (La Jolla, CA, U.S.A.); and molecular weight standards from Pharmacia (Uppsala, Sweden). The ampholytes were purchased from LKB-Produkter AB (Bromma, Sweden). Ovine prolactin (oPRL, NIH P-S-15), human chorionic gonadotrophin (hCG CR-181), human growth hormone (hGH, AFP, 4793 B) were obtained from NIH, Bethesda, MD, U.S.A.) Carboxypeptidase A (treated with phenylmethylsulfonyl fluoride) was obtained from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.).

Preparative and analytical SDS–polyacrylamide gel electrophoreses

Preparative electrophoreses were performed on polyacrylamide slab gel ($190 \times 140 \times 2.7$ mm) using 13% acrylamide in the presence of SDS according to Laemmli's method [17] modified by Delacourte *et al.* [18]. $700 \mu\text{l}$ of BCF corresponding to 10–20 mg of protein were diluted with an equal volume of buffer (0.125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue, pH 6.8), the solution was heated in a boiling water bath for 2 min and layered across the plate. A potential of 35 V was applied for 15 h until the bromophenol blue had migrated to the lower limit of the plate. Two lateral guide strips were cut out from the slab and stained with Coomassie blue R 250 to locate the protein fractions on the gel. The unstained gel was then sliced and each purified component was isolated by extraction with 0.15 M NaCl. The extracts were dialyzed against distilled water for 72 h in order to remove the SDS and then lyophilized.

Analytical SDS–polyacrylamide gel electrophoreses were performed on polyacrylamide slab gel ($180 \times 140 \times 1.5$ mm) as described above in order to check the purity of each component or to analyze the protein distribution in BCF. The percentage of each protein component was determined on stained wet gel using a densitometer (autoscanner densitometer, Helena, France). Apparent

Isoelectric focusing (IEF) in polyacrylamide tubes

The IEF gel mixture containing ampholytes in the pH range 2.5–6 was prepared as described by O'Farrell [22]. Fifteen μ l of radioiodinated light protein sample (1 mg/ml) were loaded on the gel tubes (10 cm length, 2.4 mm diameter). After 24 h of electrophoresis, the gel was cut into 30 slices 3 mm thick. The slices were transferred into tubes and soaked with 1 ml of distilled water. The pH and radioactivity were then measured for each fraction.

Immunoelectrophoresis

This was performed according to Grabar *et al.* [23]. Electrophoresis was achieved at a constant voltage of 20 V for 3 h in a 1% agarose gel buffered with 0.07 M veronal buffer, pH 8.2. 20 μ l BCF were placed in the central well and immunoprecipitations were obtained using unconcentrated, and three-fold concentrated antisera. The slides were treated with 5% citrate for 1 h, washed in saline, dried and stained with Coomassie blue, R-250.

Amino acid analysis

Protein samples were hydrolyzed *in vacuo* for 24 h and 72 h in 6 M HCl (1 ml/mg of protein). One drop of 1% phenol was added to prevent the excessive degradation of tyrosine. The amino acid and osamine analyses were performed on a Beckman 119 CL using a single column system.

End group determination

Carboxy-terminal analysis: protein (17 nmol) was dissolved in 1.1 ml of 0.2 M *N*-methylmorpholine acetate, pH 8.0, and digested at 37°C with carboxypeptidase A (11 μ g). At 15, 30, 60, 120, 240 min aliquots were withdrawn, acidified with glacial acetic acid and freeze-dried. The released amino acids were analyzed on the amino acid analyzer.

Amino-terminal analysis: Amino-terminal analysis was performed by dansylation [24] and by manual Edman degradation [25].

Sugar analysis

Sugar composition was determined by gas-chromatography according to Lamblin [26] and sialic acid was measured as described by Aminoff [27].

Other analytic methods

Protein concentrations were determined using the method of Lowry *et al.* [28]. The radioactivity of ¹²⁵I-labeled protein was counted using a Beckman gamma 5500 counter with about 60% counting efficiency.

Immune serum preparation

Antisera were produced in male New Zealand white rabbits weighing about 3.5 kg. The rabbits were injected intradermally according to Vaitukaitis [19] with 100 μ g of purified protein in 1 ml of saline solution mixed with 1 ml of complete Freund's adjuvant. Three weeks after the first injection, they were given one injection every week for three months.

Protein iodination

Protein labeling was carried out with Na¹²⁵I using low concentrations of chloramine-T [20] which resulted in a specific activity of approximately 40 μ Ci/ μ g. Excess iodine was removed by desalting chromatography on Sephadex G-25.

Radioimmunoassay

Biological samples (200 μ l) were assayed with 25 μ l of diluted antiserum in phosphate buffered saline (PBS) plus ovalbumin (2 mg/ml); a first incubation under agitation at 4°C was performed for 60 min, then 25 μ l (= 5 ng) of iodinated light BCF protein were added and a second incubation was performed overnight at 4°C. The reaction was stopped by the addition of 25 μ l of antirabbit IgG goat serum, and after 2 h, 4% polyethylene glycol (0.6 ml) was added. The pellet obtained after centrifugation was counted in a gamma counter.

High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis

HPLC analyses were performed on size exclusion columns: 200 μ l of BCF or isolated light protein in PBS, were injected into 2 successive protein Pak columns 300 SW (300 x 7.5 mm) fitted with a 22 mm pre-column (Waters SA, Paris, France) using a model U6k universal liquid chromatography injector (Waters). The buffer was pumped by a Beckman Model 110A solvent delivery system at a rate of 0.5 ml per min and fractions were collected for 60 s. The elution buffer used was PBS. Calibration was achieved by injecting 0.05 mg of each of the following calibration proteins: ferritin (M_r 440 000), catalase (M_r 232 000), aldolase (M_r 158 000), bovine serum albumin (M_r 67 000), ovalbumin (M_r 43 000), chymotrypsinogen (M_r 25 000), ribonuclease A (M_r 13 700). Molecular weights were calculated, using the method of Siegel and Monty [21].

Results

Isolation and molecular weight determination of the lightest BCF fluid protein

SDS-polyacrylamide gel electrophoreses of different BCF, with or without 5% 2-mercaptoethanol, all contained a fast migrating component of molecular weight of $\approx 17\,000$. The amount of this protein determined by densitometry, represented $15.7\% \pm 4.8$ ($n = 8$) of total proteins present in the BCF on gels run with 2-mercaptoethanol; the amount represented only $8.85\% \pm 1.1$ ($n = 3$) of total proteins in the absence of 2-mercaptoethanol. Isolated protein showed only one band by analytical polyacrylamide gel electrophoresis, which migrated to a position that corresponds to a molecular weight of $17\,415 \pm 612$ ($n = 8$) (Fig. 1).

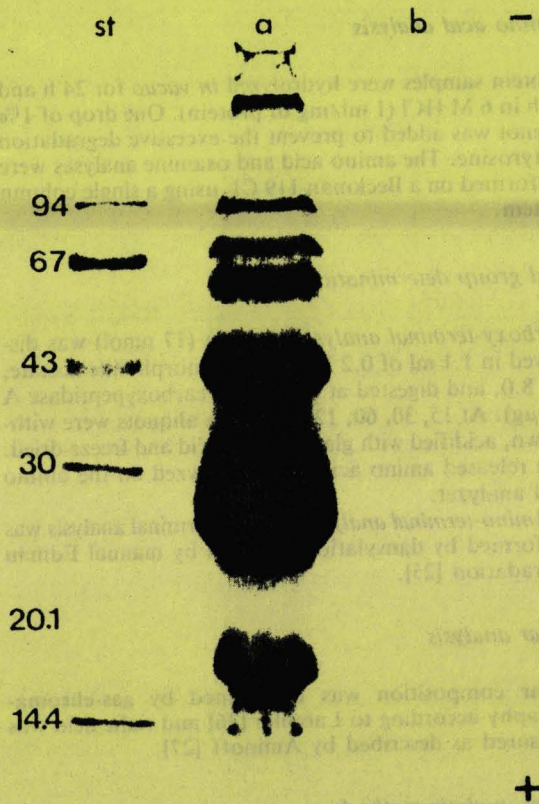


Fig. 1. Analytical SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of $10\ \mu\text{l}$ of breast cyst fluid ($\approx 300\ \mu\text{g}$ of protein) (a) and $25\ \mu\text{g}$ of its corresponding light protein purified by preparative gel electrophoresis (b).

Analyses of gel exclusion chromatography

Gel exclusion chromatography (HPLC) of the light iodinated BCF protein showed two major peaks of molecular weights of around $67\,000$ and $32\,000$ (Fig. 2A) indicating that the light BCF protein consists of subunits which may aggregate to form dimers or tetramers. Analysis of total BCF revealed 3 major fractions by U.V. absorption (Fig. 2B); radioimmunoanalysis of the collected fractions from HPLC showed that binding with anti-light BCF protein rabbit immune serum had occurred with protein fractions of molecular weights of around $265\,000$, $71\,000$, $34\,000$, respectively (Fig. 2B).

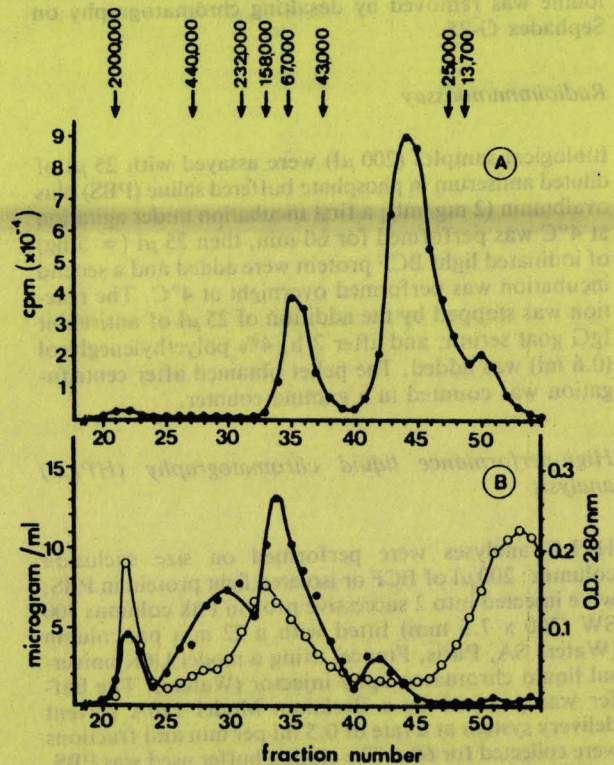


Fig. 2. High-performance chromatographic analyses performed on a protein Pak 300 size exclusion column using PBS as eluant at a flow rate of $0.5\ \text{ml/min}$. Fractions were collected for $60\ \text{s}$. (A) elution profile of the radiolabeled light BCF protein; (B) \bullet , amounts of light BCF protein determined by radioimmunoassays performed on collected fractions from BCF; \circ , U.V. absorption profile of collected fractions from BCF.

Physicochemical characteristics of the light BCF protein

Isoelectric point

Isoelectrofocusing of light BCF protein exhibited a peak at pH 3.75 (Fig. 3). Total BCF also showed an anodic migration, with spots located between pH 2.5–5, upon isoelectrofocusing in the pH range of 2.5–6.

Amino acid composition and end group determination

Table I shows the amino acid composition of the light BCF protein. This protein was characterized by high aspartic acid and glutamic acid contents, both representing 25% of the total amino acid residues, and by low histidine, cysteine and methionine contents. The number of amino acid residues per molecule of protein was calculated to be 163.

BCF light protein was devoid of a free terminal

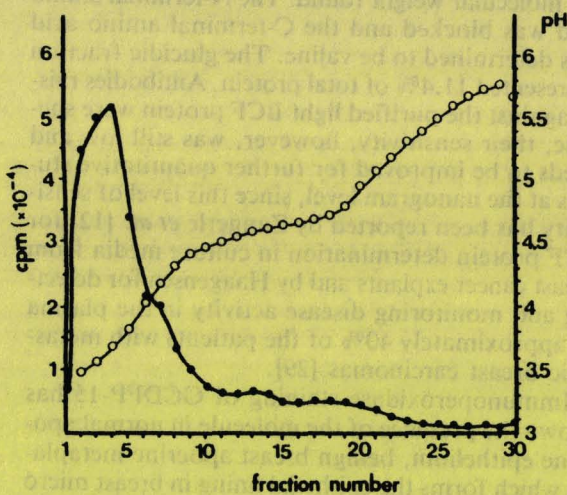


Fig. 3. Isoelectrofocusing in polyacrylamide tubes of the radioiodinated light BCF protein. The profile shows a peak at pH 3.75.

amino group as established by dansylation and Edman degradation. A valine residue was identified at the C-terminal position following carboxypeptidase A digestion of the BCF protein (Table II).

Sugar analysis

The sugar composition expressed in weight percent was as follows: neutral hexoses 4%, including: mannose 1.2%, galactose 2.1% and glucose 0.6%; osamines 2.5% (glucosamine 1.9%, galactosamine 0.6%); sialic acid 4.9%.

Table I. Amino acid composition of light BCF protein

Amino acid	Amount (mol/100 mol)	No. of residues/molecule of protein
Aspartic acid	13.7 ± 0.20	22.5 (22–23)
Threonine	7.4 ± 0.25	12.1 (12)
Serine	4.0 ± 0.34	6.6 (7)
Glutamic acid	10.6 ± 0.28	17.4 (17)
Proline	5.6 ± 0.14	9.2 (9)
Glycine	3.9 ± 0.09	6.4 (6)
Alanine	7.5 ± 0.08	12.4 (12)
Cysteine	0.8 ± 0.02	1.4 (1)
Valine	8.4 ± 0.49	13.9 (14)
Methionine	1.4 ± 0.22	2.4 (2)
Isoleucine	7.9 ± 0.45	13.0 (13)
Leucine	7.4 ± 0.07	12.2 (12)
Tyrosine	4.7 ± 0.21	7.8 (8)
Phenylalanine	4.2 ± 0.12	6.9 (7)
Histidine	0.6 ± 0.02	1.0 (1)
Lysine	6.7 ± 0.26	11.0 (11)
Arginine	4.1 ± 0.11	6.7 (7)
Tryptophan	1.2 ± 0.02	2.0 (2)

The amounts of each amino acid were calculated from triplicate analyses performed on 24 h and 72 h hydrolysates. The values for threonine and serine were obtained by linear extrapolation to zero hydrolysis time. For valine the 72 h value was taken. The number of residues was calculated on the basis of one histidine residue per mole of light BCF protein. Values in parentheses are the nearest integers.

Table II. Carboxy-terminal amino acid analysis of light BCF protein.

Amino acid released	Carboxypeptidase A				
	15 min	30 min	60 min	120 min	240 min
Serine	0.1 (0.03)	0.2 (0.06)	0.9 (0.3)	1.0 (0.3)	0.9 (0.3)
Glutamic acid	1.0 (0.3)	1.1 (0.3)	1.6 (0.5)	1.8 (0.5)	1.7 (0.5)
Valine	2.2 (0.6)	2.5 (0.7)	3.2 (0.9)	3.1 (0.9)	3.1 (0.9)
Leucine	0.5 (0.1)	0.6 (0.2)	0.7 (0.2)	0.7 (0.2)	0.8 (0.2)

Results are expressed in nanomoles. Each aliquot taken for amino acid analysis corresponds to 3.4 nmol. The calculated number of residues appears in parentheses.

Specificity of light BCF protein antiserum

Immuno-electrophoretic studies

The light BCF protein antiserum was tested by crossed immunoelectrophoresis. Early anti-light BCF protein rabbit immune serum taken 4 weeks after immunization gave one band against BCF. In contrast, anti-BCF protein rabbit immune serum exhibited many precipitating lines when tested against BCF (Fig. 4).

Cross-reactivity

The specificity of the early anti-light BCF protein rabbit immune serum was studied by performing cross-reactions with various proteins which can be found either in BCF or human serum. Fig. 5 shows the inhibition curves obtained by radioimmunoassays using iodinated light BCF protein and protein competitors.

Discussion

The purification of the light BCF protein from BCF was achieved by preparative polyacrylamide gel electrophoresis. This one-step method is rapid and easier than that described by Haagensen [8] which involves many chromatographic steps; it gave us light protein preparation with a good yield, the protein thus obtained represented $8.58 \pm 2.72\%$ (mean

\pm SD, $n = 4$) of total BCF proteins, which is in agreement with the distribution of BCF proteins reported by Haagensen [8]. The purity of this BCF protein was assessed by analytical SDS-polyacrylamide gel electrophoresis where a single band corresponding to a molecular weight of 17415 ± 612 (mean \pm SD, $n = 8$) was observed.

This molecular weight is higher than that of the 15 000 Da glycoprotein isolated by Haagensen from BCF [8]. We cannot yet explain this discrepancy, since no smaller proteins or subunits have been observed in all the BCF tested under our conditions by polyacrylamide gel electrophoresis. Light BCF protein may aggregate easily since dimers, tetramers and polymers were found during HPLC analyses. As for total BCF, the light BCF protein is acidic, its isoelectric point being 3.75. The acidic character of the protein, also reported by Haagensen [8], is likely due to the presence of significant amounts of sialic acid and dicarboxylic amino acids.

Purified light BCF protein was found to be constituted of 163 amino acids which is consistent with the molecular weight found. The N-terminal amino acid was blocked and the C-terminal amino acid was determined to be valine. The glucidic fraction represented 11.4% of total protein. Antibodies raised against the purified light BCF protein were specific, their sensitivity, however, was still low and needs to be improved for further quantitative studies at the nanogram level, since this level of sensitivity has been reported by Zangerle *et al.* [12] for BCF protein determination in culture media from breast cancer explants and by Haagensen for detecting and monitoring disease activity in the plasma of approximately 40% of the patients with metastatic breast carcinomas [29].

Immunoperoxidase staining of GCDFFP-15 has shown the presence of the molecule in normal apocrine epithelium, benign breast apocrine metaplasia which forms the epithelial lining in breast micro and gross cystic diseases and breast carcinoma with apocrine features [11]. These findings establish a biochemical link between apocrine glandular cells, gross cystic disease and breast carcinoma, and suggest the histogenesis of some breast carcinomas from benign apocrine metaplastic cells in the breast. Indeed, some authors have shown that women with gross cystic disease are at increased risk of developing breast cancer [3-6] although others have been unable to confirm these findings [30, 31]. Our own data are at this time too preliminary to draw conclusions. It may therefore be speculated that the synthesis of the light protein by apocrine cells which is under hormonal influence, must serve a physiological function that at present remains unknown.

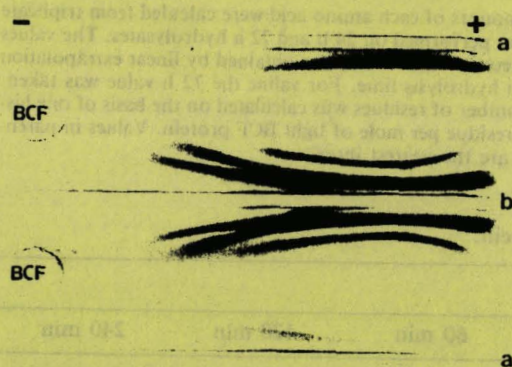


Fig. 4. Crossed immunoelectrophoresis of BCF proteins. The central well contains BCF, the channels a and a' respectively contain the 3-fold concentrated and the unconcentrated anti-light BCF protein immune serum, and channel b the anti-total BCF protein immune serum.

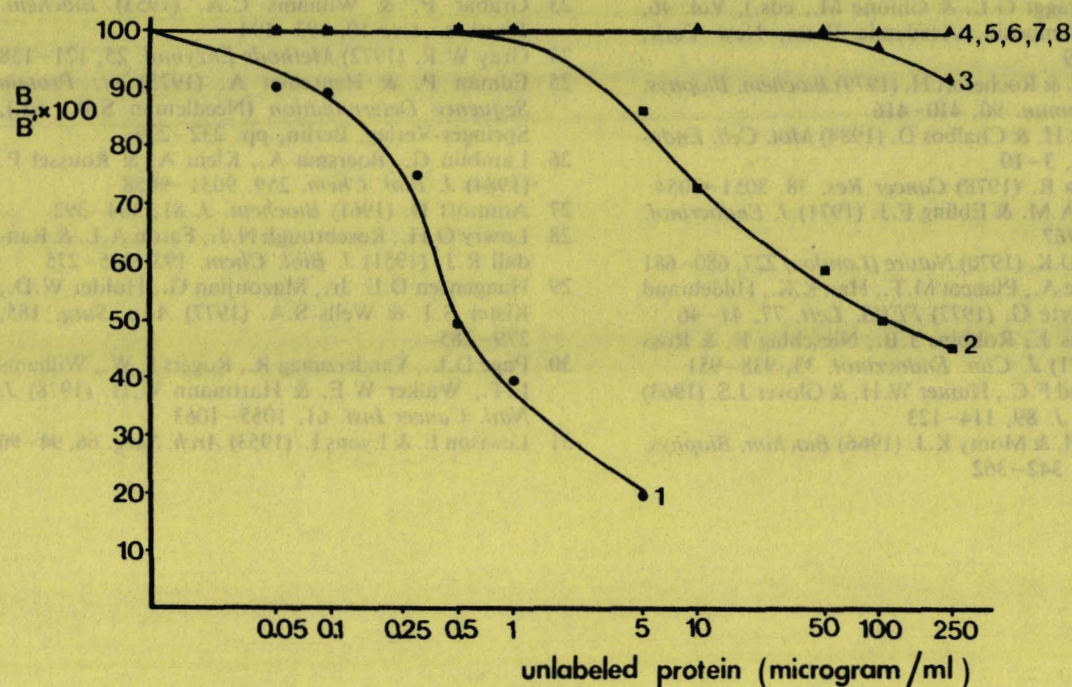


Fig. 5. Specificity of the light BCF protein antiserum. Inhibition curves showing the specificity of the antiserum supplied with respect to protein interference: 1, light BCF protein; 2, 24 000 BCF protein; 3, ovine prolactin; 4, human serum albumin; 5, transferrin; 6, human chorionic gonadotrophin; 7, human growth hormone; 8, Cohn fraction II. The percentages of cross-reaction are calculated as $100 \times$ the ratio (B/B') of the weight of the antigenic substance over the weight of the cross-reactant that caused 50% inhibition of the tracer binding. The cross-reactivity with the 24 000 BCF protein was only 0.5%.

In an attempt to understand better the pathophysiology of gross cystic disease and its relationship to breast carcinoma, our results may provide a clue to the study of cyst glycoprotein biosynthesis. The further characterization and comparison of the identical protein encountered in normal apocrine and breast carcinoma secretions may be informative and will be considered.

Acknowledgements

We wish to thank Dr. P. Sautière U409 CNRS-Lille for structural studies and critical reviews of the manuscript, Dr. G. Lamblin and Dr. P. Degand U16 INSERM-Lille for sugar determination, and Dr. M.T. Belin U233 INSERM-Lille for helpful advice on isoelectrofocusing.

References

- Bradlow H.L., Schwartz M.K., Flusher M., Nisselbaum J.S., Bayer R., O'Connor J. & Fukushima D.K. (1979) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49, 778-782
- Bradlow H.L., Rosenfeld R.S., Kream J., Fleisher M., O'Connor J. & Schwartz M.K. (1981) *Cancer Res.* 41, 105-107
- Haagensen C.D. (1977) *Ann. Surg.* 185, 375-376
- Veronesi V. & Pizzocara G. (1969) *Surg. Gynecol. Obstet.* 126, 529-534
- MacMahon B., Cole P. & Brown J. (1973) *J. Natl. Cancer Inst.* 50, 21-43
- Dixon J.M., Lumsden A.B. & Miller W.R. (1985) *Eur. J. Clin. Oncol.* 9, 1047-1050
- Pearlman W.H., Gueriguian J.L. & Sawyer M.E. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 5736-5741
- Haagensen D.E. Jr., Mazoujian G., Dilley W.G., Pedersen C.E., Kister S.J. & Wells S.A. (1979) *J. Natl. Cancer Inst.* 62, 239-247
- Mazoujian G., Pinkus G.S., Davis S. & Haagensen D.E. Jr. (1983) *Am. J. Pathol.* 110, 105-112
- Haagensen C.D., Bodian C. & Haagensen D.E. Jr. (1981) in: *Breast Carcinoma, Risk and Detection*, W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 301-337
- Haagensen D.E. Jr. & Mazoujian G. (1983) in: *Endocrinology of Cystic Breast Disease* (Angeli A., Bradlow H.L. & Dogliotti L., eds.), Raven Press, New York, pp. 149-168
- Zangerle P.F., Collette J., Hendrick J.C., Miller W.B. & Franchimont P. (1982) in: *Markers for Diag-*

nosis and Monitoring of Human Cancer (Colnaghi M.I., Buraggi G.L. & Ghione M., eds.), Vol. 46, Sero Symposium, Academic Press, New York, pp. 35-49

13 Westley B. & Rochefort H. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 410-416

14 Rochefort H. & Chabos D. (1984) *Mol. Cell. Endocrinol.* 36, 3-10

15 Grattarola R. (1978) *Cancer Res.* 38, 3051-3054

16 Wales N.A.M. & Ebling F.J. (1971) *J. Endocrinol.* 51, 763-767

17 Laemmli U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-681

18 Delacourte A., Plancot M.T., Han K.K., Hildebrand H. & Biserte G. (1977) *FEBS. Lett.* 77, 41-46

19 Vaitukaitis J., Robbins J.B., Nieschlag E. & Ross G.T. (1971) *J. Clin. Endocrinol.* 33, 938-951

20 Greenwood F.C., Hunter W.H. & Glover J.S. (1963) *Biochem. J.* 89, 114-123

21 Siegel L.M. & Monty K.J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 112, 342-362

22 O'Farrell P.H. (1977) *Cell* 12, 1133-1142

23 Grabar P. & Williams C.A. (1953) *Biochem. Biophys. Acta* 10, 193-194

24 Gray W.R. (1972) *Methods Enzymol.* 25, 121-138

25 Edman P. & Henschen A. (1975) in: *Protein Sequence Determination* (Needleman S.B., ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 232-279

26 Lamblin G., Boersma A., Klein A. & Roussel P. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 9051-9058

27 Aminoff D. (1961) *Biochem. J.* 81, 384-392

28 Lowry O.H., Rosebrough N.J., Faron A.L. & Randall R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275

29 Haagen D.E. Jr., Mazoujian G., Holder W.D., Kister S.J. & Wells S.A. (1977) *Ann. Surg.* 185, 279-285

30 Page D.L., Vanderzuaag R., Rogers L.W., Williams L.T., Walker W.E. & Hartmann W.H. (1978) *J. Natl. Cancer Inst.* 61, 1055-1063

31 Lewison E. & Lyons L. (1953) *Arch. Surg.* 66, 94-96

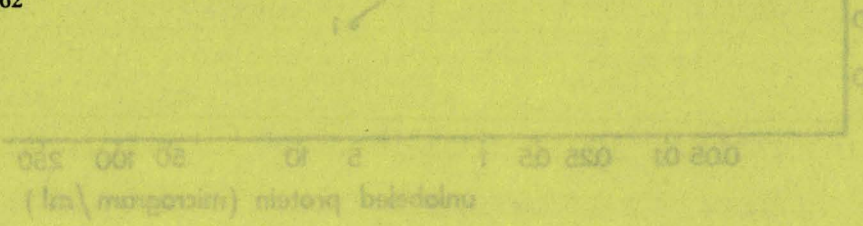


Fig. 2. Specificity of the right BCF protein marker. Inhibition curves showing the specificity of the structure supplied with respect to protein markers: 1, left BCF protein; 2, 54,000 BCF protein; 3, ovine prolactin; 4, human serum albumin; 5, transferrin; 6, human chorionic gonadotropin; 7, human growth hormone; 8, Cohn fraction II. The parameters of cross-reaction are calculated as 100 x the ratio (B/C) of the weight of the antigen solution over the weight of the cross-reactant that reacts with inhibition of the react binding. The cross-reactivity with the 54,000 BCF protein was only 0.24%.

1 Brindley H.L., Kozmich R.S., Kream J., Fisher M., O'Connor J. & Schwartz M.K. (1981) *Cancer Res.* 41, 103-107

2 Haskason C.J. (1977) *Ann. Surg.* 182, 372-376

3 Votaw V. & Pritchard G. (1969) *Surg. Gynecol. Obstet.* 128, 229-234

4 MacMahon H., Cole P. & Brown J. (1973) *J. Natl. Cancer Inst.* 30, 21-43

5 Dixon J.M., Lunden A.B. & Miller W.R. (1952) *Eur. J. Clin. Invest.* 9, 1047-1050

6 Pothman W.H., Ganselaar J.J. & Sawyer M.E. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 2726-2741

7 Haskason D.E. Jr., Mazoujian G., Diller W.G., Robinson C.E., Kister S.J. & Wells S.A. (1978) *J. Natl. Cancer Inst.* 62, 129-147

8 Haskason D.E., Davis S. & Haskason W.B. (1981) *Breast Carcinoma: Risk and Detection* (1981) W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 301-317

9 Haskason D.E. Jr. & Mazoujian G. (1973) in: *Endocrinology of Cystic Breast Disease* (Angeli A., Brindley H.L. & Ingbar S., eds.), Raven Press, New York, pp. 148-152

10 Langford P.E., Collins J., Hendrick J.C., Miller W.B. & Pritchard G. (1982) in: *Markers for Dis-*

in an attempt to understand better the pathophysiology of cystic disease and its relationship to breast carcinoma, our results may provide a clue to the study of cyst glycoprotein biosynthesis. The further characterization and comparison of the identical protein encountered in normal appearing and breast carcinoma sections may be informative and will be considered.

Acknowledgments

We wish to thank Dr. P. Sauter, U-09 CNRS-Lille for structural studies and critical review of the manuscript. Dr. G. Lamblin and Dr. P. D'Amico U16 INSERM-Lille for sugar determination, and Dr. M.T. Bonn U239 INSERM-Lille for helpful advice on isotopic labeling.

References

1 Brindley H.L., Schwartz M.K., Fisher M., Kream J.S., Hoyer R., O'Connor J. & Pritchard G. (1978) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48, 778-783

ANALYSE DES RESULTATS

A - EFFET SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE

Comme plusieurs auteurs, nous constatons dans certaines conditions un effet positif de l'oestradiol (10^{-8} M) sur la croissance des cellules oestrogéno-sensibles.

1° Nos résultats établis sur la base du nombre de cellules montrent que dans la lignée oestrogéno-sensible VHB-1, nouvellement établie, l'augmentation induite par l'oestradiol est nette pour les 3 milieux étudiés (Figures 16, 17 et 18), l'effet est cependant plus important avec le milieu défini (Figure 16).

Les résultats obtenus avec la lignée MCF-7, établie depuis plus de 10 ans, sont moins nets (en raison peut-être d'une trop longue adaptation en culture) : l'oestradiol stimule la croissance des cellules dans le milieu défini (Figure 19), mais a peu d'effet dans les milieux contenant du sérum de veau nouveau-né (SVNN) (Figure 20) et aucun effet dans les milieux contenant du sérum de veau traité au charbondextran (SVF-DCC) (Figure 21). Une interférence avec les facteurs de croissance contenus dans le sérum peut être responsable de ces effets.

L'anti-oestrogène 4-hydroxy-taxomifène (4OH-Tam) à la concentration de 10^{-7} M et même parfois à la concentration de 10^{-6} M, a un effet agoniste de celui de l'oestradiol quand il est ajouté au milieu de culture contenant du sérum ; cet effet est particulièrement net pour les cellules MCF-7 (Figures

20 et 21). Ces résultats corroborent ceux de BERTHOIS (1986) qui montre aussi un léger effet agoniste de 4OH-Tam dans les cellules MCF-7 prouvant que l'effet anti-oestrogénique décrit par beaucoup d'auteurs à ces concentrations n'est dû en fait qu'à une compétition avec le rouge de phénol contenu dans leur milieu de culture.

Nous constatons cependant un effet inhibiteur de 4OH-Tam à la concentration de 10^{-6} M, quand les cellules MCF-7 et VHB-1 sont cultivées en milieu défini (Figures 16 et 19).



De la même façon, nous constatons en utilisant ce milieu défini, un effet antiprolifératif de 2OH-E1, à la concentration de 10^{-7} M, et ce, pour les deux types de cellules (Figures 16 et 19), et l'inhibition de croissance est dépendante de la dose puisqu'elle est plus nette à la concentration de 10^{-6} M (Figure 16). Il s'agit là encore d'un effet propre, qui ne peut être attribuable, contrairement aux expériences de SCHNEIDER (1984) à une compétition de 2OH-E1 avec le rouge de phénol.

En utilisant des milieux contenant du sérum, l'effet de 2OH-E1 est, dans certains cas, positif sur la prolifération cellulaire, mimant l'effet observé avec les anti-oestrogènes (Figures 20 et 21).

Nous avons voulu savoir, si les effets antagonistes de E2 et 2OH-E1 mis en évidence lors de cultures en milieu sans sérum, étaient médiés par le même mécanisme; Dans ce but, les deux stéroïdes ont été ajoutés ensemble, 24 heures après ensemencement des cellules. La figure 22 montre qu'à concentration égale (10^{-8} M), 2OH-E1 contrebalance mal l'effet stimulant de E2, une différence significative apparaît pour une concentration de 2OH-E1 10 fois supérieure à celle de E2, tandis qu'à une concentration 100 fois supérieure, 2OH-E1 abolit l'effet de E2. Les deux stéroïdes sont donc compétiteurs.

Cependant, si au bout de 3 jours de culture en présence de 2OH-E1 (10^{-7} M), on remplace le milieu par le mélange E2 (10^{-8} M) + 2OH-E1 (10^{-7} M), l'inhibition de croissance devient irréversible (Figure 23). D'autres mécanismes que ceux faisant intervenir les récepteurs de l'oestradiol doivent en ce cas être mis en jeu.

En ce qui concerne la lignée MDA-MB 231 hormono-insensible, aucun effet de E2 (10^{-8} à 10^{-5} M) n'est mis en évidence (Figure 24), 2OH-E1, inefficace aux concentrations physiologiques, a un effet anti-prolifératif à la concentration pharmacologique de 10^{-5} M (Figure 25).

2° L'analyse des résultats en fonction du taux de récepteurs de la transferrine qui sont, comme décrit dans l'article IV, corrélés à l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN, renseigne sur l'activité proliférative des cellules.

En utilisant des milieux définis sans sérum, nous observons une corrélation entre nombre de cellules et taux de récepteurs de la transferrine par cellule, ce qui atteste que les cellules sont en phase exponentielle de croissance (Figure 16 et 19).

Les résultats obtenus en utilisant des milieux de culture contenant du sérum sont moins nets et une discordance entre les deux paramètres est souvent observée, surtout en ce qui concerne la lignée MCF-7 (Figures 20 et 21). Dans ces conditions, l'oestradiol augmente très nettement les taux de récepteurs par cellule par rapport au témoin alors que le nombre de cellules reste identique. Une discordance analogue entre incorporation de thymidine et nombre de cellules a aussi été observée par JOZAN (1985).

Le phénomène pourrait être expliqué par des perturbations cinétiques : l'oestradiol stimulerait l'entrée des cellules en phase S mais la vitesse de progression dans cette phase et le passage dans la phase G2 seraient considérablement ralentis, d'où une diminution des cellules en phase G2 et un index mitotique faible.

De telles perturbations cinétiques pourraient être induites par des facteurs contenus dans le sérum. Dans la plupart des travaux, les milieux utilisés contiennent presque toujours du sérum et les effets sont appréciés soit par incorporation de la thymidine tritiée soit par le nombre de cellules. Ces éléments pourraient expliquer les discordances de résultats entre ceux qui font état soit d'un effet mitogène direct de l'oestradiol, soit d'une absence d'effet *in vitro*.

Pour les anti-oestrogènes et 2OH-E1, nous observons une situation tout à fait inverse en présence de sérum, à savoir une diminution des taux de récepteurs de la transferrine alors que dans certains cas le nombre de cellules est paradoxalement augmenté (Figures 20 et 21). Les effets positifs sur le nombre de cellules, seulement observés en milieu contenant du sérum, pourraient encore être expliqués par un effet synergique des facteurs de croissance sériques mal maîtrisés et il y aurait en même temps internalisation des récepteurs de la transferrine.

La mesure des récepteurs de la transferrine rend donc bien compte d'une action mitogène de l'oestradiol et d'une action anti-proliférative des antioestrogènes et des catécholoestrogènes. Son utilisation est particulièrement intéressante dans les cas où une discordance avec la numération cellulaire est notée.

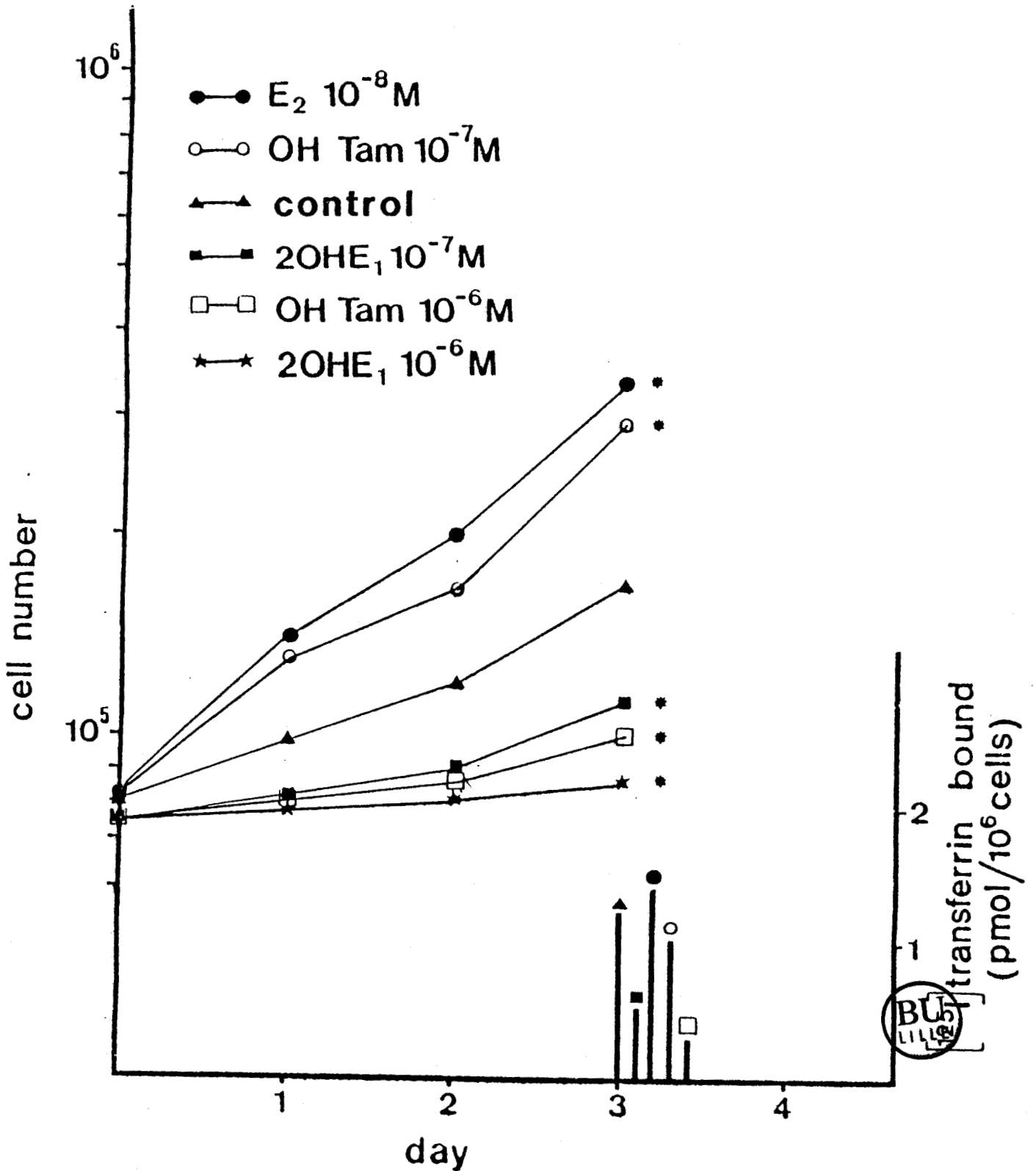


Figure 16 - Cellules VHB-1 cultivées en milieu MEM défini

• Chaque point représente la moyenne de 6 expériences, les écarts entre valeurs sont inférieurs à 10 %

* significativement différent du témoin ($p < 0.05$ test de Cochran)

• Coefficient de corrélation entre nombre de cellules et taux de récepteurs de la transferrine $r = 0.99$ (corrélation positive, test de Spearman, $n=5$)

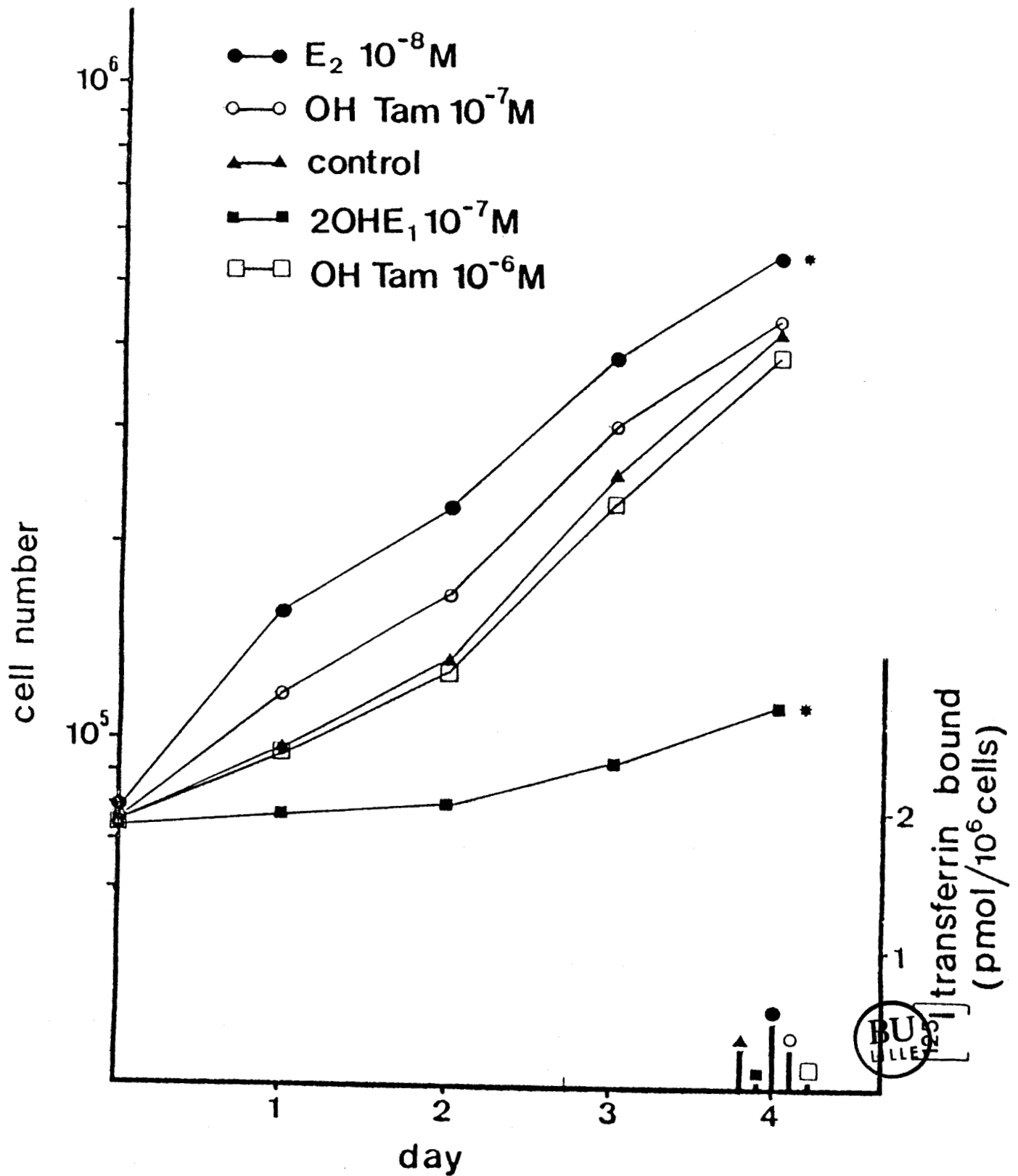


Figure 17 - Cellules VHB-1 cultivées en milieu MEM +5 % SVNN

• Chaque point représente la moyenne de 6 expériences, les écarts entre valeurs sont inférieurs à 10 %

* significativement différent du témoin ($p < 0.05$ test de Cochran)

• Coefficient de corrélation entre nombre de cellules et taux de récepteurs de la transferrine $r = 0.875$ (pas de corrélation, test de Spearman, $n=5$)

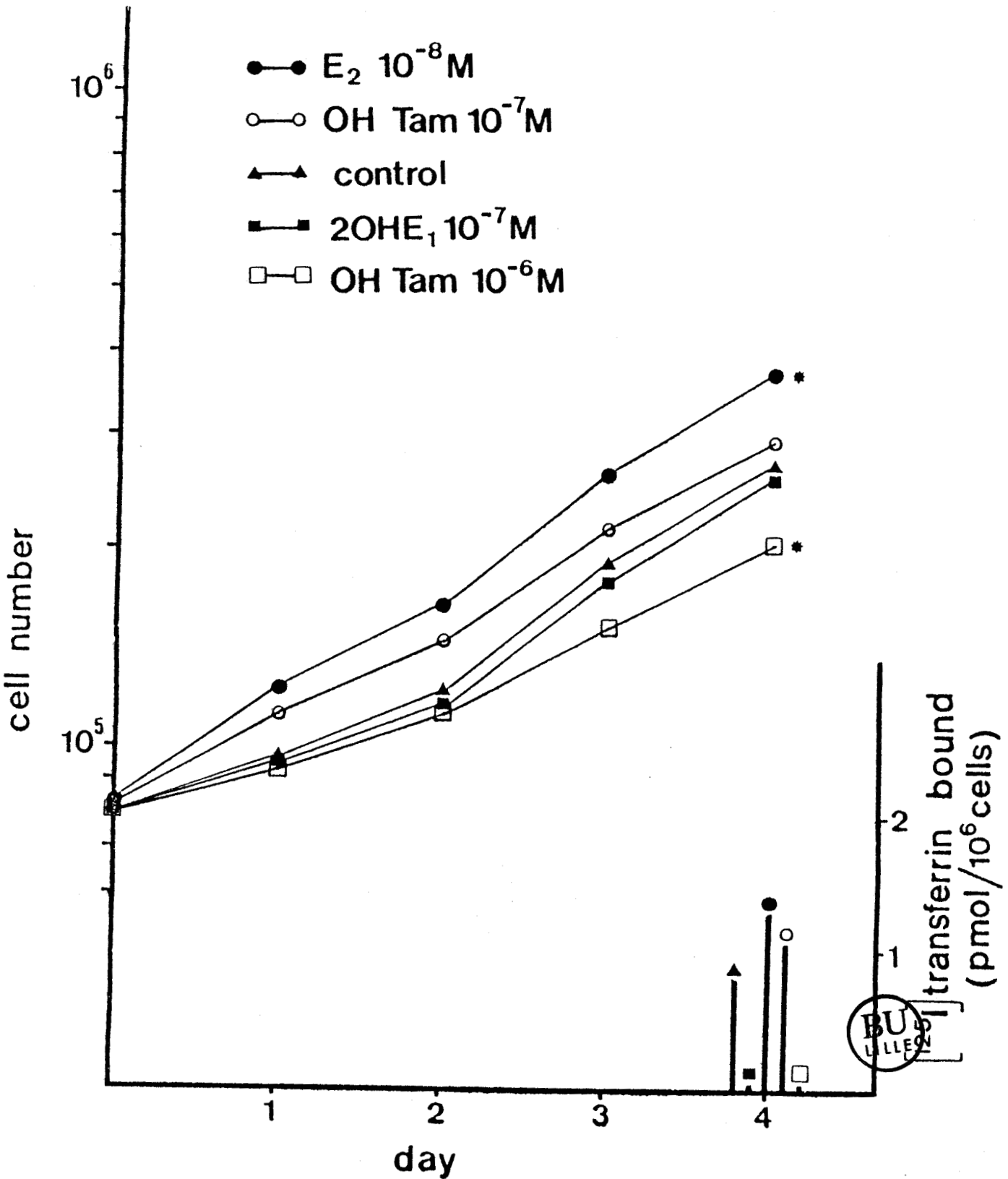


Figure 18 - Cellules VHB-1 cultivées en milieu MEM +5 % SVF - DCC

• Chaque point représente la moyenne de 6 expériences, les écarts entre valeurs sont inférieurs à 10 %

* significativement différent du témoin ($p < 0.05$ test de Cochran)

• Coefficient de corrélation entre nombre de cellules et taux de récepteurs de la transferrine $r = 0.97$ (corrélation positive, test de Spearman, $n=5$)

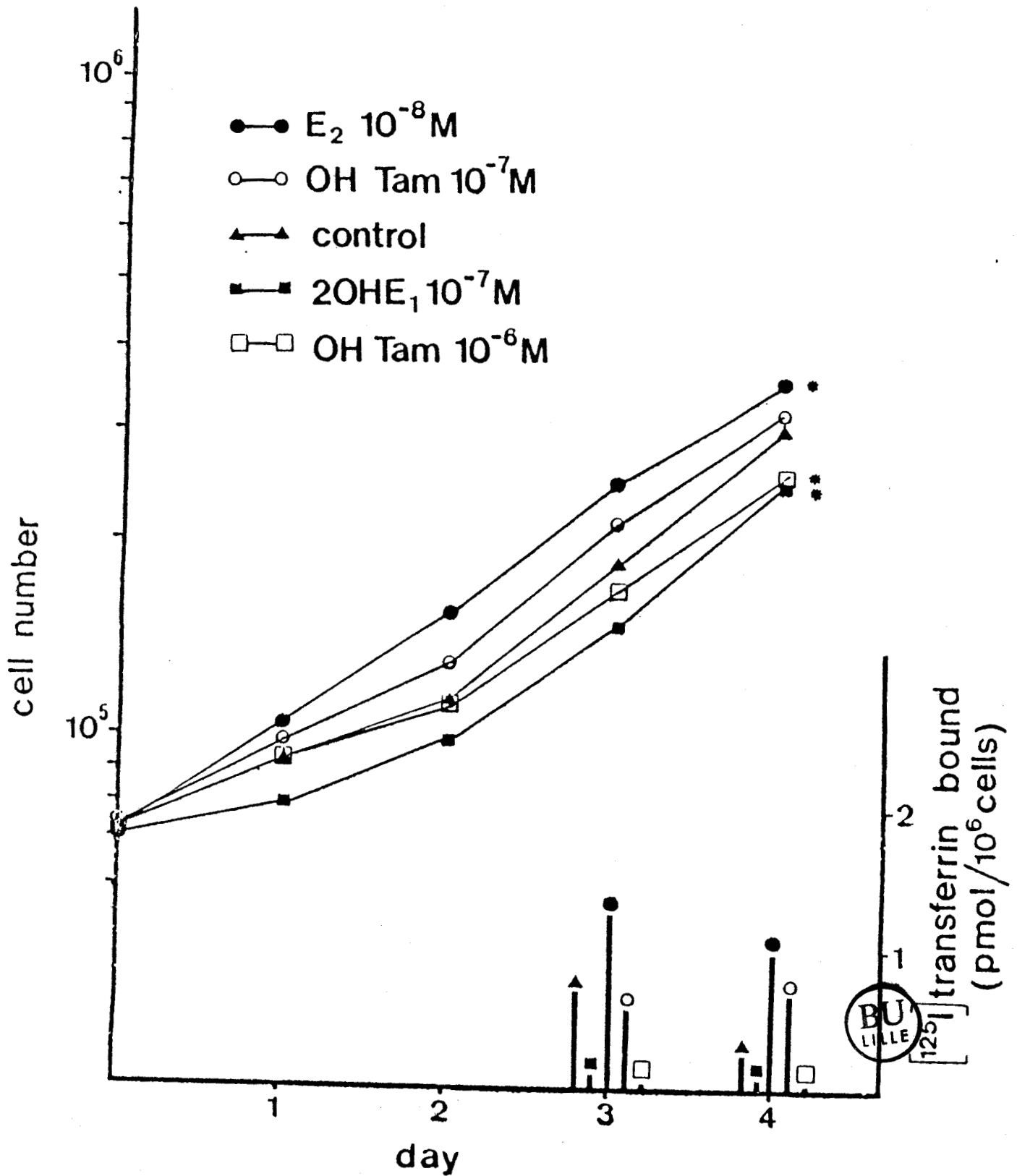


Figure 19 - Cellules MCF-7 cultivées en milieu MEM défini

. Chaque point représente la moyenne de 6 expériences, les écarts entre valeurs sont inférieurs à 10 %

• significativement différent du témoin ($p < 0.05$ test de Cochran)

. Coefficient de corrélation entre nombre de cellules et taux de récepteurs de la transferrine $r = 1$ (corrélation positive, test de Spearman, $n=5$)

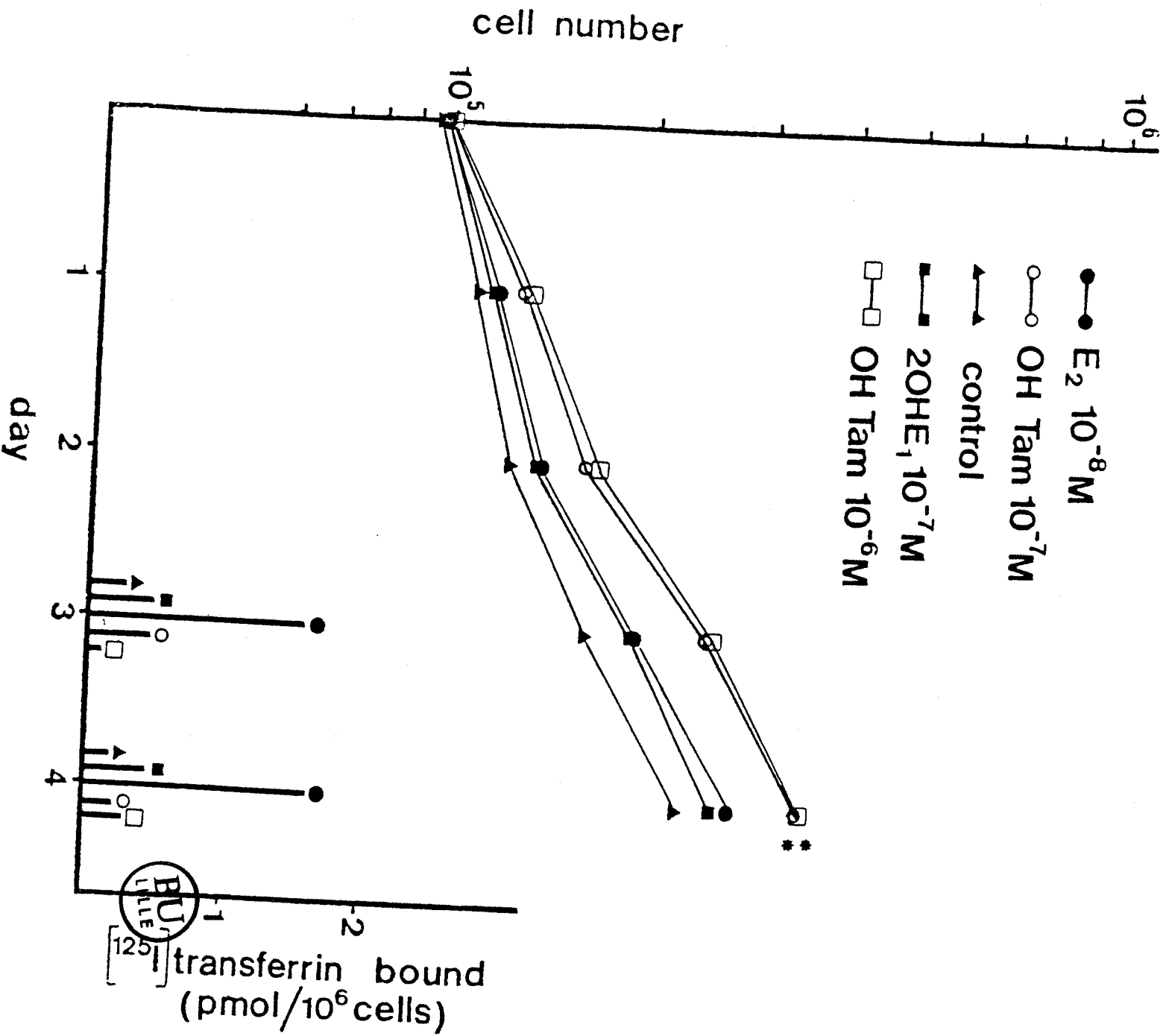


Figure 20 - Cellules MCF-7 cultivées en milieu MEM +5 % SVNN

• Chaque point représente la moyenne de 6 expériences, les écarts entre valeurs sont inférieurs à 10 %

* significativement différent du témoin ($p < 0.05$ test de Cochran)

• Coefficient de corrélation entre nombre de cellules et taux de récepteurs de la transferrine $r = 0.20$ (pas de corrélation, test de Spearman, $n=5$)

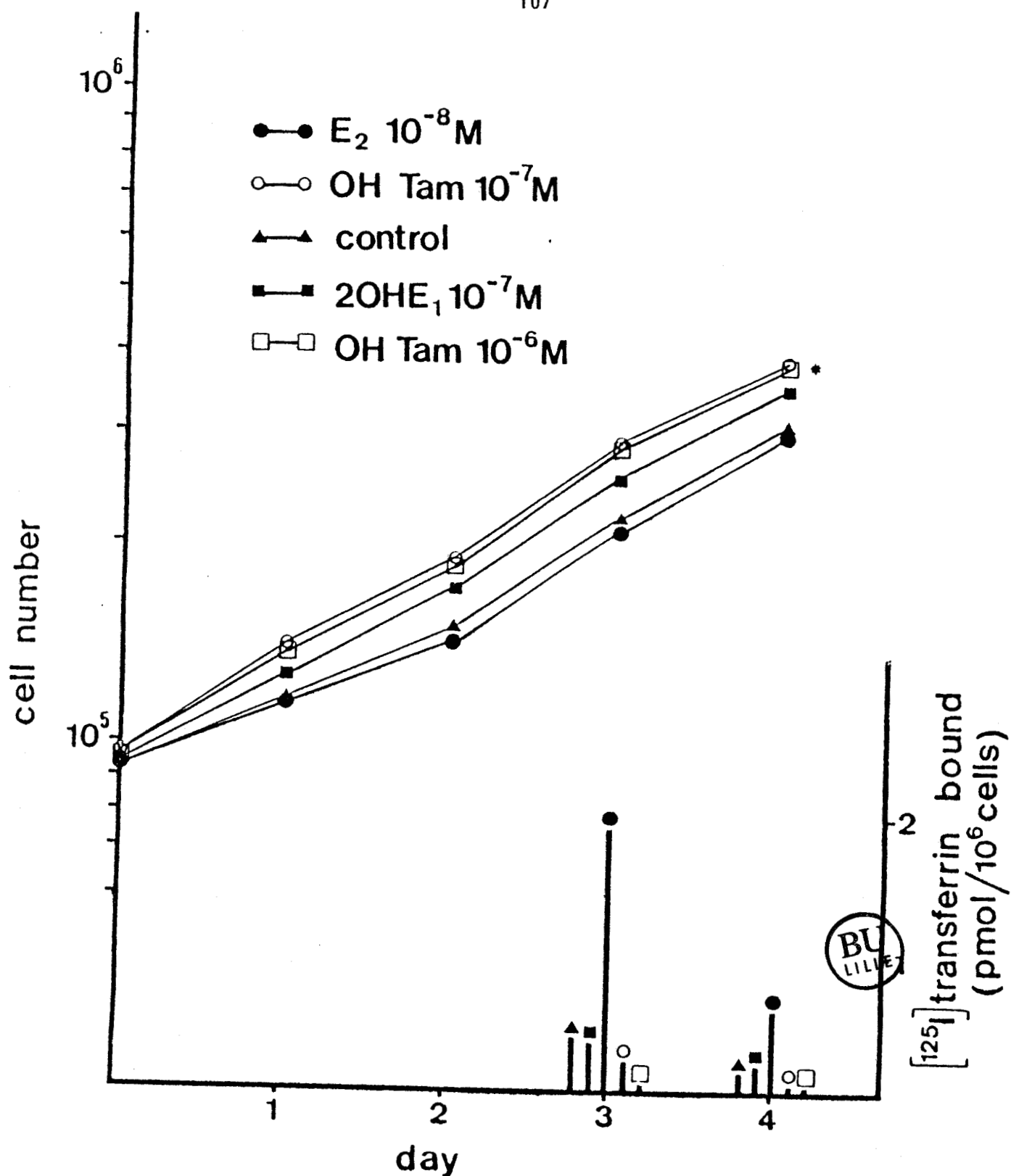


Figure 21 - Cellules MCF-7 cultivées en milieu MEM +5 % SVF - DCC

- Chaque point représente la moyenne de 6 expériences, les écarts entre valeurs sont inférieurs à 10 %
- * significativement différent du témoin ($p < 0.05$ test de Cochran)
- Coefficient de corrélation entre nombre de cellules et taux de récepteurs de la transferrine $r = 0.676$ (pas de corrélation, test de Spearman, $n = 5$)

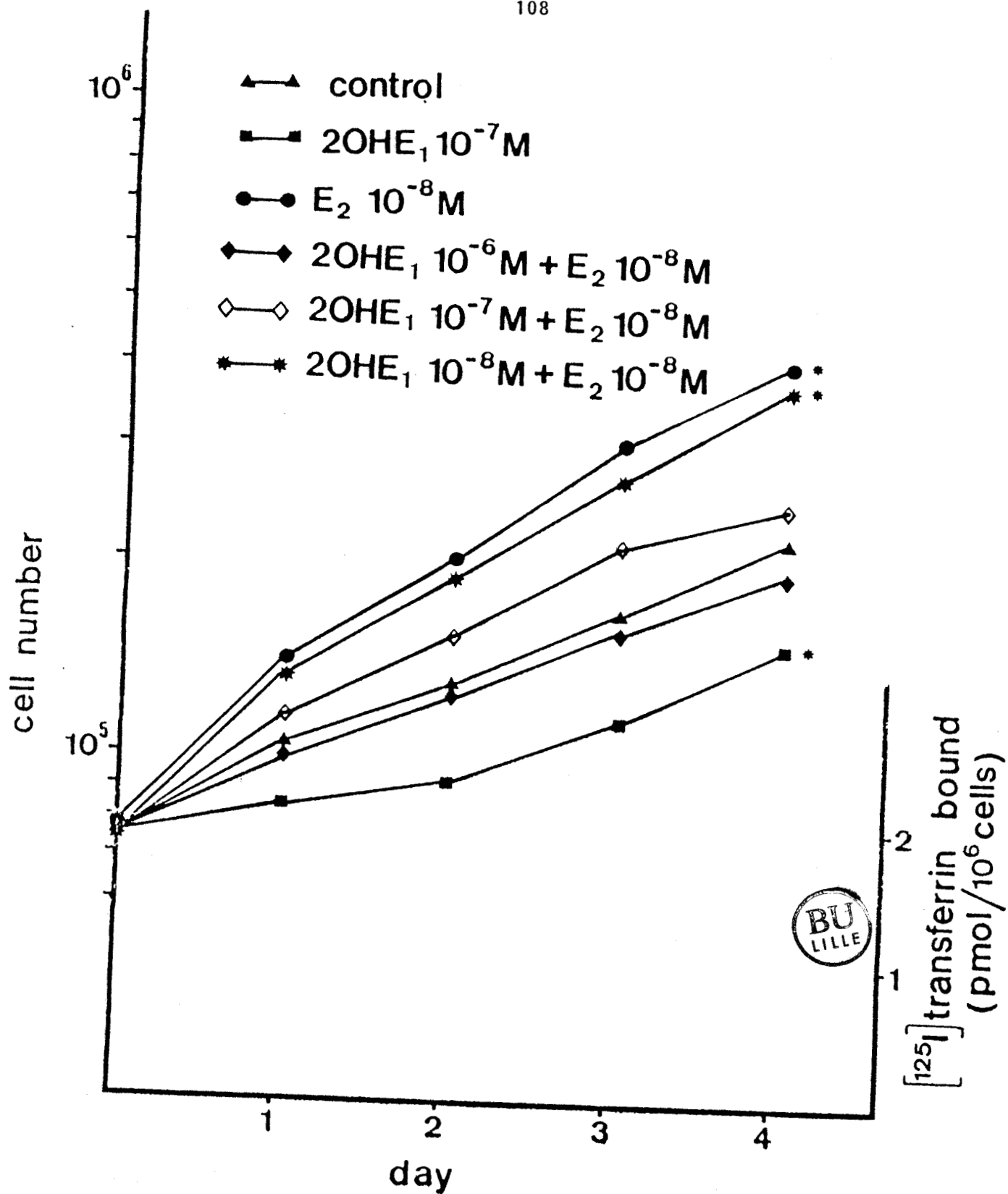


Figure 22 - Cellules VHB-1 cultivées en milieu MEM défini

. Chaque point représente la moyenne de 6 expériences, les écarts entre valeurs sont inférieurs à 10 %

* significativement différent du témoin ($p < 0.05$ test de Cochran)

. Les hormones ont été ajoutées au même temps au jour 0, et sont compétitives

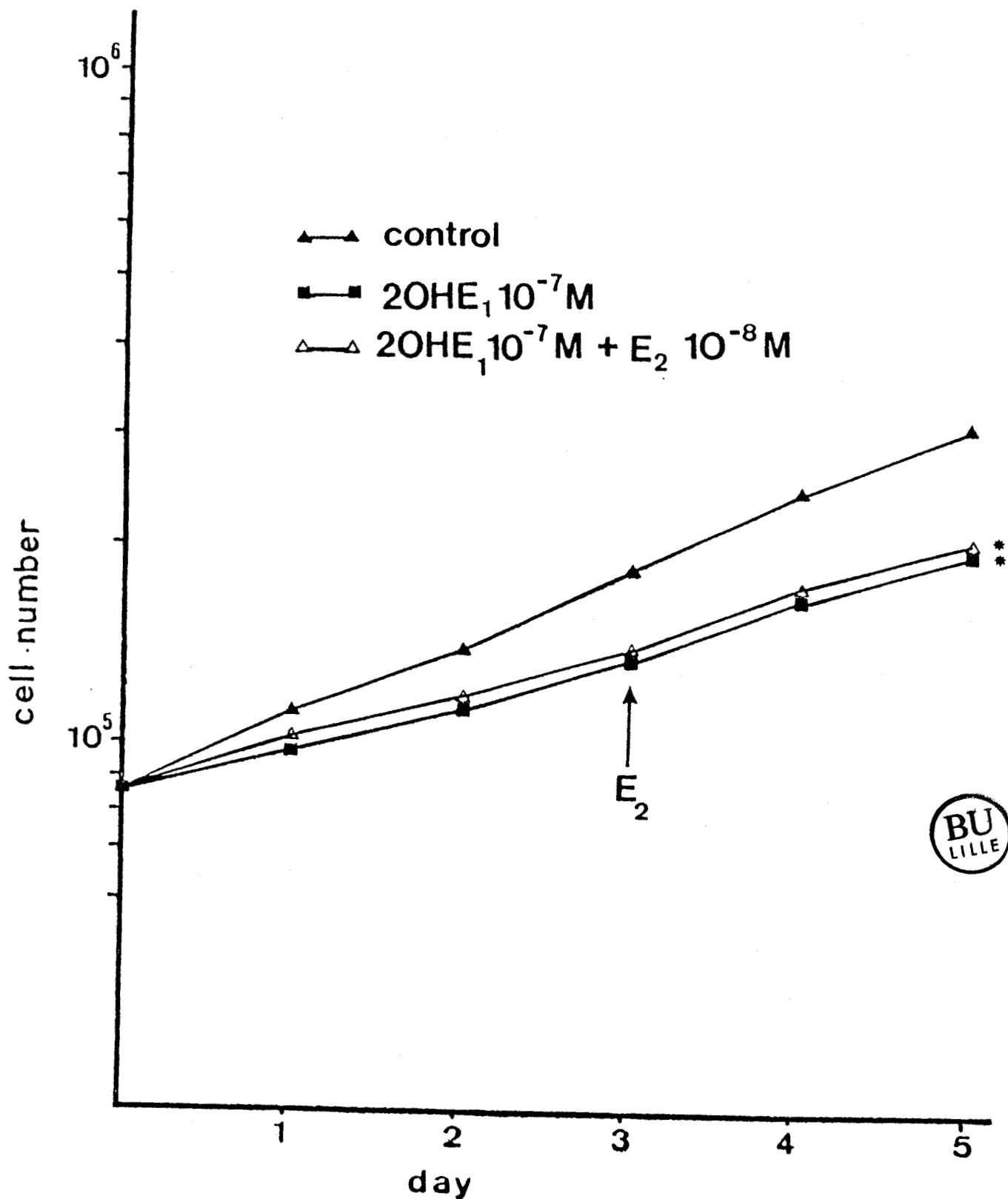


Figure 23 - Cellules VHE-1 cultivées en milieu MEM défini

- Chaque point représente la moyenne de 6 expériences, les écarts entre valeurs sont inférieurs à 10 %
- significativement différent du témoin ($p < 0.05$ test de Cochran)
- E₂ est ajouté au troisième jour de culture et ne peut annuler l'effet de 2OH-E₁ (△—△)

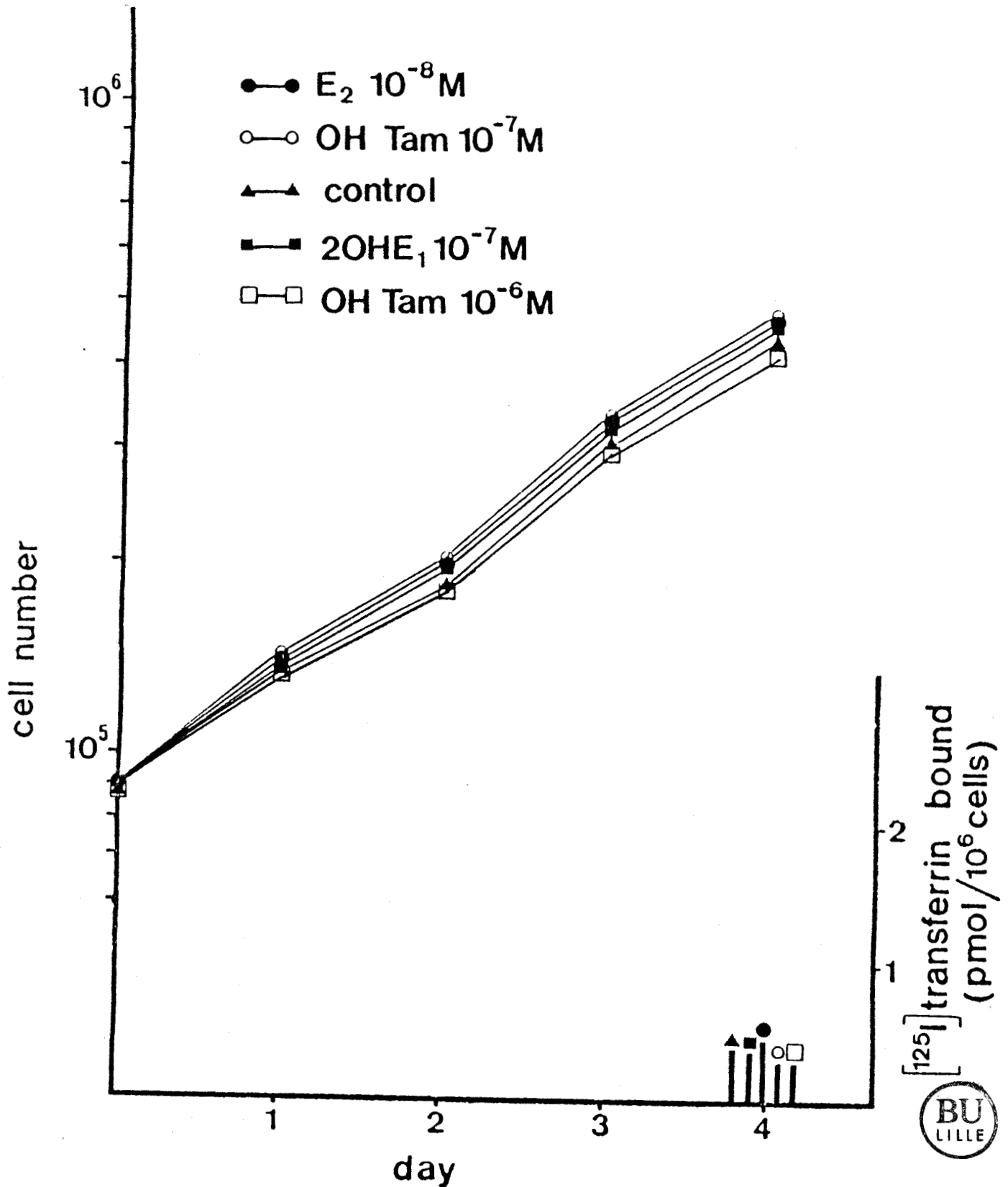


Figure 24 - Cellules MDA-MB231 cultivées en milieu MEM défini

- Chaque point représente la moyenne de 6 expériences, les écarts entre valeurs sont inférieurs à 10 %
- Coefficient de corrélation entre nombre de cellules et taux de récepteurs de la transferrine $r = 0.92$ (corrélation positive, test de Spearman, $n=5$)

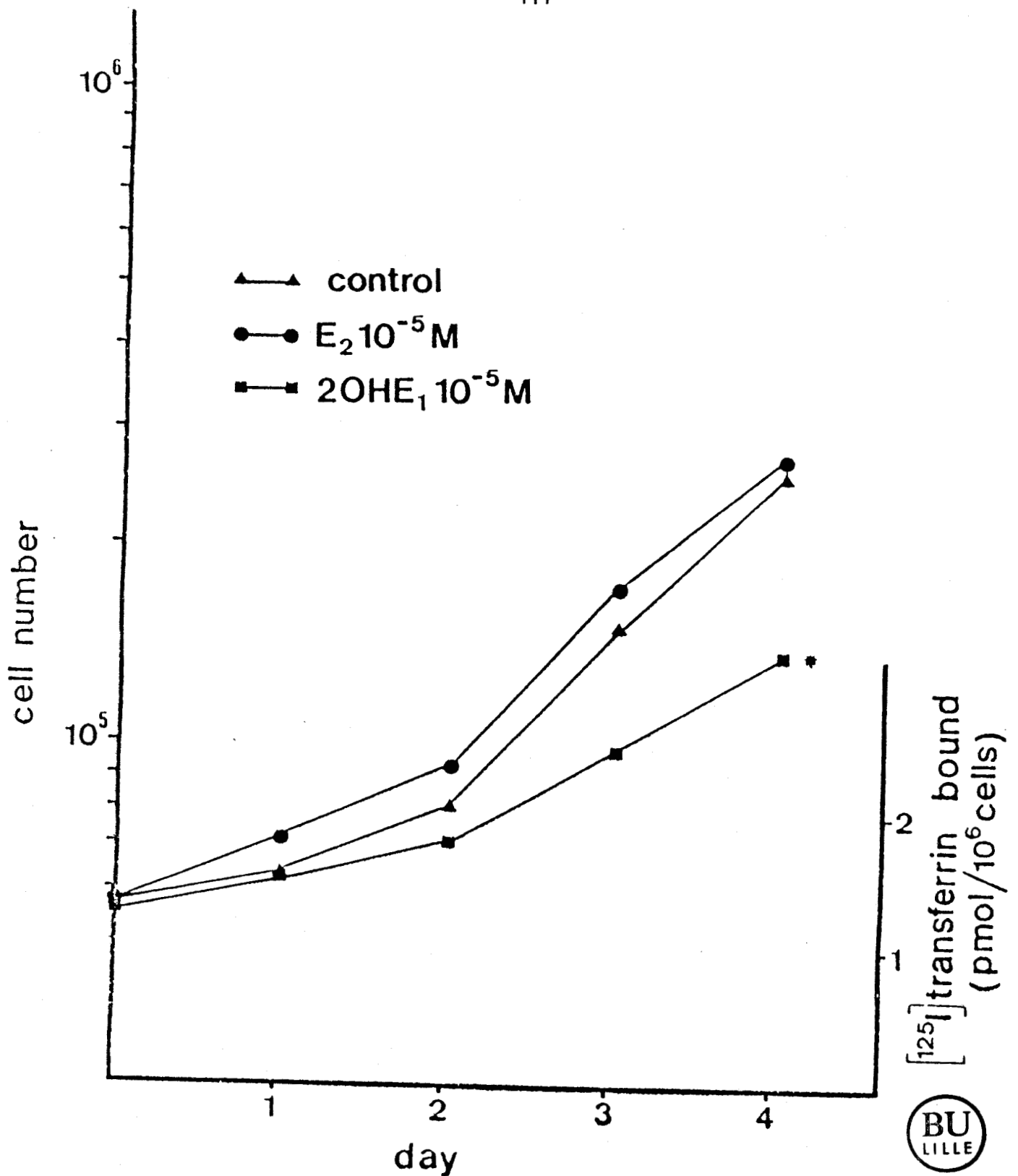


Figure 25 - Cellules MDA-MB231 cultivées en milieu MEM défini

. Chaque point représente la moyenne de 6 expériences, les écarts entre valeurs sont inférieurs à 10 %

* significativement différent du témoin ($p < 0.05$ test de Cochran)

B - EFFET SUR LA DIFFERENCIATION FONCTIONNELLE DES CELLULES

a) Effet sur la stimulation de protéines induites

Les dosages radioimmunologiques d'alpha-lactalbumine et de GCDFP-15 ont été réalisés dans les milieux de culture concentrés 6 fois. Les résultats figurent sur le tableau XIII.

Tableau XIII - Protéines sécrétées (ng/10⁶ cellules)
pendant 72 heures de culture par les cellules hormonosensibles

	Alpha-lactalbumine		GCDFP-15	
	VHB-1	MCF-7	VHB-1	MCF-7
Témoin	0.53 ± 0.11	< 0.100	9.84 ± 1.37	6.55 ± 0.98
E2 10 ⁻⁸ M	0.28 ± 0.07*	indélectable	5.56 ± 0.77*	1.88 ± 0.24*
2OH-E1 10 ⁻⁷ M	0.82 ± 0.10*	0.21 ± 0.03	9.75 ± 1.24	9.42 ± 1.00*
4OH-Tam 10 ⁻⁷ M	0.50 ± 0.14	< 0.100	8.48 ± 1.10	4.00 ± 0.20*
4OH-TAM 10 ⁻⁶ M	1.05 ± 0.20*	< 0.100	9.71 ± 0.56	5.84 ± 0.53

* Significativement différent du témoin (test de Cochran, p<0.05, n=6)

Les résultats mettent en évidence des effets nettement opposés entre E2 et 2OH-E1 ou 4-OH-Tam sur la sécrétion de protéines de différenciation. Les taux de sécrétion d'alpha-lactalbumine sont plus importants et les résultats plus nets dans la lignée VHB-1 que dans la lignée MCF-7. Cependant, dans les deux types cellulaires, E2 diminue et 2OH-E1 augmente significativement les sécrétions. A l'inverse, les taux de sécrétion de GCDFP-15 sont plus importants dans la lignée VHB-1, mais plus significatifs dans la lignée MCF-7. Ils subissent les mêmes variations que les taux d'alpha-lactalbumine : diminution ou augmentation des sécrétions sous stimulation par E2 ou 2OH-E1 respectivement.

b) Effet sur la synthèse du récepteur de la progestérone

Les cellules VHB-1 cultivées dans du milieu exempt de rouge de phénol additionné de 5 % de sérum de veau foetal traité au charbon dextran ont été stimulées au jour J0 par de l'oestradiol 10^{-8} M ou par 2OH-E1 10^{-7} M. Au bout de trois jours de stimulation, un dosage des récepteurs de la progestérone sur les cellules entières a été pratiqué (Tableau XII).

Tableau XII - Induction de la synthèse du récepteur de la progestérone dans les cellules VHB-1

	fmoles fixées par cupule	Cellules par cupule	fmoles fixées par 10^6 cellules
Témoin	177 \pm 13	1 250 000	142 \pm 10,4
E2 10^{-8} M	433 \pm 71	1 700 500	255 \pm 42*
2OH-E1 10^{-7} M	165 \pm 5,3	1 200 000	138 \pm 4,4

* significativement différent du témoin (test de Cochran $p < 0.05$, $n=6$)

Les résultats démontrent, dans ce système, l'absence d'oestrogénicité de 2OH-E1 puisqu'il est incapable d'induire la synthèse du récepteur de la progestérone. Dans des conditions, à peu près analogues, le tamoxifène a par contre la capacité d'induire dans les cellules MCF-7 la synthèse du récepteur de la progestérone (HORWITZ, 1978).

c) Effet sur la synthèse des récepteurs de la prolactine

L'étude a été réalisée sur des cellules VHB-1. Après 3 jours de culture dans le milieu défini additionné de E2 (10^{-8} M) ou de 2OH-E1 (10^{-7} M), une mesure des taux de récepteurs de la prolactine a été effectuée dans la

fraction membranaire des cellules. Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison par rapport à celle du témoin qui est de l'ordre de 12 fmol/mg de protéine pour les récepteurs totaux.

Tableau XIV - Induction du récepteur de la prolactine
dans les cellules VHB-1

	Récepteurs libres	Récepteurs totaux
Témoin	100 %	100 %
E2 (10^{-8} M)	94 \pm 5,2	91 \pm 2,5
2OH-E1 (10^{-7} M)	136 \pm 2	158 \pm 7,5

Les résultats rapportés dans le tableau XIV montrent que l'oestradiol est sans effet sur la synthèse du récepteur de la prolactine tandis que 2OH-E1 l'augmente très significativement.

C - CONCLUSION

En culture, la multiplication des cellules tumorales mammaires hormono-sensibles est nettement influencée par la présence d'oestrogènes dans nos conditions expérimentales en milieu défini. Résultats en opposition avec l'hypothèse du contrôle négatif indirect de la croissance par l'oestradiol proposé par SOTO (1987), pour qui, le seul effet de l'oestradiol serait d'annuler l'inhibition de croissance induite par des facteurs sériques. Il est cependant évident que l'addition, aux milieux de culture, de sérum de veau, qui contient une variété de facteurs de croissance, entraîne des

modifications dans le mode d'action de l'oestradiol, dont les effets deviennent difficilement significatifs, comme en témoignent nos travaux ainsi que les résultats discordants rapportés dans la littérature, en fonction des protocoles utilisés. L'estimation de la croissance cellulaire par la mesure des taux de récepteurs de la transferrine, se révèle être un paramètre intéressant qui rend compte plus fidèlement que la numération des cellules, des activités prolifératives et inhibitrices induites respectivement par l'oestradiol et 2OH-E1 ou les anti-oestrogènes.

La prolifération cellulaire semble s'accompagner d'une diminution de la différenciation fonctionnelle de la cellule puisqu'une baisse des taux de sécrétion d'alpha-lactalbumine et de GCDFP-15 est observée dans les mêmes temps. Les mécanismes régissant ces réactions ne sont pas encore élucidés.

Dans les cellules tumorales mammaires, le métabolite de l'oestradiol, le catécholoestrogène 2OH-E1, a un effet opposé à celui de l'oestradiol. L'antagonisme se manifeste par une diminution de la prolifération cellulaire accompagnée d'une augmentation des sécrétions de protéines de différenciation. Les taux de 2OH-E1, efficaces en culture, sont physiologiques (environ $2 \cdot 10^{-8}$ M) puisqu'une perte de l'ordre de 80 % de la quantité initiale (10^{-7} M) s'effectue dès le premier jour de culture par la méthylation du catéchol en dérivé méthylé inactif.

Les effets différents des deux stéroïdes parents sont encore nets sur la synthèse du récepteur de la progestérone : nos résultats mettent ainsi en évidence l'absence d'oestrogénicité de 2OH-E1 incapable d'induire la synthèse du récepteur de la progestérone. Enfin, des discordances sont encore observées au niveau de la synthèse du récepteur de la prolactine. Des travaux complémentaires sont nécessaires à la compréhension des mécanismes d'actions responsables de ces effets opposés.

DISCUSSION - PERSPECTIVES

L'intérêt de la dualité oestradiol-catécholoestrogène tient au fait que dans les tumeurs du sein, il existe un métabolisme qui semble réguler les taux intratumoraux d'oestradiol. L'enzyme impliquée, la 2-hydroxylase dépendant du P-450, transforme les oestrogènes en catécholoestrogènes, et selon BRUGGEMEIER (1981) et SHIVERICK (1983) ce système enzymatique est régulé par les oestrogènes eux-mêmes, leurs effets étant médiés par les récepteurs des oestrogènes. Le sein possède de plus un système enzymatique responsable de la dégradation des catécholoestrogènes.

Les tumeurs du sein les plus différenciées sont moins capables de métaboliser les catécholoestrogènes que les tumeurs indifférenciées puisqu'elles contiennent des taux plus faibles de COMT : une concentration locale de CE dans certaines tumeurs est donc possible. En ce cas, dans les tumeurs hormonosensibles, 2OH-E1 pourra entrer en compétition avec l'oestradiol pour sa liaison au récepteur et particulièrement au site de faible affinité. Mais à la différence de l'oestradiol, 2OH-E1, est capable de se fixer aussi d'une façon réversible sur des sites microsomaux. L'affinité de 2OH-E1 pour ces sites de nature protéique est du même ordre que celles décrites pour les récepteurs hormonaux classiques (3-8 nM). Ils lient 2OH-E1 de manière spécifique mais des compétiteurs de nature très variée comme les catécholamines, les anti-oestrogènes, les anti-histaminiques H_1 , peuvent déplacer 2OH-E1 de son site de fixation. L'existence de ces sites n'est pas liée à la présence des récepteurs des oestrogènes, cependant nous montrons que les cellules oestrogéno-sensibles en possèdent des quantités plus importantes. Leur distribution cellulaire et leur spécificité présentent des points de convergence avec les sites microsomaux des anti-oestrogènes dont la fonction est encore mal définie. Pour les catécholoestrogènes, le fait qu'au bout de 3 jours de culture sous stimulation par 2OH-E1, l'oestradiol soit incapable d'annuler l'effet de 2OH-E1 et de provoquer une reprise de la

croissance cellulaire, plaide en faveur d'un rôle pour un site autre que le récepteur classique de l'oestradiol, mais faute d'arguments supplémentaires, on peut penser que les sites microsomaux constituent au moins un réservoir capable de lier et par là même protéger 2OH-E1 d'une dégradation rapide par la COMT.

Une tentative d'explication de l'antagonisme entre l'oestradiol et son métabolite peut être recherchée au niveau des réactions moléculaires. Les mécanismes d'action impliquant les oestrogènes dans les phénomènes de croissance et de différenciation des cellules mammaires tumorales sont encore mal compris, mais il est acquis qu'un des premiers maillons de la chaîne d'évènements, au moins en ce qui concerne les cellules hormonodépendantes, soit le récepteur classique des oestrogènes bien que ce ne soit pas forcément l'unique voie possible.

De l'interaction des complexes oestradiol-récepteur sur les gènes spécifiques résulte la formation d'enzymes et protéines spécifiques. Un des premiers effets oestrogéniques pourrait être la stimulation d'une protéine réceptrice, ayant pour l'oestradiol une affinité plus faible que le récepteur classique, dont la fonction serait de moduler la synthèse de protéines impliquées dans la croissance ou la différenciation cellulaire. La synthèse d'un site de faible affinité pour E2 est dans l'utérus de rate corrélée à la prolifération cellulaire. Dans les cellules tumorales mammaires, nous montrons l'existence d'un tel site, 2OH-E1 et E1 étant des compétiteurs plus efficaces de la liaison de E2 au site nucléaire de faible affinité qu'au site de forte affinité. Il est d'ailleurs intéressant de noter que comme 2OH-E1, E1 a des effets inhibiteurs sur la croissance cellulaire (JOZAN, 1978).

Les catécholoestrogènes pourraient, selon KIRCHOFF (1983) avoir dans le noyau de cellules hypothalamiques de rates ovariectomisées et surrénalectomisées une activité intrinsèque réduite, entraînant des modifications de synthèse de protéines induites. Extrapolée aux cellules mammaires en culture, cette hypothèse pourrait rendre compte, par exemple, de l'incapacité de 20H-E1 d'induire la synthèse du récepteur de la progestérone ou de ses effets propres sur l'induction de protéines de différenciation.

Parmi les protéines sécrétées, en réponse à une stimulation oestrogénique, certaines restent localisées dans le cytoplasme (récepteur de la progestérone, protéine 24 Kda), mais d'autres sont sécrétées à l'extérieur de la cellule (protéines 52 Kda et 160 Kda, antichymotrypsine, TGF alpha et bêta, EGF, PS2). Elles peuvent donc agir de façon autocrine ou paracrine sur d'autres cellules et modifier leur croissance. Toutefois le mécanisme par lequel le signal mitogénique du facteur de croissance est transmis à la cellule est encore pratiquement inconnu. On sait que le facteur de croissance se lie à un récepteur de membrane, que cette liaison active une tyrosine-kinase qui est constitutive du récepteur lui-même, la phosphorylation de protéine spécifique activant ou réprimant ensuite une série de gènes. Un modèle parallèle et complémentaire à la régulation de la prolifération cellulaire est lié à l'existence d'inhibiteurs de facteurs de croissance. Ce domaine de recherche est à peine effleuré, cependant des expériences récentes ont permis de montrer qu'une même molécule comme le "transforming growth factor Bêta" (TGF bêta) pouvait être un facteur de croissance pour certaines cellules cibles et inhibiteur pour d'autres (ROBERTS, 1981).

La suite de ce travail devra avoir comme objectif la recherche d'un tel type de facteur inhibiteur répondant à une stimulation par 2OH-E1. Dans les lignées cellulaires issues de cancer du sein des sites récepteurs de haute affinité pour le TGF-bêta viennent d'ailleurs être décrits (KNABBE, 1986).

Le TGF-bêta est détecté aussi bien dans les tissus néoplasiques que dans les tissus sains (ROBERTS, 1983). Il altère la croissance des fibroblastes en culture en prolongeant la période pré-répllicative des cellules quiescentes stimulées par les mutagènes (FROLIK, 1984). Une hypothèse concernant son mode d'action passe aussi par le récepteur de l'EGF qui est une cible sensible à l'action mitogène des facteurs de croissance tels que le PDGF, ou les esters de phorbols. TGF-bêta agirait sur les fibroblastes en réduisant l'affinité des récepteurs de l'EGF et en augmentant le nombre de récepteurs de faible affinité (ASSOIAN, 1984).

La transformation d'une cellule normale en une cellule maligne implique une série de modifications, notamment chromosomiques avec transformation de proto-oncogènes en oncogènes. L'expression génique de certains oncogènes est augmentée dans les lignées cellulaires malignes. Ce fait associé aux découvertes liant les produits protéiques de certains de ces gènes à des facteurs de croissance comme le PDGF, à des récepteurs membranaires comme le récepteur de l'EGF ou à des protéines impliquées dans la transduction membranaire (C-Ha-Ras, C-Fos), semble confirmer l'hypothèse de SACHS (1980), qui suggère que l'origine du processus malin pourrait être due au passage d'un état induit à un état constitutif de l'expression des gènes qui contrôlent la prolifération cellulaire.

Cependant, le fait que certaines tumeurs et leucémies murines et humaines peuvent être amenées à se différencier permet d'évoquer la possibilité que la cellule maligne n'a pas complètement perdu les gènes régulateurs de la pousse et de la différenciation normale et peut dans certaines conditions redevenir normale. Dans la cellule maligne, les gènes qui maintiennent l'équilibre entre prolifération et différenciation demeurent accessibles mais non fonctionnels. Ces gènes doivent néanmoins garder des liens puisqu'il est habituel d'observer, bien que ce ne soit pas systématique, une différenciation cellulaire concomitante à un arrêt de la prolifération : en rétablissant l'équilibre normal prolifération-différenciation, l'arrêt de la prolifération des cellules malignes permet de déclencher la différenciation cellulaire. Processus que nous constatons avec l'induction d'une sécrétion d'alpha-lactalbumine et de GCDFP-15 liée à la baisse de la prolifération cellulaire en réponse à une stimulation par les catécholoestrogènes.

2OH-E1 pourrait aussi favoriser la libération d'un inducteur de différenciation cellulaire. Le mécanisme d'action de ces inducteurs est certainement très complexe car paradoxalement, beaucoup d'entre eux sont aussi connus comme inducteurs tumoraux (les phorbols diesters) ou comme substances cancérogènes ou mutagènes, dont la plupart des drogues antinéoplasiques (Méthotrexate, 5-Azacitidine). Parmi les agents induisant la différenciation, il faut aussi noter les rétinoïdes, le butyrate de sodium, les métabolites de la vitamine D, l'interféron, les télécidines mais leur mécanisme d'action n'est pas élucidé. Des expériences éparses mettent quelquefois en évidence certains aspects de leur mode de fonctionnement : le traitement des cellules MCF-7 par les esters de phorbol provoque par exemple une réduction de la liaison de l'oestradiol sur son récepteur par une augmentation de la phosphorylation de ce dernier sur la sérine et la thréo-

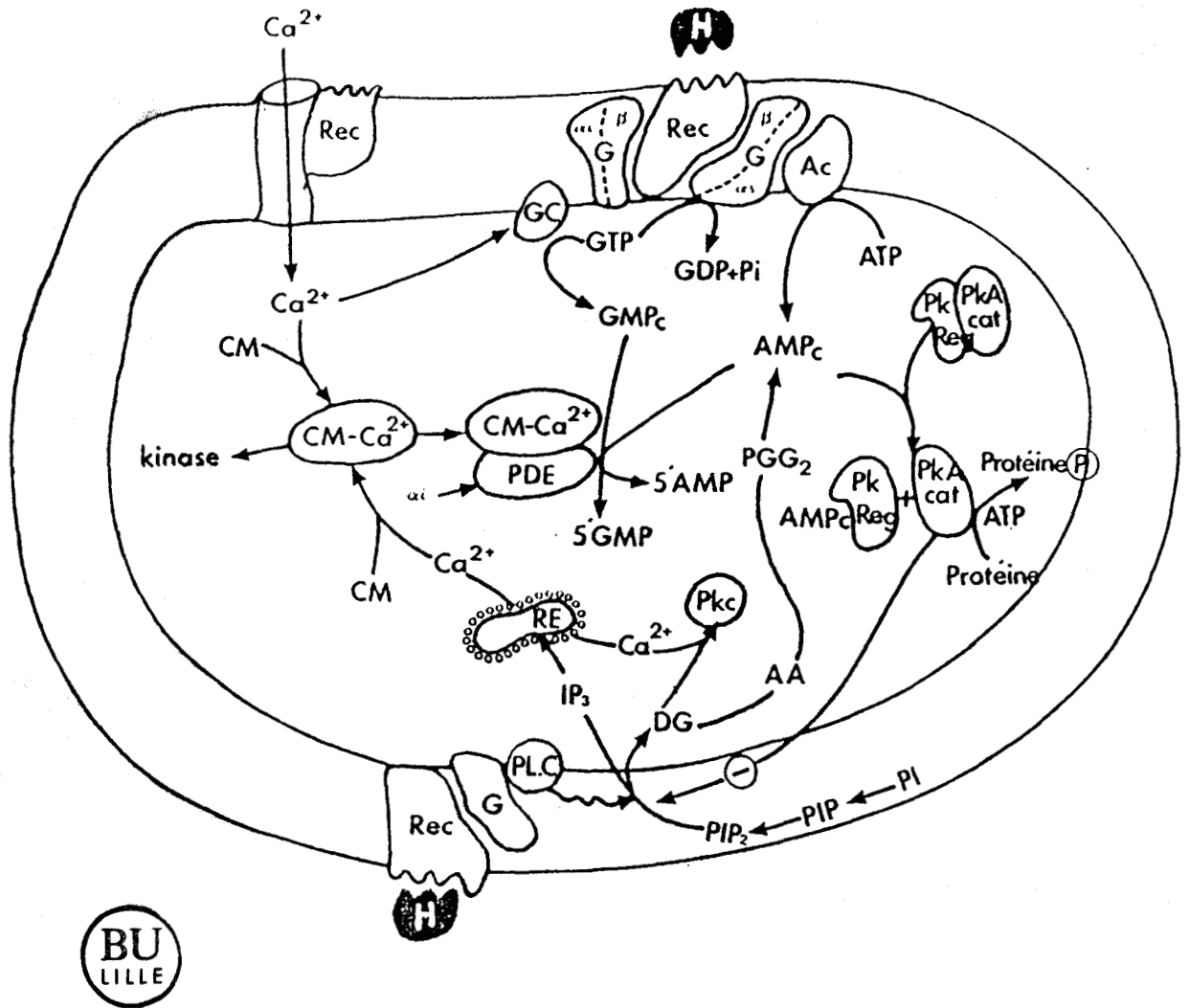


Figure 26 - La liaison de l'hormone au récepteur provoque :

- une activation de l'adényclase (AC) par l'intermédiaire d'une GTPase (G) formées de 2 sous-unités bêta et alpha-s (Gilman, 1973). AC catalyse la formation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) à partir de l'adénosine triphosphate (ATP). Chaque molécule d'AMPC, 2ème messager, active une molécule de protéine-kinase (PKA) qui phosphoryle et donc modifie l'activité de nombreuses molécules protéiques spécifiques de la cellule considérée. L'AMPC est dégradé en 5'AMP par la phosphodiesterase (PDE)
- une activation de la guanylate cyclase (GC) par l'intermédiaire d'une GTPase (G) formées de 2 sous-unités bêta et alpha-i. GC catalyse la formation d'un 2ème messager, le guanosine monophosphate cyclique (GMPc) à partir de la guanosine triphosphate (GTP). G-alpha-i stimule PDE qui hydrolyse GMPc en 5'GMP, et inhibe AC (Gilman, 1984)
- une dégradation du phosphatidylinositol diphosphate (PIP₂) par l'intermédiaire vraisemblablement d'une GTPase, qui active la phospholipase C (PLC). L'hydrolyse de PIP₂ donne naissance à l'inositoltriphosphate (IP₃) et au diacylglycérol (DG). IP₃ permet la libération du calcium du réticulum endoplasmique. Une fois libéré à l'intérieur de la cellule Ca⁺⁺ peut se lier à des protéines spécifiques comme la calmoduline (CM). Le complexe ainsi formé active des protéines kinases spécifiques, qui elles-mêmes phosphorylent des protéines. DG stimule en présence de calcium une protéine-kinase C (PKC). Il semble être impliqué, par sa dégradation en acide arachidonique (AA) et prostaglandine (PGG₂) dans le rétrocontrôle négatif exercé par l'AMPC sur la dégradation de PIP₂ (Nishizuka, 1984c),

nine (HANOVER, 1985). Ce traitement aboutit à une diminution de la proportion de cellules en phase S et à l'apparition de granules de sécrétion (VALETTE, 1987).

Les réactions provoquées par les inducteurs de différenciation s'intègrent sans doute dans un ensemble de mécanismes complexes et beaucoup de questions restent posées : ces produits sont-ils actifs parce qu'ils modifient le promoteur ? parce qu'ils agissent sur un activateur ou au contraire sur un gène suppresseur ? Ont-ils une action sur les facteurs de croissance (comme l'interaction entre les télécidines et le facteur de croissance épidermique (EGF) ?) Enfin peuvent-ils changer l'épissage des ARN messagers ? Si 2OH-E1 induit la formation de tels produits, une de ces hypothèses rendrait peut-être compte de ses effets.

Un autre domaine à ne pas négliger, et qui peut rendre compte, aux fortes concentrations d'hormones et d'anti-hormones d'une inhibition de la croissance des cellules, qu'elles soient hormonosensibles ou insensibles, est lié aux processus de transduction des signaux transmembranaires. Rappelons que le passage dans la cellule de l'information contenue dans les molécules messages est assuré par plusieurs systèmes de transduction (Figure 26), qui semblent être de plus en plus impliqués dans les mécanismes contrôlant la croissance. Parmi ceux-ci, la protéine kinase C découverte par NISHIZUKA (1984a) semble présider aux échanges Na^+/H^+ , responsables du changement transitoire de pH caractérisant les cellules stimulées par les facteurs de croissance. Elle pourrait jouer un rôle important dans la division cellulaire, elle est en effet le site d'action privilégié de certains esters de phorbols connus pour être des agents stimulant la transformation ou la différenciation tumorale des cellules (NISHIZUKA, 1984b). Cette protéine kinase C phosphoryle les récepteurs de la transferrine, de l'EGF, de l'in-

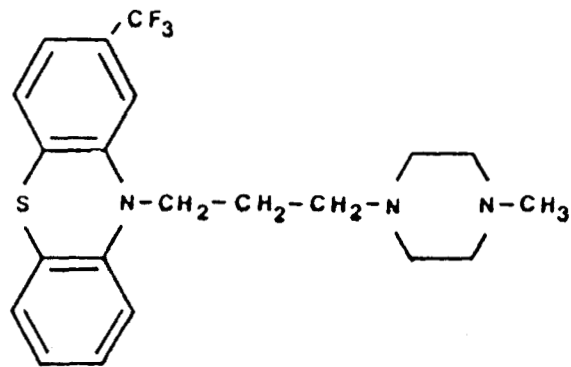


Figure 27 - Trifluoropérazine
(Bêta-agoniste de l'épinéphrine)

suline et des somatomédines sur des sites sérine ou thréonine favorisant ainsi leur internalisation (THOMOPOULOS, 1985). De nombreux facteurs de croissance (EGF, PDGF) stimulent d'ailleurs le métabolisme du phosphatidylinositol. L'oestradiol provoque lui aussi chez la souris une augmentation de 70 % de la protéine-kinase C au niveau des glandes mammaires tandis que le traitement par la progestérone la diminue de 30 % (HOLLADAY, 1986). Une corrélation positive entre l'activité de l'enzyme et le taux des récepteurs de l'oestradiol est ainsi notée dans les lignées cellulaires issues de cancer du sein (FABBRO, 1986).

Curieusement, les cellules MCF-7 transfectées par l'oncogène v-ras (MCF7-ras) ont, comme les cellules MCF-7 stimulées par E2, un "turnover" du phosphatidyl inositol augmenté.

L'AMPC est aussi très impliqué dans les processus de croissance cellulaire. Il en est de même de la calmoduline dont la concentration et la répartition cellulaires subissent des variations en fonction des phases du cycle cellulaire ; ses taux intracellulaires sont deux fois plus élevés en fin de phase G1 et début de phase S ; l'augmentation de la calmoduline à la fin de G1 serait en rapport avec l'augmentation des phosphorylations observées pendant cette période du cycle cellulaire, elle-même reliée à la croissance cellulaire. Dans les cellules transformées, les taux cellulaires sont d'ailleurs plus élevés que dans les cellules normales (CHAFOULEAS, 1981).

Des drogues antipsychotiques de la famille des phénothiazines comme la trifluoropérazine (Figure 27) sont des antagonistes de la calmoduline car elles retardent l'entrée des cellules en phase S (CHAFOULEAS, 1982). Ce sont aussi des bêta agonistes de l'épinéphrine qui bloquent les récepteurs alpha-adrénergiques, et récemment, en raison de quelques analogies structurales avec les phénothiazines, le tamoxifène a été comparé à ces drogues.

Il s'est avéré, aux doses de l'ordre de la micromole, être un inhibiteur compétitif de la liaison du calcium à la calmoduline empêchant ainsi l'activation de la phosphodiesterase, d'où accumulation d'AMPc (LAM, 1984). D'autre part, aux mêmes doses, le tamoxifène, et le trifluoperazine peuvent inhiber l'activité de la protéine-kinase C et l'addition de phospholipides lève cette inhibition, il est donc probable que le tamoxifène inhibe la protéine-kinase C par compétition avec les phospholipides.

Ces études prouvent, qu'aux doses pharmacologiques, les anti-oestrogènes peuvent exercer une action antiproliférative en dehors de tout système récepteur des oestrogènes. Les processus régulant cette action seraient plutôt ceux impliqués dans les mécanismes de traduction de l'information liée aux récepteurs membranaires mettant en jeu toute une série de réactions enzymatiques (SUTHERLAND, 1986).

Aux fortes concentrations, l'action inhibitrice exercée par 2OH-E1 sur la croissance des cellules hormono-insensibles pourrait s'expliquer par ses propriétés de type catéchol, il pourrait moduler l'expression de systèmes enzymatiques variés, notamment la protéine kinase C, puisque 2OH-E1 peut par ses propriétés anti-oxydantes modifier les phospholipides membranaires ou encore l'AMPc, puisque 2OH-E1, comme le trifluoropérazine, est dans certains tissus un bêta-agoniste de l'épinéphrine. Nous allons dans ce sens entreprendre une étude des relations entre 2OH-E1, AMPc et protéines kinase C.

La formation dans les tumeurs du sein, de métabolites de type catéchol, loin de constituer des catabolites inactifs, doit selon nous être considérée comme maillon efficace dans la chaîne des mécanismes hormonaux ou

non, régulant la croissance et la différenciation cellulaires. La compréhension des modes d'action variés de ces molécules, aux propriétés oestrogéniques et catécholaminergiques, ouvre des perspectives intéressantes qui peuvent donc s'intégrer dans plusieurs thèmes de recherches.

Premièrement ceux liés aux mécanismes régulés par les hormones oestrogéniques qui contrôlent via leurs récepteurs spécifiques la libération des facteurs protéiques stimulant ou inhibant la croissance cellulaire ou la libération de facteurs favorisant la différenciation cellulaire.

Deuxièmement ceux liés à l'expression des messagers cellulaires impliqués, eux-aussi par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaires. Cet axe de recherche nous amènera à analyser les fluctuations induites par l'oestradiol et son métabolite, au niveau notamment de l'AMPc et de la protéine kinase C.

L'étude de ces divers mécanismes tendra à mettre en lumière la subtilité des réactions par lesquelles la cellule cancéreuse mammaire semble limiter les effets de l'oestradiol.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABUL-HAJJ YJ.
Binding of catechol estrogens to the estrogen receptor of dimethylbenzanthracene induced rat mammary tumors.
J. STEROID BIOCHEM., 1979a, 13, 83-88.
- ABUL-HAJJ YJ.
Relationship between estrogen receptors, 17 bêta hydroxy-steroid dehydrogenase and estrogen content in human breast cancer.
STEROIDS, 1979b, 34, 217-225.
- ACEVEDO HF. and GOLDZIEHER JW.
The metabolism of estrone ¹⁴C by hypertrophic and carcinomatous human prostate tissue.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 1965, 97, 571-574.
- ACEVEDO HF. and BURJING SC.
The metabolism of 4-¹⁴C-estradiol 17bêta by pheochromocytoma tissue.
STEROIDS, 1965, 6, 531-535.
- ADAMS JB., LI K.
Biosynthesis of 17-bêta-oestradiol in human breast carcinoma tissue and a novel method for its characterization.
BR. J. CANCER, 1975, 31, 429-433.
- ADASHI EU., RAHOFF J., DIVERS W., FISHMAN J. and YEN SSC.
The effects of acutely administered 2-hydroxyestrone on the release of gonadotropins and prolactin before and after estrogen priming in hypogonadal women.
LIFE SCI., 1979, 25, 2051-2055.
- AITKEN SC. and LIPPMAN ME.
Hormonal regulation of net DNA synthesis in MCF-7 human breast cancer cells in tissue culture.
CANCER RES., 1982, 42, 1727-1735.
- ALBINI A., GRAF JO., KITTEN T., KLEINMAN HK., MARTIN GR., VEILLETE A. and LIPPMAN ME.
Estrogen and v-ras transfection regulate the interactions of MCF-7 breast cancer cell to basement membrane.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1986, 83, 8182-8187.
- ALLEGRA JC. and LIPPMAN
Growth of a human breast cancer cell in serum free hormone supplemental medium.
CANCER RES., 1978, 38, 3823-3828.
- ANDERSON JN., CLARK JH. and PECK EJ.
The relationship between nuclear receptor-estrogen binding and uterotrophic responses.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 1972, 48, 1460-1466.
- ASSICOT M., CONTESSO G. and BOHUON C.
Catechol-o-methyltransferase in human breast cancers.
EUR. J. CANCER, 1977, 13, 961-966.

- ASSOIAN RK., GROTEAST GR., MULLER DM. and SPORN MB.
Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets.
NATURE, 1984, 309, 804-806.
- AURICCHIO F., MIGLIACCIO A., CASTORIA G., ROTONDI A., DI-DOMENICO M. and PAGANO M.
Activation-inactivation of hormone binding sites of the oestradiol-17 bêta receptor is a multiregulated process.
J. STEROID BIOCHEM., 1986, 24, 39-43.
- AXELROD LR. and GOLDZIEHER JW.
The polycystic ovary. V. Alternate pathways of steroid aromatization in normal, pregnancy and polycystic ovaries.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1965, 25, 1275-1278.
- BALL P., KNUPPEN R. and BRENER H.
Kinetic properties of a soluble catechol-o-methyltransferase of human liver.
EUR. J. BIOCHEM., 1972, 26, 560-569.
- BALL P. and KNUPPEN R.
Metabolism of estradiol-17 bêta in the human uterus in vitro.
ACTA ENDOCRINOL., 1973, suppl. 173-3.
- BALL P., HOPPEN HO. and KNUPPEN R.
Metabolism of oestradiol-17bêta and 2-hydroxyoestradiol-17bêta in rat liver slices.
Z. PHYSIOL. CHEM., 1974, 355, 1451-1454.
- BALL P., GALBKE HP. and KNUPPEN R.
The excretion of 2-hydroxyestrone during the menstrual cycle.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1975, 40, 406-408.
- BALL P., FARTHMAN E. and KNUPPEN R.
Comparative studies on the metabolism of oestradiol-17 bêta and 2-hydroxy-oestradiol-17 bêta in man in vivo.
J. STEROID BIOCHEM., 1976, 139, 7-15.
- BALL P. and KNUPPEN R.
Catecholestrogens (2- and 4-hydroxyestrogens). Chemistry, biogenesis, metabolism occurrence and physiological significance.
ACTA ENDOCR. COPENH., 1980, 93, suppl. 233, 1-127.
- BARBIERI RL., CARICK JA. and RYON KJ.
Estrogen 2-hydroxylase activity in rat tissues.
STEROIDS 1978, 32, 529-534.
- BARNEA ER., MACHISHY NJ. and NAFTALIN F.
Kinetics of catechol-estrogen receptor dissociation : a possible factor underlying differences in catechol-estrogen biological activity.
STEROIDS 1984, 41, 643-656.
- BARRACK ER. and COFFEY DS.
The role of the nuclear matrix in steroid hormone action.
Biochemical actions of hormones.
G. LITWACK Ed., 1983, Vol. 10, pp. 23-90, NY Academic.

- BASSLER R.
The morphology of hormone induced structural changes in female breast.
CURR. TOPICS PATHOL., 1970, 53, 1-89.
- BECK JS. and GOREN HJ.
Simulation of association curves and "Scatchard" plat of binding reactions where ligand and receptor are degraded or internalized.
J. RECEPT. RES., 1983, 3, 561-577.
- BEN-BARUCH G., SCHRIEBER G. and SOHOLOVSKY M.
Cooperativity pattern in the interaction of the anti-oestrogen drug domiphere with the muscarinic receptors.
MOL. PHARMACOL., 1982, 21, 287-293.
- BERTHOIS Y., KATZENELLENBOGEN JA. and KATZENELLENBOGEN BS.
Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen : implications concerning the study of estrogen responsive cells in culture.
PROC. NATL. ACAD. SCI., 1986, 83, 2496-2500.
- BISHOP JM.
Oncogènes as hormone receptors.
NATURE, 1986, 321, 112-113.
- BLOOM HJG. and RICHARDSON WW.
Histological grading and prognosis in breast cancer, a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years.
BR. J. CANCER, 1957, 11, 359-362.
- BODWIN JS., CLAIR T. and CHO-CHUNG YS.
Inverse relation between estrogen receptor and cyclic adenase 3'-5' monophosphatase binding proteins in hormone-dependent mammary tumor regression due to dibutyryl cyclic adenosine 3'5'- monophosphate treatment or ovariectomy.
CANCER RES., 1978, 38, 3410-3413.
- BOMFORD AB. and MUNRO HN.
Transferrin and its receptor : their roles in cell function.
HEPATOLOGY, 1985, 5, 870-875.
- BONNEY RC., REED MJ., DAVIDSON K., BERANEK PA. and JAMES VHT.
The relationship between 17-bêta hydroxy-steroid dehydrogenase activity and oestrogen concentrations in human breast tumours and in normal breast tissue.
CLIN. ENDOCRINOL., 1983, 19, 727-739.
- BRADLOW HL., HERSHCOPF RJ., MARTUCCI CP. and FISHMAN J.
Estradiol 16-alpha-hydroxylation in the mouse correlates with mammary tumor incidence and presence of mutine mammary tumor virus : a possible model for the hormonal etiology of breast in humans.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1985, 82, 6295-6299.
- BRANDES LJ.
A diphenylmethane derivative selective for the anti-estrogen binding site may help to define its biological role.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN, 1984, 124, 244-249.

- BRANDES LJ. and HERMONAT MW.
A diphenylmethane derivative specific for the anti-estrogen binding site found in rat liver microsomes.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN, 1984b, 123, 724-728.
- BRANDES LJ., Mc DONALD LM. and BOGDNOVIC
Evidence that the anti-estrogen binding site is a histamine or histamine-like receptor.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN, 1985, 126, 905-910.
- BRAUNSBURG H. and HAMMOND K.
Practical and theoretical aspects in the analysis of steroid receptors.
J. STEROID BIOCHEM., 1980, 13, 1133-1145.
- BRIAND P. and LYKKESFELDT AE.
Effect of estrogen and anti-estrogen on the human breast cancer cell line MCF-7 adapted to growth at low serum concentration.
CANCER RES., 1984, 44, 1114-1119.
- BRONZERT D., SILVERMAN S., LIPPMAN M.
Estrogen inhibition of a Mr 39 000 glycoprotein secreted by human breast cancer cells.
CANCER RES., 1987, 47, 1234-1238.
- BROWN JJ. and JELLINER PH.
Factors affecting the activity of oestradiol hydroxylase in rat liver microsomal subfractions.
BIOCHEM. J., 1971, 124, 91-97.
- BRUGGEMEIR RW.
Kinetics of rat liver microsomal estrogen-2-hydroxylase. Evidence for sex differences at initial velocity conditions.
J. BIOL. CHEM., 1981, 256, 10239-10243.
- BURCH JBE. and WEINTRAUB H.
Temporal order of chromatin structural changes associated with activation of the major chicken vitellogenin gene.
CELL, 1983, 33, 65-76.
- BUTLER WB., KIRKLAND WL. and JORGENSEN TL.
Induction of plasminogen activator by estrogen in a human breast cancer cell line MCF-7.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN 1979, 90, 1328-1334.
- BUTLER WB., KELSEY WH. and GORAN N.
Effects of serum and insulin on the sensitivity of the human breast cancer cell line MCF-7 to estrogen and anti-estrogens.
CANCER RES., 1981, 41, 82-88.
- CAILLEAU R., YOUNG R., OLIVE M. and REEVES WJ.
Breast tumor cell lines from pleural effusions.
J. NATL. CANCER INST., 1974, 53, 661-674.
- CASTRACANE VD. and JORDAN VC.
Consideration into the mechanisms of estrogen stimulated prostaglandin synthesis.
PROSTAGLANDINS, 1976, 12, 243-251.

- CATELLI MG., BINART N., JUNG-TESTAS I., RENOIR JM., BAULIEU EE., FERAMISCO JR. and WELCH WJ.
The common 90 Kd protein component of non-transformed "8S" steroid receptors is a heat shock protein.
EMBO J., 1985, 4, 3131-3135.
- CEDARD L. and KNUPPEN R.
6-alpha hydroxylation in human placenta perfusion.
STEROIDS, 1965, 6, 307-310.
- CERIANI RL., CONTESSO GP., NATAF BM.
Hormone requirement for growth and differentiation of the human mammary gland in organ culture.
CANCER RES., 1972, 32, 2190-2196.
- CHAFOULEAS JG., PARDUE RL., BRINKLEY BR., DEDMAN JR. and MEANS AR.
Regulation of intracellular levels of calmodulin and tubulin in normal and transformed cells.
PROC. NAT. ACAD. SCI. USA, 1981, 78, 996-1000.
- CHAFOULEAS JG., BOLTON WE., HIDAKA H., BOYD AE. and MEANS AR.
Calmodulin and the cell cycle : involvement in regulation of cell-cycle progression.
CELL, 1982, 28, 41-50.
- CHALBOS D., VIGNON F., KEVDAR I. and ROCHEFORT H.
Estrogens stimulate cell proliferation and induce secretory proteins in a human breast cancer cell line (T47-D).
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1982, 55, 276-283.
- CHO-CHUNG YS. and REDLER BH.
Dibutyryl cyclic AMP mimics ovariectomy : nuclear protein phosphorylation in mammary tumor regression.
SCIENCE, 1977, 197, 272-275.
- CHO-CHUNG YS., CLAIR T. and PORPER R.
Cyclic AMP binding proteins and protein kinase during regression of walker 256 mammary carcinoma.
J. BIOL. CHEM., 1977, 252, 6342-6348.
- CHO-CHUNG YS.
On the interaction of cyclic AMP binding protein and estrogen receptor in growth control.
LIFE SCI., 1979, 24, 1231-1240.
- CHO-CHUNG YS.
Cyclic AMP and its receptor protein in tumor growth regulation in vivo.
J. CYCLIC NUCLEOTIDE RES., 1980, 6, 163-177.
- CHO-CHUNG YS. and HUANG FL.
In "Advances in gene technology : human genetic disorders"
F. Ahamad., S. Blade, J. Schultz, WA. Scott, WJ. Welam Eds.
ICSU Press, Miami, 1984, pp. 142-143.

- CHOUVET C. and SAEZ S.
High affinity cytosol binding site(s) for anti-oestrogens in two human breast cancer cell lines and in biopsy specimens devoid of estrogen receptors.
J. STEROID BIOCHEM., 1984, 21, 755-761.
- CHUKNYISHA RS. and ROTH GS.
Decreased estrogenic stimulation of RNA polymerase II in aged rat uteri is apparently due to reduced nuclear binding of receptor-oestradiol complexes.
J. BIOL. CHEM., 1985, 260, 8661-8663.
- CIOCCA DR., ADAMS DJ., EDWARDS DP., BJERCKE RJ. and Mc GUIRE WL.
Distribution of an estrogen induced protein with a molecular weight of 24 000 in normal and malignant human tissues and cells.
CANCER RES., 1983, 43, 1204-1210.
- CLARKE IJ. and FINDLAY JK.
Catechol-estrogens and gonadotrophin secretion in the liver : affinity for pituitary estrogen receptors in vitro and action on gonadotrophin secretion in vivo.
J. ENDOCRINOL., 1981, 85, 503-509.
- CLARK CR.
The cellular distribution of steroid hormone receptors : have we got it right ?
TRENDS BIOCHEM. SCI., 1984, 9, 207-208.
- CLARK JH., PASZKO Z. and PECK E.
Nuclear binding and retention of the receptor estrogen complex : relation to the agonistic and antagonistic properties of estriol.
ENDOCRINOLOGY, 1977, 100, 91-96.
- CLARK JH. and PECK EJ.
Nuclear retention of receptor oestrogen complex and nuclear acceptor sites.
NATURE, 1976, 260, 635-637.
- CLARK JH. and MARKAVERICH BM.
Heterogeneity of estrogen binding and the nuclear matrix.
In : The nuclear envelope and the nuclear matrix.
GG. Maul Ed., Wistar Symposium series, Vol 2, 1981, pp. 259-269.
- CLARK JH., WILLIAMS M., UPCHURCH S., ERIKSSON H., HELTON E. and MARKAVERICH BM.
Effects of estradiol-17 alpha on nuclear denpancy of estrogen receptor, stimulation of nuclear type II sites and uterine growth.
J. STEROID BIOCHEM., 1982, 16, 323-328.
- CLARK JH., WINNEKER RC. and MARKAVERICH BM.
Estrogen and anti-estrogen binding sites : relation to the estrogen receptor and biological response.
In : Biochemical actions of hormones.
G. LITWACK Ed., Vol XII, 1985, pp. 353-383.

- CLARK JH.
An endogenous ligand for type II binding sites in normal and neoplastic tissues.
ADV. EXP. MED. BIOL., 1986, 196, 305-315.
- COLLINS DC., WILLIAMS KIH. and LAYNE DS.
Metabolism of radioactive estrone and estradiol by golden hamster.
ENDOCRINOLOGY, 1967, 80, 893-896.
- CUATRECASAS P.
Membrane receptors
ANN. REV. BIOCHEM., 1974, 43, 169-214.
- DARKE P., YATES J., CURTIS S. and KING RJ.
Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture.
CANCER RES., 1983, 43, 349-354.
- DAVIES IJ., NAFTOLIN F., RYAN KJ., FISHMAN J. and SIU J.
The affinity of catechol-estrogens for estrogen receptors in the pituitary and anterior hypothalamus of the rat.
ENDOCRINOLOGY, 1975, 97, 554-557.
- DEHENNIN L., BLACKER C., REIFFSTECK A. and SCHOLLER R.
Estrogen 2-, 4-, 6- or 16-hydroxylation by human follicles shown by gas chromatography mass spectrometry associated with stable isotope dilution.
J. STEROID BIOCHEM., 1984, 20, 465-471.
- DE MEYTS P.
Cooperative properties of hormone receptors in cell membranes.
J. SUPRAMOL. STRUCT., 1976, 4, 241-258.
- DICZFALUSY E. and MANCUSO S.
Oestrogen metabolism in pregnancy.
In : "Foetus and placenta"
A. KLOPPER and DICZFALUSY E. Eds. Blackwell Scientific, Oxford, 1969, Chap. 5.
- DICKSON RB., Mc MANAWAY ME. and LIPPMAN ME.
Estrogen-induced factors of breast cancer cells partially replaces estrogen to promote tumor growth.
SCIENCE, 1986a, 232, 1540-1543.
- DICKSON RB., BATES SE., Mc MANAWAY ME. and LIPPMAN ME.
Characterization of estrogen responsive transforming activity in human breast cancer cell lines.
CANCER RES., 1986b, 46, 1707-1713.
- DICKSON RB., LIPPMAN ME.
Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma.
ENDOCR. REV., 1987a, 8, 29-42.
- DICKSON RB., KASID A., HUFF KK., BATES SE., KNABBE C., BRONZERT D., GELMAN EL. and LIPPMAN ME.
Activation of growth factor secretion in tumorigenic states of breast cancer induced by 17 beta-estradiol or V-Ha-ras oncogene.
PROC. NATL. ACAD. SCI., 1987b, 84, 837-841.

- DUNN JF., MERRIAM GR., EIL G., KANO S., LORIAUX DL. and NISUBA BC.
Testosterone-estradiol binding globulin binds 2-methoxy-estradiol with greater affinity than to testosterone.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1981, 51, 404-406.
- ECKERT RL. and KATZENELLENBOGEN BS.
Physical properties of estrogen receptor complexes in MCF-7 human breast cancer cells : differences with anti-estrogen and estrogen.
J. BIOL. CHEM., 1982, 257, 8840-8844.
- EDERY M., GOUSSARD J., DEHENNIN L., SCHOLLER R., REIFFSTECK J., DROSDOWSKY MA.
Endogenous oestradiol-17 bêta concentration in breast tumours determined by mass fragmentography and by radioimmunoassay : relationship to receptor content.
EUR. J. CANCER, 1981, 17, 115-120.
- EDWARDS DP., MURTHY SR. and Mc GUIRE WL.
Effects of estrogen and anti-estrogen on DNA polymerase in human breast cancer.
CANCER RES., 1980, 40, 1722-1726.
- EDWARDS DP., ADAMS DJ., SAVAGE N. and Mc GUIRE WL.
Estrogen induced synthesis of specific proteins in human breast cancer cells.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN, 1980, 93, 804-812.
- EISINGER M. and MARKO O.
Selective proliferation of normal human melanocytes "in vitro" in the presence of phorbol ester and cholera toxin.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1982, 79, 2018-2022.
- ELLIS RW., DE FEO D., SHIH TY., GONDA MA., YOUNG HA., TSUCHIDA N., LOWRY DR. and SCOLNICK EM.
The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate.
NATURE, 1981, 292, 506-511.
- ETCHEGOYEN GS., CARDINALI DP., PEREZ AE., TAMAYO J. and PEREZ-PALACIOS G.
Binding and effects of catecholestrogens on adenylate cyclase activity, and adenoreceptors, benzodiazepine and GABA receptors in guinea-pig hypothalamic membranes.
EUR. J. PHARMACOL., 1986, 129, 1-10.
- EVANS E., BASKEVITCH PP. and ROCHEFORT H.
Estrogen receptor DNA interaction : differences between activation by estrogen and anti-estrogen.
EUR. J. BIOCHEM., 1982, 128, 185-190.
- FABBRIO D., KUNG W., ROOS W., REGAZZI R. and EPPENBERGER U.
Epidermal growth factor binding and protein kinase C activities in human breast cancer cell lines : possible quantitative relationship.
CANCER RES., 1986, 46, 2720-2725.

- FAYE JC., LASSERE B. and BAYARD F.
Anti-estrogen specific high affinity saturable binding sites in rat uterine cytosol.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN, 1980, 93, 1225-1231.
- FAYE JC., JOZAN S., REDEUILH G., BAULIEU EE. and BAYARD F.
Physicochemical and genetic evidence for specific anti-estrogen binding sites.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1983, 80, 3158-3162.
- FINLAY TH., KATZ J., RASUMS A., SEILER S. and LEVITS M.
Estrogen stimulated uptake of alpha-1 protease inhibitor and other plasma proteins by the mouse uterus.
ENDOCRINOLOGY, 1981, 108, 2129-2135.
- FISHMAN J., BRADLOW HL. and GALLAGHER TF.
Oxidative metabolism of estradiol.
J. BIOL. CHEM., 1960, 235, 3104-3107.
- FISHMAN J., COX RJ. and GALLAGHER TF.
2-hydroxyestrone : a new metabolite of estradiol in man.
ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS., 1960, 90, 318-319.
- FISHMAN J., BRADLOW HL., ZUMOFF B., HELLMAN L. and GALLAGHER TF.
Further studies of the metabolism of estradiol in man.
ACTA ENDOCRINOL., 1961, 37, 57-59.
- FISHMAN J., HELLMAN L., ZUMOFF B. and GALLAGHER TF.
Influence of thyroid hormone on estrogen metabolism in man.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1962, 22, 389-392.
- FISHMAN J.
Role of 2-hydroxyestrone in estrogen metabolism.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1963, 23, 207-210.
- FISHMAN J., HELLMAN L., ZUMOFF B. and GALLAGHER TF.
Effect of thyroid on hydroxylation of estrogen in man.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1965, 25, 365-368.
- FISHMAN J. and DIXON D.
2-hydroxylation of estradiol by human placental microsomes.
BIOCHEMISTRY, 1967, 6, 1683-1687.
- FISHMAN J., GOLDBERG S., ROSENFELD RS., ZUMOFF B., HELLMAN L. and GALLAGHER TF.
Intermediates in the transformation of oral oestradiol.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1969, 29, 41-48.
- FISHMAN J., NAFTOLIN F., DAVIES TJ., RYAN KJ. and PETRO Z.
Catechol estrogen formation by the tumoral fetal brain and pituitary.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1976a, 42, 177-179.
- FISHMAN J.
The catecholestrogens.
NEUROENDOCRINOL., 1976b, 22, 363-374.

- FISHMAN J., NAFTOLIN F. and DAVIES TJ.
Catechol estrogen formation by the human fetal brain and pituitary.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1976c, 42, 177-183.
- FISHMAN J., NISSELBAUM JS., MENENDEZ-BODET CJ., SCHWARTZ MK.
Estrone and estradiol content in human breast tumors : relationship to estradiol receptors.
J. STEROID BIOCHEM., 1977, 8, 893-897.
- FISHMAN J. and MARTUCCI G.
Differential biological activity of estradiol metabolites.
PEDIATRICS, 1978, 62, 1128-1133.
- FISHMAN J. and NORTON B.
Catechol estrogen formation in the central nervous system of the rat.
ENDOCRINOLOGY, 1979, 96, 1054-1056.
- FISHMAN J., BRADLOW HL., SCHNEIDER J., ANDERSON KE. and KAPPOS A.
Radiometric analysis of biological oxidation in man : sex differences in estradiol metabolism.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1980a, 77, 4957-4960.
- FISHMAN J., NORTON BJ. and HAHN EF.
Opiate regulation of estradiol 2-hydroxylase in brain of male rats : mechanism for control of pituitary hormone secretion.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1980b, 77, 120-122.
- FISHMAN J. and TULCHINSKY D.
Suppression of prolactin secretion in normal young women by 2-hydroxy-estrone.
SCIENCE, 1980c, 210, 73-74.
- FISHMAN JH., FISHMAN J.
Copper and estradiol receptor.
BIOCHIM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 1987, 144, 505-511.
- FOREMAN MM. and PORTER JC.
Effects of catechol estrogens and catecholamines on hypothalamic and corpus striatal tyrosine hydroxylase activity.
J. NEUROCHEM., 1980, 34, 1175-1183.
- FOURNIER S., ALLALI F., DURAND JC., STERKERS N., DEBERTRAND P., DIEBOLD N., MARTIN PM., KUTTENN F., MAUVAIS-JARVIS P.
Evaluation de l'activité enzymatique, 17 bêta-hydroxysteroid deshydrogenase comme marqueur de l'hormonodépendance des cancers du sein.
PATHOLOGIE BIOLOGIE, 1985, 33, 659-664.
- FRANKS S., LIGHTMAN SL., MASHUSHY NJ., NAFTOLIN F., LYNCH SS., BUTT WR. and JACOBS HS.
Failure of 2-hydroxyestrone to lower prolactin concentration in hyperprolactinaemic women.
CLIN. ENDOCRINOL., 1981, 15, 385-389.
- FROLIK CA., WAKEFIELD LM., SMITH DM. and SPORN MB.
Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor bêta in normal rat kidney fibroblasts.
J. BIOL. CHEM., 1984, 259, 10995-11000.

- FURTH ME., DAVIS LJ., FLEURDILYS B. and SCOLNICK EM.
Monoclonal antibodies to the p21 products of the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus and the cellular ras gene family.
J. VIROL., 1982, 43, 294-304.
- GARDNER WU., PFEIFFER CA. and TRENTON JT.
In : The physiopathology of cancer.
(2nd ed.) F. HOMBURGER Ed., NY : Paul B Hoeber, 1959, pp.
152-237.
- GIANNOPOULOS G. and GORSKI J.
Estrogen receptors : quantitative studies on transfer of estradiol from cytoplasmic nuclear binding sites.
J. BIOL. CHEM., 1971, 246, 2524.
- GILMAN AG.
Guanine nucleotide binding regulatory proteins and dual control of adenylate cyclase.
J. CLIN. INVEST., 1984, 73, 1-4.
- GOLDING T., GULLY J. and KORACH KS.
Multiple nuclear estrogen receptor peaks : salt resistance and appearance of different target tissues.
Program of the 67th Annual Meeting of the Endocrine Society, Baltimore 1985.
- GORMAN CA., BECKER DU., GREENSPAN FS., LEVY RP., OFFENHEIMER JH., RIVLIN RS., ROBBINS S. and VANDERLANN WP.
American thyroid association statement : breast cancer and thyroid hormone therapy.
ANN. INTERN. MED., 1977, 86, 502-503.
- GOTTESMAN MM., ROTH C., VLAHAKIS G. and PASTAN I.
Cholera toxin treatment stimulates tumorigenicity of Rous sarcoma virus-transformed cells.
MOL. CELL BIOL., 1984, 4, 2639-2642.
- GOTTESMAN MM., FLEISCHMAN RD.
The role of cAMP in regulating tumour cell growth.
CANCER SURVEYS, 1986, 5, 291-308.
- GRAHAM RM., HESS JG. and HOMCY CJ.
Biophysical characterization of the purified alpha-1-adrenergic receptor and identification of the hormone binding subunit.
J. BIOL. CHEM., 1982, 257, 15179-15181.
- GREEN H.
Cyclic AMP in relation to proliferation of epidermal cell : a new view.
CELL, 1978, 15, 801-811.
- HAAGENSEN CD.
Diseases of the breast.
WB. Saunders Ed., Philadelphie 1971.

- HAAGENSEN DC., MAZOUJIAN G., HOLDER W., KISTER SG. and WELLS SA.
Evaluation of breast cyst fluid protein detectable in the plasma of breast carcinoma patients.
ANN. SURG., 1977, 185, 279-285.
- HANOVER JA. and DICKSON RB.
The possible link between receptor phosphorylation and internalization.
TRENDS PHARMACOL. SCI., 1985, 6, 165-167.
- HARDIN JW., CLARK JH., GLASSER SR. and PECK EJ.
RNA polymerase activity and uterine growth : differential stimulation by estradiol, estriol and nafoxidine.
BIOCHEMISTRY, 1976, 15, 1370-1374.
- HART HE.
Determination of equilibrium constants and maximum binding capacities in complex in vitro systems.
BULL. MATHS. BIOPHYS., 1965, 27, 87-99.
- HERSEY RM., WEISZ J. and KATZENELLENBOGEN BS.
Estrogenic potency, receptor interactions and metabolism of catechol estrogens in the immature rat uterus in vitro.
ENDOCRINOLOGY, 1982, 111, 896-903.
- HIEMKE C. and GHRAF R.
Interaction of non-steroidal antiestrogens with dopamine receptor binding.
J. STEROID. BIOCHEM., 1984, 21, 663-667.
- HOFFMAN AR., PAUL SM. and AXELROD J.
Catecholestrogen synthesis and metabolism by human breast tumors in vitro.
CANCER RES., 1979, 39, 4584-4587.
- HOFFMAN AR., PAUL SM. and AXELROD J.
Estrogen 2-hydroxylase in the rat. Distribution and response to hormonal manipulation.
BIOCHEM. PHARMACOL., 1980, 29, 83-87.
- HOLLADAY CS. and BOLANDER FF.
Hormonal regulation of protein kinase C in the mouse mammary gland.
PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 1986, 183, 343-347.
- HOLLANDER VP., DIAMOND EJ.
Hormonal control in animal breast cancer.
In : Endocrine control in neoplasia.
SHARMA K., CRISS WE. Eds., Raven Press, NY, 1978, pp. 93-119.
- HOLTSMAN S., STONE JP. and SHELLABERGER CJ.
Synergism of diethylstilbestrol and radiation in mammary carcinogenesis in female F 344 rats.
J. NATL. CANCER INST., 1979, 63, 1071-1074.
- HORWITZ KB., HOSEKI Y. and Mc GUIRE WL.
Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. Role of estradiol and anti-estrogen.
ENDOCRINOLOGY, 1978, 103, 1742-1751.

- HOUDEBINE LM.
Regulation hormonale de la glande mammaire normale.
BULL. CANCER, 1985, 72, 121-141.
- HSIE AW. and PUCK TT.
Morphological transformation of chinese hamster cells by dibutyryl adenosine 3'5' monophosphate and testosterone.
PROC. NATL. ACAD. SCI., 1971, 68, 358-361.
- HUANG FL. and CHO-CHUNG YS.
Dibutyryl cyclic AMP treatment mimics ovariectomy : new genomic regulation in mammary tumor regression.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN, 1982, 107, 411-415.
- HUGGINS C., BRIZIARELLI G. and SUTTON H.
Rapid induction of mammary carcinoma in the rat and the influence of hormone on the tumors.
J. EXP. MED., 1959, 109, 25-41.
- INABA M. and KAMATA K.
Effect of estradiol 17bêta and other steroids on noradrenaline and dopamine binding to synaptic membrane fragments of rat brain.
J. STEROID BIOCHEM., 1979, 11, 1491-1497.
- INSCOE JK., DALY J. and AXELROD J.
Factors affecting the enzymatic formation of o-methylated dihydroxy-derivatives.
BIOCHEM. PHARMACOL., 1965, 14, 1257-1263.
- International Agency for Research on cancer monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human. Vol 21.
SEX HORMONES (II), Lyon IARC, 1979.
- ITO H. and HIDAKA H.
Antitumor effect of a calmodulin antagonist on the growth of solid sarcoma 180.
CANCER LETTERS, 1983, 19, 215-220.
- JAKESZ R., SMITH CA., AITKEN S., HUFF K., SCHUETTE W., SCHAKNEY S. and LIPPMAN M.
Influence of cell proliferation and cell cycle phase on expression of estrogen receptor in MCF-7 breast cancer cells.
CANCER RES., 1984, 44, 619-625.
- JAKOWLEW SB., BRETHNACH B., JELTSCH JM., MASIAKOWSKI P. and CHAMBON P.
Sequence of the PS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7.
NUCLEI ACIDS RES., 1984, 12, 2861-2878.
- JAMES VHT., Mc NEILL JM., BERANEK PA., BONNEY RC. and REED MJ.
The role of tissue steroid in regulating aromatase and oestradiol 17-bêta-hydroxysteroid dehydrogenase activities in breast and endometrial cancer.
J. STEROID BIOCHEM., 1986, 25, 787-790.

- JELLINCK PH. and GARLAND M.
Endocrine control of the metabolism of estradiol by rat liver micro-
somes.
J. ENDOCRINOL., 1969, 45, 75-78.
- JENSEN EV. and JACOBSON HI.
Basic guide to the mechanism of estrogen action.
REC. PROG. HORMONE RES., 1962, 18, 314-387.
- JENSEN EW. and DE SOMBRE ER.
Mechanism of action of the female sex hormones.
ANN. REV. BIOCHEM., 1972, 41, 203-230.
- JIRKA M.
An alpha-2 globulin component present in sweat, saliva, tears, human
milk colostrum and cerumen.
FEBS LETT., 1968, 1, 77-79.
- JOAB I., RADANYI C., RENOIR M., BUCHOU T., CATELLI MG.,
BINART N., MESTER J. and BAULIEU EE.
Common non-hormone binding component in non-transformed chick
oviduct receptors of four steroid hormones.
NATURE, 1984, 308, 850-853.
- JORDAN VC.
Biochemical pharmacology of anti-estrogen action.
PHARMACOL. REV., 1984, 36, 245-276.
- JOZAN S., MOURE C., GILLOIS M. and BAYARD F.
Effects of estrone on cell proliferation of a human breast cancer
(MCF-7) in long-term tissue culture.
J. STEROID BIOCHEM., 1979, 10, 341-342.
- JOZAN S., GAY G., MARQUES B., MIRQUZE A. and DAVID JF.
Oestradiol is effective in stimulating ³H thymidine incorporation but not
on proliferation of breast cancer cultured cells.
CELL TISSUE KINET., 1985, 18, 457-464.
- JUDD W., POADRY CA. and STOMINGER JL.
Novel surface antigen expressed on dividing cells but absent from
non-dividing cells.
J. EXP. MED., 1980, 152, 1430-1435.
- KAHN A. and DREYFUS JC.
Contrôle hormonal de l'expression des gènes.
MEDECINE SCIENCES, 1986, 1, 50-51.
- KATAYAMA S. and FISHMAN J.
Inhibition of phasic but not tonic pituitary secretion of 2-hydroxy-
oestrone in the rat : evidence of action as an oestrogen antagonist.
J. ENDOCRINOL., 1983, 98, 103-112.
- KATZENELLENBOGEN BS., MILLER MA., ECKERT RC. and SUDO K.
Anti-estrogen pharmacology and mechanism of action.
J. STEROID BIOCHEM., 1983, 19, 59-68.

- KATZENELLENBOGEN BS., NORMAN MJ., ECKERT RL., PELTZ SW. and MANGEL WF.
Bioactivities estrogen receptor interactions and plasminogen activator inducing activities of tamoxifen and hydroxytamoxifen isomers in MCF-7 human breast cancer cells.
CANCER RES., 1984, 44, 112-119.
- KATZENELLENBOGEN BS., MILLER MA., MULLICK A. and SHEEN YY.
Anti-estrogen action in breast cancer cells : modulation of proliferation and protein synthesis, and interaction with estrogen receptors and additional anti-estrogen binding sites.
BREAST CANCER RES. TREAT., 1985, 5, 231-243.
- KEITH WB. and WILLIAMS KIH.
Metabolism of radioactive estrone by rats.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 1970, 210, 328-332.
- KELLY R. and ABEL MH.
Catecholestrogens stimulate uterine prostaglandin production.
PROC. 4th Int. Prostaglandin Conference, Washington DC, 1979, p. 60.
- KELLY RW., ABEL MH., KENNEDY RL. and TAYLOR TL.
Effects of catecholestrogens on the synthesis and metabolism of prostaglandins.
In : "Catecholestrogens", MERRIAM GR., LIPSETT MB. Eds.
Raven Press, 1982, pp. 203-214.
- KING RJB.
Metabolism of oestriol in vitro.
BIOCHEM J., 1961, 79, 361-369.
- KING WJ. and GREENE GL.
Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in the nuclei of target cells.
NATURE, 1984, 307, 745-747.
- KIRCHHOFF J., HORMING E., GHRAF R., BALL P. and KNUPPEN R.
Interactions of catecholestrogens with cytoplasmic and nuclear estrogen receptors in rat pituitary gland and hypothalamus.
J. NEUROCHEM., 1981, 37, 1540-1547.
- KIRCHHOFF J., HOFFMAN B. and GHRAF R.
Estrogen receptor translocation and replenishment in rat hypothalamus and pituitary gland after the application of catecholestrogen or non-steroidal anti-estrogen.
J. STEROID. BIOCHEM., 1983, 18, 631-633.
- KLEINBERG DL. and TODD J.
Alpha-lactalbumin in human and subhuman primate normal mammary tissue in human breast cancer as a marker for prolactin activity.
CANCER RES., 1978, 38, 4318-4322.
- KNABBE C., HUFF KK., DICKSON RB. and LIPPMAN ME.
Transforming growth factor beta in human breast cancer.
Proceedings of the 68th annual meeting of the endocrine society, 1986, Abs. 1036.

- KNUPPEN R. and BRENER H.
Biogenesis of 11 β hydroxyoestrone and 16- α hydroxyoestrone by adrenal tissue.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 1962, 58, 147-150.
- KNUPPEN R., HAUPT M. and BREUER H.
Formation of 15 α -hydroxyestrone by human adrenal tissue.
J. ENDOCRINOL., 1965, 33, 529-532.
- KRAYCHY S. and GALLAGHER TF.
2-methoxyestrone a new metabolite of estradiol 17- β in man.
J. BIOL. CHEM., 1957, 229, 519-526.
- KON OL.
An anti-estrogen binding protein in human tissues.
J. BIOL. CHEM., 1983, 258, 3173-3177.
- KON OL.
Characterization of an anti-estrogen binding protein in high salt extracts of human breast cancer tissue.
J. STEROID BIOCHEM., 1985, 22, 177-186.
- KORENMAN SG.
Oestrogen window hypothesis of the aetiology of breast cancer.
LANCET, 1980, 1, 700-701.
- KORNYEI J., CSERMELY T., SZEKELY A. and VERTES M.
Two types of nuclear oestradiol binding sites in human myometrium and leiomyoma during the menstrual cycle.
EXP. CLIN. ENDOCRINOL., 1986, 87, 256-264.
- KREBS EG.
Protein kinases.
CURR. TOP. CELL REGUL., 1972, 5, 99-133.
- KUMAR V., GREEN S., STAUB A. and CHAMBON P.
Localisatoin of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor.
EMBO J., 1986, 5, 2231-2236.
- KVINNSLAND S., EKANGER R., DOSKELAND SO. and THORSEN T.
Relationship of cyclic AMP binding capacity and estrogen receptor to hormone sensitivity in human breast cancer.
BREAST CANCER RES. TREAT., 1983, 3, 67-72.
- LAM HP.
Tamoxifen is a calmodulin antagonist in the activation of cAMP phosphodiesterase.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 1984, 118, 27-32.
- LAMBERTS SWJ., VERLEUN T. and OOSTEROM R.
Studies on the effects of catechol-estrogens on prolactin secretion by cultured normal rat anterior pituitary cells.
ENDOCRINOLOGY, 1985, 116, 2631-2636.
- LE DOUSSAL V., ZANGERLE PF. and COLLETTE J.
Immunohistochemical detection of alphasactalbumine in breast lesions.
EUR. J. CANCER CLIN. ONCOL., 1984, 26, 1069-1078.

- LE DOUSSAL V., ZANGERLE PF., COLLETTE J., SPYRATOS F., HACENE K., BRIERE M., FRANCHIMONT T. and GEST J.
Immunohistochemistry of a component protein of the breast cystic disease fluid with Mol Wr 15 000.
EUR. J. CANCER CLIN. ONCOL., 1985, 21, 715-725.
- LEIBOVITZ A.
Development of media for isolation and cultivation of human cancer cells.
In : Human tumor cells in vitro.
J. FOGH. Ed. Plenum, NY, 1975, pp. 23-50.
- LESKO SM., ROSENBERG L. and KAUFMAN DW.
Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer.
N. ENGL. J. MED., 1985, 313, 593-596.
- LEUNG BS., QURESHI S. and LEUNG JS.
Response to estrogen by the human mammary carcinoma cell line CAMA-1.
CANCER RES., 1982, 42, 5060-5066.
- LINSTEDT AB., WEST NB. and BRENNER RM.
Analysis of monomeric dimeric states of the estrogen receptor with monoclonal antiestrophilins.
J. STEROID BIOCHEM., 1986, 24, 677-686.
- LIPPMAN ME., BOLAND G. and HUFF KK.
The effect of estrogen and antiestrogens on hormone responsive human breast cancer in long-term tissue culture.
CANCER RES., 1976, 36, 4595-4601.
- LIPPMAN ME., DICKSON RB., KASID A., GELMANN E., DAVIDSON N., Mc MANAWAY M., HUFF K., BRONZERT D., BATES S., SWAIN S. and KNABBE C.
Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer.
J. STEROID BIOCHEM., 1986, 24, 147-154.
- LISBOA BP. and SAUER HD.
Metabolism of oestradiol 17 bêta in the human myometrium.
J. STEROID. BIOCHEM., 1975, 6, 1131-1136.
- LITTLE M., SEZNDÁ P., TERAN C., HUGHES A. and JUNGHERT PW.
Biosynthesis and transformation of microsomal and cytosol estradiol receptor.
J. STEROID BIOCHEM., 1975, 6, 493-497.
- LLOYD RV.
Studies on the progesterone content and steroid metabolism in normal and pathological human breast tissues.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1979, 48, 585-593.
- LONGCOPE C., FLOOD C., FEMINO A. and WILLIAMS KIH.
Metabolism of 2-methoxyestrone in normal men.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1983, 57, 277-282.

- LUFT R., OLIVECRONA H., IKKOS D., NILSSON LB. and MOSSBERG H.
Hypophysectomy in management of metastatic carcinoma of the breast.
In : Endocrine aspects of the breast cancer.
Curie AE., Livingstone S. Eds. (Edinburg), 1958, pp. 27-35.
- MACINDOE JH.
Estradiol formation from testosterone by continuously cultured human breast cancer cells.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1979, 49, 272-277.
- MARKAVERICH BM. and CLARK JH.
Two binding sites for estradiol in rat uterine nuclei : relationship to uterotrophic response.
ENDOCRINOLOGY, 1979, 105, 1458-1462.
- MARKAVERICH BM., UPCHURCH S. and CLARK JH.
Two binding sites for estradiol in rat uterine nuclei : relationship to stimulation and antagonism of uterine growth.
In "Perspectives in steroid receptor research". F. Bresciani Ed. Raven Press, 1980, pp. 143-167.
- MARKAVERICH BM., UPCHURCH S., Mc CORMACK SA., GLASSER SR. and CLARK JH.
Differential stimulation of uterine cells by nafoxidine and clomiphene: relationship between nuclear estrogen receptors and type II estrogen binding sites and cellular growth.
BIOL. REPROD., 1981, 24, 171-181.
- MARKAVERICH BM., UPCHURCH S. and CLARK JH.
Progesterone and dexamethasone antagonism of uterine growth : a role for a second nuclear binding site for estradiol in estrogen action.
J. STEROID BIOCHEM., 1981, 14, 125-132.
- MARKAVERICH BM., ROBERTS RR., AJEJANDRO MA. and CLARK JH.
An endogenous inhibitor of (3H) estradiol binding to nuclear type II estrogen binding sites in normal and malignant tissues.
CANCER RES., 1984, 44, 1575-1579.
- MARKAVERICH BM. and CLARK JH.
The role of bioflavonoids in the inhibition of cancer cell growth in vitro and in vivo.
Proceedings of the 8th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry, Paris 24-27 May 1987.
- MARKS F. and HECHER E.
Metabolism and mechanism of action of estrogens. XII Structure and mechanism of formation of water-soluble and protein-bound metabolites of oestrone in rat liver microsomes in vitro and in vivo.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 1969, 187, 250-265.
- MARQUARDT H. and TODARO GJ.
Human transforming growth factor.
J. BIOL. CHEM., 1982, 257, 5220-5225.

- MARTUCCI C. and FISHMAN J.
Uterine estrogen receptor binding of catecholestrogens and of estetrol (1,3,5(10) estratriene 3,15alpha,16alpha,17bêta-tetrol)
STEROIDS, 1976, 27, 325-329.
- MARTUCCI C. and FISHMAN J.
Direction of estradiol metabolism as a control of its hormonal action uterotrophic activity of estradiol metabolite.
ENDOCRINOLOGY, 1977, 101, 1709-1715.
- MARTUCCI C. and FISHMAN J.
Impact of continuously administered catecholestrogens on uterine growth and LH secretion.
ENDOCRINOLOGY, 1979, 105, 1288-1292.
- MASSAGUE J.
Epidermal growth factor-like transforming growth factor.
J. BIOL. CHEM., 1983, 258, 1606-1613.
- MAY WS., SAHYOUN N., JACOBS S., WOLF M. and CUATRECASAS P.
Mechanism of phorbol diester induced regulation of surface transferrin receptor involves the action of activated protein kinase C an intact cytoskeleton.
J. BIOL. CHEM., 1985, 260, 9419-9426.
- MAYNARD PU., PIKE AW., WESTON A. and GRIFFITHS K.
Analysis of dehydroepiandrosterone and androstenediol inhuman breast tissue using high resolution Gas chromatography-mass spectrometry.
EUR. J. CANCER, 1977, 13, 971-975.
- Mc GRATH CM.
Augmentation of the response of normal mammary epithelial cells to estradiol by mammary stroma.
CANCER RES., 1983, 43, 1355-1359.
- Mc NEILL JM., REED MJ., BERANEK PA., BONNEY RC., SHISCHICK MN., ROBINSON DJ. and JAMES VHT.
A comparison of the in vivo uptake and metabolism of 3H oestrone and 3H estradiol by normal breast and breast tumour tissues in post-menopausal women.
INT. J. CANCER, 1986, 38, 193-196.
- MELVILLE E.
Conversion of estradiol-17 bêta by human breast tumours in vitro.
BIOCHEM. SOC. TRANS., 1973, 1, 766-768.
- MERRIAM GR., NAFTOLIN F., RYAN KJ.
An assay for catechol estrogens based on their enzymatic-o-methylation. In hypothalamus and endocrine function (Edited by F. Labrie, J. Meites and G. Pelletier), Plenum, New-York, 1976, pp 494-531.
- MERRIAM GR., PFEIFFER DG., LORIAUX DL. and LIPSETT MB.
Catechol estrogens and the control of gonadotropin and prolactin secretion in man.
J. STEROID BIOCHEM., 1983, 19, 619-625.

- MICHNOVICZ JJ., HERSHCOPF RJ., NAGANUMA H., BRADLOW HL. and FISHMAN J.
Increased 2-hydroxylation of estradiol as a possible mechanism for the anti-estrogenic effect of cigarette smoking.
N. ENGL. J. MED., 1986, 315, 1305-1309.
- MIGLIACCIO A., LASTORIA S., MONTCHARMONT B., ROTONDI A. and AURICCHIO F.
Phosphorylation of calf uterus 17 β estradiol receptor by endogenous Ca²⁺ stimulated kinase activating the hormone binding of the receptor.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 1982, 109, 1007-1010.
- MIGLIACCIO A., ROTONDI A. and AURICCHIO F.
Calmodulin-stimulated phosphorylation of 17 β estradiol receptor on tyrosine.
PROC. NATL. ACAD. SCI., 1984, 81, 5921-5925.
- MIGLIACCIO A., ROTONDI A. and AURICCHIO F.
Calmodulin-stimulated phosphorylation of 17 β estradiol receptor on tyrosine.
PROC. NATL. ACAD. SCI., 1984, 81, 5921-5925.
- MILLER MA., MULLICK A., GREENE GL. and KATZENELLENBOGEN BS.
Characterization of the subunit nature of nuclear estrogen receptors by chemical cross-linking and dense amino-acid labeling.
ENDOCRINOLOGY, 1985, 117, 515-523.
- MILLER MA. and KATZENELLENBOGEN BS.
Characterisation and quantitation of antioestrogen binding sites in estrogen receptor-positive and negative human breast cancer cell lines.
CANCER RES., 1983, 43, 3094-3100.
- MILLER WR., HAWKINS RA. and FORREST APM.
Significance of aromatase activity in human breast cancer.
CANCER RES., 1982, 42, 3365-3368.
- MORISHITA H., ADACHI H., NAFTOLIN F., RYAN KJ. and FISHMAN J.
Elevation of serum gonadotropin in male rat by catecholestrogens.
ACTA OBSTET. GYNECOL. JAPONICA, 1976, 23, 325-326.
- MOROZOVA TM., MITINA RL., NAGIBNEVA IN., OZNOGINA ZB. and SALGANIK RI.
The biochemical mechanisms of the stimulating action of estradiol on the growth of mammary tumours.
EXP. CLIN. ENDOCRINOL., 1986, 88, 293-302.
- MOSES DF., FRIDMAN O. and DE NICOLA AF.
Relationship between type I and type II estrogen binding sites in the rat uterus.
ACTA PHYSIOL. PHARMACOL. LATINOAM., 1985, 35, 451-457.
- MURPHY LC. and SUTHERLAND RL.
Antitumor activity of clomiphene analogs in vitro : relationship to affinity for the estrogen receptor and another high affinity anti-estrogen binding site.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1983, 57, 373-379.

- MUSGROVE E., RUGG C., TAYLOR I. and HEDLEY D.
Transferrin receptor expression during exponential and plateau phase growth of human tumour cells in culture.
J. CELL PHYSIOL., 1984, 118, 6-12.
- NAGASAWA H.
Hormones and experimental mammary tumorigenesis.
In : Hormone related tumors. Nagasawa H., Abe K. Eds., Springer Verlag, 1981, pp. 137-164.
- NAFTOLIN F., MORISHITA H., DAVIES IJ., TODD R., RYAN KJ. and FISHMAN J.
Hydroxyestrone induced rise in serum luteinizing hormone in the immature mole rat.
BIOCHIM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 1975, 64, 905-910.
- NAKANO M., SUGIOKA K., NAITO I., TAKEKOSHI S. and NIKI E.
Norel and potent biological anti-oxidants on membrane phospholipid peroxidation : 2-hydroxy-estrone and 2-hydroxy-estradiol.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 1987, 142, 919-924.
- NAVINS JR.
The pathway of eukaryotic mRNA formation.
ANN. REV. BIOCHEM., 1983, 52, 441-466.
- NEWMARK P.
Events at the surface of the cell.
NATURE, 1987, 317, 380-381.
- NISHIZUKA Y.
Turnover of inositol phospholipids and signal transduction.
SCIENCE, 1984a, 225, 1365-1366.
- NISHIZUKA Y.
The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion.
NATURE, 1984b, 308, 693-698.
- NISHIZUKA Y., TAKAI Y., KISHIMOTO A., KIKKAWA U. and KAIBUCHI K
Phospholipid turnover in hormone action.
In "Recent progress in hormone research", GREEP RO. Ed.
Raven Press, 1984c, 40, 301-345.
- O'BRIAN CA., LISKAMP RM., SOLOMON DH. and WEINSTEIN IB.
Inhibition of protein kinase C by tamoxifen.
CANCER RES., 1985, 45, 2462-2465.
- OKATANI Y. and FISHMAN J.
Effect of catecholestrogens on the pre-ovulatory content of luteinizing hormone releasing hormone in the median eminence of the rat.
NEUROENDOCRINOL., 1986, 44, 190-194.
- OLEA-SERRANO N., DEVLEESCHANVER N., LECLERCQ G. and HEUSON JC.
Assay for estrogen and progesterone receptors of breast cancer cell-lines in monolayer culture.
EUR. J. CANCER CLIN. ONCOL., 1985, 21, 965-973.

- OSBORNE CK. and Mc GUIRE WL.
The use of steroid hormone receptors in the treatment of human breast cancer : a review.
BULL. CANCER (Paris), 1979, 66, 203-210.
- OSBORNE CK.
Effects of anti-estrogens and estrogens on proliferation of human breast cancer cells : in vitro and in vivo models.
In : Progress in cancer research and therapy. Bresciani F., King RJB., Lippman ME., Namer M., Raynaud JP. Eds., Raven Press, New-York, 1984, Vol. 31, pp. 187-191.
- PAGE MJ., FIELD JK., EVERETT NP. and GREEN CD.
Serum regulation of the estrogen responsiveness of the human breast cancer cell line MCF-7.
CANCER RES., 1983, 43, 1244-1250.
- PAUL SM., AXELROD J. and DILIBERTO EJ.
Catecholesterogen-forming enzyme of brain : demonstration of a cytochrome P-450 monooxygenase.
ENDOCRINOLOGY, 1977a, 101, 1604-1610.
- PAUL SM. and AXELROD J.
Catecholestrogens : presence in brain and endocrine tissues.
SCIENCE, 1977b, 197, 657-664.
- PAUL SM. and SKOLNICK P.
Catecholesterogens inhibit estrogen elicited accumulation of hypothalamic cyclic AMP suggesting role as endogenous anti-oestrogens.
NATURE, 1977c, 266, 559-560.
- PAULING L.
The binding of oxygen to hemoglobin.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1935, 21, 186-188.
- PERRY JW. and OKA T.
Cyclic AMP as a negative regulator of hormonally induced lactogenesis in mouse mammary gland organ culture.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1980, 77, 2093-2097.
- PEYRAT JP., DJIANE J., KELLY PA., VANDEWALLE B., BONNETERRE J. and DEMAILLE A.
Characterization of prolactin receptors in human breast cancer.
BREAST CANCER RES. TREAT., 1984, 4, 275-281.
- PEYRAT JP., BONNETERRE J., VANDEWALLE B., VENNIN PH., LESOIN A. and LEFEBVRE J.
Prolactin receptors and lactalbumin plasma production in human breast cancer.
ANN. N.Y. ACAD. SCI., 1986, 464, 427-431.
- PIETRAS RJ. and SZEGO CM.
Specific binding sites for estrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells.
NATURE, 1977, 265, 68-70.

- PIETRAS RJ. and SZEGO CM.
Estrogen receptors in uterine plasma membrane.
J. STEROID BIOCHEM., 1979, 11, 1471-1483.
- POLLOW K., BOQUOI E., BAUMANN J., SCHMIDT-GOLLWITZER M.,
POLLOW B.
Comparison of the in vitro conversion of estradiol 17- β to estrone in
normal and neoplastic breast tissue.
MOL. CELL. ENDOCRINOL., 1977, 6, 333-348.
- POURREAU-SCHNEIDER N., BERTHOIS Y., GANDILHON P., CAU P. and
MARTIN PM.
Early alterations at the plasma membrane of breast cancer cell lines in
response to estradiol and hydroxy-tamoxifen.
MOL. CELL ENDOCRINOL., 1986, 48, 77-88.
- PRUDHOMME JF., MALET C., GOMPEL A.
17- β hydroxysteroid dehydrogenase activity in human breast epithelial
cell and fibroblast cultures.
ENDROCRINOLOGY, 1984, 114, 1483-1489.
- PTASHNE K., HSUEH HW. and STOCKDALE FF.
Partial purification and characterization of mammary stimulating factor,
a protein which promotes proliferation of mammary epithelium.
BIOCHEMISTRY, 1979, 18, 3533-3539.
- REDDEL RR., MURPHY LC., HALL RE. and SUTHERLAND RL.
Differential sensitivity of human breast cancer cell lines to the growth
inhibitory effects of tamoxifen.
CANCER RES., 1985, 45, 1525-1531.
- RINGOLD GM.
Steroid hormone regulation of gene expression.
ANN. REV. PHARMACOL. TOXICOL., 1985, 25, 529-566.
- ROBERTS AB., ANZANO MA., LAMB LC., SMITH JM. and SPORN MB.
New class of transforming growth factors potentiated by epidermal
growth factor : isolation from non neoplastic tissues.
PROC. NATL. ACAD. SCI., 1981, 78, 5339-5343.
- ROBERTS AB., FROLIK CA., ANZANO MA. and SPORN MB.
Transforming growth factors from neoplastic and non neoplastic
tissues.
FED. PROC., 1983, 42, 2621-2626.
- ROSENTHAL HE.
A graphic method for the determination and presentation of binding
parameters in a complex system.
ANAT. BIOCHEM., 1967, 20, 525-532.
- RUENITZ PC., BAGLEY JR. and PAPE CW.
Some chemical and biochemical aspect of liver microsomal metabolism of
tamoxifen.
DRUG. METAB. DISPOS., 1984, 12, 478-483.

- RUH TS. and SPELBERG TC.
Acceptor sites for estrogen receptor in new oviduct chromatin.
BIOCHEM. J., 1983, 210, 905-909.
- SACHS L.
Constitutive uncoupling of the controls for growth and differentiation in myeloid leukemia and the development of cancer.
J. NAT. CANCER INST., 1980, 65, 675-679.
- SALOMON DS., ZWEIBEL JA. and MAZEENA S.
Presence of transforming growth factors in human breast cancer cells.
CANCER RES., 1984, 44, 4069-4077.
- SANTNER ST., FEIL PD. and SANTEN RJ.
In situ estrogen production via the estrone sulfatase pathway in breast tumors : relative importance versus the aromatase pathway.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1984, 59, 29-33.
- SAPAG-HAGAR M. and GREENBAUM AL.
The role of cyclic nucleotides in the development and function of rat mammary tissue.
FEBS LETTERS, 1974, 46, 180-183.
- SASSON S. and NOTIDES AC.
Estradiol and estrone interaction with the estrogen receptor. I Temperature induced modulation of the cooperative binding of (3H) estradiol and (3H) estrone to the estrogen receptor.
J. BIOL. CHEM., 1983, 258, 8113-8117.
- SASSON S. and NOTIDES AC.
Estradiol and estrone interaction with the estrogen receptor. II Estradiol and estrone-induced inhibition of the cooperative binding (3H) estradiol.
J. BIOL. CHEM., 1983, 258, 8118-8122.
- SCATCHARD G.
The attractions of proteins for small molecules and ions.
ANN. N.Y. ACAD. SCI., 1949, 51, 600-672.
- SCHAEFFER JM., STEVENS S., SMITH RG. and HSUEH JW.
Binding of 2-hydroxyestradiol to rat anterior pituitary cell membranes.
J. BIOL. CHEM., 1980, 255, 9838-9843.
- SCHNEIDER J., KINNE D., FRACCHIA A., PIERCE U., ANDERSON KE., BRADLOW HL. and FISHMAN J.
Abnormal oxidative metabolism of estradiol in women with breast cancer.
PROC. NATL. ACAD. SCI., 1982, 79, 3047-3051.
- SCHNEIDER J., BRADLOW HL., STRAIN G., LEVIN J., ANDERSON K. and FISHMAN J.
Effects of obesity on estradiol metabolism : decreased formation of non-uterotropic metabolites.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1983, 56, 973-977.

- SCHNEIDER J., HUH MM., BRADLOW HL. and FISHMAN J.
Anti-estrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells.
J. BIOL. CHEM., 1984, 259, 4840-4845.
- SCHOENBERG DR. and CLARK JH.
Nuclear association states of rat uterine oestrogen receptors as probed by nuclease digestion.
BIOCHEM. J., 1981, 196, 423-427.
- SCHULTZ GS. and EBNER KE.
Lactalbumine levels in human mammary tumors, sera and mammary cell cultures lines.
CANCER RES., 1977, 37, 4489-4492.
- SCHINFELD JS., TULCHINSKY D., SCHIFF I. and FISHMAN J.
Suppression of prolactin and gonadotropin secretion in post-menopausal women by 2-hydroxyestrone.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1979, 50, 408-410.
- SHAEFFER JM., STEVENS S., SMITH RG. and HSUEH A.
Binding of 2-hydroxyestradiol to rat anterior pituitary cell membranes.
J. BIOL. CHEM., 1980, 256, 9838-9843.
- SHAFIE SM. and 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.
- SHAFIE SM.
Estrogen and the growth of breast cancer new evidence suggests indirect action.
SCIENCE, 1980, 209, 701-702.
- SHELLABARGER CJ., Mc KNIGHT B., STONE JP. and HOLTZMAN S.
Interaction of dimethylbenzanthracene and diethylstilbestrol on mammary adenocarcinoma formation in female ACI rats.
CANCER RES., 1980, 40, 1808-1811.
- SHERIDAN PJ., BUCHANAN JM., ANSELMA UC. and MARTIN PM.
Equilibrium : the intracellular distribution of steroid receptors.
NATURE, 1979, 282, 579-582.
- SHIH TY., WEEKS MO., YOUNG HA. and SCOLNIK EM.
Identification of a sarcoma virus coded phosphoprotein in non-producer cells transformed by kirsten or Harvey murine sarcoma virus.
VIROLOGY, 1979, 96, 64-79.
- SHINDELMAN JE., ORBMEYER AE. and SUSSMAN HH.
Demonstration of the transferrin receptor in human breast cancer tissue. Potential marker for identifying dividing cells.
INT. J. CANCER, 1981, 44, 1301-1310.
- SHIVERICK KT. and NOTELOVITZ M.
Regulation of cytochrome P-450 dependent catecholestrone formation in rat liver microsomes. Evidence for involvement of estrogen receptors.
BIOCHEM. PHARMACOL., 1983, 32, 2399-2403.

- SHUPNIK MA., KLIBANSKI A., LONGCOPE C. and RIDGWAY EC.
Catecholesterogen regulation of prolactin synthesis in pituitary cell culture.
ENDOCRINOLOGY, 1985, 117, 939-946.
- SHYAMALA G. and GORSKI J.
Estrogen receptors in the rat uterus. Studies on the interaction of cytosol and nuclear binding sites.
J. BIOL. CHEM., 1969, 244, 1097-1101.
- SHYAMALA G. and LEONARD L.
Inhibition of estrogen receptor transformation by molybdate.
J. BIOL. CHEM., 1980, 255, 602-606.
- SILBERSTEIN GB., STRICKLAND P., TRUMPBOUR V., COLEMAN S. and DAMEL CW.
In vivo cAMP stimulates growth and morphogenesis of mouse mammary ducts.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1984, 81, 4980-4984.
- SILVA JS., GEORGIADIS GS., DILLEY WG., Mc CARTY KS. Jr., WELLS SA. and Mc CARTY KS. Jr.
Menstrual cycle - dependent variations of breast cyst fluid proteins and sex steroid receptors in the normal human breast.
CANCER, 1983, 51, 1297-1302.
- SIMMEN RCM., MEANS AR. and CLARK JH.
Estrogen modulation of nuclear matrix associated steroid hormone binding.
ENDOCRINOLOGY, 1984, 115, 1197-1202.
- SINGH RK., RUH MF. and RUH TS.
Binding of (3H) estradiol and (3H) H1285 receptor complexes to rabbit uterine chromatin.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 1984, 800, 33-35.
- SINGH RK., RUH MF., BUTLER WB. and RUH TS.
Acceptor sites on chromatin for receptor bound by estrogen versus anti-estrogen in anti-estrogen sensitive and resistant MCF-7 cells.
ENDOCRINOLOGY, 1986, 118, 1087-1095.
- SIRBASKU DA.
Estrogen induction of growth factors specific for hormone-responsive mammary, pituitary and kidney tumor cells.
PROC. NATL. ACAD. SCI., 1978, 75, 3786-3790.
- SIRBASKU DA.
Hormonal regulation of human breast cancer cells in vitro.
In : New concepts in control of estrogen-responsive tumor growth".
BANBURY REP., 1981, 8, 425-442.
- SONNENSCHNEIN C. and SOTO AM.
But ... are estrogens per se growth-promoting hormones ?
J. NATL. CANCER INST., 1980, 64, 211-215.

- SOTO A. and SONNENSCHNEIN C.
Mechanism of estrogen action on cellular proliferation. Evidence for indirect and negative control on cloned breast tumor cells.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 1984, 122, 1097-1103.
- SOTO AN. and SONNENSCHNEIN C.
Cell proliferation of estrogen-sensitive cells : the case for negative control.
ENDOCRINOL. REV., 1987, 8, 44-52.
- SOULE HD., VAZQUEZ J., LONG A., ALBERT S. and BRENNAN M.
A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.
J. NATL. CANCER INST., 1973, 51, 1409-1413.
- SOULE HD. and Mc GRATH CM.
Estrogen responsive proliferation of clonal human breast carcinoma cells in athymic mice.
CANCER LETT., 1980, 10, 177-189.
- SPELBERG TC., GOSSE BJ., LITTLEFIELD BA., TOYODA H. and SEELKE R.
Reconstitution of native-like nuclear acceptor sites of the ovarian oviduct progesterone receptor : evidence for involvement of specific chromatin proteins and specific DNA sequences.
BIOCHEMISTRY, 1984, 23, 5103-5106.
- SPORN MB. and TODARO GJ.
Autocrine secretion and malignant transformation of cells.
N. ENGL. J. MED., 1980, 303, 878-880.
- STARKA L., SULCOVA J., KNUPPEN R. and HAUPT O.
Formation of 2-methoxyoestrone from oestrone in human foetal adrenals in vitro.
J. STEROID BIOCHEM., 1973, 4, 17-20.
- SUDO K., MONSMA F. and KATZENELLENBOGEN BS.
Anti-estrogen binding sites distinct from the estrogen receptor : subcellular localization, ligand specificity and distribution in tissues of the rat.
ENDOCRINOLOGY, 1983, 112, 425-434.
- SUTHERLAND RL. and FOO MS.
Differential binding of antiestrogen by rat uterine and chick oviduct cytosol.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 1979, 91, 183-191.
- SUTHERLAND RL., MURPHY LC., FOO MS., GREEN MD. and WHYBOWINE MA.
High-affinity anti-estrogen binding site distinct from the oestrogen receptor.
NATURE, 1980, 288, 273-275.
- SUTHERLAND RL. and JORDAN VC.
Non steroidal anti-oestrogens.
Academic Press, Sydney, 1981, pp. 143-163.

- SUTHERLAND RL. and MURPHY LC.
Mechanisms of estrogen antagonism by non-steroidal anti-estrogen.
MOL. CELL ENDOCRINOL., 1982, 25, 5-23.
- SUTHERLAND RL., MURPHY LC., HALL RE., REDDEL RR., WATTS CKW. and TAYLOR IW.
Effects of anti-estrogens on human breast cancer cells in vitro. Interactions with high affinity intracellular binding sites and effects on cell proliferation kinetics.
In : Progress in cancer research and therapy.
F. Bresciani, RJB. King, ME. Lippman, M. Namer, JP. Raynaud Eds.
Raven Press, NY, 1984, 31, pp. 193-212.
- SUTHERLAND RL., WATTS CKW. and RUENITZ PC.
Definition of two distinct mechanisms of action of anti-estrogens on human breast cancer cell proliferation using hydroxytriphenylethylenes with high affinity for the estrogen receptor.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 1986, 140, 523-529.
- SYNE JS., MARKAVERICH BM., CLARK JH., PANKO WB.
Estrogen binding sites in the nucleus of normal and malignant human tissue : characteristics of the multiple nuclear binding sites.
CANCER RES., 1982, 42, 4449-4454.
- TAM SP., HACHE RJG. and DEELEY RG.
Estrogen memory effect in human hepatocytes during repeated cell division without hormone.
SCIENCE, 1986, 234, 1234-1237.
- TAYLOR-PAPADIMITROU P., PURKIS P. and FENTEMAN IS.
Cholera toxin and analogues of cyclic AMP stimulate the growth of cultured human mammary epithelial cells.
J. CELL PHYSIOL., 1980, 102, 317-321.
- TCHERNITCHIN A., TCHERNITCHIN X., RODRIGUEZ A., MENA MA., UNDA C., MAIRESSE N. and GALAND P.
Effect of propranolol on various parameters of estrogen stimulation in the rat uterus.
EXPERIENTIA, 1977, 33, 1536-1537.
- THORSEN T., TANGEN M. and STOA KF.
Concentration of endogenous oestradiol as related to oestradiol receptor sites in breast tumor cytosol.
EUR. J. CANCER CLIN. ONCOL., 1982, 18, 333-337.
- TOPPER YT. and FREEMAN CS.
Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland.
PHYS. REV., 1980, 60, 1049-1106.
- TRAISH AM., MULLER RE. and WOTIZ HH.
Effect of pyridoxal 5'-phosphate on uterine estrogen receptor. Inhibition of estrogen receptor transformation.
J. BIOL. CHEM., 1980, 255, 4068-4070.

- WELSHONS WU., LIEBERMAN ME. and GORSKI J.
Nuclear localization of unoccupied estrogen receptors.
NATURE, 1984, 307, 747-749.
- WESTLEY B. and ROCHEFORT H.
A secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines.
CELL, 1980, 20, 353-362.
- WILKING N., CARLSTROM K., GUSTAFSSON SA., SHOLDEFORS H. and TOLLBOM O.
Oestrogen receptors and metabolism of oestrone sulphate in human mammary carcinoma.
EUR. J. CANCER, 1980, 16, 1339-1344.
- WILLINGHAN MC., PASTAN I., SHIH T. and SCOLNICK E.
Localization of the src gene product of the Harvey strain of murine sarcoma virus to the plasma membrane of transformed cells.
CELL, 1980, 19, 1005-1014.
- WINNEKER RC. and CLARK JH.
Estrogenic stimulation of the anti-estrogen specific binding site in rat uterus and liver.
ENDOCRINOLOGY, 1983, 112, 1910-1915.
- WOODS KL., COVE DH. and MORRISON JM.
The investigation of lactalbumine as a possible marker of human breast cancer.
EUR. J. CANCER, 1979, 55, 47-51.
- YAMAMOTO KR. and ALBERTS BM.
Steroid receptors : elements for modulation of eukaryotic transcription.
ANN. REV. BIOCHEM., 1976, 45, 721-746.
- ZIEMIECKI A., CATELLI MG., JOAB I. and MONCHARMONT B.
Association of the heat shock protein HSP 90 with steroid hormone receptors and tyrosine kinase oncogene products.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 1986, 138, 1298-1307.
- ZUMOFF B., FISHMAN J., CASSAOUTO J. and GALLAGHER TF.
Influence of age and sex on normal estradiol metabolism.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1968, 28, 937-941.

- TROEN P.
Perfusion studies of the human placenta. II Metabolism of C¹⁴-17β estradiol with and without added human chorionic gonadotrophin.
J. CLIN. ENDOCRINOL., 1961, 21, 395-398.
- UI H. and MULLER GC.
The role of RNA synthesis in early estrogen action.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1963, 50, 256-260.
- VALETTE A., GAS N., JOZAN S., ROUBINET F., DUPONT MA. and BAYARD F.
Influence of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate on proliferation and maturation of human breast carcinoma cells (MCF7) : relationship to cell cycle events.
CANCER RES., 1987, 47, 1615-1620.
- VANDEWALLE B., GRANIER AM., PEYRAT JP., BONNETERRE J. and LEFEBVRE J.
Detection of transferrin receptors in cultured breast cancer cells.
Endocrinology of the breast : basic and clinical aspects.
ANN. N.Y ACAD. SCI., 1986, 464, 482-485.
- VAN-LANDEGHEM AAJ., POORTMAN J., NABUURS M., THIJSSSEN JHH.
Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue.
CANCER RES. 1985, 45, 2900-2906.
- VARELA RM. and DAO TL.
Estrogen synthesis and estradiol binding by human mammary tumors.
CANCER RES., 1978, 38, 2429-2433.
- VERMEULEN A., DESHYPERE JP., PARIDAENS R., LECLERCQ G., RAY F. and HEUSON JC.
Aromatase, 17β-hydroxysteroid dehydrogenase and intratissular sex hormone concentrations in cancerous and normal glandular breast tissue in post-menopausal women.
EUR. J. CANCER CLIN. ONCOL., 1986, 22, 515-525.
- VIGNON F., TERGUI M., WESLEY B., DEROCQ D. and ROCHEFORT H.
Effects of plasma estrogen sulfates in mammary cancer cells.
ENDOCRINOL., 1980, 106, 1079-1086.
- VIGNON F., BARDON S., CHALBOS D. and ROCHEFORT H.
Anti-estrogenic effect of R-5020, a synthetic progestin in human breast cancer cells in culture.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1983, 56, 1124-1130.
- VIGNON F. and ROCHEFORT H.
Estrogen-specific proteins released by breast cancer cells in culture and control of cell proliferation.
In : Hormonally responsive tumors.
VP. Hollander Eds. Academic Press, 1985, pp. 135-153.
- VIGNON F., CAPONY F., CHAMBON M., GARCIA M. and ROCHEFORT H.
Autocrine growth stimulation of the MCF-7 breast cancer cells by the estrogen regulated 52K protein.
ENDOCRINOLOGY., 1986, 118, 1537-1545.

- VAN LANDEGHEM AAJ., POORTMAN J., NABUURS M. and THIJSSSEN JHH.
Endogenous concentration and sub-cellular distribution of oestrogens in normal and malignant human breast tissue.
CANCER RES., 1985, 45, 2900-2906.
- WALKER RA.
DNA flow cytometry of human breast carcinomas and its relationship to transferrin and epidermal growth factor receptors.
J. PATHOL., 1986, 150, 37-42.
- WALTER P., GREEN S., GREENE G., KOUST A., BORNERT JM., JELTSCH JM., STRAUB A., JENSEN E., SCRACE G., WATERFIELD M. and CHAMBON P.
Cloning of the human estrogen receptor cDNA.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1985, 82, 889-893.
- WATSON GH. and MULDOON TG.
Specific binding of estrogen and estrogen-receptor complex by microsomes from estrogen responsive tissues of the rat.
ENDOCRINOL., 1985, 117, 1341-1349.
- WATTERS MR.
Steroid hormone receptors and the nucleus.
ENDOCRINE REV., 1985, 6, 512-543.
- WATTS CKW., LEIGH CM. and SUTHERLAND RL.
Microsomal binding sites for non-steroidal anti-estrogens in MCF-7 human mammary carcinoma cells.
J. BIOL. CHEM., 1984a, 259, 4223-4229.
- WATTS CKW. and SUTHERLAND RL.
High affinity specific anti-estrogen binding sites are concentrated in rough microsomal membranes of rat liver.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 1984b, 120, 109-115.
- WATTS CKW. and SUTHERLAND RL.
Microsomal binding sites for anti-estrogens in rat liver properties and detergent solubilization.
BIOCHEM. J., 1986, 236, 903-911.
- WEDER HG., SCHILDKNECHT J., LUTZ RA. and KESSELRING P.
Determination of binding parameters from scatchard plots. Theoretical and practical considerations.
EUR. J. BIOCHEM., 1974, 42, 479-483.
- WEIDSELBAUM RR., HELLMAN S., PIRA AJ., NOVA JJ. and LITTLE JB
Proliferation kinetics of a human breast cancer line in vitro following treatment with 17 β estradiol and 1 β D-arabinofuranosyl lertosine.
CANCER RES., 1978, 38, 2339-2342.
- WEINBERGER MJ., ATEN RF. and EISENFELD AJ.
Estrogen receptor in the mammalian liver : effect of metabolism on the amount and identity of receptor bound estrogen.
BIOCHEM. PHARMACOL., 1978, 27, 2469-2474.

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	1
Bases de travail.....	6
A - Matériel d'étude.....	6
B - Rappel des caractéristiques de liaison d'une hormone sur un site récepteur spécifique.....	6
a) Interaction hormone-récepteur.....	7
b) Aspect cinétique de la liaison protéine-ligand....	11
c) Spécificité et transformation.....	13
<u>OESTROGENES ET CANCERS DU SEIN</u>	16
. GENERALITES.....	17
A - Oestrogènes et tumorigenèse.....	17
B - Hormonodépendance des tumeurs mammaires expérimentales	18
C - Hormonosensibilité des cancers du sein.....	18
. RECEPTEURS.....	21
A - Structure des récepteurs.....	24
B - Transformation du récepteur.....	25
C - Liaison nucléaire.....	26
a) Fixation du complexe E2-R au noyau.....	28
b) Sites de liaison multiples dans les tumeurs du sein	33
D - Régulation de l'expression des gènes.....	38
. IMPLICATION DES OESTROGENES DANS LA SECRETION DE PROTEINES SPECIFIQUES.....	42
A - Effet sur la croissance cellulaire.....	42
B - Effet sur la différenciation cellulaire.....	44
. EFFETS OESTROGENIQUES NON MEDIÉS PAR LES RECEPTEURS.....	46
A - AMPc et glande mammaire.....	47
B - AMPc et croissance des cellules tumorales mammaires...	48
a) Interaction entre oestrogènes et AMPc.....	48
b) Régulation de l'expression des gènes.....	49
c) Relation avec l'expression des oncogènes.....	50
C - Conclusion.....	50

<u>CATECHOLOESTROGENES ET CANCERS DU SEIN.....</u>	52
. RAPPEL DU METABOLISME.....	55
A - Métabolisme de l'oestradiol.....	55
a) Hydroxylation des oestrogènes.....	55
b) Contrôle de l'activité des hydroxylases.....	57
B - Catabolisme des catécholoestrogènes.....	60
. INTERACTION DES CATECHOLOESTROGENES AVEC LES COMPOSANTS TISSULAIRES ET PLASMATIQUES.....	61
A - Interaction avec les enzymes.....	61
B - Interaction avec les protéines circulantes.....	62
C - Interaction avec les structures subcellulaires.....	62
. EFFETS BIOLOGIQUES DES CATECHOLOESTROGENES.....	64
. ETUDE DES CATECHOLOESTROGENES DANS LE CANCER DU SEIN.....	68
A - Formation des catécholoestrogènes.....	68
B - Liaison des catécholoestrogènes dans les cancers du sein.....	72
a) Sites de liaison cytosoliques.....	72
b) Sites de liaison non cytosoliques.....	73
C - Catécholoestrogènes et lignées cellulaires mammaires..	75
a) Activités enzymatiques.....	75
b) Caractérisation des sites de liaison de 2OH-E1 dans les microsomes.....	76
c) Spécificité de la liaison de 2OH-E1 au complexe solubilisé.....	80
D - Comparaison avec les sites de liaison des anti- oestrogènes.....	82
E - Conclusion.....	86
 <u>ACTION COMPAREE DE L'OESTRADIOL ET DE SON METABOLITE 2-HYDROXY-OESTRONE SUR LES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES EN CULTURE.....</u>	 88
. PROTOCOLE D'ETUDE.....	89
A - Culture cellulaire.....	89
a) Conditions de culture.....	89
b) Stimulation hormonale.....	91
B - Paramètres d'appréciation de la croissance cellulaire.	92
a) Nombre de cellules.....	92
b) Récepteurs de la transferrine.....	92
C - Paramètres d'appréciation de la différenciation fonctionnelle des cellules.....	94
a) Dosage des protéines sécrétées.....	94
b) Dosage des récepteurs de la progestérone.....	94
c) Dosage des récepteurs de la prolactine.....	95

. ANALYSE DES RESULTATS.....	98
A - Effet sur la croissance cellulaire.....	98
B - Effet sur la différenciation fonctionnelle des cellules.....	112
a) Effet sur la stimulation de protéines induites....	112
b) Effet sur la synthèse du récepteur de la progestérone.....	113
c) Effet sur la synthèse des récepteurs de la prolactine.....	113
C - Conclusion.....	114
<u>DISCUSSION - PERSPECTIVES</u>	116
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	128

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Représentation de la liaison hormone récepteur.....	8
Figure 2 : Méthode de Rosenthal.....	10
Figure 3 : Mécanisme d'action des stéroïdes.....	20
Figure 4 : Les 3 modèles de distribution intracellulaire des récepteurs des hormones stéroïdes.....	22
Figure 5 : Relation entre la rétention nucléaire des récepteurs de l'oestradiol et la croissance utérine.....	27
Figure 6 : Induction polymérase I et II dans l'utérus de rate...	29
Figure 7 : Effet de E2 et E3 sur la réponse utérotrophique.....	29
Figure 8 : Effet de E2 et E3 sur la formation des sites nucléaires I et II.....	31
Figure 9 : Exemple de molécules de la famille des bioflavonoïdes, qui se liant aux sites nucléaires de faible affinité inhibent la croissance cellulaire.....	35
Figure 10 : Contrôle hormonal de l'expression des gènes.....	40
Figure 11 : Transformation oxydative de l'oestradiol chez la femme	54
Figure 12 : Différentes voies de synthèse des oestrogènes.....	67
Figure 13 : Chromatographie haute performance (HPLC) du complexe 2OH-E1 - protéine solubilisé.....	77
Figure 14 : Gradient de sucrose (5-15 %) du complexe 2OH-E1 - protéine solubilité (cellules VHB-1).....	79
Figure 15 : Compétiteurs de la liaison de 2OH-E1 dans les microsomes.....	81
Figure 16 : Cellules VHB-1 cultivées en milieu MEM défini.....	102
Figure 17 : Cellules VHB-1 cultivées en milieu MEM + 5 % SVNN.....	103
Figure 18 : Cellules VHB-1 cultivées en milieu MEM + 5 % SVF-DCC..	104
Figure 19 : Cellules MCF-7 cultivées en milieu MEM défini.....	105
Figure 20 : Cellules MCF-7 cultivées en milieu MEM + 5 % DVNN.....	106
Figure 21 : Cellules MCF-7 cultivées en milieu MEM + 5 % SVF-DCC..	107
Figure 22 : Cellules VHB-1 cultivées en milieu MEM défini.....	108
Figure 23 : Cellules VHB-1 cultivées en milieu MEM défini.....	109
Figure 24 : Cellules MDA-MB-231 cultivées en milieu MEM défini....	110
Figure 25 : Cellules MDA-MB-231 cultivées en milieu MEM défini....	111
Figure 26 : Effet de la liaison de l'hormone au récepteur.....	122
Figure 27 : Trifluoropérazine.....	124

R E S U M E

L'oestradiol (E2) et son métabolite le catécholoestrogène 2-hydroxy-oestrone (2OH-E1), peuvent être formés dans les cancers du seins.

Nous décrivons dans ces tumeurs, en plus du récepteur nucléaire classique, un site nucléaire de faible affinité pour l'oestradiol (Kd 20-30 nM) dont la liaison est beaucoup plus déplacée par 2OH-E1 que celle au récepteur de forte affinité. Ce site est associé au récepteur classique et est plus souvent présent dans les tumeurs les plus différenciées. Les tumeurs fixent aussi 2OH-E1 de manière spécifique sur des sites cytosoliques (Kd = 0,54 nM) mais aucune corrélation entre la fixation de 2OH-E1 dans le cytosol et celle de E2 n'a été mise en évidence tendant à prouver l'existence d'un autre site de fixation cytosolique pour 2OH-E1. Contrairement à E2, 2OH-E1 se lie spécifiquement à des sites microsomaux (Kd = 3-8 nM) de nature protéique. L'analyse du complexe 2OH-E1-protéine solubilisée, met en évidence un pic de haut poids moléculaire de l'ordre de 440 Kda compris entre 11,3 S et 19 S. Des compétiteurs très variés comme des catécholamines, des anti-oestrogènes et des antihistaminiques-H1 peuvent déplacer 2OH-E1 de son site de liaison mais l'oestradiol est sans effet.

Une lignée cellulaire hormonosensible VHB-1, que nous avons établie et caractérisée à partir d'un carcinome galactophorique, ainsi que d'autres lignées classiques issues de métastases pleurales de cancer du sein (MCF-7 et MDA-MB-231) nous ont servi à apprécier les effets cellulaires des deux oestrogènes parents. La mesure des taux de récepteurs de la transferrine, que nous avons caractérisés dans les cellules tumorales mammaires en culture primaire, nous a permis d'estimer l'activité proliférative des cellules. Les marqueurs de différenciation cellulaire suivants ont été utilisés : récepteurs de la progestérone, récepteurs de la prolactine, protéines sécrétées : alpha-lactalbumine et GCDFP15. Nos résultats mettent en évidence des effets opposés des deux stéroïdes parents dans les cellules hormonosensibles :

- stimulation de la croissance par E2 tandis que 2OH-E1 l'inhibe,
- induction de la synthèse du récepteur de la progestérone par E2, pas d'effet de 2OH-E1,
- induction de la synthèse du récepteur de la prolactine par 2OH-E1, pas d'effet de E2,
- stimulation des sécrétions d'alpha-lactalbumine et de GCDFP-15 par 2OH-E1 inhibition des sécrétions ou absence d'effet de E2.

La confrontation de ces résultats montre l'importance du métabolisme de E2 dans certaines tumeurs où l'accumulation et la fixation de 2OH-E1 peuvent favoriser la différenciation cellulaire et l'inhibition de la croissance.

Mots-clés : Cancer du sein, Oestradiol, Catécholoestrogènes, Croissance cellulaire, Différenciation cellulaire

