

50376  
1988  
99

50376  
1988  
99

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

Année 1988



N° d'ordre : 256.

**THESE**

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

**DOCTEUR D'UNIVERSITE EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**(OPTION BIOCHIMIE)**

**(NOUVEAU REGIME)**

par

**Souliman AMRANI**

**RECEPTEURS  
DE LA PROLACTINE DANS LE CANCER DU SEIN :  
CARACTERISATION ET OBTENTION  
D'ANTICORPS ANTI-IDIOTYPES**

présentée le 6 Juillet 1988 devant la Commission d'Examen

**J U R Y**

Président : Professeur J. MONTREUIL  
Rapporteurs : Professeur A. VERBERT  
: Docteur J. BONNETERRE  
Membres : Professeur A. BART  
Professeur J. LEFEBVRE  
Docteur JP. PEYRAT

SCD LILLE 1



D 030 319879 7

50376  
1988  
99

50376  
1988  
99



*"Notre étonnement reste le même.  
Seul grandit en nous le courage de  
comprendre l'étonnant"*

*Niels BOHR*

*A mon père, à ma mère*

*A mes frères*

*A la mémoire de mes grands-parents*

*A tous mes amis qui me sont chers.*

*Ce travail a été réalisé au Centre de Lutte Contre le Cancer de la Région Nord (Centre Oscar Lambret).*

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

*Je témoigne ma reconnaissance à Monsieur le Professeur J. LEFEBVRE, qui a toujours porté un grand intérêt à mes recherches et a accepté de juger ce travail.*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Docteur JP. PEYRAT, Biologiste au Centre Oscar Lambret, qui a dirigé avec beaucoup de bienveillance et de compétence mes travaux. Vous avez contribué puissamment par la rigueur et la clarté de vos avis, à l'orientation de mes recherches. Votre disponibilité à mon égard ainsi que vos précieux conseils ont contribué efficacement à ma formation scientifique. Soyez-en remercié et assuré de toute ma reconnaissance.*

*Je suis reconnaissant à Monsieur le Professeur J. MONTREUIL de bien vouloir présider le jury de cette thèse. J'ai gardé un souvenir vivace de vos cours dispensés dans le cadre de l'enseignement de la biochimie. Veuillez accepter, avec mes remerciements sincères, l'expression de mon profond respect.*

*J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur A. VERBERT d'avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse. Soyez-en remercié et acceptez le témoignage de ma profonde gratitude.*

*Je remercie sincèrement le Docteur J. BONNETERRE d'avoir accepté d'être également le rapporteur de cette thèse. J'ai été très sensible à l'intérêt porté à ce travail. Soyez assuré de ma respectueuse gratitude.*

*Je remercie Monsieur le Professeur A. BART d'avoir accepté de juger ce mémoire.*

*Monsieur le Professeur J. LEONARDELLI m'a accueilli dans son Laboratoire (d'histologie, à la Faculté de Médecine) pour la réalisation des études immunohistochimiques, qu'il trouve ici, avec les membres de son équipe et en particulier Madame P. SAINT-POL et Mademoiselle E. CARPENTIER, l'expression de ma gratitude.*

*Je remercie tous les membres du Laboratoire, en particulier Madame le Docteur B. LEROY-MARTIN pour les échanges fructueux que nous avons eus, Mesdames MM. LOUCHEZ, J. FOURNIER pour leur assistance technique efficace et leur gentillesse. Qu'ils soient ici remerciés et trouvent l'assurance de mon amitié.*

*Mes remerciements chaleureux et ma gratitude vont aussi au Docteur B. HECQUET et à son équipe.*

*Que Madame M. FOCKENOY, Monsieur J. VIENNE et Monsieur C. ZYDOWER soient assurés de ma reconnaissance.*

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

## TABLE DES MATIERES

-----

<u>INTRODUCTION</u> .....	1
<u>MATERIEL ET METHODES</u> .....	11
I - Caractéristiques des récepteurs de la prolactine.....	11
1. Hormones et produits utilisés.....	11
2. Culture des cellules épithéliales mammaires cancéreuses....	12
3. Préparation des microsomes.....	12
4. Marquages des hormones à l'iode 125.....	13
5. Solubilisation des récepteurs membranaires.....	13
6. Mesure des récepteurs.....	14
61. Test de liaison.....	14
62. Détermination du nombre de sites et de la constante d'affinité.....	15
7. Spécificité de liaison des récepteurs membranaires.....	15
8. Marquage par affinité.....	16
9. Etude des récepteurs de la prolactine en gel filtration à basse pression.....	17
10. Etude chromatographique des récepteurs solubilisés en HPLC.....	18
11. Etude des R-PRL en gradient de saccharose.....	20
12. Purification des R-PRL par chromatographie d'affinité.....	22
121. Préparation du gel de chromatographie d'affinité.....	22
122. Purification des R-PRL par chromatographie d'affinité, à l'aide de l'hormone de croissance humaine.....	23
II - Anticorps anti-R-PRL.....	25
1. Obtention d'anticorps polyclonaux.....	25
2. Obtention d'anticorps monoclonaux.....	25
3. Obtention d'anticorps anti-idiotypiques.....	27
4. Test de l'activité des anticorps.....	30
41. Inhibition de la liaison hormone-récepteur.....	30
42. Immunoprécipitation du récepteur occupé.....	30
5. Test des anticorps par liaison du "complexe anticorps anti-idiotypes - R-PRL membranaires" à la protéine A radioactive.....	31
6. Immunohistochimie.....	31
7. Immobilisation du R-PRL sur nitrocellulose et immunodétection (Dot immunobinding).....	32
8. Immunoélectrotransfert.....	33
81. Principe général.....	33
82. Application au R-PRL.....	34

<u>RESULTATS</u> .....	36
I - Caractéristiques des R-PRL dans les cellules de cancer du sein et dans la glande mammaire normale de lapine.....	36
1. Interaction entre hormone de croissance humaine et R-PRL..	36
11. Caractérisation de l'hormone de croissance humaine iodée.....	36
12. Détermination du nombre de sites et de la constante d'affinité des récepteurs.....	36
13. Spécificité de liaison.....	39
2. Interaction entre prolactine humaine et R-PRL.....	39
21. Détermination du nombre de sites et de la constante d'affinité des récepteurs.....	39
22. Spécificité de liaison.....	42
3. Détermination du poids moléculaire de l'unité liant l'hormone de croissance humaine.....	42
II - Solubilisation des récepteurs prolactiniques.....	45
1. Conditions optimales de solubilisation des récepteurs membranaires.....	45
2. Etude chromatographique des récepteurs solubilisés.....	49
21. Chromatographie à basse pression.....	49
22. En HPLC.....	55
3. Etude des récepteurs solubilisés en gradient de saccharose.....	55
III - Purification des R-PRL par chromatographie d'affinité.....	55
IV - Etude des anticorps.....	61
1. Anticorps polyclonaux.....	61
11. Inhibition de la liaison hormone-récepteur.....	61
12. Immunoprécipitation du R-PRL.....	61
13. Immunohistochimie.....	62
2. Anticorps monoclonaux.....	65
3. Anticorps anti-idiotypiques.....	65
31. Inhibition de la liaison hormone-récepteur.....	65
32. Test de liaison des anticorps anti-idiotypiques par la protéine A iodée.....	69
33. Immunoprécipitation du R-PRL.....	69
34. Immunohistochimie.....	74
35. Immobilisation du R-PRL sur nitrocellulose et immunodétection.....	74
36. Immunoélectrotransfert.....	74
<u>DISCUSSION</u> .....	78
<u>CONCLUSION</u> .....	90
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u> .....	92

# **INTRODUCTION**

La prolactine (PRL) a été découverte en 1928 par STRICKER et GRUETER qui ont démontré que des extraits hypophysaires étaient capables d'induire le développement et la différenciation du tissu mammaire de lapine. Cette hormone a depuis été purifiée à partir d'hypophyses de nombreuses espèces animales. Sa structure est assez bien précisée : c'est un polypeptide formé d'environ 200 acides aminés (198 pour la prolactine humaine) qui comporte 3 ponts disulfures dont l'un situé au milieu de la molécule, est essentiel à l'activité lactogène (Figure 1). Récemment, il a été démontré l'existence d'une forme glycosylée de la PRL dont on ignore encore l'éventuel rôle physiologique (LEWIS et coll., 1984, 1985 ; MEURIS et coll., 1985 ; PANKOV et coll., 1986).

La prolactine dériverait du même gène ancestral que les hormones de croissance et les hormones lactogènes placentaires (FONTAINE, 1984). En effet, sa structure est assez proche de celle de ces hormones. L'hormone de croissance et l'hormone lactogène placentaire ne possèdent pas néanmoins un troisième pont disulfure dans la partie NH<sub>2</sub> terminale.

Plus de 85 fonctions biologiques de la PRL ont été décrites chez les vertébrés, notamment son implication dans la fonction de reproduction (NICOLL et BERN, 1972 ; THEINTZ et coll., 1984, RUSSEL et coll., 1984, 1985). Un rôle physiologique bien connu de cette hormone est le contrôle du fonctionnement de la glande mammaire normale, elle agit à la fois sur la multiplication (mammogénèse) et sur la différenciation (lactogénèse) des cellules épithéliales mammaires (TOPPER et FREEMAN, 1980 ; DJIANE et coll., 1982). Selon les espèces, elle est capable d'agir seule ou en synergie avec les glucocorticoïdes, l'hormone de croissance, la thyroxine et la triiodothyronine (Figure 2).

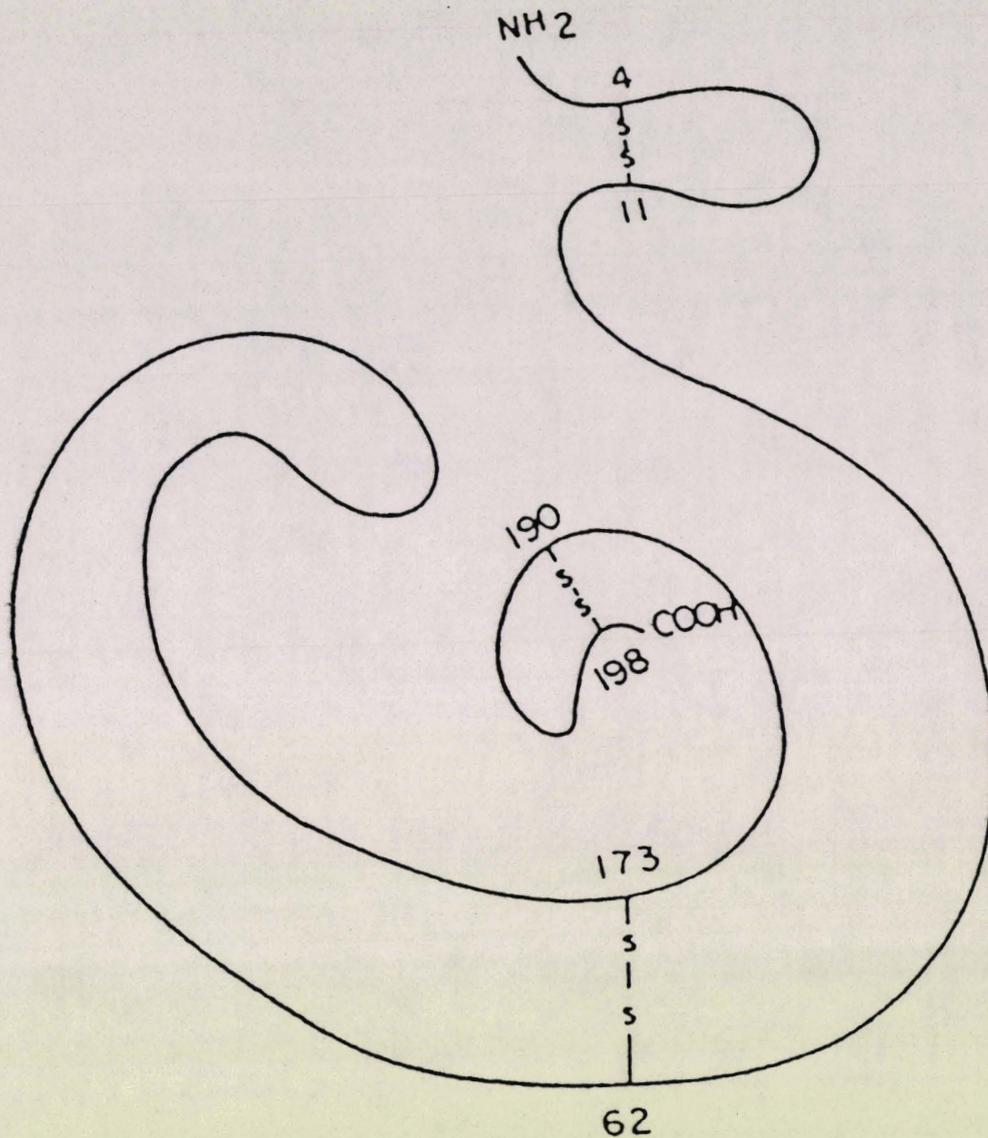


Figure 1 - La structure de la prolactine ovine d'après LI (1974)

La prolactine humaine partage environ 70 % d'acides aminés en commun avec la prolactine ovine. Elle ne partage que 26 % d'acides aminés en commun avec l'hormone de croissance humaine.

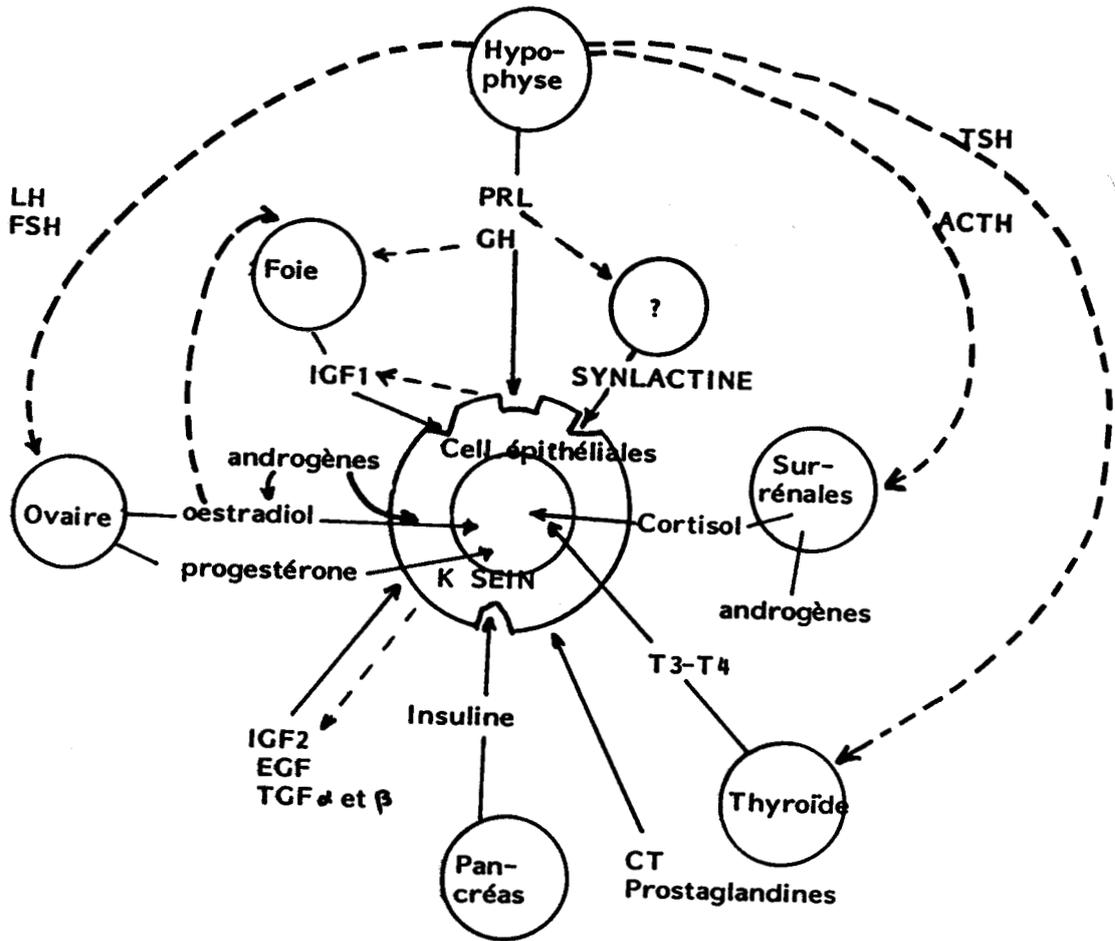


Figure 2 - Schéma général du contrôle hormonal de la glande mammaire normale

Dans la glande mammaire, la PRL exerce une action à la fois sur la prolifération et la différenciation cellulaire (Figure 3). Elle contrôle l'expression des gènes des protéines du lait en augmentant leur taux de transcription ainsi que la stabilité et la traduction des ARN-messagers correspondants (HOUDEBINE et coll., 1982). Par ailleurs, certaines études récentes suggèrent qu'un facteur de croissance de type somatomédine : la "synlactine" pourrait être, au moins partiellement, le médiateur de l'action mitogène de la prolactine (ANDERSON et coll., 1983 ; MITTRA, 1984).

Les hormones polypeptidiques exercent leur action cellulaire en se fixant sur des récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules cibles. Ces récepteurs sont des protéines ou des glycoprotéines incluses dans la membrane plasmique et sont de taille plus importante et de nature plus complexe que les hormones elles-mêmes. Du point de vue fonctionnel, un récepteur comporte au moins deux éléments fondamentaux : un site receveur ou de reconnaissance auquel se lie l'hormone et un site exécutif qui peut interagir par un mécanisme de couplage, ou transduction, avec un amplificateur membranaire. L'amplificateur induira la formation d'un "deuxième messager" intracellulaire dont l'effet peut se produire à différents niveaux cellulaires depuis la modulation de l'activité des enzymes cytoplasmiques jusqu'à la régulation de la transcription et la synthèse d'ADN. Deux messagers intracellulaires sont bien décrits : l'AMP cyclique, qui est le messager par exemple des hormones gonadotropes, et l'inositol triphosphate qui, avec le calcium et l'alcalinisation du cytosol, est le messager de certains facteurs de croissance (MARX, 1984). Le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) (CARPENTER, 1983) et le récepteur de l'insuline (KAHN et coll., 1983) sont des récepteurs qui ont une activité tyrosine kinase intrinsèque ; le récepteur de l'EGF (et peut-être celui de

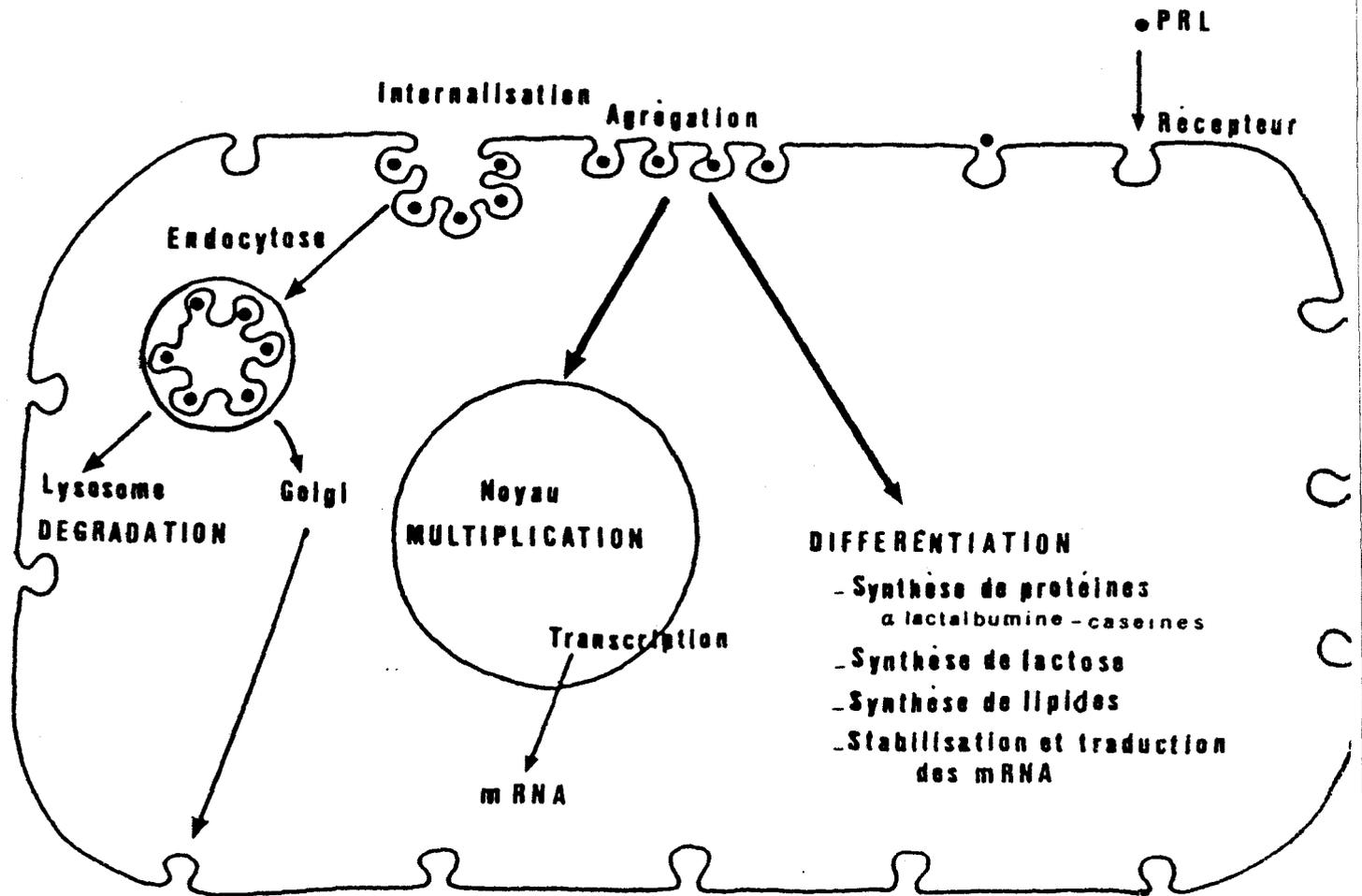


Figure 3 - Représentation schématique des mécanismes assurant la reconnaissance et le transfert de la stimulation de la PRL dans la cellule mammaire (d'après JP. PEYRAT, Doctorat d'Etat, 1985)

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

l'insuline aurait l'aptitude de phosphoryler (inhiber) une lipocortine inhibitrice de la phospholipase A2 et donc de favoriser la synthèse des prostaglandines qui stimuleraient notamment la production d'AMP cyclique.

Les récepteurs de la prolactine (R-PRL) présentent des propriétés communes à tous les types de récepteurs hormonaux. Leurs caractéristiques dans la glande mammaire de lapine ont été analysées en détail par SHIU et FRIESEN (1974b). Les récepteurs possédant une forte affinité pour la PRL ( $K_a > 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) sont en nombre limité et leur spécificité ne s'exerce que vis-à-vis de l'ensemble des hormones lactogènes.

Comme pour la plupart des récepteurs des hormones polypeptidiques, la liaison hormone-récepteur n'est pas complètement réversible et on doit imaginer un processus d'interaction en plusieurs étapes tendant à augmenter la cohésion du système au cours de l'association (KELLY et coll., 1980; VAN DER GUGTEN et coll., 1980). Schématiquement, l'interaction pourrait avoir la forme suivante :



Après la liaison de la PRL au récepteur membranaire, les complexes s'agrègent puis sont internalisés dans des vésicules d'endocytose dites "coated pits" ou vésicules hérissées (Figure 3). Ces vésicules vont fusionner avec les lysosomes où les complexes "hormone-récepteur" seront dégradés complètement (DJIANE et coll., 1980 ; SHIU et FRIESEN, 1980 ; POSNER et coll., 1982). D'autre part, les R-PRL possèdent une demi-vie très brève (KELLY et coll., 1975 ; DJIANE et coll., 1982) et, par voie de conséquence, ils doivent être synthétisés en permanence ; leur présence est donc essentiellement détectée au niveau des membranes cellulaires soit

dans les membranes golgiennes après leur synthèse soit dans les membranes de vésicules d'endocytose. On estime que 20 à 30 % d'entre eux sont situés au niveau de la membrane plasmique de la cellule cible (BERGERON et coll., 1978 ; POSNER et coll., 1979 ; DJIANE et coll., 1981a). La PRL provoque donc l'internalisation de son récepteur et lorsqu'on augmente les concentrations de cette hormone, le processus d'internalisation est rapidement activé, ce qui conduit à une diminution des récepteurs disponibles pour l'hormone circulante et une modulation de l'action hormonale. Cette régulation négative à court terme ("down-regulation"), phénomène généralement observé avec les hormones polypeptidiques, est un processus rapide et réversible (DJIANE et coll., 1979 ; KELLY et coll., 1979). A des concentrations supraphysiologiques, on observe une disparition complète des récepteurs membranaires, ce qui correspond à une désensibilisation complète de la cellule. La concentration de ces récepteurs à un moment donné n'est pas seulement le résultat de ce processus ("down-regulation") mais aussi d'un effet à long terme de stimulation par la PRL de la synthèse de ses propres récepteurs (DJIANE et coll., 1977 ; POSNER et coll., 1979). Cette régulation positive induite par la prolactine sur ses propres récepteurs est un phénomène lent et stable qui semble lié au développement important du réseau membranaire intracellulaire au cours de la différenciation du tissu mammaire (DEVINOY et coll., 1979). Les voies d'action cellulaire de la prolactine après sa liaison demeurent inconnues ; il a été démontré en définitive que les messagers intracellulaires ne sont ni l'AMP cyclique ni l'inositol triphosphate (voir supra) mais il se pourrait que la PRL agisse par un mécanisme semblable à celui de l'insuline (MATUSIK et ROSEN, 1980 ; KELLY et coll., 1984 ; HOUDEBINE et coll., 1985). Les processus d'internalisation ne semblent pas nécessaires à l'action hormonale. La colchicine inhibe cette action en laissant se dérouler la régulation négative des récepteurs (HOUDEBINE et DJIANE, 1980 ; SERVELY et

coll., 1982) alors qu'inversement les agents lysosomotropes ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , chloroquine) qui inhibent la régulation négative, n'altèrent en rien la réponse des cellules mammaires à une stimulation par la PRL. L'utilisation des anticorps anti-R-PRL étaye cette hypothèse puisque ces anticorps, qui ne pénètrent pas dans la cellule, possèdent des propriétés prolactino-mimétiques (DJIANE et coll., 1981b). De plus, l'utilisation de ces anticorps montre la nécessité d'un ligand divalent pour induire l'effet hormonal (DUSANTER-FOURT et coll., 1984).

Récemment, le clonage des R-PRL a été réalisé à partir de foie de rat (BOUTIN et coll., 1988), il est en cours pour la glande mammaire et ceci permettra une connaissance plus approfondie de sa structure et de son mode de fonctionnement.

Le rôle de la PRL dans les cancers mammaires expérimentaux a fait l'objet de revues générales très documentées (MEITES, 1972, 1979, 1980 ; NAGASAWA et coll., 1973 ; KIM et FURTH, 1976 ; WELSH, 1976 ; WELSH et NAGASAWA, 1977 ; BLANKENSTEIN et coll., 1984). La PRL agit au moment de l'induction puis sur la croissance tumorale chez le rat. La présence de R-PRL dans les tumeurs mammaires de rat a été mise en évidence par TURKINGTON (1974). De nombreuses études ont par la suite confirmé ces observations (COSTLOW et Mc GUIRE, 1978 ; TURCOT-LEMAY et KELLY, 1980). La fixation de la PRL est plus importante dans les tumeurs dont la croissance est stimulée par la PRL (KELLY et coll., 1979). Pour certains auteurs (COSTLOW et coll., 1974, 1976 ; DE SOMBRE et coll., 1976), il semble que l'on puisse établir un lien entre la présence de ces récepteurs de la PRL et la dépendance de la tumeur vis-à-vis de l'hormone. Le taux de récepteurs pourrait indiquer le degré de sensibilité de la tumeur à la prolactine (KELLY et coll., 1974).

Le rôle de la PRL dans les cancers du sein humain n'a pas encore été bien établi (NAGASAWA, 1979 ; BONNETERRE et coll., 1985). La PRL pourrait jouer un rôle soit dans l'induction soit dans la croissance des cancers du sein. La mise en évidence des R-PRL dans les cancers du sein de la femme ainsi que la démonstration de la sensibilité à la PRL de ces tumeurs donnent un regain d'intérêt à l'étude des relations prolactine-cancers du sein (BONNETERRE et coll., 1985).

En effet, des R-PRL ont été détectés dans les cancers du sein en culture (SHIU, 1979 ; MURPHY et coll., 1984b) ou après biopsie dans 50 à 70 % des cas (PEYRAT et coll., 1981 ; BONNETERRE et coll., 1982). La caractérisation de ces récepteurs dans ces tumeurs montre que ceux-ci sont spécifiques des hormones lactogènes (PEYRAT et coll., 1984a). Par ailleurs, sur le plan clinique, les R-PRL présentent un intérêt pronostique sur la survie sans récurrence (BONNETERRE et coll., 1987).

In vivo, la PRL est capable de stimuler la prolifération cellulaire de certains cancers du sein en culture organotypique ou primaire (WELSH et NAGASAWA, 1977 ; KLEVJER-ANDERSON et CASE-BUEHRING, 1980 ; MALARKEY et coll., 1983 ; PEYRAT et coll., 1984b ; SIMON et coll., 1985 ; MANNI et coll., 1986). La PRL peut aussi être impliquée dans la différenciation des cellules de cancer du sein puisqu'elle stimule la production de protéines spécifiques (SHIU et IWASIOU, 1985), et en particulier l'alpha-lactalbumine (KLEINBERG ET TODD, 1978). L'existence d'une corrélation entre R-PRL et récepteurs d'oestrogènes d'une part et entre R-PRL et récepteurs de la progestérone d'autre part a été mise en évidence (BONNETERRE et coll., 1982, 1986 ; MURPHY et coll., 1984b).

Mais les R-PRL dans les cancers du sein ne semblent être que partiellement fonctionnels ; en effet la PRL n'est capable d'induire comme dans les conditions normales la synthèse d'alpha-lactalbumine que dans 27 % des tumeurs (PEYRAT et coll., 1986). De même la PRL ne stimule la synthèse d'ADN que dans 16 % des cas (PEYRAT et coll., 1984b).

Enfin, il a été démontré que la PRL n'était pas capable d'induire la régulation négative de son propre récepteur *in vivo* chez les patientes opérées (PEYRAT et coll., 1984c) comme *in vivo* dans les lignées de cellules de cancer du sein MCF-7 et T47-D (LEROY-MARTIN et coll., 1987).

L'objectif de notre travail est donc de mieux caractériser les R-PRL dans les cancers du sein en utilisant une lignée de cellules épithéliales cancéreuses mammaires humaines en culture riches en R-PRL (T47-D). Les caractéristiques de liaison aux hormones lactogènes (hormone de croissance et prolactine humaines), biochimiques (électrophorétiques, chromatographiques, hydrodynamiques...) sont déterminées afin de mettre en évidence des éventuelles différences avec les R-PRL de la glande mammaire normale qui expliquerait le fonctionnement des R-PRL tumoraux. Par ailleurs, le résultat clinique essentiel qu'est la démonstration de la valeur pronostique de ces récepteurs nous a incité à mettre au point un dosage radio- ou enzymo-immunologique des R-PRL, plus sensible que les techniques actuelles, qui pourrait être facilement utilisable par des laboratoires de biologie clinique. Pour se faire, nous avons préparé des anticorps dirigés contre les R-PRL humains en utilisant en particulier l'approche anti-idiotypique.

# **MATERIEL ET METHODES**

## I - CARACTERISATION DES RECEPTEURS DE LA PROLACTINE

### 1. HORMONES ET PRODUITS UTILISES

Le RPMI 1640, le sérum de veau foetal (SVF), la glutamine, la streptomycine, la pénicilline, la kanamycine ont été fournis par Seromed (BIO-PRO, Mulhouse, France). L'insuline bovine provient de la Société Sigma (St-Louis, MO). Les hormones suivantes nous ont été fournies par le National Institute of Arthritis, Diabetes & Digestive & Kidney Diseases (NIADDK), Baltimore, Maryland, USA :

- La prolactine ovine (oPRL ; NIADDK-oPRL-18 ; 30 UI/mg),
  - la prolactine humaine (hPRL ; NPA - batch hPRL 5 ; AFP-1582 C),
  - l'hormone de croissance humaine (hGH ; NIAMDD-hGH-I-1 AFP-4793 B ; 30 UI/mg),
  - la prolactine porcine (pPRL ; USDA-pPRL-B-1 ; AFP 5000 ; 111 UI/mg),
  - la prolactine bovine (bPRL ; USDA-bPRL-B-1 ; AFP 5300 ; 13 UI/mg),
  - l'hormone lactogène placentaire humaine (hPL ; NIADDK-hPL),
  - l'hormone de croissance ovine (oGH ; NIADDK-oGH-14 ; AFP-7649 C ; 1,9 UI/mg),
  - l'hormone de croissance bovine (bGH ; USDA-bGH-B-1) et gonadotrophine chorionique humaine (hCG ; NIH-batch-CR-121 ; 13,45 UI/mg).
- L'insuline bovine et porcine (b,pINS, SIGMA ; 25,6 UI/mg) est aussi utilisée. La hGH a été fournie aussi par le Professeur DRAY de l'Institut Pasteur de Paris ; ainsi que la hPRL (P40 II) par le Laboratoire de Neuroendocrinologie Expérimentale de Marseille. Les sérums anti-prolactine humaine (71-75) avaient été obtenus à Marseille, dans le Laboratoire de Neuroendocrinologie Expérimentale (Docteur PELLIGRINI, Professeur JACQUET).

## 2. CULTURE DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES CANCEREUSES

Le milieu utilisé pour la culture des cellules T47-D est le RPMI 1640 dilué au 1/10ème et contient de la streptomycine (25 µg/ml), de la pénicilline (25 U/ml), de la kanamycine (50 µg/ml), de l'insuline bovine (0,6 µg/ml), de la L-glutamine (2 mM), du bicarbonate (7,5 %), de l'hepes (20 mM) et du SVF (10 %).

La lignée T47-D (clone 11, passage 57) nous a été donnée par le Professeur ROCHEFORT (Montpellier, France). Elle est cultivée en monocouche dans des flacons de culture (NUNC, 175 cm<sup>2</sup>/800 ml) contenant 50 ml du milieu, dans une étuve à 37° C. Les cellules sont récupérées par trypsinisation (10 minutes) en ajoutant dans chaque boîte vidée de son milieu de culture 2,5 ml d'une solution de trypsine 0,05 % EDTA 0,02 % (Seromed, Biopro). Une fois les cellules décollées, l'enzyme est bloqué par 2,5 ml de milieu de culture contenant 10 % de SVF.

## 3. PREPARATION DES MICROSOMES

Pour préparer les membranes, les cellules confluentes sont lavées 2 fois avec du tampon TRIS 25 mM-MgCl<sub>2</sub> 10 mM - PMSF 1 mM (phényl-méthyl-sulfonyl-fluoride, PIERCE)-azide de sodium 0,02 %, pH 7.6 (tampon TRIS-PMSF). Elles sont récupérées par grattage mécanique, centrifugées à 750 g, 4°C pendant 10 minutes. Le culot cellulaire obtenu est mis en suspension dans du tampon TRIS-PMSF, puis homogénéisé dans la glace à l'aide d'un potter en verre. L'homogénat subit une ultracentrifugation à 105 000 g, 4°C pendant 60 minutes. Le culot membranaire obtenu est repris en tampon TRIS-PMSF en homogénéisant avec un potter verre téflon. Les

concentrations en protéines sont déterminées par la méthode de LOWRY (1951) en utilisant une gamme standard de sérum albumine bovine (BSA). Les microsomes ainsi obtenus sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4. MARQUAGE DES HORMONES A L'IODE $^{125}$

L'hormone de croissance humaine (hGH) et la prolactine humaine (hPRL) sont iodées par l' $^{125}\text{I}$ Na (CEA) selon la méthode de HUNTER et GREENWOOD (1962), mais en utilisant de plus faibles concentrations de chloramine T (1  $\mu\text{g}$  pour 10  $\mu\text{g}$  d'hormone) (KELLY et coll., 1979). Avant iodination, la hPRL est tamponnée par le tampon phosphate 100 mM, pH 7,4. La séparation entre l'hormone marquée et l'iode libre est effectuée par chromatographie sur Ultrogel AcA 54 (IBF) en tampon TRIS 25 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, pH 7,6, BSA 0,1 % (albumine bovine, fraction V, SIGMA). L'hormone présente une radioactivité spécifique de l'ordre de 70  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  (PEY-RAT et coll., 1984a).

#### 5. SOLUBILISATION DES RECEPTEURS MEMBRANAIRES

La technique classique de solubilisation des R-PRL est basée sur l'utilisation du Triton X-100 (SHIU et FRIESEN, 1974a ; DJIANE et coll., 1981a ; HAEUPTLE et coll., 1983 ; KATOH et coll., 1984). Mais ce détergent neutre, peu sélectif, provoque une agrégation des molécules de PRL, interdisant son utilisation comme ligand en chromatographie d'affinité et comme traceur pour la caractérisation des R-PRL ainsi solubilisés (SHIU et FRIESEN, 1974a). Cette technique nécessite obligatoirement l'utilisation de l'hGH au cours des étapes ultérieures de purification (KELLY et coll., 1974 ; PARKE et FORSYTH, 1975 ; HERINGTON et VEITH, 1977).

Pour cette raison, nous avons aussi utilisé comme DS. LISCIA et KATOH (LISCIA et coll., 1982a ; LISCIA et VONDERHAAR, 1982b ; KEL-

LY et coll., 1984) un nouveau détergent Zwitterionique, le CHAPS : 3((3-cholamidopropyl)diméthyl-ammonio)-1-propane sulfonate (HJELMELAND, 1980; SIMONDS et coll., 1980). Ce détergent Zwitterionique ne possède pas les inconvénients présentés par le Triton X-100 ; le CHAPS ne présente aucune interférence avec la prolactine. Après dilution pour obtenir une concentration protéique comprise entre 1 et 10 mg/ml, la préparation de microsome est incubée pendant 60 min, à température ambiante et sous agitation, en présence de CHAPS (SIGMA) à différentes concentrations, puis centrifugée à 105 000 g, 4°C pendant 60 min. Le surnageant, représentant l'extrait solubilisé et renfermant les R-PRL solubilisés, est conservé à -20°C.

## 6. MESURE DES RECEPTEURS

### 61. TEST DE LIAISON

Afin de mesurer la liaison de l'hormone de croissance humaine sur les différentes préparations, 400 µg de protéines pour la fraction membranaire et 200 µg (de protéines solubilisées) pour les extraits solubilisés, sont incubés pendant 18 heures à 20°C, avec l'hormone iodée (200 000 cpm), en absence et en présence d'un excès de prolactine ovine non radioactive (1 µg) (POSNER et coll., 1974 ; SHIU et FRIESEN, 1974a,b ; KATOH et coll., 1984 ; PEYRAT et coll., 1984a). Le volume final est ajusté à 0,5 ml avec du tampon TRIS 25 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM - BSA 0,1 % - azide de sodium 0,02 % - pH 7,4 (tampon BSA). L'incubation des récepteurs membranaires est arrêtée par l'addition de 4 ml de tampon TRIS 25 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM, BSA 0,2 %, azide de sodium 0,02 %, pH 7,4, celle des fractions solubles par précipitation des complexes "hormone-récepteur" à l'aide d'une solution à 0,1 % de gamma-globulines de lapin (CALBIOCHEM) en tampon phosphate 0,1 M, pH 7,5 et d'une solution de polyéthylène-glycol à 20 % (P/V) (PEG

6000, PROLABO) (SHIU et FRIESEN, 1974a). Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 g, 4°C pendant 15 min. La radioactivité présente dans les culots ainsi obtenus est mesurée à l'aide d'un compteur gamma (1275 Mini-gamma, LKB). La liaison spécifique de l'hormone sur les récepteurs est déterminée en établissant la différence entre la quantité de radioactivité liée en absence et en présence d'hormone non radioactive. Toutes les mesures sont effectuées en double.

## 62. DETERMINATION DU NOMBRE DE SITES ET DE LA CON- TANTE D'AFFINITE

La détermination du nombre de sites fixant l'hormone de croissance humaine (N) ainsi que le calcul de la constante d'affinité de liaison des récepteurs (Ka) sont réalisés selon la méthode de SCATCHARD (1949). Pour cela, les récepteurs de la prolactine sont incubés pendant 18 heures à 20°C en présence de quantités croissantes d'hormone de croissance humaine iodée (de 0,125 à  $2 \cdot 10^6$  cpm) et de quantité fixe de prolactine ovine non radioactive (1 µg/tube). Les conditions d'incubation et d'arrêt de la réaction sont identiques à celles décrites pour les tests de liaison. La représentation du rapport hormone liée sur hormone libre (B/F) en fonction de l'hormone liée (B) donne une droite de pente négative (-Ka) et d'abscisse à l'origine N.

## 7. SPECIFICITE DE LIAISON DES RECEPTEURS MEMBRANAIRES

Les récepteurs (200 ou 400 µg de protéines membranaires) sont incubés avec l'hormone iodée (1 ou  $2 \cdot 10^5$  cpm), pendant 18 heures à 20°C, en absence ou en présence de concentrations croissantes en différentes hormones polypeptidiques (de 0,1 à 1000 ng/tube) (hGH, hPRL, oPRL, pPRL, bPRL, oGH, bGH, hCG et p,bINS). Les conditions d'incubation et d'arrêt de la réaction sont identiques à celles décrites pour les tests de liaison.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison spécifique maximale obtenue en absence d'hormone non radioactive.

#### 8. MARQUAGE PAR AFFINITE

Le marquage par affinité est une technique qui, par l'intermédiaire d'agents bifonctionnels, permet la liaison covalente du récepteur et de l'hormone iodée. Les réactifs les plus couramment utilisés sont le DSS (disuccinimidyl subérate, PIERCE), l'EGS (Ethylène-Glycol-bis(Succinimidyl Subérate) PIERCE) ; tous deux agents homobifonctionnels, et le HSAB (N-hydroxysuccinimidyl-4-azidobenzoate, PIERCE), agent hétérobifonctionnel photo-activable (KELLY et coll., 1984 ; KATOH et coll., 1985 ; SAKAI et coll., 1985).

Des microsomes de cellules T47-D (800 µg) et des extraits solubilisés par le CHAPS à 0,5 % (P/V) (400 µg) sont incubés pendant 15 heures à 20°C, avec l'hormone de croissance humaine (800 000 cpm) en absence et en présence de 20 µg de prolactine ovine non radioactive, le volume final étant complété à 1 ml avec du tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4 contenant du MgCl<sub>2</sub> 10 mM, de la BSA 0,1 %, du PMSF 1 mM et 0,1 mg/ml d'inhibiteur de trypsine (Trypsin inhibitor from soybean, type II-S, 10 000 UI/mg, SIGMA).

L'incubation des récepteurs membranaires est arrêtée par l'addition de 4 ml de tampon phosphate de sodium 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,4, celle des fractions solubles par précipitation des complexes "hormone-récepteur" à l'aide d'une solution à 0,1 % de gamma-globulines de lapin en tampon phosphate 0,1 M, pH 7,5 et d'une solution de polyéthylène-glycol à 20 % (P/V). Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 g 4°C pendant 15 minutes, cette étape de lavage étant répétée une seconde fois. Le culot

obtenu est repris avec 0,5 ml de tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4 auquel sont ajoutés 10 µl d'une solution 25 mM d'EGS (Ethylène-Glycol-bis(Succinimidyl Succinate) PIERCE), solubilisé en diméthyl-sulfoxyde (DMSO). Après une incubation de 16 min. à 0°C, la réaction des récepteurs membranaires est stoppée par l'addition de 4 ml de tampon TRIS 10 mM, pH 7,5 et centrifugation à 3000 g, 4°C pendant 15 minutes ; celle des fractions solubles par l'addition de 0,15 volume de tampon TRIS 1 M, pH 7,5. Le culot et la fraction soluble, repris dans 50 µl de tampon TRIS 62 mM, pH 6,8 SDS 2 % (P/V), glycérol 10 % (v/v), bleu de bromophénol 0,02% (P/V), sont resolubilisés par chauffage à 100°C pendant 5 minutes.

L'analyse électrophorétique des différents échantillons est effectuée en gradient linéaire d'acrylamide-SDS (5-15 %) (SAKAI et coll., 1985) selon la technique décrite par LAEMMLI (1970). Après coloration au bleu de Coomassie (Bleu R250, SERVA), décoloration et séchage, le gel est mis au contact de films autoradiographiques (KODAK X OMAT SFW, 18 x 24 cm) pendant 7 à 15 jours à -80°C. Les poids moléculaires des complexes "hormone-récepteur" sont déterminés en comparant les distances de migration des échantillons par rapport à celles obtenues avec les standards (PHARMACIA) utilisés : phosphorylase b (94 000), albumine bovine (67 000), ovalbumine (43 000), anhydrase carbonique (30 000), inhibiteur de trypsine (20 100) et alpha-lactalbumine (14 400).

## 9. ETUDE DES RECEPTEURS DE LA PROLACTINE EN GEL FILTRATION

L'estimation du poids moléculaire apparent du récepteur solubilisé par le CHAPS, non occupé par l'hormone de croissance humaine, a été réalisée par chromatographie d'exclusion sur Sépharose 6B. Ce type de gel assure

un fractionnement linéaire pour des poids moléculaires compris entre 100 000 et 4 000 000 Da, la limite d'exclusion se situant à 4 000 000 Da. Grâce à sa structure très ouverte et à sa porosité très large, le Sépharose 6B est utilisé pour la séparation des protéines solubilisées par le détergent (CHAPS) qui, en général, présente des effets sur la conformation des protéines.

Pour l'étude du récepteur libre, des récepteurs membranaires de cellules T47-D, solubilisés par le CHAPS (2 ml soit 4 mg de protéines) sont déposés sur une colonne de Sépharose 6B (Pharmacia), d'un volume de 97,2 ml (1,4 x 60 cm) et préalablement équilibrée en tampon TRIS 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, CHAPS 1 mM, PMSF 1 mM, azide de sodium 0,02 %, pH 7,4. Sur chacune des fractions obtenues (100 x 1 ml), après élution avec le tampon pré-cité, un test de liaison est réalisé en incubant 100 µl de l'éluat avec 200 000 cpm d'hormone de croissance humaine iodée en absence et en présence d'1 µg de prolactine ovine non radioactive. Le volume d'exclusion (V<sub>0</sub>) de la colonne est déterminé avec une solution de bleu dextran 2000 (Pharmacia).

#### 10. ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES RECEPTEURS SOLUBILISES EN HPLC

L'étude a été réalisée en gel de perméation, à l'aide de 3 colonnes en série : TSK G 4000 SW (7,5 mm x 60 cm, LKB), Protein PAK 300 SW (7,5 mm x 30 cm, Waters) et Protein PAK 125 (7,8 mm x 30 cm, Waters) permettant respectivement un fractionnement linéaire de protéines des poids moléculaires allant de 5000 à 1 000 000 Da, de 10 000 à 400 000 Da et de 2 000 à 80 000 Da. Il a été indispensable d'utiliser ces 3 colonnes ensemble pour assurer un bon fractionnement du récepteur solubilisé par le Triton

X-100 dans la zone de poids moléculaire intéressée. Aucune conclusion n'a pu être tirée des profils d'élution obtenus avec le récepteur solubilisé par le CHAPS, car il s'est avéré impossible de calibrer les colonnes. En présence de CHAPS, les différents standards de poids moléculaire (Pharmacia) utilisés sortent en même temps. Il semble que le CHAPS interfère avec le support des colonnes, soit en provoquant l'agrégation des protéines, soit en modifiant le pouvoir de séparation du gel. La gel filtration est effectuée à l'aide d'une pompe Beckman 110A, d'un injecteur universel Waters UGK, d'un détecteur LKB réglé à 280 nm. Les trois colonnes sont connectées en série et plongées dans un bain de glace. Elles sont équilibrées dans le tampon borate de sodium 0,1 M, NaCl 0,2 M, Triton X-100 0,1 %, PMSF 0,2 mM, azide de sodium 0,02 %, pH 7,4. Le débit de la pompe est de 0,5 ml/minute. Le récepteur solubilisé par le Triton X-100 à 1 % (0,2 ml soit 1,5 mg de protéines) est injecté dans la colonne et l'on recueille des fractions de 0,5 ml. Des fractions aliquotes de 100 µl sont prises pour le test de liaison réalisé en incubant avec 200 000 cpm d'hormone de croissance humaine iodée en absence et en présence d'1 µg de prolactine ovine non radioactive.

Les standards (Pharmacia) utilisés pour la détermination des poids moléculaires sont : thyroglobuline (669 000), ferritine (440 000), catalase (232 000), aldolase (158 000), sérumalbumine bovine (67 000), ovalbumine (43 000), chymotrypsinogène (25 000) et ribonucléase (13 700). Le volume d'exclusion des colonnes est mesuré à l'aide d'une solution de bleu Dextran 2000 et le volume total par l'iode 125 radioactif.

## 11. ETUDE DES RECEPTEURS DE LA PROLACTINE EN GRADIENT DE SACCHAROSE

La vitesse à laquelle une macromolécule sédimente est caractérisée par son coefficient de sédimentation  $S$ , défini comme étant la vitesse de sédimentation par unité de champ de forces.

$$S = \frac{\frac{dr}{dt}}{\omega^2 \cdot r}$$

où  $dr/dt$  est la vitesse à l'instant  $t$

et  $r$  est la distance de la macromolécule à l'axe de rotation du rotor à l'instant  $t$

$$\omega = 2 \cdot \pi \cdot \frac{N}{60}$$

$\omega$  est la vitesse angulaire de rotation

$N$  est la vitesse en tours par minute

Le coefficient de sédimentation  $S$  est exprimé en unités Svedberg.

Une unité Svedberg =  $1 S = 10^{-13}$  unités cgs.

Le gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 % (p/v) réalise un milieu de centrifugation où la vitesse de sédimentation des macromolécules est indépendante du temps de centrifugation.

Le moyen le plus simple de mesurer le coefficient de sédimentation d'une macromolécule inconnue consiste à centrifuger celle-ci en présence de macromolécules de même nature dont le coefficient de sédimentation est connu.

Au fur et à mesure que les macromolécules sédimentent, elles traversent des zones où la densité, la viscosité du milieu ainsi que l'intensité du champ de forces  $\omega^2 \cdot r$  augmentent ; on en déduit que leur vitesse de sédimentation n'est pas nécessairement constante et que la grandeur directement mesurée lors de la centrifugation est la distance  $r$  parcourue par la zone de macromolécules pendant la durée  $t$  de la centrifugation sous forme d'une vitesse moyenne  $\Delta r / \Delta t$ .

On a :

$$\frac{(\Delta r)_1}{(\Delta r)_2} = \frac{(S_{20,\omega})_1}{(S_{20,\omega})_2} = \frac{\eta_0 - \eta_1}{\eta_0 - \eta_2}$$

où  $\eta_0$  est le nombre total de fractions collectées après la centrifugation et  $\eta_1, \eta_2$  sont les fractions où les concentrations, respectivement de la macromolécule inconnue et de la macromolécule connue, sont maximales.

$S_{20,\omega}$  représente le coefficient de sédimentation, constante caractéristique de chaque espèce de macromolécule, que l'on aurait à +20°C avec l'eau ( $\omega$ ) comme milieu :

$$S_{20,\omega} = S_{T,m} \cdot \frac{\eta_{T,m} \cdot (1 - \bar{v}\rho)_{20,\omega}}{\eta_{20,\omega} \cdot (1 - \bar{v}\rho)_{T,m}}$$

où  $\eta_{T,m}$  est la viscosité du milieu de centrifugation  $m$  à la température  $T$

$\eta_{20,\omega}$  est la viscosité de l'eau à +20°C (0,010002 g.cm)

$(1 - \bar{v}\rho)_{T,m}$  est le terme de flottaison dans le milieu de centrifugation  $m$  à la température  $T$

$(1 - \bar{v}\rho)_{20,\omega}$  est le terme de flottaison dans l'eau  $\omega$  à la température de +20°C

$S_{T,m}$  est le coefficient de sédimentation de la macromolécule dans le milieu de centrifugation  $m$  à la température  $T$ .

Les gradients de saccharose linéaires 5-20 % (p/v) sont préparés en tampon TRIS 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, PMSF 1 mM, CHAPS 1 mM, pH 7,4 à l'aide d'un formeur de gradient à deux chambres cylindriques et coulés dans des tubes en polyallomère de 4,4 ml.

Les échantillons (200 µl) : récepteur solubilisé par le CHAPS (700 µg) et les témoins de poids moléculaire (Pharmacia) sont déposés sur ces gradients et les tubes sont centrifugés à 55 000 rpm et à 4°C pendant 17 heures dans un rotor SW60 (Beckman). Des fractions de 200 µl sont collectées après perçage du tube. Sur chacune des fractions obtenues (25 fractions), la concentration en protéines, pour les témoins de poids moléculaire, est déterminée en mesurant la densité optique à 280 nm et un test de liaison, pour le récepteur solubilisé fractionné, est réalisé en incubant 100 µl de fraction avec 200 000 cpm d'hormone de croissance humaine iodée en absence et en présence d'1 µg de prolactine ovine non radioactive.

## 12. PURIFICATION DES RECEPTEURS DE LA PROLACTINE PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

### 121. PREPARATION DU GEL DE CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Cette technique a pour but de fixer le ligand (hormone de croissance humaine) sur un support solide. Pour cela est utilisé l'Affi-Gel-10 (N-hydroxysuccinimide ester de 3,3'-diaminodipropylaminosuccinyl-agarose, BIO-RAD). A un pH convenable (de 6,5 à 8,5), ce gel possède des groupements N-hydroxysuccinimides pouvant être facilement déplacés par des fonctions amines primaires du ligand. Ce dernier se trouve alors fixé sur le gel par des liaisons amides stables. L'hormone de croissance humaine (10 mg), préalablement solubilisé dans 10 ml de tampon NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,0

est ajoutée à 40 ml de tampon  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M contenant 1 g d'Affi-gel 10. Après une incubation de 18 heures à 4°C sous agitation, la réaction de couplage est arrêtée par l'addition de 3 ml d'une solution de glycine 1 M en tampon  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M, ceci afin de bloquer les sites libres éventuels. Le ligand non fixé est éliminé par plusieurs lavages successifs réalisés à l'aide d'urée 8 M et de guanidine HCl 4 M. Le gel est conservé à 4°C en tampon  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M, azide de sodium 0,03 %.

Lors de son utilisation, l'Affi-gel 10 auquel est couplée l'hormone est équilibré avec un tampon borate de sodium 0,1 M, CHAPS 1 mM, PMSF 1 mM, azide de sodium 0,02 %, pH 7,4 (tampon borate, CHAPS).

#### 122. PURIFICATION DES RECEPTEURS DE LA PROLACTINE PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE, A L'AIDE D'HORMONE DE CROISSANCE HUMAINE

Les récepteurs, solubilisés par le CHAPS, sont dilués avec un tampon TRIS-PMSF contenant du  $\text{MgCl}_2$  10 mM afin d'abaisser la concentration finale de CHAPS à 1,62 mM et de travailler en présence de  $\text{MgCl}_2$  10 mM. Ces deux conditions sont nécessaires pour rendre optimale la liaison entre l'hormone et le récepteur. Cette préparation initiale (environ 300 ml) est passée sur la colonne d'Affi-gel 10 (2,2 x 30 cm) auquel est couplée l'hormone. Le passage sur la colonne est effectué à 20°C, à l'aide d'une pompe péristaltique (Gilson) assurant un débit d'environ 15 ml par heure et durant une vingtaine d'heures ; le réservoir d'alimentation ainsi que l'effluent sont maintenus à +4°C.

Après passage des récepteurs solubilisés sur la colonne, le gel subit différents lavages par l'équivalent de 10 volumes de gel de tampon borate-

CHAPS, un volume de NaCl 1 M en tampon borate-CHAPS suivi de 4 volumes de tampon.

L'étape d'élution des récepteurs est assurée par le passage d'un volume de  $MgCl_2$  5 M en tampon borate-CHAPS suivi de 4 volumes de tampon. Les premières fractions correspondant à la sortie de  $MgCl_2$ , renfermant les récepteurs élués, sont réunies et déposées sur une colonne de gel-filtration (Séphadex G100, Pharmacia ; 2,8 x 55 cm) à  $+4^\circ C$ , préalablement équilibrée avec le tampon, afin d'éliminer le  $MgCl_2$ . Parmi les fractions obtenues, celles contenant les récepteurs sont réunies et dialysées pendant 48 heures à  $4^\circ C$  contre du tampon borate-CHAPS dilué au 1/10ème et renouvelé 4 fois. Le dialysat, représentant la fraction de récepteurs partiellement purifiés, est concentré par lyophilisation et conservé à  $-20^\circ C$ .

La purification du récepteur prolactinique, par chromatographie d'affinité, est suivie en établissant les profils d'élution. Pour cela, des tests de liaison sont réalisés sur les différentes fractions obtenues. Parallèlement, le  $MgCl_2$  présent dans l'éluat de l'Affi-gel 10 et dans l'effluent de la colonne de gel-filtration est mis en évidence par l'apparition d'un précipité blanc lorsqu'un aliquot des différentes fractions est ajouté à 0,5 ml de NaOH 1N.

Le facteur de purification est déterminé en comparant la concentration en R-PRL, présentée par les préparations correspondant aux différentes étapes de purification (récepteurs membranaires, extrait solubilisé, fraction partiellement purifiée), et mesurée selon la méthode de SCATCHARD.

## II - ETUDE DES ANTICORPS

### 1. OBTENTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX

Différents sérums anti-récepteur ont été obtenus au laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire du Centre de Recherches INRA de Jouy-en-Josas (Dr J. DJIANE), avec lequel notre laboratoire collabore (Tableau I).

Deux chèvres (442 et 443) ont été immunisées contre une préparation partiellement purifiée de R-PRL de glande mammaire de truie, présentant une liaison spécifique de 17,7 pmoles par mg de protéines. Pour cela 100 µg de cette préparation solubilisées dans 1 ml de tampon TRIS 25 mM, Triton X-100 0,1 %, pH 7,5 ont été injectés par voie intra-dermique, en adjuvant complet de Freund pour la 1ère, la 6ème et la 7ème immunisations et en adjuvant incomplet de Freund pour les autres injections de rappel, effectuées à 1 mois d'intervalle. Les prélèvements de sang ont été réalisés 7 à 10 jours après l'injection de rappel.

Les autres sérums anti-récepteur des chèvres 46 et 47, de brebis 151 et de cobaye ont été obtenus, de la même façon que précédemment, en immunisant ces animaux contre le R-PRL de glande mammaire de lapine partiellement purifié par chromatographie d'affinité.

### 2. OBTENTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Les hybridomes ont été obtenus à MONTREAL, dans le laboratoire d'endocrinologie moléculaire de Paul A. KELLY. Des souris BALB/C ont été immunisées contre une préparation de récepteurs prolactiniques de glande mammaire de lapine, partiellement purifiés par chromatographie d'affinité sur Affi-gel 10 oPRL après une solubilisation par le CHAPS ; cette préparation possédant une capacité de liaison spécifique égale à 150 pmoles par

Tableau I - Anticorps (Ac) polyclonaux et monoclonaux préparés  
contre les R-PRL purifiés à partir de glande mammaire  
de truie et de lapine

	<u>Anticorps polyclonaux</u>
Sérums anti-R-PRL de truie	Chèvre 442
	Chèvre 443
Sérums anti-R-PRL de lapine	Chèvre 46
	Chèvre 47
	Brebis 151
	Cobaye
	<u>Anticorps monoclonaux</u> (anti-site)*
	M 110
	A 917
	A 82

Ces anticorps ont été mis à notre disposition par le Dr J. DJIANE (Unité d'Endocrinologie Moléculaire INRA - Jouy-en-Josas). Les R-PRL de lapine ont été purifiés par chromatographie d'affinité en utilisant la hGH, comme ligand ; les Ac, préparés ensuite, contiennent aussi des Ac-GH.

\* Le site contre lequel est dirigé l'anticorps est déterminé sur les R-PRL de lapine.

mg de protéines. Dix mg d'antigène ont été injectés par voie intra-péritonéale avec l'adjuvant complet de Freund pour la première immunisation, puis l'adjuvant incomplet de Freund pour les deux rappels suivants effectués à 3 semaines d'intervalle.

Le dernier rappel, 9 semaines après la première injection, est réalisé sans adjuvant par voie sous-cutanée ou intra-veineuse. Les rates sont prélevées 3 jours après la dernière immunisation et les splénocytes obtenus sont fusionnés avec des cellules myélomateuses de souris (NSO ou SP2) en présence de polyéthylène-glycol 1000. Après dilution en milieu RPMI 1640 contenant 10 % de sérum de veau foetal, les hybridomes sont sélectionnés à l'aide du milieu HAT (Hypoxantine, Aminoptérine, Thymidine) puis clonés 3 fois successivement selon la technique en gélose molle ou de la dilution limite.

Afin de ne retenir que les clones sécrétant des immunoglobulines dirigées contre le site de liaison de l'unité réceptrice, le test de sélection utilisé a consisté à déterminer la capacité d'inhibition de la liaison de l'hGH iodée sur les microsomes de glande mammaire de lapine. Parmi 983 hybridomes, 3 clones sécrétant des anticorps monoclonaux, nommés respectivement M110 (IgG1), A917 (IgG2b) et A82 (IgG1) ont été sélectionnés.

### 3. OBTENTION D'ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES

La notion d'idiotypie introduite en immunologie il y a un peu plus de vingt ans a pris aujourd'hui de nouvelles dimensions par ses diverses applications, notamment pour la préparation d'anticorps anti-récepteur. En effet, depuis que JERNE (1974) a avancé sa théorie sur le réseau idiotypique qui lui a valu le prix Nobel, il a été bien vérifié que le site de com-

binisation antigénique d'une molécule d'anticorps peut être reconnu par d'autres anticorps. Ces derniers auraient alors un site semblable à celui de l'antigène (Figure 4). L'existence d'anticorps de type images internes a été expérimentalement montrée pour des antigènes exogènes variés (SEGE et PETERSON, 1978 ; ISLAM et coll., 1983), et leur capacité d'avoir la même activité biologique que les antigènes (hormones) a été bien discutée (MARASCO et BEECLEER, 1982). Ainsi, plusieurs récepteurs membranaires, dont les récepteurs hormonaux sont peu solubles et difficiles à purifier, ont été étudiés par des anticorps ressemblant aux ligands de ces récepteurs. Les résultats remarquables obtenus dans ce domaine nous ont conduit à envisager cette approche pour l'étude du récepteur de la prolactine.

Le principe de préparation des anticorps anti-idiotypes est toujours le même : pour préparer des anticorps anti-idiotypes contre les récepteurs hormonaux, certains auteurs utilisent l'hormone comme immunogène de départ (SEGE et PETERSON, 1978 ; FARID et coll., 1984 ; AMIT et coll., 1986), d'autres utilisent des analogues de synthèse dont l'affinité pour le récepteur est beaucoup plus grande que l'hormone naturelle (SCHREIBER et coll., 1980 ; CAYANIS et coll., 1986). Les anticorps anti-hormone obtenus sont sélectionnés en fonction de leur activité antigénique. Ils sont ensuite injectés à des animaux de même espèce (AMIT et coll., 1986) et de préférence de même souche. Néanmoins, il y a quelques exemples où des espèces différentes ont été utilisées avec succès (ISLAM et coll., 1983). Le protocole que nous avons adopté est détaillé ci-dessous. Les sérums anti-hPRL humains préparés chez le lapin néozélandais (71), nous ont été fournis par le Professeur JACQUET et le Docteur PELLEGRINI (Laboratoire de Neuroendocrinologie Expérimentale).

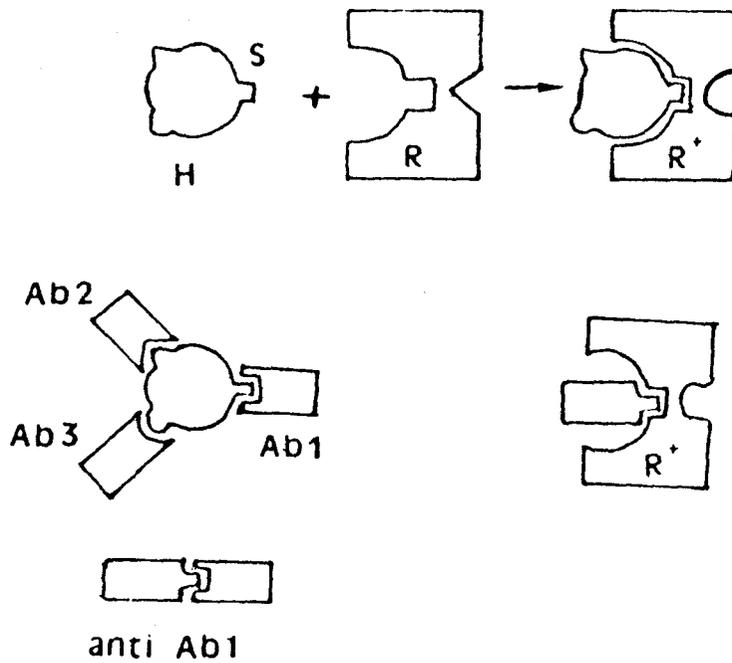


Figure 4 - Représentation schématique de la préparation d'anticorps anti-idiotypes

La réaction du haut montre l'association étroite de l'hormone (H) avec son site actif (S) au récepteur (R). La réaction du bas montre qu'un anticorps anti-anticorps (anti-Ab1) peut interagir avec le site actif du récepteur (R).

Six lapins néozélandais (L1, L2, L3, L4, L5, L6) ont été immunisés avec une préparation d'IgG anti-prolactine humaine purifiée par chromatographie sur protéine A Sépharose (Pharmacia).

Pour cela 0,5 mg et 1 mg de cette préparation, solubilisés dans 1 ml de solution physiologique (NaCl 9 ‰) ont été injectés respectivement aux L1, L2 et L3 et aux L4, L5 et L6 par voie intra-dermique, en adjuvant complet de Freund (Sigma) pour la première immunisation et en adjuvant incomplet de Freund pour les autres injections de rappel, effectuées à 15 jours d'intervalle. Les prélèvements de sang ont été réalisés 7 à 10 jours après l'injection de rappel.

#### 4. TEST DE L'ACTIVITE DES ANTICORPS

##### 41. INHIBITION DE LA LIAISON HORMONE-RECEPTEUR

L'activité inhibitrice des anticorps (sérums) sur la liaison hormone-récepteur a été mesurée en réalisant des tests de liaison de la prolactine humaine iodée (200 000 cpm) sur des membranes de glande mammaire de lapine et des cellules T47-D (400 µg de protéines membranaires), en l'absence ou en présence des sérums immuns et non immuns à différentes dilutions.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la liaison spécifique obtenue avec ou sans 1 µg de prolactine ovine non marquée.

##### 42. IMMUNOPRECIPITATION DU RECEPTEUR OCCUPE

Des récepteurs prolactiniques de glande mammaire de lapine et des cellules T47-D, solubilisés par le CHAPS, sont incubés avec la prolactine

humaine iodée dans des conditions identiques à celles utilisées pour les tests de liaison. Après 18 heures d'incubation à 20°C, 100 µl de différentes dilutions en anticorps, réalisées en tampon BSA, sont ajoutés dans chacun des tubes. Après une seconde incubation de 6 heures à 20°C, la réaction est arrêtée par l'addition de 110 µl de pansorbine (CALBIOCHEM) à 4 % que l'on laisse agir pendant 15 minutes à 4°C. Pour les tubes contrôles, ayant reçu 100 µl de tampon, le test est stoppé par précipitation des complexes "hormone-récepteur" à l'aide de gamma-globulines de lapin et de polyéthylène-glycol. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 g, 4°C pendant 15 minutes et la radioactivité présente dans les culots ainsi obtenus, représentant les complexes "hormone-récepteur" précipités par les anticorps ou le polyéthylène glycol, est mesurée à l'aide du compteur 1275 Minigamma.

##### 5. TEST DES ANTICORPS PAR LIAISON DU COMPLEXE "ANTICORPS ANTI-IDIOTYPES - R-PRL MEMBRANAIRES" A LA PROTEINE A RADIOACTIVE

Des récepteurs prolactiniques membranaires de cellules T47-D (400 µg) sont incubés avec différentes dilutions en anticorps anti-idiotypes, réalisées en tampon BSA. Le volume final est ajusté à 0,3 ml avec du tampon BSA. Après 1 heure d'incubation à 4°C, les membranes sont lavées trois fois par addition d'1 ml de tampon BSA. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 g, 4°C pendant 15 minutes. Les culots ainsi obtenus sont repris avec le volume initial, et 100 µl de protéine A iodée (Amersham, France) (11 500 cpm) est ajoutée dans chacun des tubes que l'on laisse agir pendant 30 minutes à 4°C. Les membranes sont de nouveau lavées deux fois comme précédemment ; les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 g, 4°C pendant 15 minutes et la radioactivité présente dans les

culots ainsi obtenus, représentant les complexes "récepteur-anticorps-protéine A", est mesurée à l'aide du compteur 1275 Minigamma.

## 6. IMMUNOHISTOCHIMIE

L'activité immunologique des anticorps a aussi été appréciée en immunocytochimie sur les cellules T47-D, en collaboration avec le Laboratoire d'Histologie (E. CARPENTIER, Pr J. LEONARDELLI ; Faculté de Médecine, Lille).

Les cellules T47-D sont lavées 2 fois avec du tampon physiologique NaCl 9 ‰ (tampon isotonique) et fixées sur des lames en atmosphère sèche à température ambiante.

Après fixation, les lames sont ensuite rincées dans deux bains de tampon Coons (Veronal sodique 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,2) puis incubées 2 heures à 37°C avec les immunosérums anti-idiotypiques ou avec les sérums non immuns, dilués au 1/50ème dans du tampon Coons. Après trois rinçages dans des bains de Coons, les lames sont ensuite exposées pendant 30 minutes à des immunoglobulines de mouton anti-lapin (Diagnostics Pasteur) conjuguées à la peroxydase diluées au 1/100ème dans du tampon Coons. Après un passage rapide des lames dans le tampon Coons, l'eau distillée et le tampon TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,4 la peroxydase est révélée par l'alpha chloronaphtol (4-chloro-1-naphtol, Sigma) en tampon TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,4 additionné d'eau oxygénée à 0,2 ‰ et de diméthyl-formamide à 2 ‰, ainsi une coloration bleue apparaît en 5 à 7 minutes. Après un passage dans l'eau distillée, les lames sont montées dans l'eau glycinée.

## 7. IMMOBILISATION DU R-PRL SUR NITROCELLULOSE ET IMMUNO DETECTION ("Dot Immunobinding")

L'application des R-PRL membranaires des cellules T47-D (40  $\mu$ l soit 400  $\mu$ g de protéines), en forme de puits sur une phase solide (nitrocellulose), a été effectuée à l'aide d'un appareil (Bio-Dot microfiltration apparatus, BIO-RAD) pour assurer une bonne imprégnation du support sans diffusion. Une fois l'immobilisation des protéines sur la matrice accomplie, l'immunodétection des récepteurs prolactiniques par les anticorps anti-idiotypes est réalisée dans des conditions identiques à celles utilisées pour l'immuno-électrotransfert et détaillées ci-après.

## 8. IMMUNO-ELECTRO-TRANSFERT

### 8.1 PRINCIPE GENERAL

Cette technique a été depuis quelques années, et continue encore d'être l'une des plus utilisées pour la détection des protéines et l'étude de la spécificité des anticorps. En 1979, TOWBIN et coll. décrivent une méthode qui permet de transférer les protéines d'un gel d'électrophorèse, à l'aide d'un courant électrique, sur une matrice (nitrocellulose) qui adsorbe les protéines ("Western Blot"). Une fois le transfert accompli, la nitrocellulose est traitée avec un "agent bloqueur" qui peut être de la sérum-albumine bovine ou une autre protéine non spécifique (protéines du lait). Cette étape est nécessaire pour saturer les sites de liaison non spécifiques sur la matrice, ce qui permet donc d'éviter l'interaction entre la matrice et la sonde spécifique utilisée pour détecter la protéine immobilisée sur la feuille de nitrocellulose. L'étape finale consiste à visualiser le complexe "anticorps spécifique - protéine" formé, par l'une des procédures suivantes :

- par autoradiographie lorsqu'un deuxième anticorps marqué à l'iode 125 est utilisé pour révéler le premier,
- par détection à l'ultraviolet lorsque le deuxième anticorps est marqué à la fluorescéine,
- par détection immuno-enzymatique lorsque le deuxième anticorps est marqué par un enzyme, la peroxydase. Comme pour les techniques immunohistochimiques, l'incubation de la peroxidase avec un substrat : l'alpha-chloronaphtol, permet de visualiser les complexes "récepteurs-anticorps" qui sont colorés en bleu.

Le développement rapide de la réaction est l'avantage de cette procédure comparée à l'autoradiographie qui demande un temps d'exposition très long.

La technique du transfert présente plusieurs avantages : facile à réaliser, très sensible et permet de détecter spécifiquement des protéines immobilisées sur la matrice.

## 8.2. APPLICATION AU RECEPTEUR PROLACTINIQUE

Les récepteurs prolactiniques membranaires de cellules T47-D (400 µg), solubilisés par le SDS 2 % en présence de dithiothréitol 0,1 M, sont déposés sur un gradient linéaire de polyacrylamide 5-15 %. Après séparation électrophorétique des différents échantillons sur le gel de polyacrylamide en présence de SDS selon la technique de LAEMMLI (1970), l'électrotransfert des protéines sur une feuille de nitrocellulose (SCHLEICHER et SCHUELL BA-85) (aux dimensions du gel) est réalisé selon la procédure de TOWBIN et coll. (1979) à 20 volts pendant une nuit dans le tampon de transfert : TRIS-HCl 25 mM - glycine 150 mM - méthanol 20 %, pH 8,3. La nitrocellulose est séchée entre deux papiers filtre. Après coloration au

rouge Ponceau (Ponceau S, SERVA) et décoloration à l'eau, les bandelettes de nitrocellulose sont ensuite saturées par 5 % (p/v) de protéines du lait dans le tampon TRIS-HCL 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 (tampon TBS) pendant une heure à 37°C. Les bandelettes sont ensuite soumises à des lavages, 2 fois pendant 15 minutes avec du tampon TBS et TBS, Tween-20 0,1 % (p/v) (tampon TNT), avant d'être incubées soit avec les immun-sérums anti-idiotypiques dilués au 1/50ème dans le tampon TNT-lait 1% (p/v), soit avec un sérum pré-immun dilué dans les mêmes conditions que le sérum anti-idiotypique pendant 2 heures à température ambiante. Après plusieurs lavages des bandelettes de nitrocellulose par du tampon TNT, celles-ci sont incubées avec un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase (Diagnostics Pasteur) dilué au 1/1000ème dans du tampon TNT-lait 1 %, pendant 1 heure à température ambiante. Après trois lavages avec du tampon TNT et un dernier lavage avec du tampon TBS, l'anticorps de chèvre marqué à la peroxydase est détecté avec son substrat, le chloronaphtol à 0,05 % (p/v) dans du tampon TBS en présence d'eau oxygénée à 0,06 %. Enfin, la réaction est arrêtée par un lavage à l'eau contenant 10 % de glycérol.

# RESULTATS

I - CARACTERISTIQUES DES RECEPTEURS DE LA PROLACTINE DANS  
LES CELLULES DE CANCER DU SEIN ET DANS LA GLANDE MAM-  
MAIRE NORMALE DE LAPINE

1. INTERACTION ENTRE HORMONE DE CROISSANCE HUMAINE ET  
RECEPTEURS DE LA PROLACTINE

11. CARACTERISATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE  
HUMAINE IODEE

La liaison spécifique de l'hormone de croissance humaine marquée à l'iode 125 ( $^{125}\text{I-hGH}$ ) sur les récepteurs de la prolactine (R-PRL) de cellules T47-D est supérieure à 14 % alors que, dans les mêmes conditions, celle obtenue avec la glande mammaire de lapine est supérieure à 25 % (Figure 5). Lorsque la concentration en protéines membranaires augmente, on observe une diminution relative de la liaison spécifique due vraisemblablement à un effet de concentration.

12. DETERMINATION DU NOMBRE DE SITES ET DE LA CONS-  
TANTE D'AFFINITE DES RECEPTEURS

La Figure 6 montre une représentation de Scatchard de la fixation de l'hormone de croissance sur son récepteur dans les cellules T47-D et dans la glande mammaire de lapine. La constante d'affinité ( $K_a$ ) du système est 4,5 fois plus élevée dans la glande mammaire de lapine ( $2,12 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) que dans les cellules T47-D ( $0,47 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ), alors que le nombre de sites des récepteurs est 1,7 fois supérieur dans les cellules T47-D que dans la glande mammaire de lapine. Le nombre de sites fixant l'hormone de croissance humaine pour les cellules T47-D étant de 269 fmoles par mg de protéines membranaires, pour la glande mammaire de lapine elle est de 155 fmoles/mg de protéines.

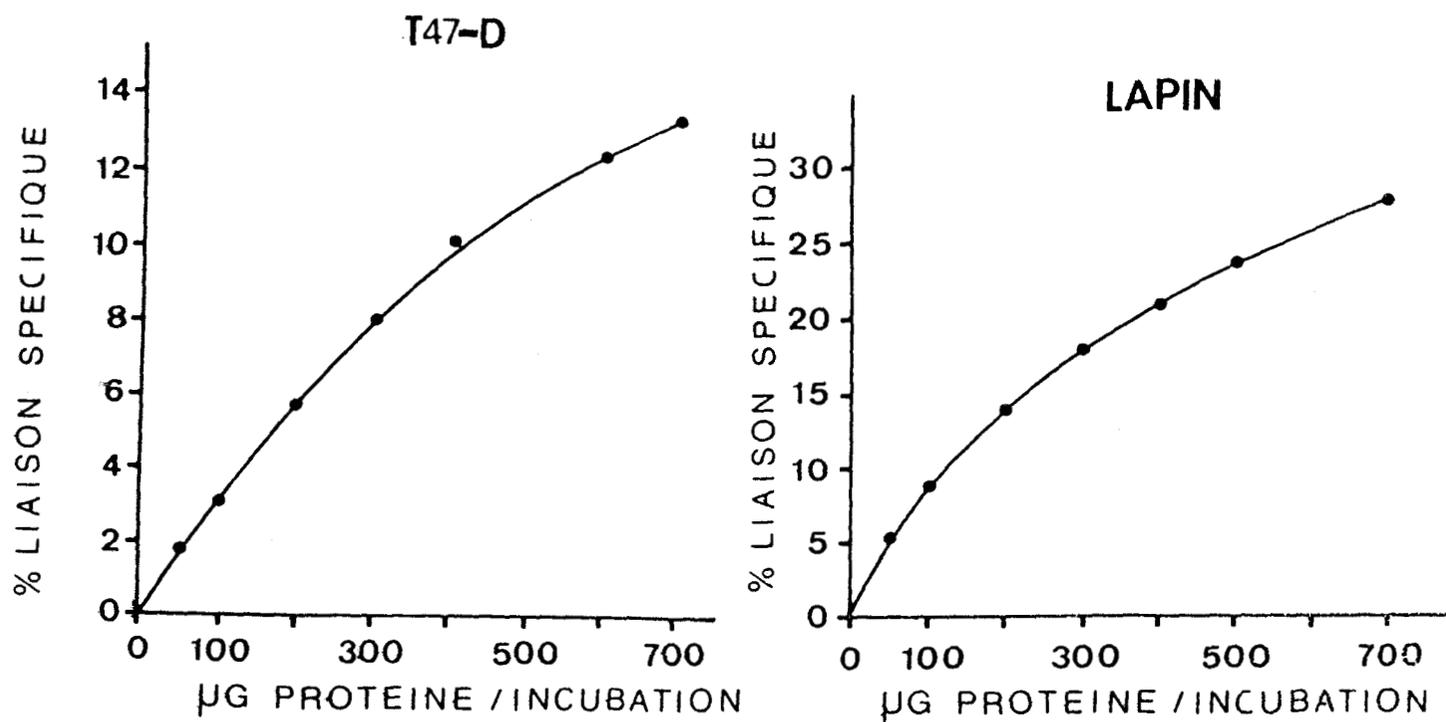


Figure 5 - Liaison spécifique de la hGH en fonction de la concentration de protéines membranaires de cellules épithéliales mammaires cancéreuses humaines (T47-D) et de glande mammaire de lapine

Les fractions membranaires sont incubées avec 200 000 cpm de  $^{125}\text{I}$ -hGH en présence et en absence de 1 µg de prolactine ovine non radioactive. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison spécifique des R-PRL.

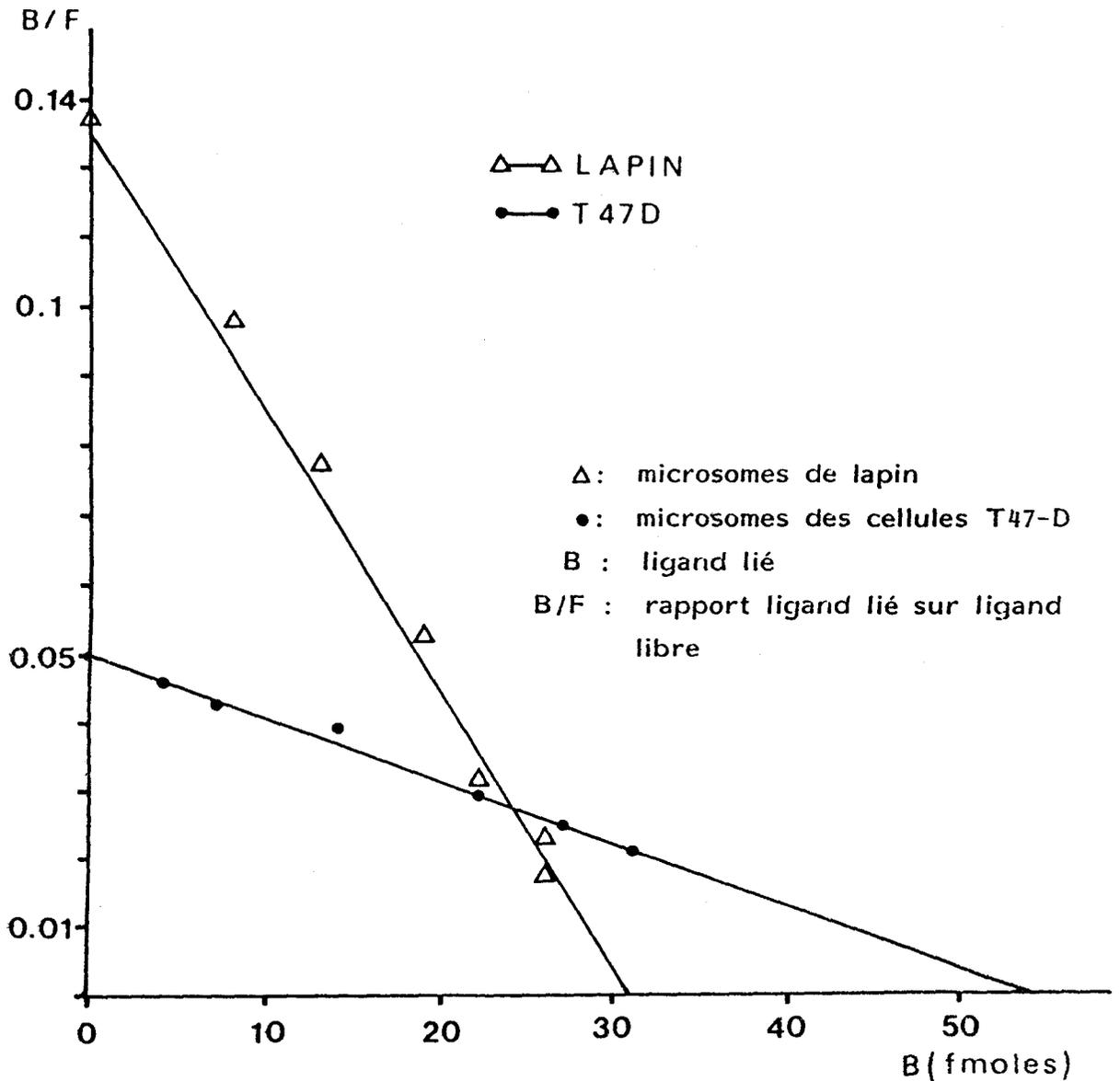


Figure 6 - Représentation selon la méthode de SCATCHARD de la liaison de l'hormone de croissance humaine sur des microsomes de glande mammaire de lapin et des cellules T47-D

Les récepteurs membranaires de glande mammaire de lapin et des cellules T47-D (200  $\mu\text{g}$  de protéines) sont incubés pendant 18 heures à 20° C avec l'hormone de croissance humaine iodée ( $0,125 \cdot 10^6$  ;  $0,25 \cdot 10^6$  ;  $0,5 \cdot 10^6$  ;  $1 \cdot 10^6$  ;  $1,5 \cdot 10^6$  ;  $2 \cdot 10^6$  cpm) avec ou sans 1  $\mu\text{g}$  de prolactine ovine non marquée.

(lapin : nombre de sites 155 fmoles/ mg de protéines ;  $K_a = 2.12 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  ; T47-D : nombre de sites 269 fmoles/mg de protéines ;  $K_a = 0.47 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ )

### 13. SPECIFICITE DE LIAISON

La spécificité de liaison des R-PRL dans les cellules T47-D et dans la glande mammaire de lapine est présentée sur la figure 7. Seules les hormones possédant une activité lactogène sont capables d'inhiber la liaison de la hGH iodée sur les récepteurs (prolactine bovine, prolactine ovine, hormone somatotrope humaine, prolactine humaine, hormone lactogène placentaire et prolactine porcine), contrairement à celles dont aucune activité lactogène n'est connue (hCG, insuline, oGH et bGH).

D'autre part, la spécificité de liaison des R-PRL de glande mammaire de lapine est voisine de celle mise en évidence avec les R-PRL des cellules T47-D. Mais l'ordre d'efficacité des hormones lactogènes présente quelques différences dans les deux systèmes. Les concentrations d'hormones lactogènes capables d'inhiber la liaison de l'hormone sur les récepteurs pour la lapine sont nettement inférieures à celles observées pour les cellules T47-D. Ces résultats sont en accord avec la plus faible constante d'affinité de liaison observée dans les cellules T47-D.

## 2. INTERACTION ENTRE PROLACTINE HUMAINE ET R-PRL

### 21. DETERMINATION DU NOMBRE DE SITES ET DE LA CON- TANTE D'AFFINITE DES RECEPTEURS

La Figure 8 montre une représentation de Scatchard de la fixation de la prolactine humaine sur le récepteur prolactinique dans les cellules T47-D et dans la glande mammaire de lapine. Les deux systèmes présentent une même constante d'affinité ( $K_a$ ) qui est de  $0,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , alors que le nombre de sites des récepteurs est plus élevé dans la glande mammaire de lapine, préalablement traitée par  $\text{MgCl}_2$  3M qui permet de désaturer les récepteurs de l'hormone endogène, que dans les cellules T47-D (32 fmoles/mg de protéines membranaires).

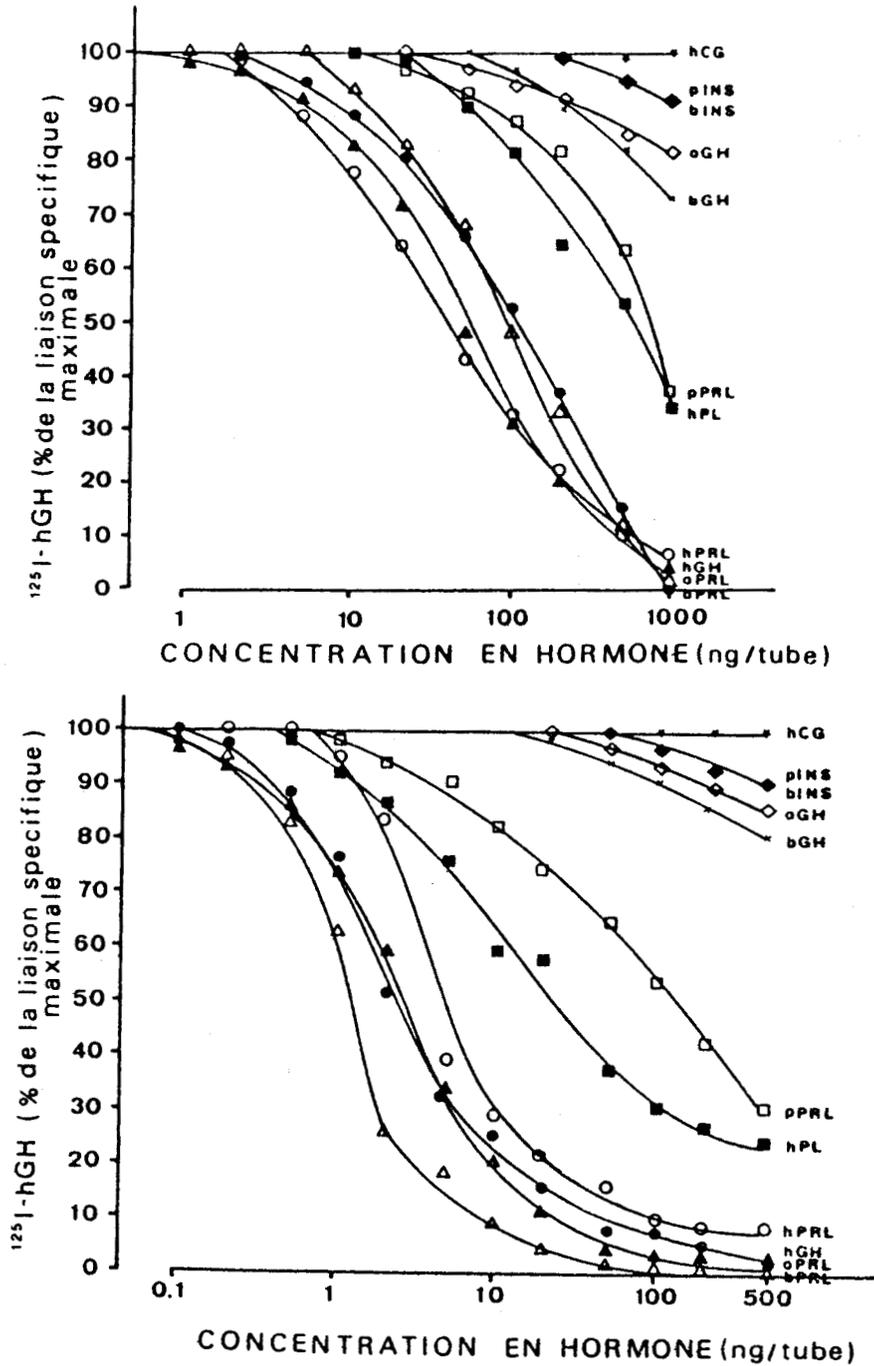


Figure 7 - Spécificité de liaison des récepteurs membranaires des cellules T47-D (en haut) et de la glande mammaire de lapine (en bas)

Les récepteurs (400  $\mu\text{g}$  de protéines membranaires pour les T47-D ou 200  $\mu\text{g}$  pour le lapin) sont incubés avec l'hormone de croissance humaine iodée (200 000 cpm pour les cellules T47-D et 100 000 cpm pour le lapin) pendant 18 heures à 20°C, en absence ou en présence de concentrations croissantes en différentes hormones polypeptidiques (\* hCG : gonadotrophine chorionique humaine ;  $\blacklozenge$  pINS : insuline porcine ;  $\blacklozenge$  bINS : insuline bovine ;  $\diamond$  oGH : hormone de croissance ovine ;  $\times$  bGH : hormone de croissance bovine ;  $\square$  pPRL : prolactine porcine ;  $\blacksquare$  hPRL : hormone lactogène placentaire humaine ;  $\circ$  hPRL : prolactine humaine ;  $\blacktriangle$  hGH : hormone de croissance humaine ;  $\bullet$  oPRL : prolactine ovine ;  $\triangle$  bPRL : prolactine bovine). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison spécifique maximale obtenue en absence d'hormone non radioactive.

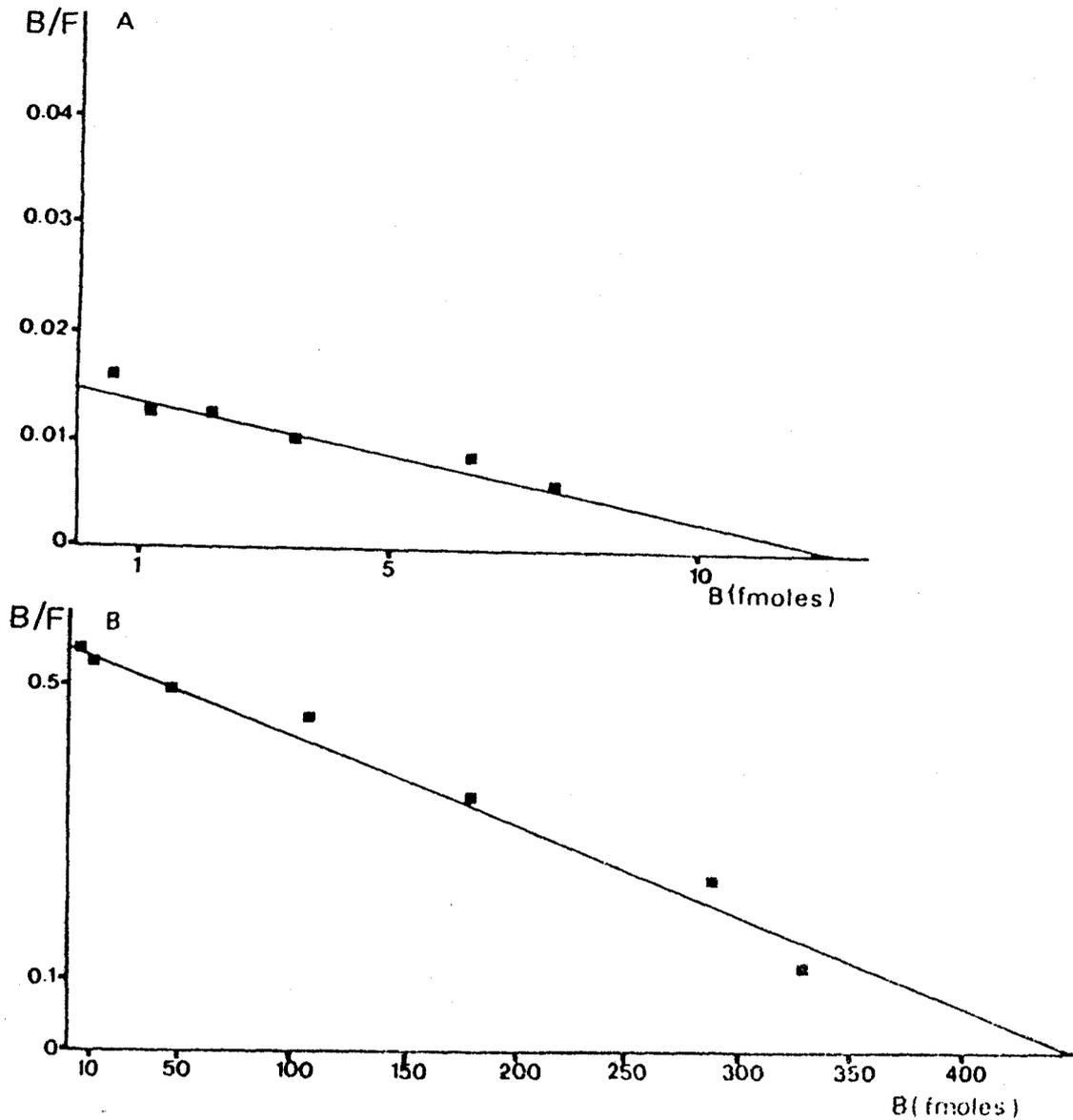


Figure 8 - Représentation selon la méthode de SCATCHARD de la liaison de hPRL (P40II) sur des microsomes de glande mammaire de lapine et des cellules T47-D

Les récepteurs membranaires de la glande mammaire de lapine (B) et des cellules T47-D (A) (400  $\mu\text{g}$  de protéines) sont incubés pendant 18 heures à 20°C avec hPRL iodée ( $0,125 \cdot 10^6$  ;  $0,25 \cdot 10^6$  ;  $0,5 \cdot 10^6$  ;  $1 \cdot 10^6$  ;  $1,5 \cdot 10^6$ ,  $2 \cdot 10^6$  cpm) avec ou sans 1  $\mu\text{g}$  de prolactine ovine non marquée.

B : ligand lié ; B/F : rapport ligand lié sur ligand libre

Lapin : nombre de sites : 1123 fmoles/mg de protéines -  $K_a$  :  $0,61 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  - T47-D : 32 fmoles/mg de protéines -  $K_a$  :  $0,60 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$

## 22. SPECIFICITE DE LIAISON

La spécificité de fixation des R-PRL dans les cellules T47-D et dans la glande mammaire de lapine est présentée sur la figure 9. Les hormones à activité lactogène sont, les seules, capables d'entrer en compétition avec la prolactine humaine marquée pour la liaison aux R-PRL des deux systèmes.

## 23. DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE DE L'UNITE LIANT L'HORMONE DE CROISSANCE HUMAINE

Parmi les trois agents bifonctionnels (voir Matériel et Méthodes) utilisés couramment dans la technique de marquage par affinité, l'EGS s'est révélé être le réactif le plus efficace en assurant un bon rendement de couplage de l'hormone de croissance aux R-PRL en vue d'une analyse électrophorétique. En outre, il possède la caractéristique de ne pas nécessiter de photo-activation (de manipulation plus aisée).

Les travaux utilisant des analyses électrophorétiques en gradient linéaire d'acrylamide-SDS (5-15 %) ont permis de mettre en évidence, par autoradiographie, dans les microsomes de glande mammaire de lapine et des cellules T47-D, l'existence d'une bande majeure de poids moléculaire 57-60 000 Da (Figure 10).

Cette bande, disparaissant lorsque l'incubation est effectuée en présence d'un excès de prolactine ovine non radioactive, représente donc le complexe "hormone-récepteur". Si l'on considère que l'hormone de croissance, dont le poids moléculaire est de l'ordre de 22 000 Da, interagit avec son récepteur selon un rapport stoechiométrique de 1, l'unité réceptrice semble présenter un poids moléculaire identique d'environ 36 500 Da chez la lapine et l'homme. Ces valeurs sont obtenues en présence et en absence d'agent réducteur, dithiothréitol.

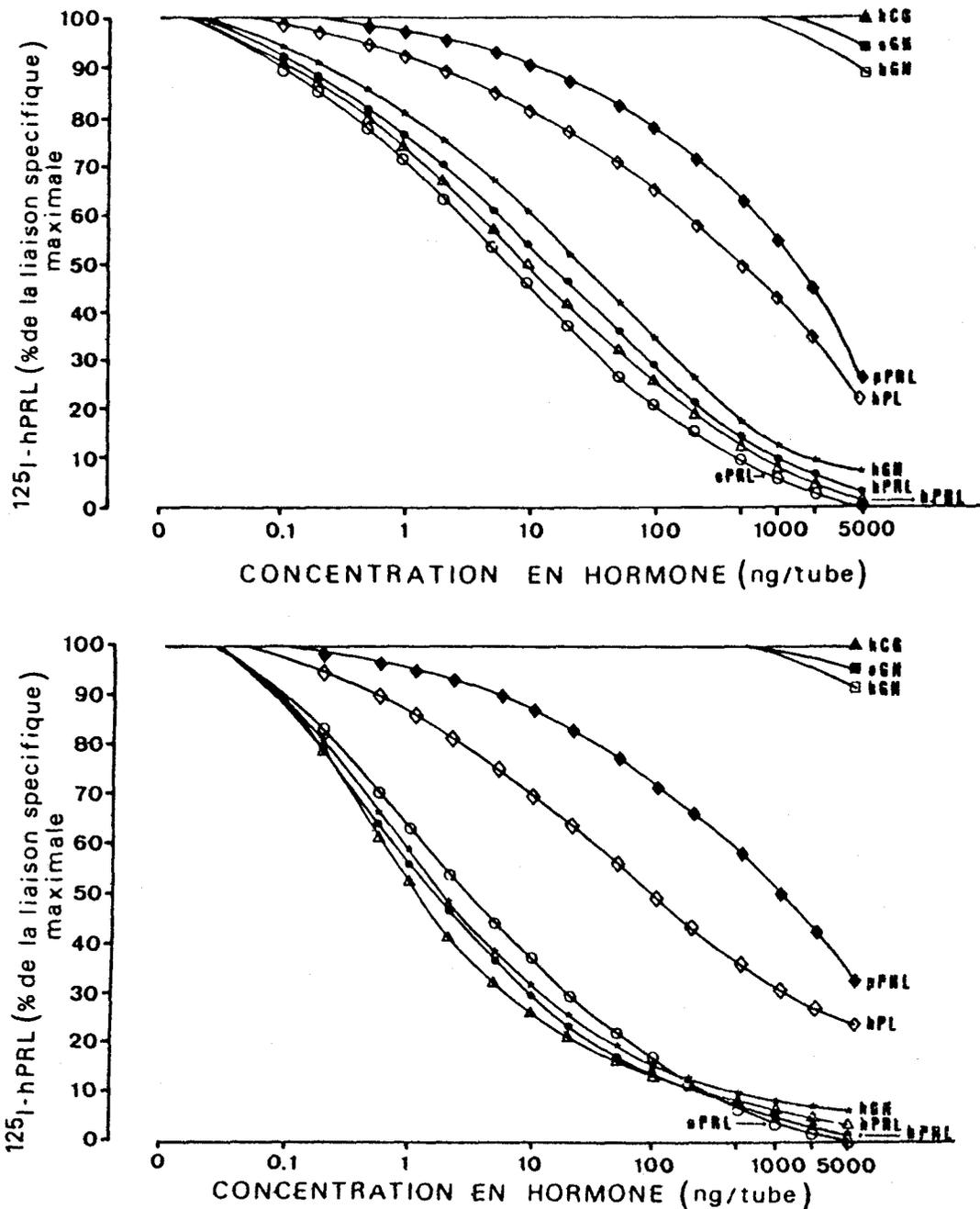


Figure 9 - Spécificité de liaison des récepteurs membranaires des cellules T47-D (en haut) et de la glande mammaire de lapine (en bas)

Les récepteurs (400  $\mu$ g de protéines membranaires) sont incubés avec la hPRL iodée (200 000 cpm), pendant 18 heures à 20° C, en absence ou en présence de concentrations croissantes en différentes hormones polypeptidiques ( $\blacktriangle$  hCG : gonadotrophine chorionique humaine ;  $\blacksquare$  oGH : hormone de croissance ovine ;  $\square$  bGH : hormone de croissance bovine ;  $\blacklozenge$  pPRL : prolactine porcine ;  $\diamond$  hPL : hormone lactogène placentaire humaine ;  $\triangle$  hPRL : prolactine humaine ; \* hGH : hormone de croissance humaine ;  $\circ$  oPRL : prolactine ovine ;  $\bullet$  bPRL : prolactine bovine). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison spécifique maximale obtenue en absence d'hormone non radioactive.



## II - SOLUBILISATION DES RECEPTEURS PROLACTINIQUES

### 1. CONDITIONS OPTIMALES DE SOLUBILISATION DES RECEPTEURS MEMBRANAIRES

La Figure 11 montre les résultats des expérimentations effectuées afin de déterminer la concentration de détergent nécessaire à la solubilisation du récepteur prolactinique. Quelle que soit la concentration protéique, le pourcentage de protéines membranaires solubilisées est maximal à partir de 8 mM pour le CHAPS et de 0,5 % (v/v) pour le Triton X-100. Une augmentation de la concentration du CHAPS ou du Triton X-100 n'augmente pas le rendement de solubilisation des protéines membranaires.

L'efficacité du Triton X-100 est relativement moins grande (67 % des protéines membranaires solubilisées) que celle du CHAPS (76 %). Le rendement de solubilisation protéique est meilleur pour les concentrations les plus faibles en protéines membranaires.

Les Figures 12 et 13 montrent que la liaison de  $^{125}\text{I}$  hGH sur les différentes fractions solubilisées est plus importante pour une concentration de CHAPS égale à 8,1 mM que celle obtenue avec le Triton X-100 à 1 % (v/v). A des concentrations plus faibles (CHAPS 1 mM, Triton X-100 0,1%), les détergents solubilisent des protéines pour lesquelles une faible liaison spécifique est observée.

La liaison spécifique de l'hormone à son récepteur est inhibée par une forte concentration de détergent, elle dépend de sa concentration dans le milieu, et présente un optimum pour une concentration finale, de CHAPS

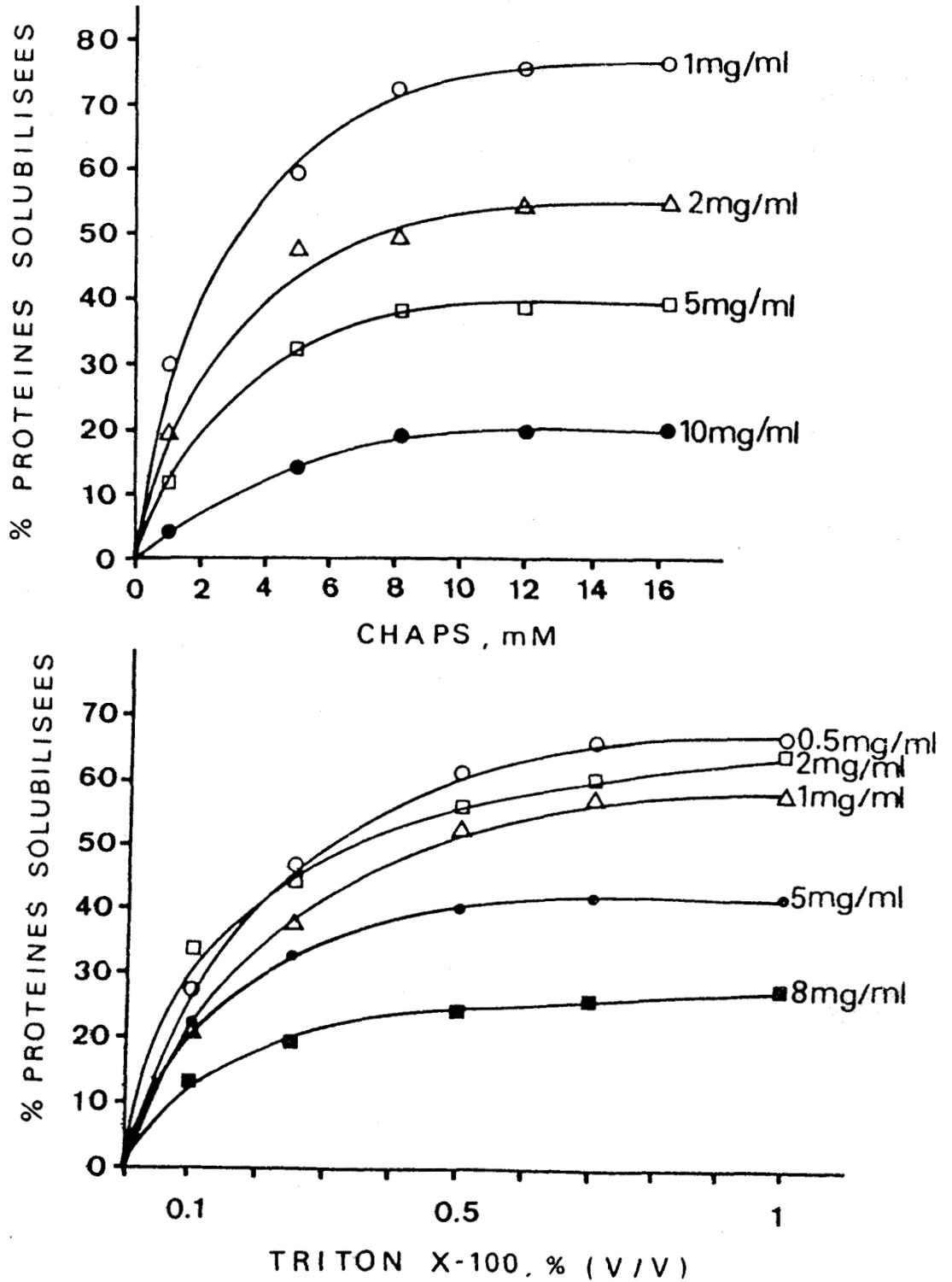


Figure 11 - Solubilisation des R-PRL membranaires

Effet de concentrations croissantes de détergent (CHAPS ; Triton X-100)  
sur le rendement de solubilisation

Chaque courbe correspond à une concentration différente en protéines membranaires de départ.

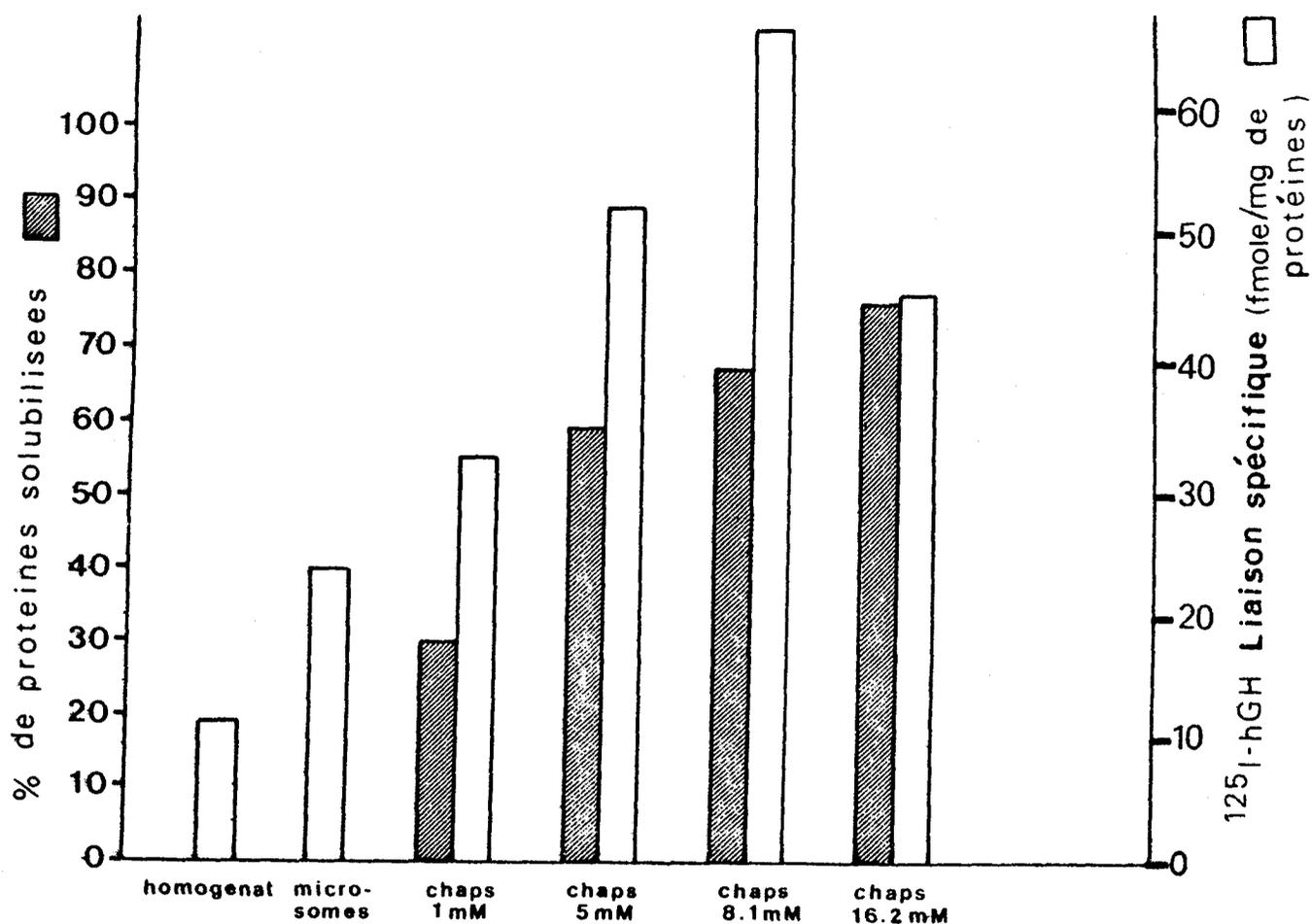


Figure 12 - Efficacité du CHAPS sur la solubilisation des protéines et des R-PRL contenus dans les membranes de cellules épithéliales de cancer du sein (T47-D)

Des préparations membranaires de cellules T47-D sont incubées 1 heure à température ambiante et à différentes concentrations de CHAPS. Après ultracentrifugation 1 heure à 105 000 g, on détermine la fixation spécifique dans les extraits solubilisés (200 µg de protéines solubilisées) à une concentration finale de CHAPS 1,62 mM) en utilisant 200 000 cpm d'<sup>125</sup>I hGH en présence et en absence de prolactine ovine non marquée. Des liaisons sont effectuées dans du tampon TRIS-HCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, BSA 0,1%, pH 7,4. Le volume final d'incubation est de 500 µl.

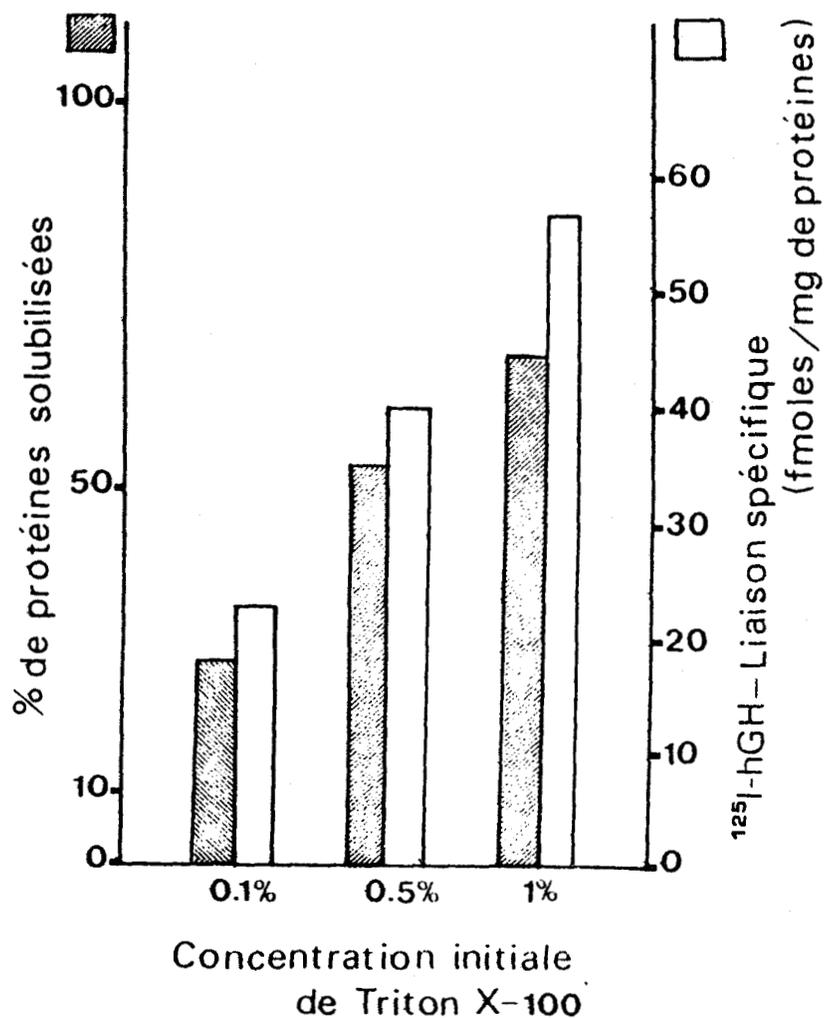


Figure 13 - Efficacité du Triton X-100 sur la solubilisation des protéines et des R-PRL contenus dans les membranes de cellules épithéliales de cancer du sein (T47-D)

Des préparations membranaires de cellules T47-D sont incubées 1 heure à température ambiante à différentes concentrations de Triton X-100. Après centrifugation 1 heure à 105 000 g, on détermine la fixation spécifique dans les extraits solubilisés (200 µg de protéines solubilisées) à une concentration de Triton X-100 0,05 % en utilisant 200 000 cpm d'<sup>125</sup>I hGH en présence et en absence de oPRL non marquée. Les liaisons sont effectuées dans du tampon TRIS HCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, BSA 0,1 %, pH 7,4. Le volume final d'incubation est de 500 µl.

comprise entre 1,5 et 2 mM (Figure 14), et de Triton X-100 égale à 0,05 % (Figure 15).

Les figures 16 A et 16 B montrent les courbes de saturation de la liaison de  $^{125}\text{I}$ -hGH, respectivement, sur les récepteurs solubilisés humains (CHAPS 8,1 mM) et de lapin (Triton X-100 1 %). La liaison spécifique de l'hormone sur le récepteur solubilisé humain est de 10 % alors que celle obtenue avec le récepteur solubilisé de lapin est de 60 %.

La solubilisation des R-PRL par le CHAPS 8,1 mM permet d'obtenir d'excellents rendements de solubilisation (67 %) et une augmentation importante de la liaison spécifique par comparaison à celle obtenue avec l'homogénat ou les microsomes de cellules T47-D (Figure 12).

L'étape de solubilisation des R-PRL de cellules T47-D s'accompagne d'une augmentation de l'affinité de liaison des molécules réceptrices pour l'hormone ; la constante d'affinité déterminée pour les extraits solubilisés ( $1,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) est 2,5 fois supérieure à celle définie pour les fractions membranaires ( $0,51 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) (Figure 17).

## 2. ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES RECEPTEURS SOLUBILISES

### 21. CHROMATOGRAPHIE A BASSE PRESSION

La Figure 18 présente les résultats obtenus après liaison de  $^{125}\text{I}$ -hGH aux différentes fractions du récepteur solubilisé par le CHAPS 8,1 mM et chromatographié. On peut observer un pic majeur renfermant les R-PRL capables de lier l'hormone de croissance humaine, ce qui correspond à un poids moléculaire apparent élevé de 235 000 Da. Nous détectons aussi des pics mineurs de faible poids moléculaire correspondant vraisemblablement à une forme dissociée du récepteur.

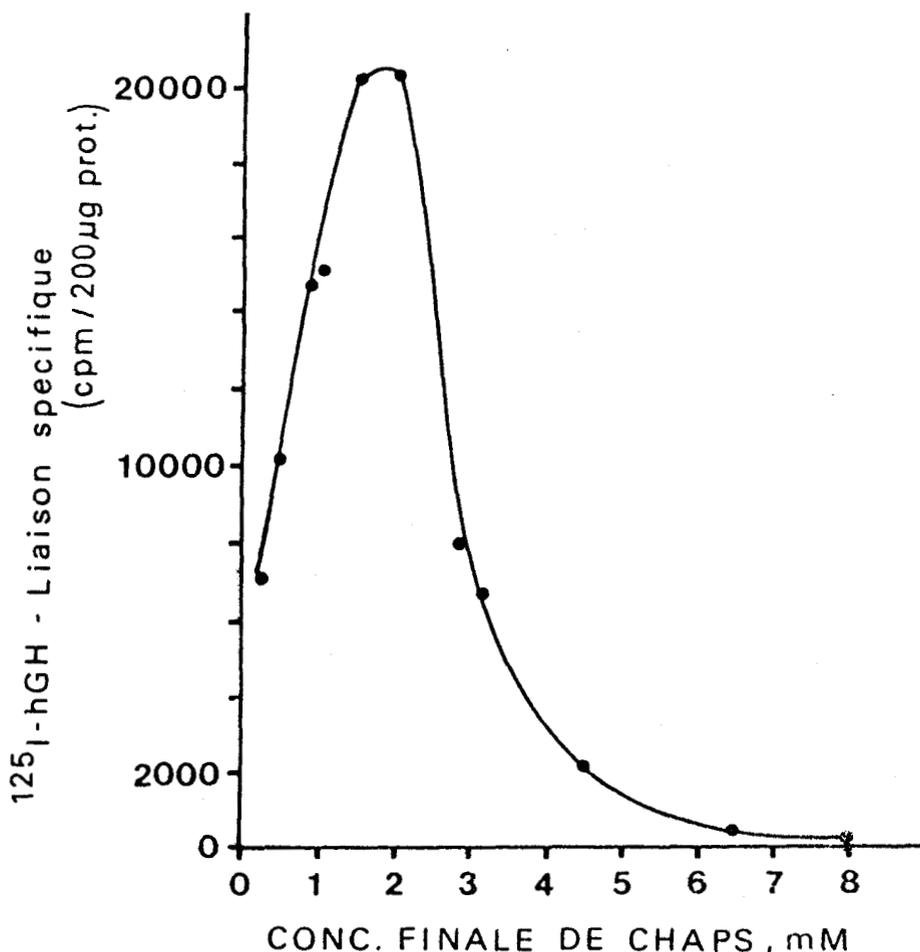


Figure 14 - Effet du CHAPS sur la liaison spécifique <sup>125</sup>I hGH -  
récepteur solubilisé

Les protéines membranaires (1 mg/ml) sont solubilisées par le CHAPS (2, 4, 8 ou 16 mM). 200 µg de protéines solubilisées sont incubées pendant une nuit à 20°C avec l'iode 125 hGH (200 000 cpm) dans le tampon TRIS 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, BSA 0,1 %, azide de sodium 0,02 %, pH 7,4 à différentes concentrations en CHAPS. La liaison spécifique de la hGH est en fonction de la concentration finale du CHAPS dans le milieu.

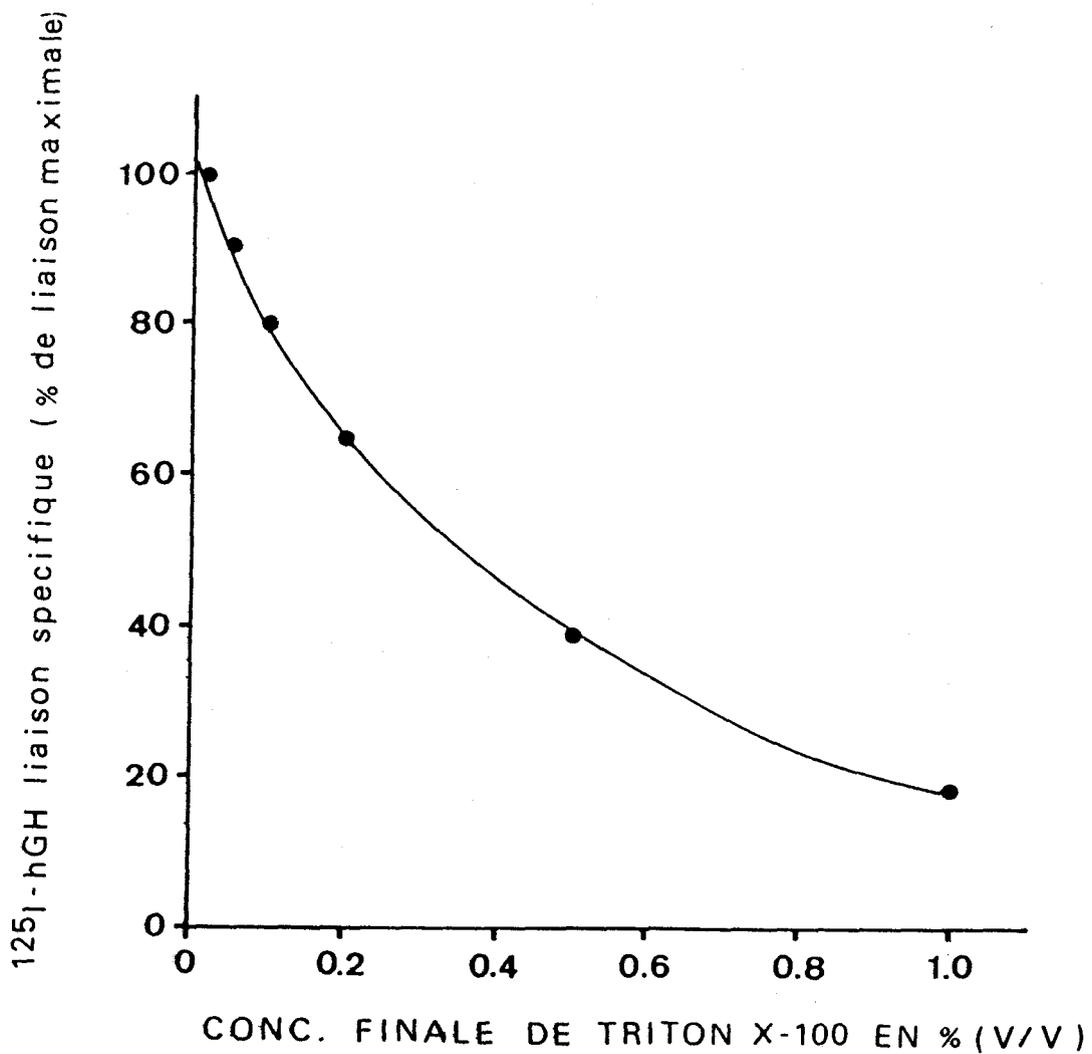


Figure 15 - Effet du Triton X-100 sur la liaison spécifique  $^{125}\text{I}$  hGH - récepteur solubilisé

Les protéines membranaires (1 mg/ml) solubilisées par le Triton X-100 sont incubées pendant une nuit à 20°C avec l'iode  $^{125}\text{I}$  hGH (200 000 cpm) dans le tampon TRIS 25 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, BSA 0,1 %, azide de sodium 0,02 %, pH 7,4 à différentes concentrations en Triton X-100. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison spécifique maximale obtenue à une concentration finale de 0,02 % en Triton X-100.

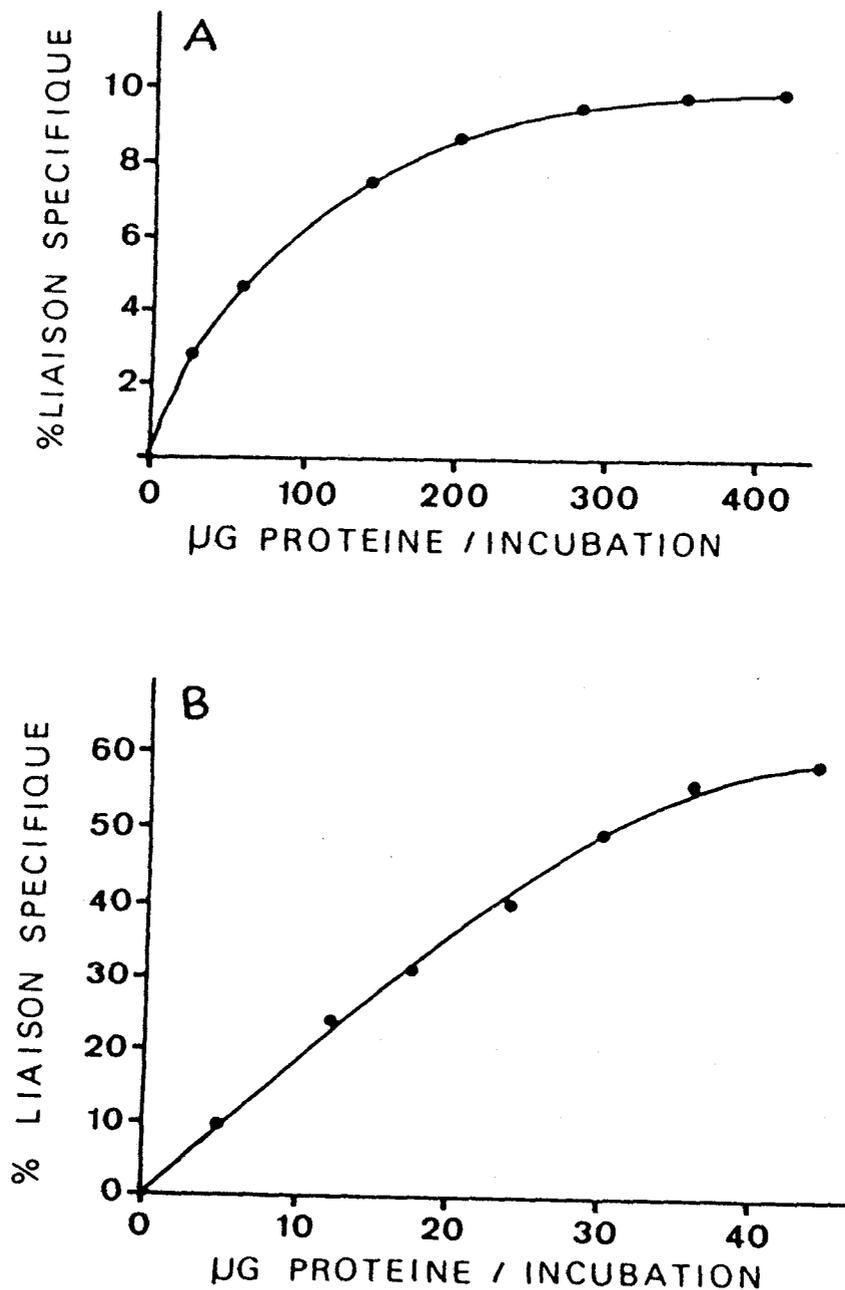


Figure 16 - Liaison spécifique de la hGH en fonction de la concentration en récepteurs solubilisés, par le CHAPS 8,1 mM, des cellules T47-D (A) et de glande mammaire de lapine (B)

Les fractions solubilisées (200  $\mu\text{g}$ ) sont incubées avec 200 000 cpm de  $^{125}\text{I}$  hGH en présence et en absence de 1  $\mu\text{g}$  de oPRL non radioactive. Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison spécifique des R-PRL.

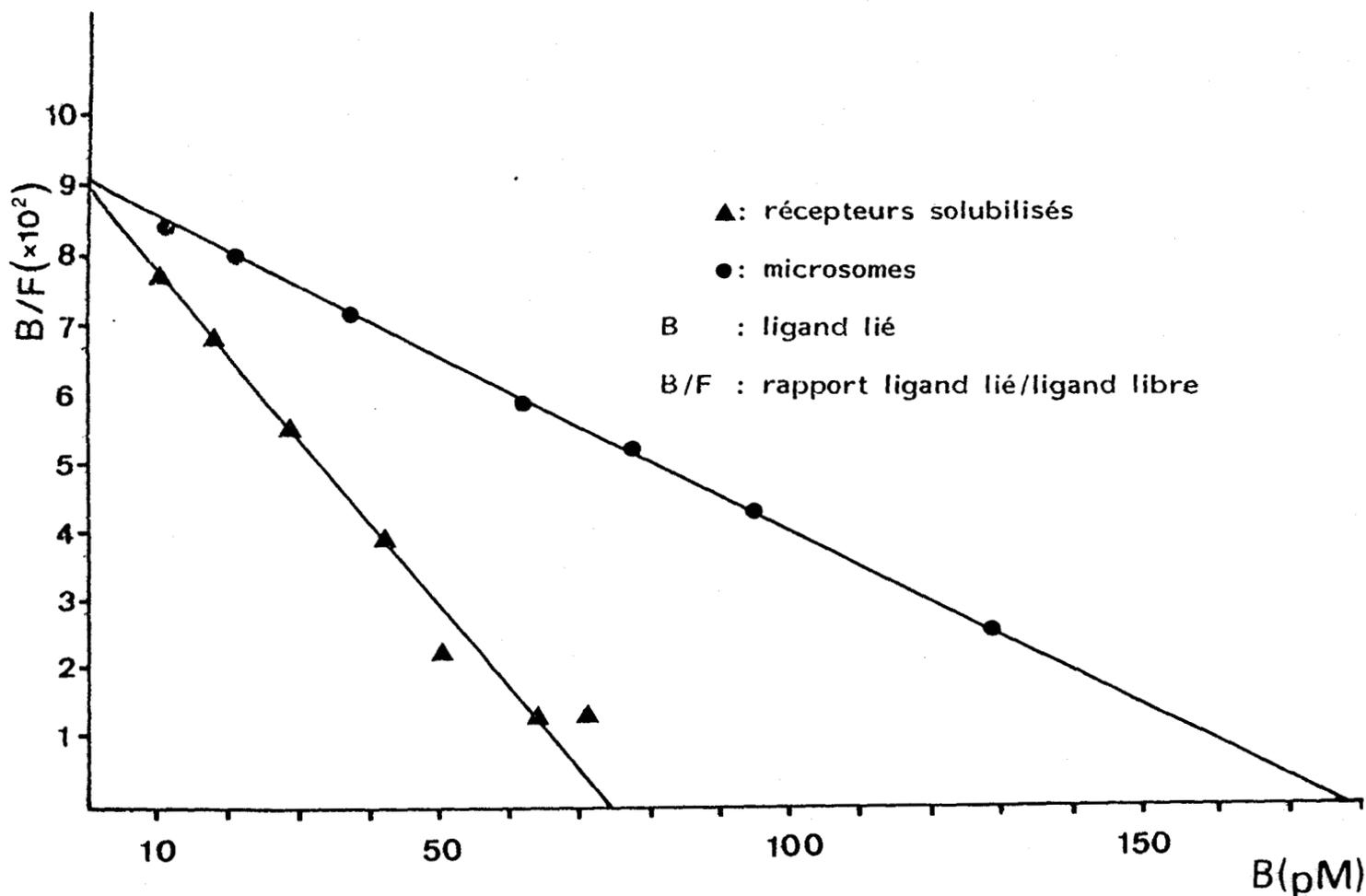


Figure 17 - Représentation selon la méthode de SCATCHARD de la liaison de la hGH sur des microsomes de cellules T47-D et des récepteurs solubilisés par le CHAPS 8,1 mM

Les récepteurs membranaires (350 µg) et solubilisés (153 µg de protéines) sont incubés pendant 18 heures à 20° C avec l'<sup>125</sup>I hGH (0,125 . 10<sup>6</sup> ; 0,25 . 10<sup>6</sup> ; 0,5 . 10<sup>6</sup> ; 0,5 . 10<sup>6</sup> ; 1 . 10<sup>6</sup> ; 1,5 . 10<sup>6</sup> ; 2 . 10<sup>6</sup> cpm) avec ou sans 1 µg de oPRL non marquée.

(récepteur solubilisé : nombre de sites : 292 fmoles/mg de protéines,  $K_a$  :  $1,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  ; microsome : nombre de sites : 245 fmoles/mg de protéines,  $K_a$  :  $0,51 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ )

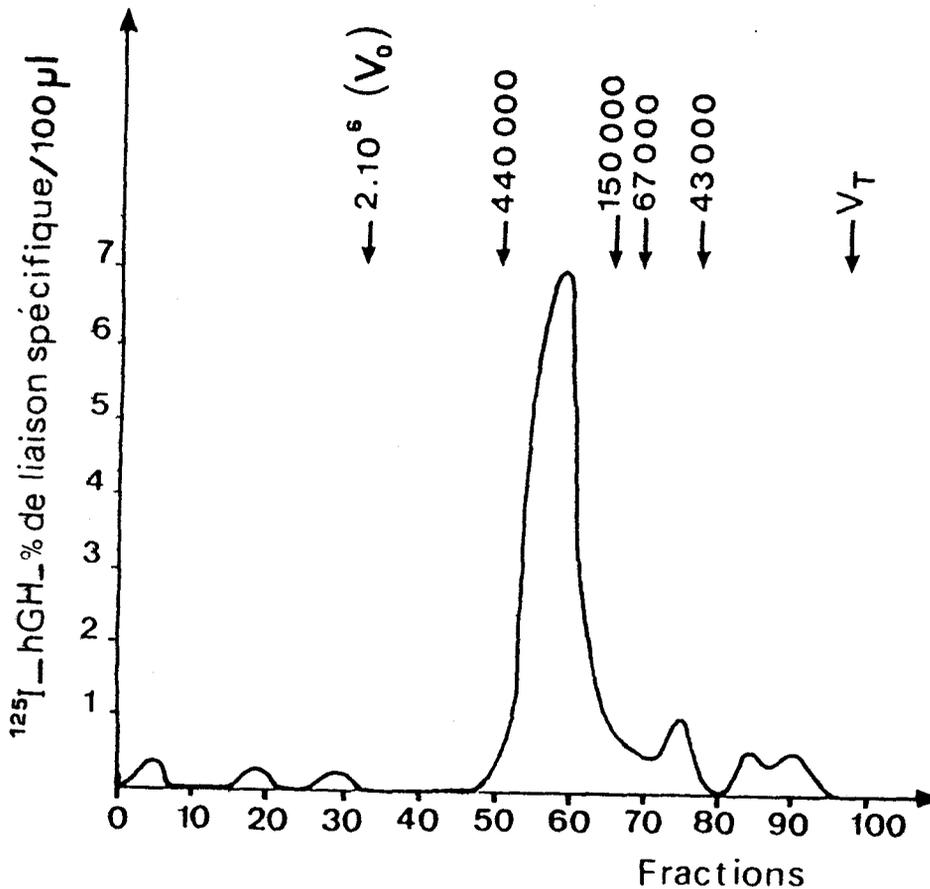


Figure 18 - Chromatogramme d'élution du récepteur solubilisé humain, par le CHAPS 8,1 mM (2 ml soit 4 mg) sur sépharose 6B (1,4 x 60 cm)

$V_0$  indique le volume mort de la colonne déterminé par le bleu de Dextran 2000 et  $V_T$  indique le volume total du gel déterminé par l'iode  $^{125}$ . Pour chacune des fractions (100 de 1 ml), obtenues après élution en tampon TRIS 25 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, CHAPS 1 mM, PMSF 1 mM, azide de sodium 0,02 %, pH 7,4, la présence de R-PRL est mise en évidence en réalisant un test de liaison sur une fraction aliquote de 100  $\mu\text{l}$ .

## 22. EN HPLC

Le profil d'éluion (Figure 19) du récepteur solubilisé par le Triton X-100 à 1 %, non occupé par l'hormone de croissance humaine, établi en mesurant le pourcentage de liaison spécifique de  $^{125}\text{I}$ -hGH sur les différentes fractions obtenues montre un pic renfermant les R-PRL, correspondant à un poids moléculaire apparent de 232 000 Da. On observe aussi des pics mineurs de faible poids moléculaire.

## 3. ETUDE DES RECEPTEURS SOLUBILISES EN GRADIENT DE SACCHAROSE

La Figure 20 présente la liaison spécifique de  $^{125}\text{I}$ -hGH sur les différentes fractions collectées après ultracentrifugation sur gradient de saccharose (5-20 %) du récepteur solubilisé par le CHAPS 8,1 mM. Elle fait apparaître un seul pic contenant les R-PRL susceptibles de lier l'hormone de croissance humaine, ce qui correspond à un coefficient de sédimentation  $S_{20,w}$  d'environ 7S.

Le rayon de Stokes ( $R_s$ ) du récepteur solubilisé a été estimé à 57 Å (Figure 21).

## III - PURIFICATION DES R-PRL PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Préalablement solubilisés par le CHAPS 8,1 mM, les récepteurs prolactiniques, présents dans les membranes de cellules T47-D ont été purifiés par chromatographie d'affinité, sur gel d'agarose (Affi-gel 10) auquel est couplée l'hormone de croissance humaine (voir Matériel et Méthodes). L'ensemble des R-PRL contenus dans l'extrait solubilisé initial sont retenus par le gel et nous n'avons pas détecté de récepteurs dans les premières

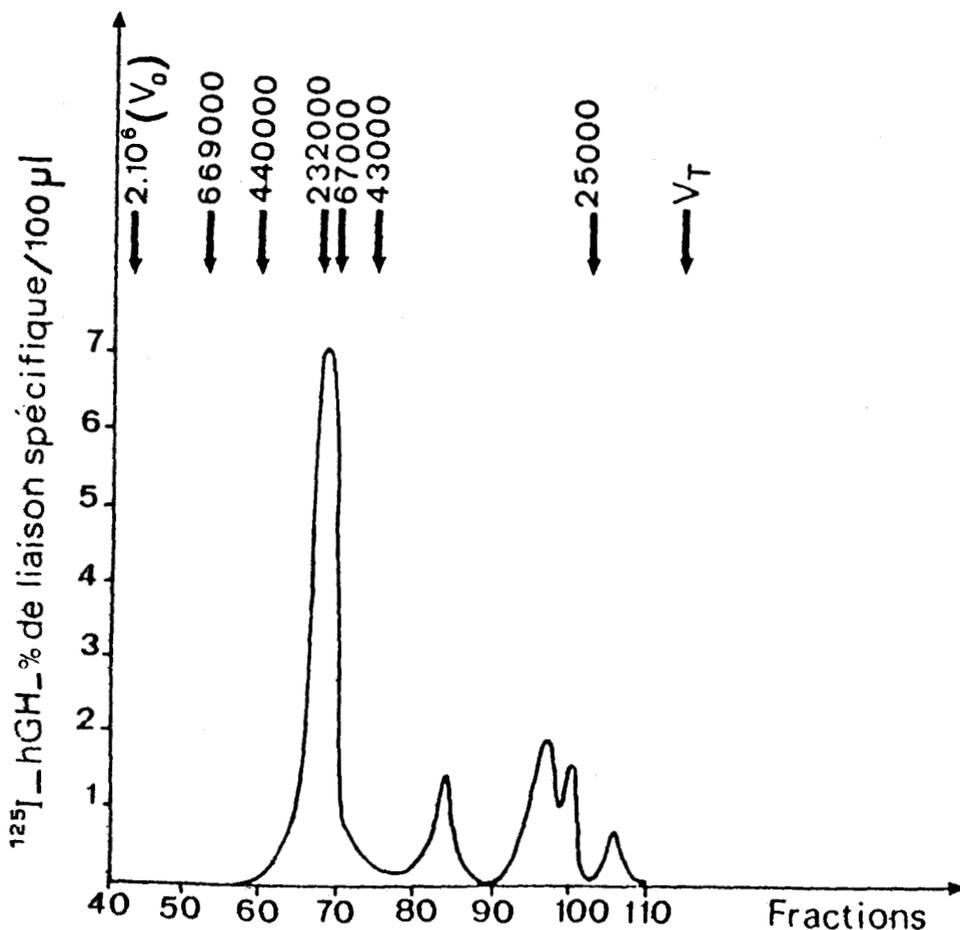


Figure 19 - Chromatogramme d'élution du récepteur solubilisé humain par le Triton X-100 à 1 %, humain (1,5 mg) sur colonnes connectées en série

TSKG 4000 SW (7,5 mm x 60 cm), Protein PAK 300 SW (7,5 mm x 30 cm) et Protein PAK 125 (7,8 mm x 30 cm).  $V_0$  indique le volume mort de la colonne déterminé par le bleu de Dextran 2000 et  $V_T$  indique le volume total du gel déterminé par l'iode 125. Pour chacune des fractions (110 de 0,5 ml), obtenues après élution en tampon borate 0,1 M, NaCl 0,2 M, Triton 0,1 %, PMSF 0,2 mM, azide de sodium 0,02 %, pH 7,4, la présence de R-PRL est mise en évidence en réalisant un test de liaison sur une fraction aliquote de 100 µl.

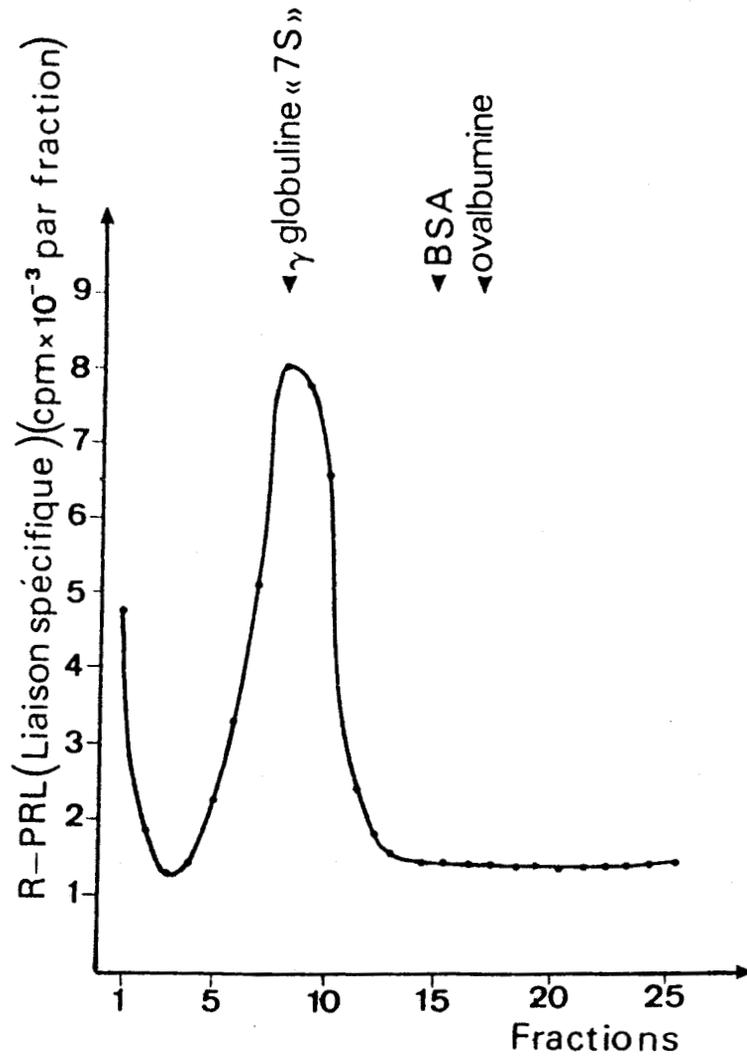


Figure 20 - Liaison spécifique de l'hormone de croissance humaine iodée aux récepteurs solubilisés par le CHAPS après centrifugation sur gradient de saccharose

Chaque point représente la liaison spécifique en présence de 1 µg de prolactine ovine non radioactive.

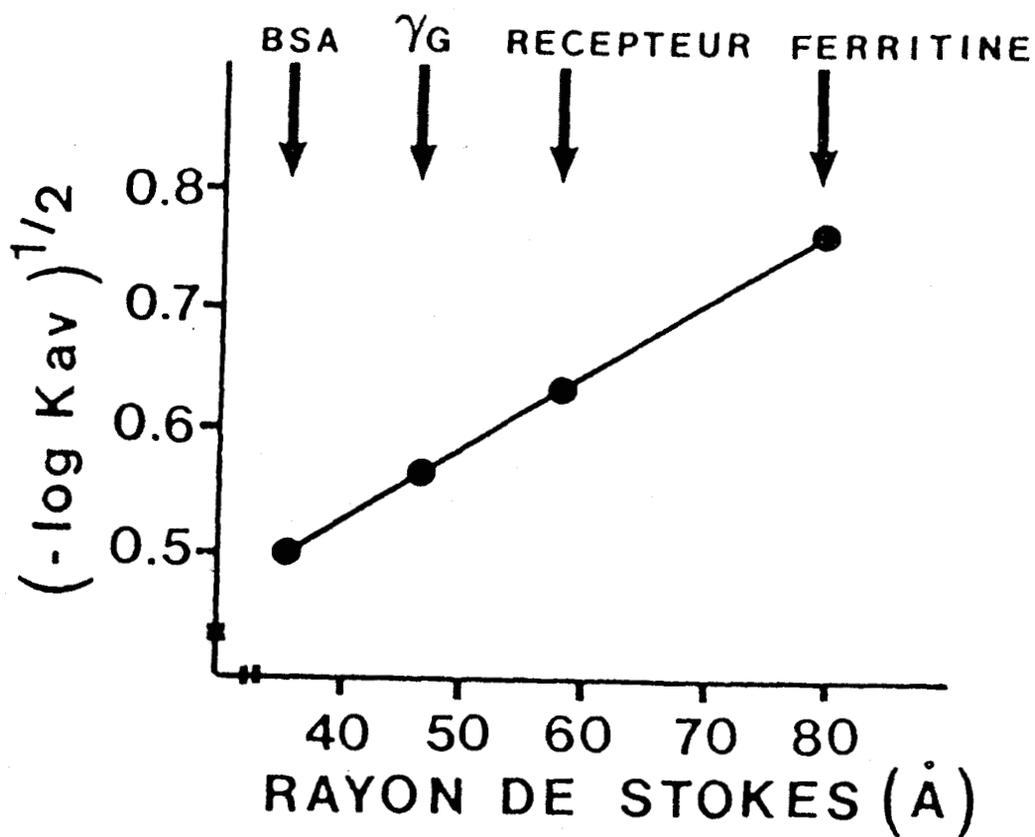


Figure 21 - Relation entre  $(-\log K_{av})^{1/2}$  et rayon de Stokes

Les protéines standards sont chromatographiées sur la colonne de sépharose 6B. Les protéines standards utilisées sont : sérumalbumine bovine (BSA) : 35 Å ; gamma globuline (γG) : 46 Å ; ferritine : 79 Å

fractions correspondant à l'effluent, au lavage du gel par le tampon borate-CHAPS, ou par le NaCl 1 M. L'élution des récepteurs est assurée par le passage du MgCl<sub>2</sub> 5 M. Le Tableau II rassemble les résultats de la purification qui a permis d'obtenir à partir de 1 g de protéines membranaires, 10 µg de R-PRL partiellement purifié (rendement protéique = 0,001 %).

L'étape d'élution des récepteurs ne permet de trouver que 8 % environ de la capacité de liaison observée dans la préparation initiale déposée sur la colonne, le reste de R-PRL demeurant probablement adsorbés sur le gel ou subissant une dégradation se traduisant par une perte d'activité de liaison.

Néanmoins, les nombres de sites des R-PRL mesurés dans l'extrait solubilisé et la fraction partiellement purifiée sont respectivement de 292 et 20 345 fmoles par mg de protéines. Cette concentration en R-PRL s'accompagne aussi d'une augmentation de la constante d'affinité de liaison pour l'hormone. L'étape de purification assure, à elle seule, un enrichissement important en R-PRL avec un facteur de purification de l'ordre de 500 par rapport aux microsomes de cellules T47-D. Par ailleurs, malgré ce plus grand enrichissement en R-PRL au cours de cette étape, les fractions partiellement purifiées dialysées, lyophilisées et conservées à -20°C perdent totalement leur activité de liaison spécifique. Cette perte d'activité pourrait être due à une dégradation des récepteurs malgré la présence d'inhibiteur de protéase, à une adsorption sur les tubes en verre avec ou sans film de silicone, en polystyrène mais aussi en polypropylène qui présentent moins d'adsorption. Il se pourrait que les molécules réceptrices très diluées soient instables, néanmoins le recueil des protéines réceptrices en présence de concentration élevée de sérumalbumine bovine n'empêche pas cette perte.

Échantillon	Constante d'affinité (nM <sup>-1</sup> )	Nombre de sites des R-PRL (fmoles/mg prot.)	Facteur de purification
Membranes	0,51	41,69	1
Extraits solubilisés	1,20	292	7
Fractions purifiées	1,50	20 345	488

Enrichissement protéique/membranes : 0,001 %

Enrichissement en récepteur/extraits solubilisés : 8 %

Tableau II - Purification des R-PRL par chromatographie d'affinité  
sur Affigel 10 hGH

Les constantes d'affinité et le nombre de sites des R-PRL sont déterminés selon la méthode de SCATCHARD. Les facteurs de purification correspondent à l'enrichissement en récepteurs par rapport aux microsomes (part 1 g de protéines).

## IV - ETUDE DES ANTICORPS

### 1. ANTICORPS POLYCLONAUX

#### 11. TEST D'ACTIVITE DES ANTICORPS

La Figure 22 montre que les anticorps anti-récepteurs (sérums de chèvre 46 et 47, de brebis 151 et de cobaye dilués au 1/100ème) inhibent totalement la liaison hormonale sur les microsomes de glande mammaire de lapine. Les anticorps 442 et 443 n'inhibent que partiellement la liaison de l'hormone sur les R-PRL de glande mammaire de lapine. L'inhibition obtenue par les sérums 442 et 443 dilués au 1/100ème est respectivement de 66 et 48 %. En revanche, les anticorps polyclonaux présents dans les sérums des différents animaux testés, à une dilution de 1/100ème, ne reconnaissent pas ou très faiblement le R-PRL humain.

#### 12. IMMUNOPRECIPITATION DU R-PRL

Les immunoprécipitations (Figure 23), obtenues après l'addition de protéine A de Staphylococcus aureus (pansorbine), sont comparées à la précipitation du complexe "hormone-récepteur" réalisée à l'aide de polyéthylène-glycol. L'immunoprécipitation des complexes "prolactine-R-PRL humain" est faible pour une dilution égale au 1/100ème des différents immunsérums testés. D'autre part, ces anticorps ne précipitent pas (442 et 443) ou partiellement (46, 47, brebis 151, cobaye), le R-PRL de lapine.

#### 13. IMMUNOHISTOCHEMIE

La planche A montre que la pré-incubation des différents sérums anti-R-PRL de glande mammaire de lapine et de truie (chèvres 46, 47, 442 et 443, brebis 151 et cobaye) avec les cellules T47-D, permettent d'obtenir

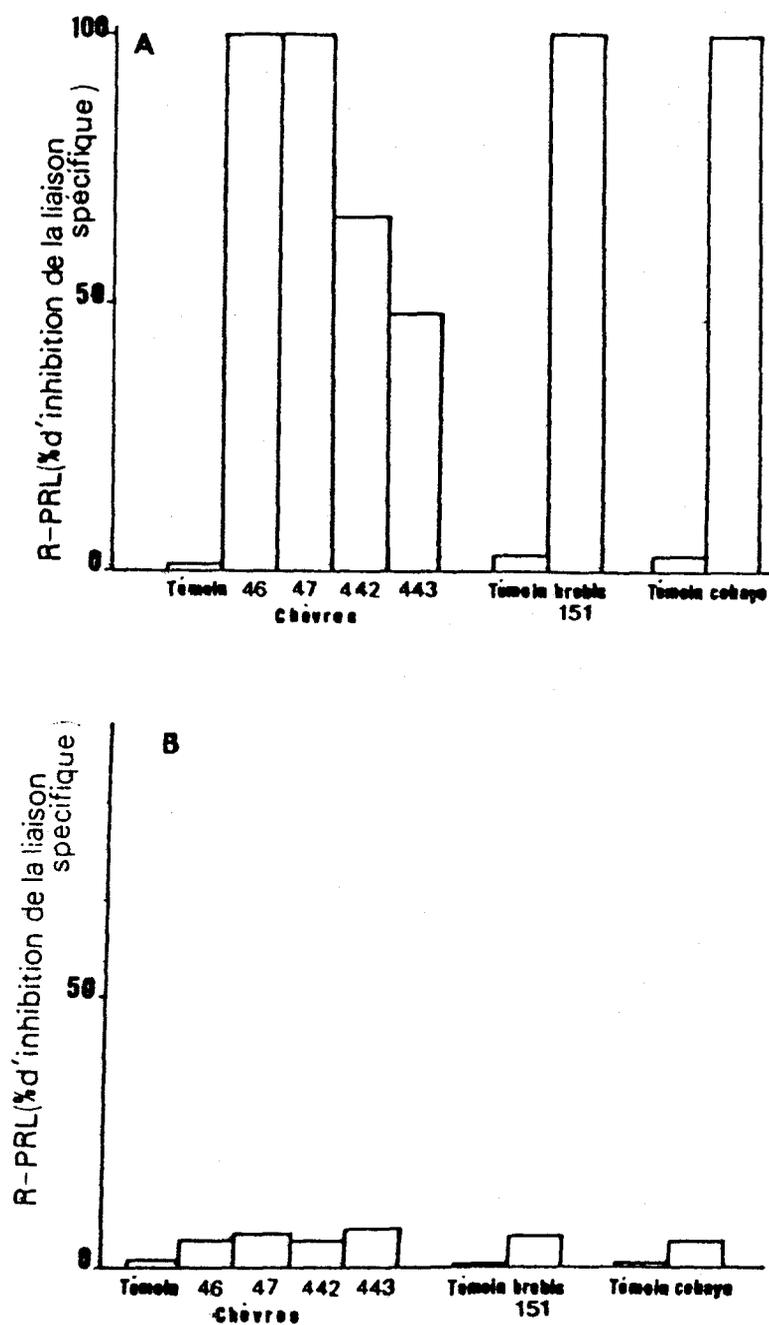


Figure 22 - Action des anticorps polyclonaux anti-récepteurs sur la liaison hormone - récepteur

Les R-PRL membranaires de lapin (A) et humains (B) sont incubés, pendant une nuit à 20°C, avec hPRL iodée (200 000 cpm) en absence et en présence de sérum anti-récepteur prolactinique de lapin et de truie à une dilution de 1/100ème. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la liaison spécifique (A : 12 577 cpm ; B : 5 105 cpm) obtenue en incubant les protéines (400 µg) en présence de 125-I hPRL avec ou sans 1 µg de oPRL non radioactive.

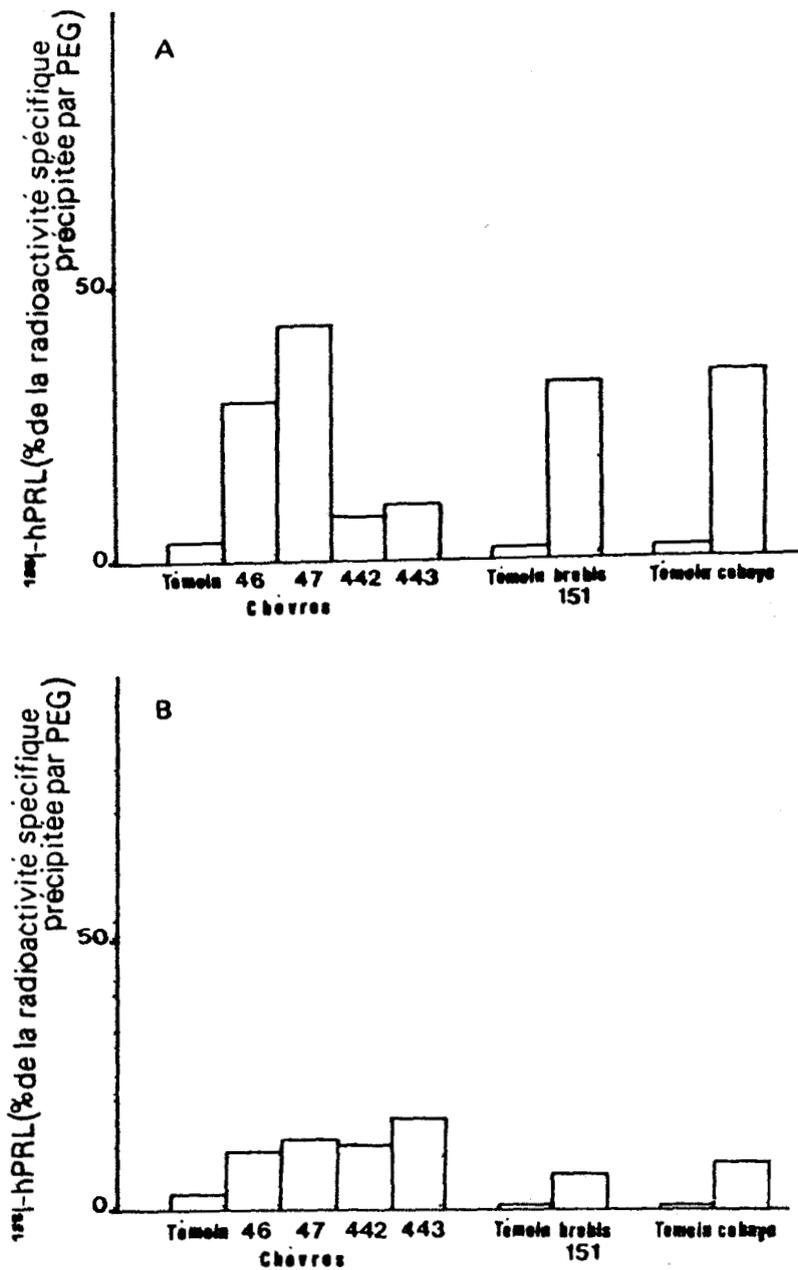


Figure 23 - Immunoprécipitation du R-PRL solubilisé, occupé par la PRL

Des R-PRL de lapin (A) et humains (B), solubilisés par le CHAPS (200 µg de protéines), sont incubés pendant une nuit à 20°C, avec hPRL iodée (200 000 cpm) en absence et en présence d'1 µg de oPRL non radioactive. En fin d'incubation, différents sérums anti-récepteur dilués au 1/100ème sont ajoutés dans chacun des tubes. Après une seconde incubation de 6 heures à 20°C, les complexes "anticorps-récepteur occupé par l'hormone" sont précipités à l'aide de la pansorbine. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité spécifique précipitée (A : 12 200 cpm ; B : 4 743 cpm), dans les contrôles, à l'aide de polyéthylène-glycol et pour lesquels la seconde incubation est effectuée en l'absence d'anticorps polyclonaux.

## PLANCHE A

### LES CELLULES T47-D MARQUEES EN IMMUNOPEROXYDASE PAR LES SERUMS ANTI-R-PRL DILUES AU 1/50<sup>ème</sup>

1. Contrôle négatif (sérum non immun de chèvre)  
absence de marquage (x 25)
2. Chèvre 46 (x 25)
3. Chèvre 47 (x 25)
4. Chèvre 442 (x 25)
5. Chèvre 443 (x 25)
6. Contrôle négatif (sérum non immun de brebis)  
absence de marquage (x 25)
7. Brebis 151 (x 25)

1

2

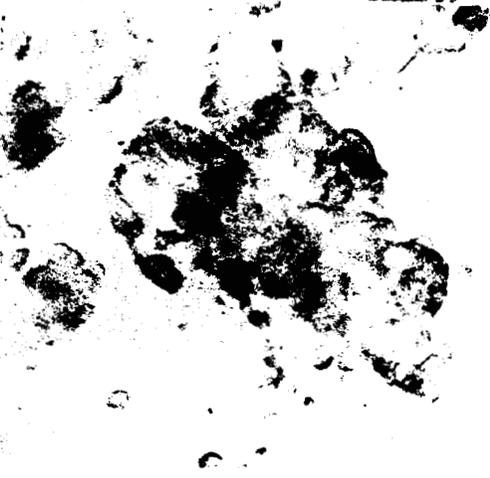
3

4

5

6

7



un très léger marquage interstitiel. L'intensité de la réaction est modérée avec le sérum de brebis 151 et de chèvre 47 (à une dilution de 1/50ème). Aucune réaction n'est observée avec les sérums non immuns correspondants.

## 2. ANTICORPS MONOCLONAUX

La Figure 24 montre que les trois anticorps monoclonaux M110 (IgG1), A917 (IgG2b) et A82 (IgG1) inhibent 100 % de la liaison de la  $^{125}\text{I}$ -hPRL sur les récepteurs membranaires de glande mammaire de lapine. La capacité d'interaction de ces anticorps monoclonaux, dirigés contre le R-PRL de lapine, testée sur le récepteur des cellules T47-D montre que seul l'anticorps A917 peut inhiber partiellement la liaison hormonale. Les deux autres anticorps monoclonaux n'inhibent pas ou très faiblement la liaison. Le maximum d'inhibition obtenu avec l'anticorps A917 est de 26 % pour le récepteur membranaire humain.

La Figure 25 montre que ces anticorps monoclonaux (M110, A917 et A82), sélectionnés pour leur spécificité vis-à-vis du site de liaison de R-PRL, sont incapables d'immunoprécipiter le récepteur solubilisé de glande mammaire de lapine et de cellules T47-D déjà occupé par la prolactine.

## 3. ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES

### 31. INHIBITION DE LA LIAISON HORMONE-RECEPTEUR

Les résultats (Figure 26) de l'activité inhibitrice de la liaison de la prolactine sur son récepteur exercée par les immunosérums obtenus au cours des différentes prises de sang, indiquent que des anticorps anti-idiotypiques apparaissent dès la 6ème immunisation. A partir de la 8ème immunisation (7ème rappel), le sérum du L3, à une dilution de 1/100ème,

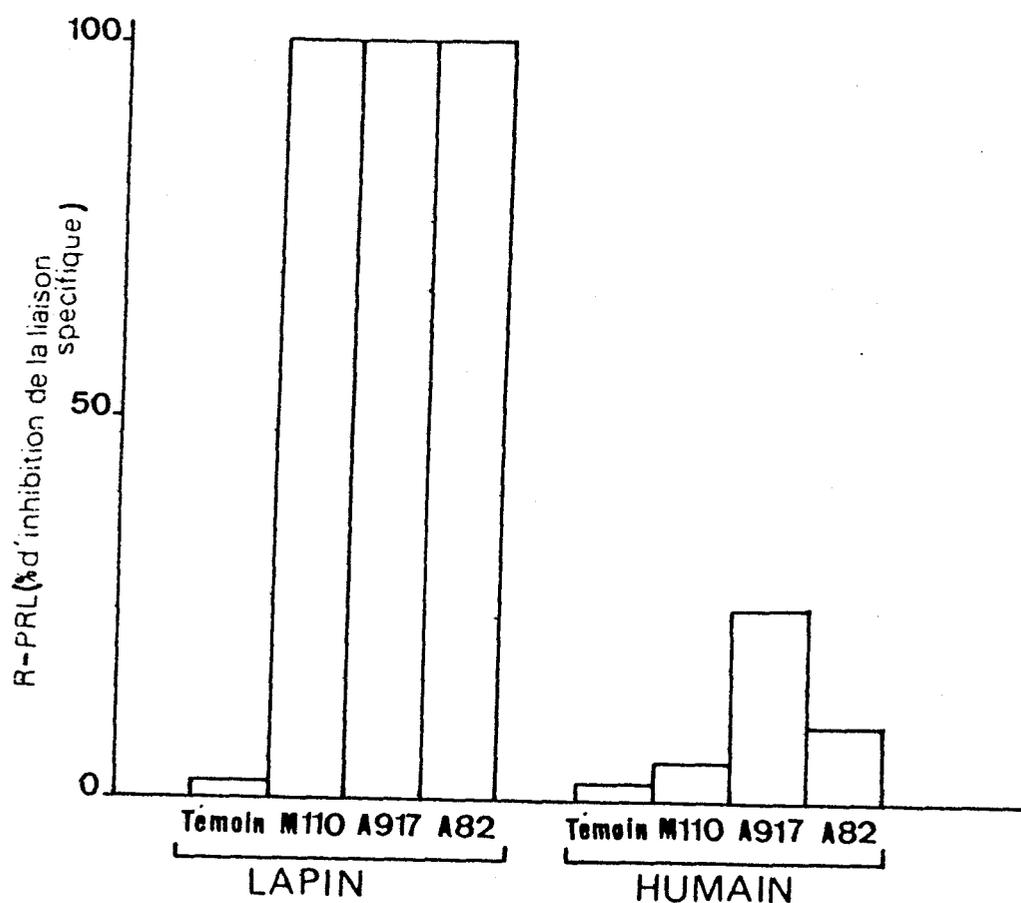


Figure 24 - Action des anticorps monoclonaux anti-récepteur sur la liaison hormone-récepteur

Les R-PRL membranaires de lapin et humains sont incubés pendant une nuit à 20°C avec la hPRL iodée en absence et en présence d'immunoglobulines monoclonales (50 µg/ml). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la liaison spécifique (lapin : 14 535 cpm ; humain : 7 603 cpm) obtenue en incubant les protéines (400 µg) en présence d'iode 125 hPRL avec ou sans 1 µg de oPRL non radioactive.

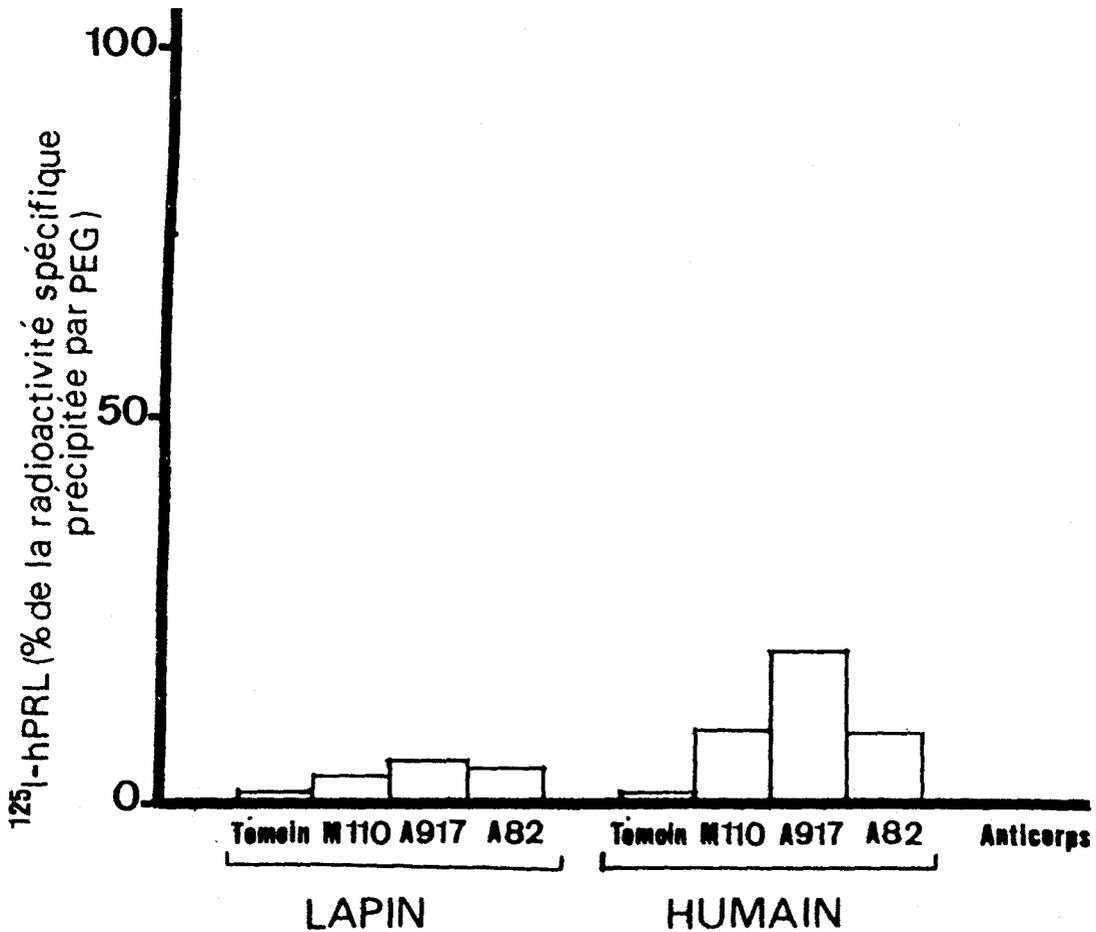


Figure 25 - Immunoprécipitation du R-PRL solubilisé, occupé par la PRL

Les R-PRL de lapin et humains, solubilisés par le CHAPS (200  $\mu\text{g}$  de protéines) sont incubés pendant 18 heures à 20°C avec la hPRL iodée (200 000 cpm) en absence et en présence d'1  $\mu\text{g}$  de oPRL non radioactive. En fin d'incubation, différents anticorps (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) sont ajoutés dans chacun des tubes. Après une deuxième incubation de 6 heures à 20°C, les complexes "anticorps-récepteur occupé par l'hormone" sont précipités à l'aide de la pansorbine. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité spécifique précipitée (lapin : 15 183 cpm ; humain : 4 932 cpm), dans les contrôles à l'aide de polyéthylène-glycol et pour lesquels la seconde incubation est effectuée en absence d'anticorps.

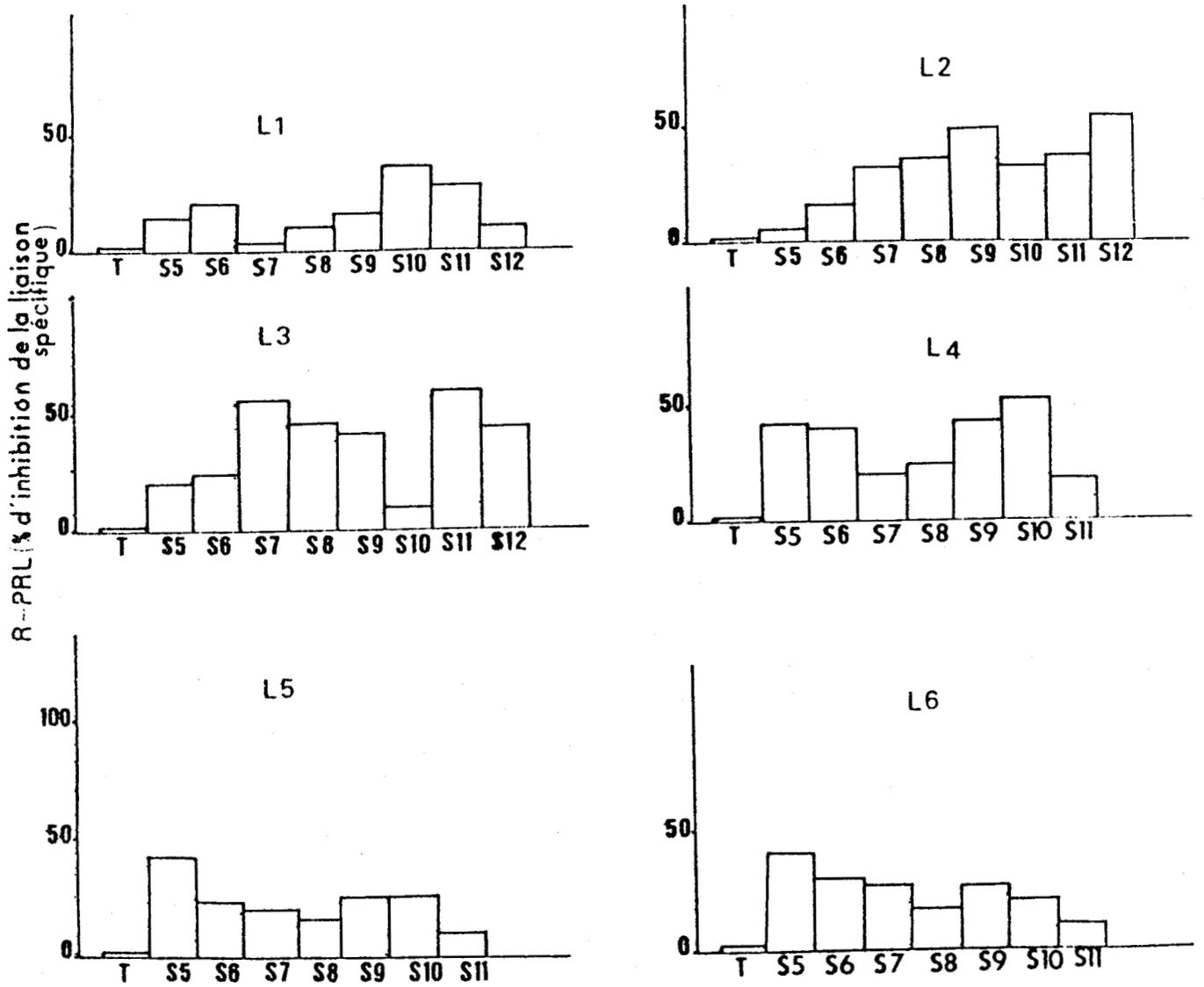


Figure 26 - Action des anticorps anti-idiotypes sur la liaison hormone-récepteur

Les R-PRL membranaires humains sont incubés pendant une nuit à 20°C avec la hPRL iodée en absence et en présence de différentes saignées (S) à une dilution de 1/100ème. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la liaison spécifique (8 879 cpm) obtenue en incubant les protéines (400 µg) en présence d'iode 125 hPRL avec ou sans 1 µg de oPRL non radioactive.

est capable d'inhiber 60 % de la liaison hormonale sur les membranes de cellules T47-D. La réponse anti-idiotypique n'a été observée que dans les sérums de 3 lapins sur six (L2, L3 et L4), pour les autres lapins (L1, L5 et L6), la réponse n'est pas tout à fait négligeable. A partir du 7ème rappel et pour les immunisations suivantes, l'efficacité des anticorps varie de façon irrégulière. D'autre part, l'activité inhibitrice des sérums S7L3 et S11L3 (Figure 27), à une dilution égale au 1/100ème et au 1/10ème, sur la liaison hormone-récepteur de lapin, est de l'ordre de 20 % (au 1/10ème). L'activité de ces anticorps semble plus faible sur la glande mammaire de lapine par rapport aux cellules T47-D.

### 32. TEST DE LIAISON DES ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES PAR LA PROTEINE A IODEE

Les résultats (Figure 28) indiquent que les anticorps anti-idiotypiques sont capables de reconnaître le R-PRL humain. Les sérums pré-immuns ont une activité très faible à des concentrations très élevées.

### 33. IMMUNOPRECIPITATION DU R-PRL

Les immunoprécipitations réalisées (Figure 29) avec les sérums S7L3 et S11L3 à une dilution de 1/100ème et de 1/10ème sur le récepteur solubilisé des cellules T47-D, révèlent que ces anticorps anti-idiotypiques sont incapables de précipiter les complexes "hormone-récepteur". Toutefois l'action de ces anticorps (S7 L3 et S11 L3) sur le récepteur solubilisé de glande mammaire de lapine, occupé par la hPRL iodée, révèle que ces anticorps sont capables de précipiter les complexes "hormone-récepteur". A une dilution optimale égale à 1/10ème, ces sérums immunoprécipitent 50 % de la radioactivité spécifique précipitée par le polyéthylène-glycol (Figure 30).

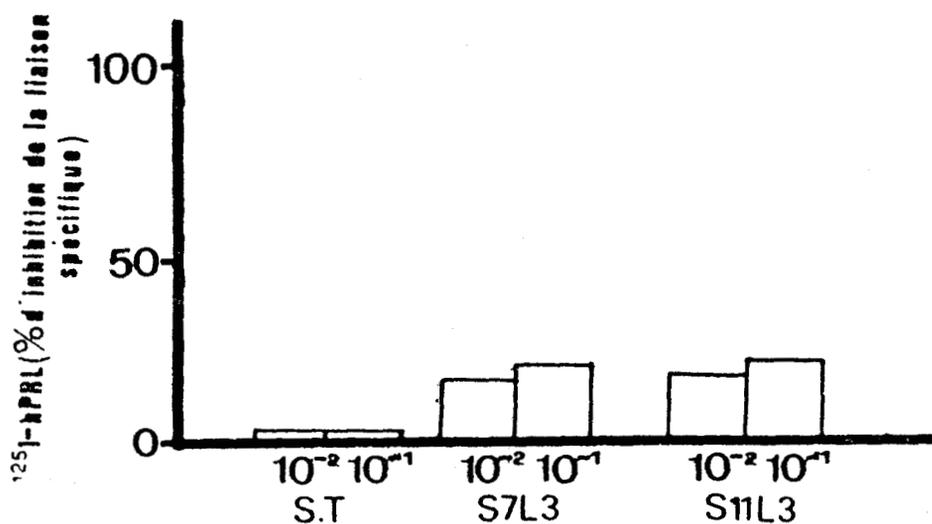


Figure 27 - Action des sérums anti-idiotypiques sur la liaison hormone-récepteur

Les R-PRL membranaires de lapin sont incubés, pendant une nuit à 20° C avec la hPRL iodée (200 000 cpm) en absence et en présence de sérums anti-idiotypiques (S7 L3 et S11 L3) et de sérums témoins (S.T) à une dilution de 1/100ème et de 1/10ème. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la liaison spécifique (23 784 cpm) obtenue en incubant des protéines (400 µg) en présence d'iode 125 hPRL avec ou sans 1 µg de oPRL non radioactive.

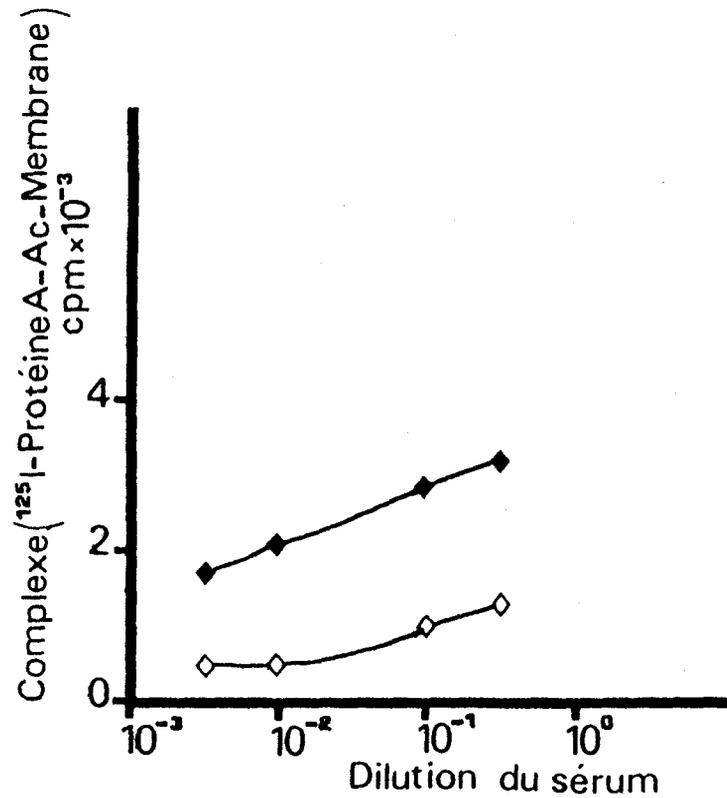


Figure 28 - Liaison des anticorps anti-idiotypiques avec les microsomes des cellules T47-D

L'antisérum anti-idiotypique (S11 L3) (◆) et le sérum pré-immun (◇) à concentrations croissantes sont incubés avec les microsomes (400 µg). Après incubation pendant 1 heure à 4°C, les membranes sont lavées trois fois. Les anticorps restant liés aux culots membranaires sont déterminés par addition de protéine A iodée (11 500 cpm) et précipités par centrifugation.

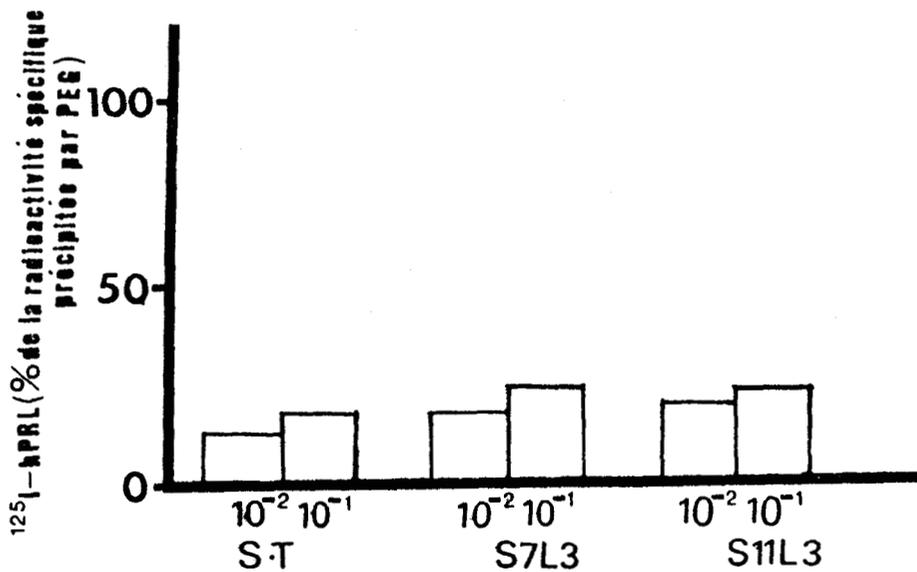


Figure 29 - Immunoprécipitation du R-PRL solubilisé occupé par la PRL

Des R-PRL humains, solubilisés par le CHAPS (200 µg de protéines) sont incubés pendant 18 heures à 20°C, avec la hPRL iodée (200 000 cpm) en absence et en présence d'1 µg de oPRL non radioactive. En fin d'incubation, les sérums anti-idiotypiques (S7 L3 et S11 L3) et le sérum témoin (S.T) dilués au 1/100ème et au 1/10ème sont ajoutés dans chacun des tubes. Après une deuxième incubation de 6 heures à 20°C, les complexes "anticorps-récepteur occupé par l'hormone" sont précipités à l'aide de la pansorbine. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité spécifique précipitée (4 469 cpm), dans les contrôles à l'aide de polyéthylène-glycol et pour lesquels la seconde incubation est effectuée en absence de sérums.

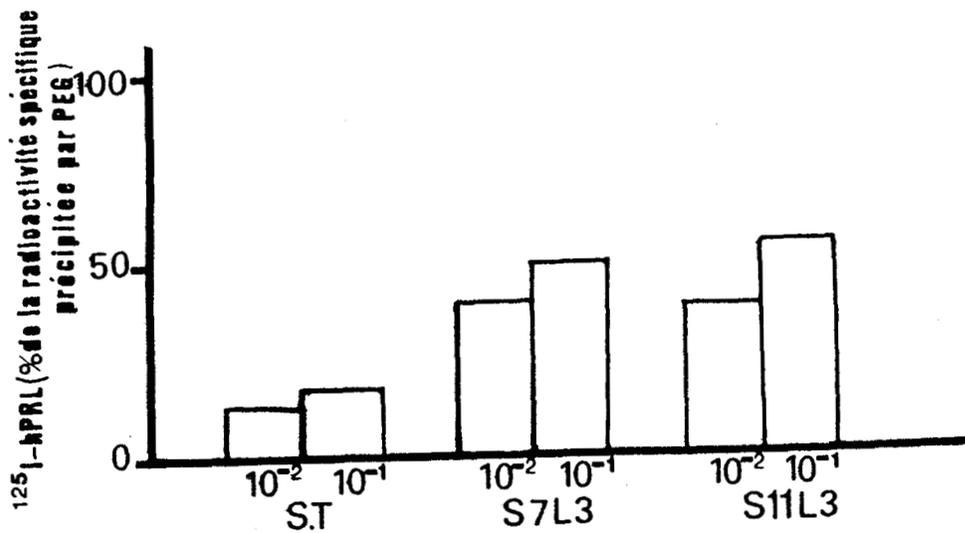


Figure 30 - Immunoprécipitation du R-PRL solubilisé occupé par la PRL

Des R-PRL de lapin, solubilisés par le CHAPS (200  $\mu$ g de protéines) sont incubés pendant une nuit à 20°C, avec la hPRL iodée (200 000 cpm) en absence et en présence d'1  $\mu$ g de oPRL non radioactive. En fin d'incubation, les sérums anti-idiotypiques (S7 L3 et S11 L3) et le sérum témoin (S.T) dilués au 1/100ème et au 1/10ème sont ajoutés dans chacun des tubes. Après une deuxième incubation de 6 heures à 20°C, les complexes "anticorps-récepteur occupé par l'hormone" sont précipités à l'aide de la pansorbine. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité spécifique précipitée (23 056 cpm), dans les contrôles à l'aide de polyéthylène-glycol et pour lesquels la seconde incubation est effectuée en absence de sérums.

#### 34. IMMUNOHISTOCHIMIE

En étude immunohistochimique (planche B), les cellules T47-D sont immunoréactives après utilisation d'anticorps anti-idiotypiques. L'intensité du marquage est plus forte avec les sérums des lapins L3 et L4 qu'avec les autres sérums de L1, L2, L5 et L6. Aucun marquage avec les sérums non immuns n'est observé. Les cellules T47-D présentent un marquage au niveau des sites récepteurs extra- et intra-cellulaires.

#### 35. IMMOBILISATION DU R-PRL SUR NITROCELLULOSE ET IMMUNODETECTION (Dot immunobinding)

L'application des microsomes de cellules T47-D sur une phase solide (nitrocellulose), suivie de la détection immunologique par les immunosérums anti-idiotypiques permet de révéler, après coloration au chloronaphtol, l'existence d'anticorps anti-idiotypiques qui reconnaissent le R-PRL humain (Figure 31).

#### 36. IMMUNO-ELECTRO-TRANSFERT

Les résultats du transfert (Figure 32) montrent que les immunosérums anti-idiotypiques reconnaissent de manière spécifique le R-PRL des cellules T47-D.

L'immuno-révélation par le chloronaphtol, après séparation électrophorétique et immunodétection des R-PRL, permet de mettre en évidence une bande majeure de 36 000 Da qui correspond au poids moléculaire de l'unité liante du R-PRL reconnu par les anticorps anti-idiotypiques, alors que cette bande n'est pas reconnue par le sérum pré-immun. Toutefois, d'autres bandes mineures sont parfois observées, de marquage plus diffus.

## PLANCHE B

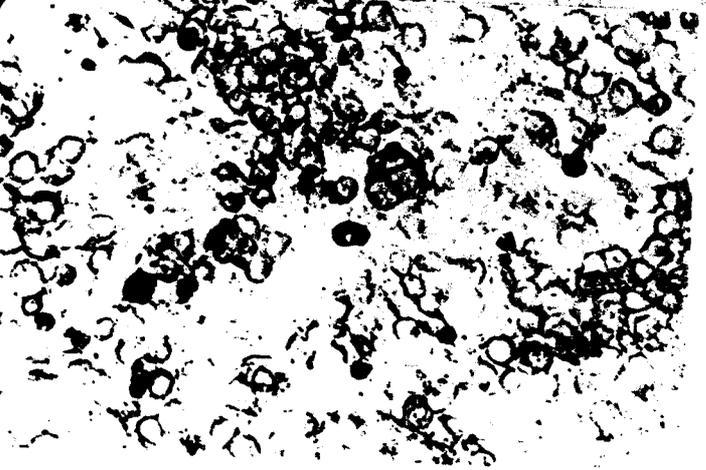
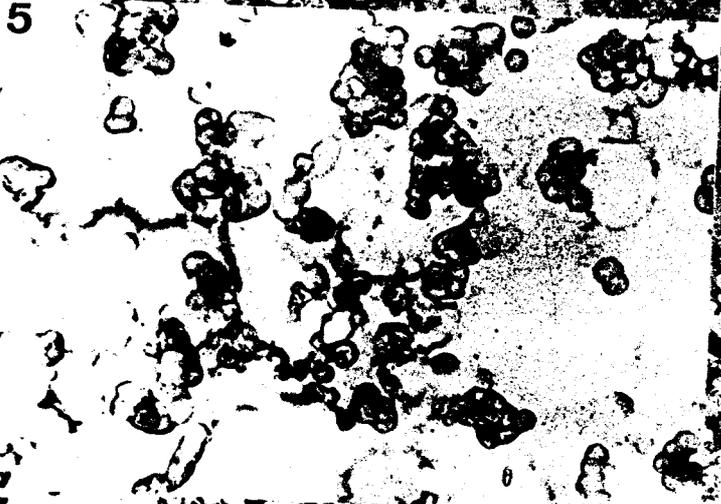
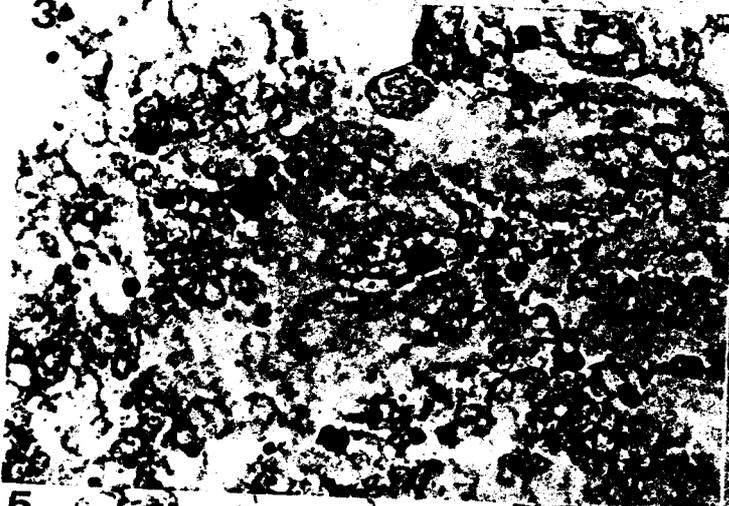
LES CELLULES T47-D MARQUEES EN IMMUNOPEROXYDASE  
PAR LES SERUMS ANTI-IDIOTYPIQUES DILUES AU 1/50<sup>ème</sup>

1. Contrôle négatif (sérum non immun de lapin)  
(absence de marquage (x 25))
2. Lapin 1 (x 25)
3. Lapin 2 (x 25)
4. Lapin 3 (x 40)
5. Lapin 4 (x 25)
6. Lapin 5 (x 25)
7. Lapin 6 (x 25)



1

2



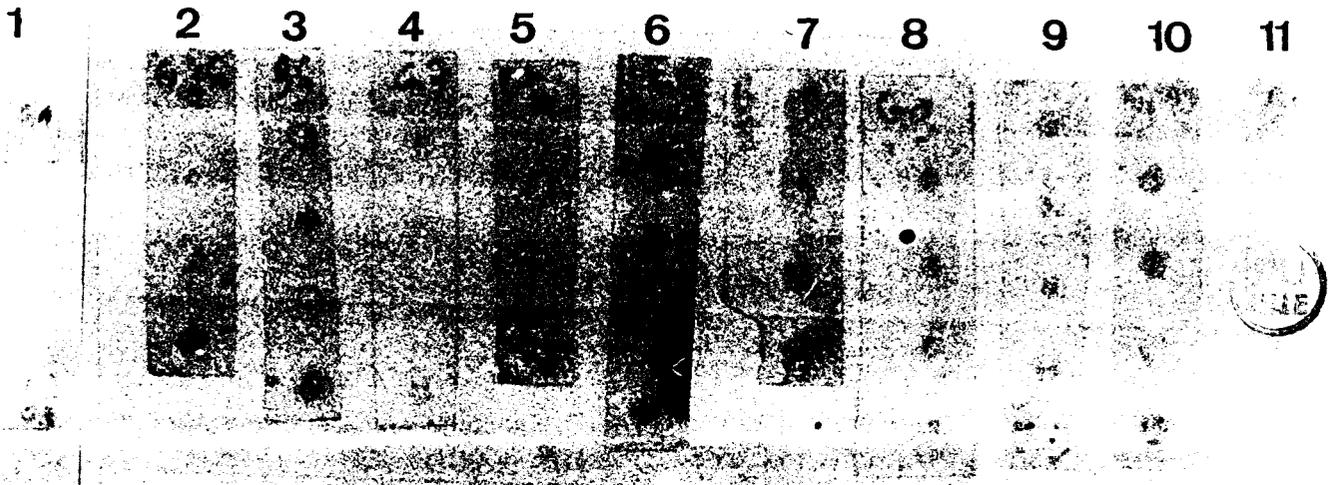


Figure 31 - Immobilisation du R-PRL sur nitrocellulose et immunodétection

Des microsomes de cellules T47-D sont déposés sous forme de puits sur nitrocellulose. Après incubation des R-PRL avec le sérum pré-immun (1) ou les sérums immuns anti-idiotypiques (2 à 11), les anticorps spécifiques reconnaissant les R-PRL sont visualisés par des anticorps de chèvre anti-IgG de lapin marqués à la peroxydase.

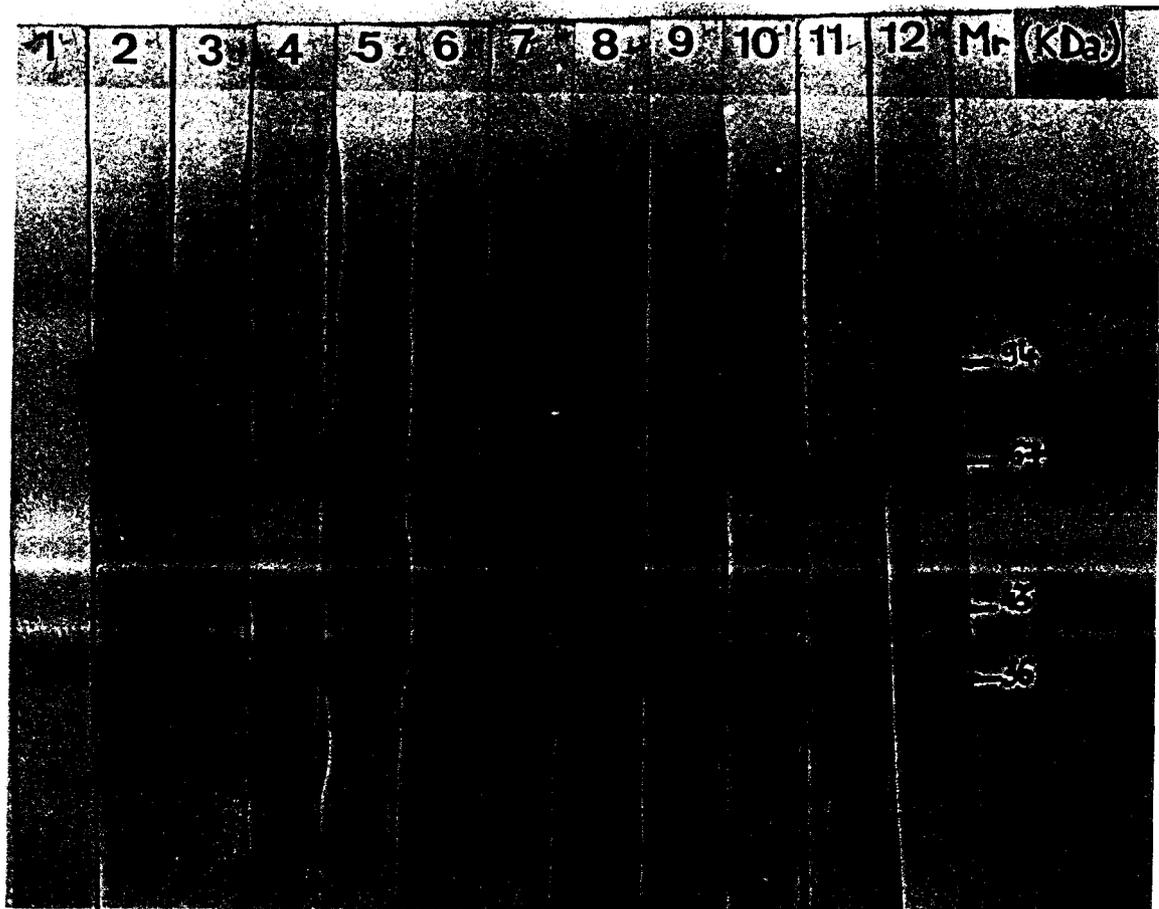


Figure 32 - Révélation du R-PRL par les anticorps anti-idiotypes

Des microsomes de cellules T47-D sont séparés par électrophorèse selon un gradient linéaire de polyacrylamide-SDS (5-15 %). Après électrotransfert sur nitrocellulose, les R-PRL sont incubés avec un sérum pré-immun (1) ou des sérums immuns anti-idiotypiques (2 à 12) et révélés par anticorps de chèvre anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase.

## **DISCUSSION**

Les caractéristiques de liaison de la hGH sur les R-PRL des cellules T47-D sont voisines de celles mises en évidence sur les R-PRL de glande mammaire de lapine (SHIU et FRIESEN, 1974a,b). L'affinité de ces récepteurs de la hGH, mesurée à l'équilibre, est élevée dans les cellules T47-D mais légèrement plus faible que dans la glande mammaire de lapine (SHIU et FRIESEN, 1974a ; MURPHY et coll., 1984a,b).

En présence d'un excès de récepteurs, le pourcentage d'hormone capable de se lier aux récepteurs, après marquage à la chloramine T, est plus élevé dans le système lapin que dans le système humain : ceci peut s'expliquer par une inhibition due à un effet de concentration membranaire, mais on peut aussi imaginer que, en raison de son hétérogénéité, les fractions d'hormone liant les deux récepteurs ne sont pas les mêmes.

L'étude de la spécificité de liaison de la hGH et de la hPRL aux R-PRL dans la tumeur comme dans le tissu normal, montre qu'elle est très étroite et ne s'exerce que vis-à-vis des hormones à activité lactogène, c'est-à-dire les prolactines bovine, ovine, humaine et aussi l'hormone de croissance humaine. Ces résultats corroborent ceux de SHIU (1979), GERTLER et coll. (1984) et BISWAS et VONDERHAAR (1987). Le fait que la hGH et la hPRL déplacent de la même façon ces deux hormones marquées suggèrent l'existence d'un seul type de récepteur lactogénique dans la glande mammaire comme cela avait été rapporté dans les cancers du sein (PEYRAT et coll., 1984a ; MURPHY et coll., 1984a,b).

D'autre part, la prolactine humaine inhibe la liaison de  $^{125}\text{I}$ -hPRL aux R-PRL humains et de lapin avec des constantes d'affinité de liaison identiques. Ce phénomène n'est pas observé chez les autres espèces animales (lapin, brebis, truie...) pour lesquelles il est très difficile d'obtenir *in vitro* une liaison de l'hormone sur les récepteurs prolactiniques de l'espèce homologue. Ainsi, chez la lapine la prolactine de lapin n'inhibe pas la liaison "hormone-récepteur". Ceci est également observé avec la prolactine ovine sur les récepteurs prolactiniques de glande mammaire de brebis, ainsi qu'avec la prolactine porcine sur ses R-PRL homologues où la liaison spécifique est inférieure à 2 % alors que, dans les mêmes conditions, la liaison spécifique obtenue avec la prolactine ovine est égale à 33 % (SAKAI et coll., 1985 ; BERTHON et coll., 1987). Ce phénomène pourrait s'expliquer par une plus faible affinité des récepteurs vis-à-vis de l'hormone homologue, dans les conditions classiques de préparation des fractions membranaires. Des travaux récents montrent qu'il est possible d'obtenir une excellente liaison spécifique de la prolactine de souris sur les récepteurs hépatiques d'espèce homologue dans des conditions particulières de préparation des fractions membranaires (homogénéisées dans le tampon glycine et mise en suspension dans le tampon TRIS) et d'incubation des échantillons avec l'hormone (dans le tampon phosphate-glycérol, pH 8,3 à 8°C en présence de NaF 100 mM et de  $\text{MgCl}_2$  10 mM) (HARO et TALAMANTES, 1985).

Les analyses électrophorétiques, effectuées à partir de membranes des cellules T47-D après marquage par affinité, révèlent que les R-RPL sont constitués d'une sous-unité liante de poids moléculaire apparent de 36 500 Da. Le poids moléculaire de la sous-unité est le même en absence et en présence de dithiothréitol : les sous-unités liant l'hormone de croissance humaine ne sont donc pas associées entre elles ou à d'autres sous-unités

par l'intermédiaire de ponts disulfures. Ainsi dans la tumeur, le poids moléculaire de la sous-unité est semblable à celui obtenu dans la glande mammaire et de foie de lapine (HAEUPTLE et coll., 1983 ; HUGHES et coll., 1983 ; KELLY et coll., 1984 ; NECESSARY et coll., 1984 ; KATOH et coll., 1985a), dans la glande mammaire de truie (SAKAI et coll., 1984 ; BERTHON et coll., 1987), dans le foie de souris (LISCIA et VONDERHAAR, 1982b), et dans divers organes de rat (BORST et SAYARE, 1982 ; BORST et coll., 1985 ; HUGHES et coll., 1983 ; BONIFACINO et DUFAU, 1984 ; KATOH et coll., 1987).

Le R-PRL est caractérisé par une sous-unité liante de faible poids moléculaire, inférieur à ceux déterminés pour d'autres unités réceptrices telles que les récepteurs bêta-adrénergiques (58 000 Da) (SHORR et coll., 1982) et du glucagon (63 000 Da) (HERBERG et coll., 1984). Le poids moléculaire de l'unité liante du récepteur spécifique de l'hormone somatotrope est estimée à 50 000 - 54 000 Da (HUGHES et coll., 1983), à 67 000 Da (HAEUPTLE et coll., 1983) et à 57 000 Da (YMER et HERINGTON, 1984) dans le foie de lapine, à 80 000 - 90 000 Da dans divers organes de rat (BONIFACINO et DUFAU, 1984, 1985) et peut atteindre à 109 000 Da sur les lymphocytes humains (HUGHES et coll., 1983). Les récepteurs de l'EGF qui ne comportent pas de sous-unités, possèdent un poids moléculaire égal à 170 000 - 180 000 Da (HUNTER, 1984). Le récepteur insulinique, hétérotétramère dont les sous-unités sont liées entre elles par des ponts disulfures, présente en absence d'agent réducteur un poids moléculaire de 400 000 Da. La sous-unité liant l'insuline, mise en évidence sous des conditions réductrices, est caractérisée par un poids moléculaire situé à 125 000 Da (JARETT, 1983 ; CZECH, 1984). Dans le cadre d'un travail de collaboration, nous avons aussi déterminé le poids moléculaire de la sous-unité liante du récepteur de l'IGF1 (Insulin Like growth factor 1) des

cellules cancéreuses du sein et de mastopathies bénignes, qui est identique à celui de la sous-unité liant l'insuline (130 000 Da) (PEYRAT et coll., 1988), et donc bien supérieur à celui de la sous-unité de la PRL.

Le rendement de solubilisation des R-PRL des cancers du sein par le Triton X-100 (1 %) est de 67 %. Il est similaire à celui obtenu à partir de la glande mammaire (SHIU et FRIESEN, 1974a, HAEUPTLE et coll., 1983 ; KATOH et coll., 1984). Mais ce détergent présente plusieurs inconvénients (voir Matériel et Méthodes). Notre étude s'est orientée vers l'utilisation d'un détergent Zwitterionique : le CHAPS qui ne possède pas les inconvénients présentés par le Triton X-100. La solubilisation des R-PRL humains est maximale (rendement 67 %) pour une concentration de CHAPS égale à 8,1 mM (0,5 % p/v) ; celle-ci étant de 5 mM pour la glande mammaire de lapine (KATOH et coll., 1985a). Les rendements de solubilisation obtenus avec le CHAPS sont identiques à ceux observés avec le Triton X-100. Mais ce Zwitterion, plus sélectif, solubilise moins de protéines contaminantes. Hormis le fait que l'emploi de ce détergent soit compatible avec l'utilisation de la prolactine, les fractions ainsi solubilisées présentent une liaison spécifique nettement supérieure à celle définie pour des préparations issues de l'action du Triton X-100. L'étape de solubilisation des microsomes, à partir d'homogénat de cellules T47-D nous a permis d'obtenir des fractions présentant des concentrations élevées de R-PRL (exprimées par mg de protéines), dans l'optique d'une purification du R-PRL, par chromatographie d'affinité, cette technique de solubilisation constitue à elle seule une première étape d'enrichissement en récepteurs.

Notons que la liaison spécifique de l'hormone marquée dépend de la concentration de CHAPS dans le milieu, et est maximale à 1,62 mM (concentration finale). Cette valeur est inférieure à celle constatée par LISCIA et

coll. (1982a), LISCIA et VONDERHAAR (1982b) sur les R-PRL de foie de souris. Ce détergent, à trop forte concentration, provoque la formation de micelles emprisonnant les R-PRL et les rendant inaccessibles à l'hormone radio-active, mais les R-PRL tumoraux semblent très sensibles à son action.

Cette étape de solubilisation des R-PRL des cellules T47-D, par le CHAPS 8,1 mM s'accompagne d'une augmentation de l'affinité de liaison des R-PRL pour l'hormone ; de manière identique à ce qui a été précédemment observé avec le R-PRL de glande mammaire de lapine, solubilisé par le CHAPS ou le Triton X-100 (SHIU et FRIESEN, 1974a ; KATOH et coll., 1984, 1985a). Le changement d'affinité du récepteur pour son ligand est lié à une modification de son environnement. En dissociant certains composants membranaires situés au voisinage des molécules réceptrices, le détergent permettrait aux R-PRL de devenir plus accessibles à l'hormone.

L'analyse électrophorétique, après marquage par affinité, met en évidence dans les préparations solubilisées par le CHAPS l'existence d'une seule unité liant la hGH, de poids moléculaire identique à celui déterminé à partir des fractions membranaires (36 500 Da). Les déterminations du poids moléculaire apparent, par analyse chromatographique à basse pression, du récepteur solubilisé des cellules T47-D indiquent que le R-PRL présente un poids moléculaire apparent très élevé, différent de celui défini par analyse électrophorétique, après marquage par affinité. Cette observation se rapproche des caractéristiques précédemment décrites pour le R-PRL de glande mammaire de lapine qui, après solubilisation par le Triton X-100 a un poids moléculaire de 220 000 Da (SHIU et FRIESEN, 1974a). De même un poids moléculaire apparent de 340 000 Da a été déterminé pour les complexes "hormone-récepteur" obtenus avec les récepteurs hydrosolubles

présents dans le foie de rat (AMIT et coll., 1984). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus avec le récepteur de foie de souris (LISCIA et VONDERHAAR, 1982b) pour lequel la forme solubilisée par le CHAPS possède un poids moléculaire de 37 000 Da. Ce récepteur, qui a une affinité semblable sous forme membranaire ou solubilisé, semble donc structurellement différent des autres types de R-PRL. En utilisant une autre technique : l'HP-LC, nous avons confirmé que l'étude de R-PRL humain solubilisé par le Triton X-100 présentait un poids moléculaire apparent très élevé, identique à celui défini par gel-filtration à basse pression (KATOH et coll., 1984).

Les poids moléculaires apparents élevés obtenus pour le R-PRL solubilisé pourraient être liés à l'action du détergent, celui-ci favorisant l'agrégation des protéines et la formation de micelles. Mais il semble plus probable que le récepteur est composé de plusieurs sous-unités dont une au moins, la sous-unité liant l'hormone de croissance possède un poids moléculaire de 36 500 Da. Il est néanmoins difficile de préciser si le poids moléculaire élevé (230 000 Da) du R-PRL défini par gel-filtration correspond au R-PRL complet car des phénomènes d'agrégation des protéines réceptrices entre elles, la formation des micelles ou des liaisons hydrophobes entre le récepteur et d'autres protéines peuvent se produire en présence de détergent. Seul le récepteur purifié marqué permettrait de mesurer son poids moléculaire exact. Par ailleurs, les pics mineurs observés dans les profils d'élution du R-PRL solubilisé pourraient correspondre à des produits de protéolyse du récepteur, ou éventuellement à des sous-unités du récepteur.

Le R-PRL humain solubilisé par le CHAPS possède un rayon de Stokes ( $R_s$ ) d'environ 57 Å et un coefficient de sédimentation  $S_{20,w}$  d'environ 7 S. Ces propriétés hydrodynamiques, déterminées par gel-filtration et ultracentrifugation sur gradient linéaire de saccharose, sont en accord

avec ceux obtenus pour les R-PRL d'ovaire humain (BONO et coll., 1983). Les résultats obtenus avec le récepteur de foie de rat (JAFPE, 1982 ; RAE-VENTER et DAO, 1983 ; HALDOSEN et GUSTAFSSON, 1987) montrent que la forme solubilisée par le Triton X-100 liée à son hormone, possède un rayon de Stokes situé entre 50 et 61 Å et un coefficient de sédimentation de l'ordre de 5 S.

La technique de purification des R-PRL par chromatographie d'affinité, sur Affi-gel 10 - hGH, permet d'obtenir des fractions partiellement purifiées possédant une capacité de liaison moyenne de 20 000 fmoles par mg de protéines, correspondant à un facteur de purification de l'ordre de 500 par rapport aux fractions membranaires de cellules T47-D. Le rendement protéique est de 0,001 % et le rendement en R-PRL, défini à partir des extraits solubilisés déposés sur le gel, est environ de 8 %. Les résultats obtenus avec les cellules T47-D sont à peu près semblables à ceux observés avec la glande mammaire de lapine, pour laquelle la fraction partiellement purifiée présente une concentration en récepteurs de 258 pmoles par mg de protéines, correspondant à un facteur de purification par rapport aux membranes de 655 (KATOH et coll., 1985a). Le rendement protéique est de 0,014 % et le rendement en récepteurs de 20,7 %. Les faibles valeurs du rendement en R-PRL, obtenues avec les cellules T47-D semblent être dues à une adsorption plus importante des récepteurs, qui sont en quantité très faible par rapport à la glande mammaire de lapine, sur le gel de chromatographie, ainsi qu'à une dégradation probable, se traduisant par une perte de capacité de liaison. D'autre part, malgré un grand enrichissement (500 fois) en R-PRL au cours de cette étape de purification, les fractions partiellement purifiées perdent totalement leur activité biologique au cours de la conservation.

En raison du problème que nous venons d'évoquer, des quantités suffisantes de R-PRL n'ont pu être purifiées ; nous n'avons donc pas pu mettre en oeuvre la préparation d'anticorps par injection de ce produit.

Les anticorps polyclonaux dirigés contre les R-PRL de la glande mammaire de lapine et de truie ne présentent pas, ou très faiblement, d'activité inhibitrice de la liaison de l'hormone (hGH ou hPRL) aux R-PRL membranaires de cancer du sein. Ces anticorps ne sont pas non plus capables d'immunoprécipiter les complexes hormone-R-PRL humain. Ils reconnaissent pourtant de manière très spécifique le site de liaison et/ou d'autres domaines des R-PRL du lapin ou de la truie (DJIANE et coll., 1985 ; KATOH et coll., 1985b) ; ces anticorps peuvent aussi inhiber la liaison de l'oPRL à des R-PRL d'autres espèces (rat, vison) et d'autres tissus (foie, surrénale, ovaire) (KATOH et coll., 1984 ; BERTHON et coll., 1987). La situation est tout à fait semblable lorsqu'on utilise les anticorps monoclonaux qui ne reconnaissent pas (ou très faiblement) les R-PRL humains.

Nos résultats mettent donc en évidence, pour la première fois, des différences majeures entre les déterminants antigéniques des R-PRL selon l'espèce, ce qui suggère que ces sites pourraient être modifiés au cours de l'évolution. Néanmoins, une autre possibilité est que la différence observée provienne de la nature cancéreuse du tissu ; l'étude du sein normal lequel est pour des raisons évidentes, très difficile à obtenir, permettrait de vérifier cette hypothèse. En tout cas, l'absence d'activité de ces anticorps sur les R-PRL humains justifie la recherche d'anticorps spécifiques que nous avons développée en utilisant l'approche anti-idiotypique.

L'immunisation des lapins contre des IgG anti-prolactine humaine ont permis d'obtenir des sérums immuns anti-idiotypiques dirigés contre l'unité réceptrice de la prolactine. Les anticorps anti-idiotypiques, à une dilution de 1/100ème pour les prélèvements correspondant aux dernières injections de rappel, inhibent à 60 % la liaison de l'hormone (hPRL ou hGH) au R-PRL des cellules T47-D. Ces anticorps sont incapables d'immunoprécipiter les complexes "hormone-récepteur". Ceci suggère que les sérums immuns renferment des anticorps anti-idiotypes de la catégorie "images internes" dirigés contre le site de liaison à l'antigène du premier anticorps (anti-prolactine). Ces résultats sont analogues à ceux précédemment décrits pour les anticorps anti-idiotypiques produits contre les anticorps anti-prolactine de brebis ou anti-prolactine de rat (AMIT et coll., 1986).

Ces anticorps anti-idiotypes n'inhibent pas ou peu la liaison de l'hormone au R-PRL de glande mammaire de lapine ; par contre, ils précipitent faiblement le récepteur solubilisé de lapin lorsqu'il est occupé par l'hormone, reconnaissant donc des régions de l'unité réceptrice de la glande mammaire de lapine en dehors du site de liaison. Ces résultats, en accord avec les précédents, confirment que les déterminants antigéniques du récepteur de la prolactine humaine ne sont pas les mêmes que ceux du récepteur de la glande mammaire de lapine. Ces anticorps anti-idiotypes apparaissent plus spécifiques de l'espèce humaine.

Les résultats de l'immuno-électro-transfert montrent que les anticorps anti-idiotypiques sont capables de reconnaître l'unité réceptrice du R-PRL humain de poids moléculaire identique à celui déterminé après marquage par affinité (36 000 Da). La présence d'autres bandes de marquage plus diffus peut correspondre soit à des liaisons d'anticorps (utilisés à concentration élevée) sur des protéines membranaires autres que le récepteur soit à la

liaison sur une sous-unité du récepteur dissocié (conditions dénaturantes) ne contenant pas le site spécifique. Ceci confirme les résultats que nous avons obtenus en immunoprécipitant les complexes "hormone-récepteur" avec la protéine A qui met en évidence une faible liaison de ces anticorps en dehors du site de liaison.

Les résultats du transfert ont montré non seulement que les immun-sérums anti-idiotypiques étaient spécifiques du récepteur humain, mais aussi que l'anticorps anti-idiotype est une immunoglobuline G. En effet, l'anticorps marqué à la peroxydase, utilisé pour révéler l'anticorps anti-idiotype est dirigé spécifiquement contre les immunoglobulines G de lapin. Sa réaction avec l'anticorps anti-idiotype ne peut donc être expliquée que par le fait que l'anticorps anti-idiotype est de type IgG.

En conclusion, les résultats d'immuno-électrotransfert confirment que les anticorps anti-idiotypiques que nous avons préparés reconnaissent spécifiquement le site de liaison du récepteur prolactinique humain.

Les anticorps anti-idiotypes présentent non seulement un intérêt fondamental dans l'immunorégulation du système immunitaire mais aussi, ont des retombées pratiques dans divers domaines. En effet, ils sont utilisés comme nouvelles sondes moléculaires pour l'étude des récepteurs cellulaires, comme moyens de compréhension de certaines pathologies auto-immunes et comme outils thérapeutiques. L'approche anti-idiotypique présente un grand intérêt dans l'étude des récepteurs de surface cellulaire et plusieurs applications d'anticorps anti-idiotypes à cette étude ont été revues récemment. Des résultats remarquables ont été obtenus dans ce domaine (Tableau II). Les études effectuées sur les récepteurs de surface cellulaire ont montré l'intérêt considérable des anticorps anti-idiotypes

dirigés contre les anticorps anti-hormone, en particulier sur le plan de leur capacité de liaison spécifique aux récepteurs de l'insuline, de la TSH et au récepteur bêta-adrénergique.

Ainsi, l'utilisation des anticorps anti-idiotypes a permis à STROSBERG et coll. (1982) de purifier la sous-unité 60 000 Da du récepteur bêta-adrénergique, et à WASSERMANN et coll. (1982) de comprendre le mécanisme de la myasthénie. Enfin, il apparaît clairement que cette approche a fait la preuve de son indiscutable fécondité dans le domaine des récepteurs membranaires.

Tableau III - Anticorps anti-idiotypes reconnaissant des récepteurs cellulaires

Immunogène	Récepteur	Signal induit par l'anticorps	Cellule	Références
Insuline	de l'insuline	Capture de l'acide alpha-amino-isobutyrique	Thymocytes	SEGE, PETERSON (1978)
		Inhibition de la lipolyse	Adipocyte	SHECHTER (1982)
Rétinol	RBP	Captation du rétinol	Cellule épithéliale intestinale	SEGE, PETERSON (1978)
Catécholamine	des bêta-adrénergiques	Activation ou inhibition de l'adénylcyclase	Erythrocyte nucléé	SCHREIBER (1980)
Thyréotrope	à TSH	Activation de l'adénylcyclase, augmentation de la vitesse de pénétration de l'iode dans les cellules formation folliculaire	Cellule thyroïdienne	-
Peptide chimio-	du peptide chimiotactique	-	Cellule neutrophile	MARASCO (1982)
Bis Q	de l'acétylcholine	-	-	WASSERMAN (1982)

## **CONCLUSION**

L'objet de cette étude était de comparer les caractéristiques biochimiques des R-PRL en situation physiologique dans la glande mammaire de lapine et en pathologie cancéreuse dans les lignées cellulaires épithéliomateuses de cancer du sein. Les similitudes apparaissent aussi bien sur les caractéristiques générales de liaison de ces récepteurs que sur leurs propriétés chromatographiques, hydrodynamiques et électrophorétiques. Par contre, nous avons pu mettre en évidence des différences antigéniques importantes entre les R-PRL humains et les R-PRL d'autres espèces puisque des anticorps anti-R-PRL de lapin et de truie ne reconnaissent pas les R-PRL humains et qu'inversement les anticorps anti-R-PRL humains, que nous avons préparés, ne reconnaissent pas les R-PRL de lapin et de truie. Il existe donc vraisemblablement des différences structurales importantes entre ces deux types de récepteurs.

L'obtention d'anticorps anti-idiotypiques anti-R-PRL humains nous permettra de mettre en oeuvre la purification de ce récepteur par immunoaffinité. Cette méthode a déjà été fructueuse dans différents modèles. La purification des R-PRL nous permettra une caractérisation plus complète du récepteur qui pourra être marqué à l'aide d'un isotope radioactif.

Ces anticorps nous permettront aussi de réaliser un dosage radio- ou enzymo-immunologique des R-PRL tumoraux, qui sera utilisable par les cliniciens.

Le gène du R-PRL dans le foie de rat a été tout récemment cloné (BOUTIN et coll., 1988) et celui du R-PRL dans la glande mammaire de lapin est en cours. La comparaison de la séquence du R-PRL dans le foie de rat et du récepteur de l'hormone de croissance dans le foie de lapin ou

humain met en évidence des homologies entre ces récepteurs (LEUNG et coll., 1987). Il y a 30 % d'identité de séquence entre ces deux protéines quand on ne tient pas compte du domaine cytoplasmique de la molécule qui est très court pour le R-PRL dans le foie. Les études d'expression du gène du R-PRL dans le foie de rat montrent que le R-PRL est une protéine de masse moléculaire relative de 40 000 Da qui n'a pas besoin d'être associée à d'autres protéines pour lier l'hormone.

Il est logique d'envisager maintenant le clonage du R-PRL humain à partir soit d'un tissu normal comme par exemple le foie, soit de cellules tumorales comme les T47-D afin d'effectuer les comparaisons avec les récepteurs connus. Les anticorps que nous avons préparés seront d'une extrême utilité dans le criblage des génothèques humaines et ce d'autant plus que si des différences importantes existent entre les R-PRL humains dans les tumeurs et d'autres espèces, comme nos résultats le suggèrent, les sondes préparées à partir de foie de rat ou de glande mammaire de lapine pourraient ne pas être utilisables dans l'espèce humaine.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- AMIT T., BARKEY R.J., GAVISH M., YODIM MBH.  
Anti-idiotypic antibodies raised against anti-prolactin (PRL) antibodies recognize the PRL receptor.  
ENDOCRINOLOGY, 1986, 118, 835-843.
- AMIT T., BARKEY R.J., GAVISH M., YODIM MBH.  
Induction of prolactin receptors by prolactin in the rat lung and liver. Demonstration and characterization of a soluble receptor.  
ENDOCRINOLOGY, 1984, 114, 545-552.
- ANDERSON TR., RODRIGUEZ J., NICOLL CS., SPENCER EM.  
The synlactin hypothesis : prolactin's mitogenic action may involve synergism with a somatomedin-like molecule.  
In : Insulin-like growth factors/somatomedins. Walter de Gruyter and Co, Berlin, 1983, pp. 71-78.
- BERGERON J.J.M., POSNER B.I., JOSEFSBERG Z., SIKSTROM R.  
Intracellular polypeptide hormone receptors. The demonstration of specific binding sites of insulin and human growth hormone in Golgi fractions isolated from the liver of female rats.  
J. BIOL. CHEM., 1978, 253, 4058-4066.
- BERTHON P., KATOH M., DUSANTER-FOURT I., KELLY PA., DJIANE J  
Purification of prolactin receptors from sow mammary gland and polyclonal antibody production.  
MOL. CELL. ENDOCRINOL., 1987, 51, 71-81.
- BISWAS R., VONDERHAAR BK.  
Role of serum in the prolactin responsiveness of MCF-7 human breast cancer cells in long-term tissue culture.  
CANCER RES., 1987, 47, 3509-3514.
- BLANKENSTEIN MA., BORERSE J.J., VAN ZWIETEN M.J., VAN DER-MOLEN H.J.  
Prolactin concentration in plasma and susceptibility to mammary tumors in female rats from different strains treated chronically with estradiol 17 bêta.  
BREAST CANCER RES. TREAT., 1984, 4, 137-141.
- BONIFACINO J.S., DUFAU ML.  
Structure of the ovarian lactogen receptors.  
J. BIOL. CHEM., 1984, 259, 4542-4549.
- BONIFACINO J.S., DUFAU ML.  
Lactogen receptors in rat Leydig cells : analysis of their structure with bifunctional cross - linking reagents.  
ENDOCRINOLOGY, 1985, 116, 1610-1614.

- BONNETERRRE J., PEYRAT JP., VANDEWALLE B., BEUSCART R., VIE MC., CAPPELAERE P.  
Prolactin receptors in human breast cancer.  
EUR. J. CANCER CLIN. ONCOL., 1982, 18, 1157-1162.
- BONNETERRE J., PEYRAT JP., DEMAILLE A.  
Prolactin (PRL) and breast cancer.  
BREAST DISEASES-SENOLOGIA, 1985, 1, 3-26.
- BONNETERRE J., PEYRAT JP., BEUSCART R., DEMAILLE A.  
Relation between prolactin receptors and steroid receptors in human breast cancer biopsies.  
EUR. J. CANCER, 1986, 22, 1331-1336.
- BONNETERRE J., PEYRAT JP., BEUSCART R., LEFEBVRE J., DEMAILLE A.  
Prognostic significance of prolactin receptors (PRL-R) in human breast cancer.  
CANCER RES., 1987, 47, 4724-4728.
- BONO A., CANTORO G., MARTORANA A., PALERMO R., PANDOLFO L.  
Solubilisation, gel filtration and sedimentation behaviour of prolactin receptors from human ovarian tissue.  
BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA, 1983, 758, 158-167.
- BORST DW., SAYARE M.  
Photoactivated cross-linking of prolactin to hepatic membrane binding sites.  
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM., 1982, 105, 194-201.
- BORST DW., SAYARE M., POSNER BI.  
Characterization of the prolactin receptor in cell fractions from rat liver.  
CELL ENDOCRINOL., 1985, 39, 125-130.
- BOUTIN JM., JOLICOEUR C., OKAMURA H., GAGNON J., EDERY M., SHIROTA M., BANVILLE D., DUSANTER-FOURT I., DJIANE J., KELLY PA.  
Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family.  
CELL., 1988, 53, 69-77.
- CARPENTER G.  
The biochemistry and physiology of the receptor kinase of epidermal growth factor.  
MOL. CELL. ENDOCRINOL., 1983, 31, 1-19.

- CAYANIS E., RAJAGOPALAN, CLEVELAND WL., EDELMAN IS., ERLANGER BF.  
Generation of an auto-anti-idiotypic antibody that binds to glucocorticoid receptor.  
J. BIOL. CHEM., 1986, 261, 5034-5103.
- COSTLOW ME., BUSCHOW RA., Mc GUIRE WL.  
Prolactin receptors in an estrogen receptor-deficient mammary carcinoma.  
SCIENCE, 1974, 184, 85-86.
- COSTLOW ME., BUSCHOW RA., Mc GUIRE WL.  
Prolactin receptors in 7,12-dimethylbenzanthracene-induced mammary tumors following endocrine ablation.  
CANCER RES., 1976, 36, 3941-3943.
- COSTLOW HE., Mc GUIRE WL.  
Prolactin receptors and hormone dependence in mammary carcinoma. In : ENDOCRINE CONTROL IN NEOPLASIA. Sharma RK., Cross WE. Ed. Raven Press, New-York, 1978, pp. 121-150.
- CZECH PM.  
New perspectives on the mechanism of insulin action.  
RECENT PROG. HORM. RES., 1984, 40, 347-377.
- DE SOMBRE ER., KLEDZIK G., MARSHALL S., MEITES J.  
Estrogen and prolactin receptor concentrations in rat mammary tumors and response to endocrine ablation.  
CANCER RES., 1976, 36, 354-358.
- DEVINOY E., HOUEBINE LM., OLLIVIER-BOUSQUET M.  
Roles of glucocorticoids and progesterone in the development of rough endoplasmic reticulum involved in casein biosynthesis.  
BIOCHIMIE, 1979, 61, 453-461.
- DJIANE J., DURAND P., KELLY PA.  
Evolution of prolactin receptors in rabbit mammary gland during pregnancy and lactation.  
ENDOCRINOLOGY, 1977, 100, 1348-1356.
- DJIANE J., CLAUSER H., KELLY PA.  
Rapid down-regulation of prolactin receptors in mammary gland and liver. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM., 1979, 90, 1371-1378.
- DJIANE J., KELLY PA., HOUEBINE LM.  
Effects of lysosomotropic agents, cytochalasin B and colchicine on the "down-regulation" of prolactin receptors in mammary gland explants.  
MOL. CELL. ENDOCRINOL., 1980, 18, 87-98.

- DJIANE J., HOUDEBINE LM., KELLY PA.  
Down-regulation of prolactin receptors in rabbit mammary gland : differential subcellular localization.  
PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 1981a, 168, 378-381.
- DJIANE J., HOUDEBINE LM., KELLY PA.  
Prolactin-like activity of anti-prolactin receptor antibodies on casein and DNA synthesis in the mammary gland.  
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1981b, 78, 7445-7448.
- DJIANE J., DELOUIS C., KELLY PA.  
Prolactin receptor turn-over in pseudo-pregnant rabbit mammary glands.  
MOL. CELL. ENDOCRINOL., 1982, 25, 163-170.
- DJIANE J., DUSANTER-FOURT I., KATOH M., KELLY PA.  
Biological activities of binding site specific monoclonal antibodies to the prolactin receptors of rabbit mammary gland.  
J. BIOL. CHEM., 1985, 260, 11430-11435.
- DUSANTER-FOURT I., DJIANE J., KELLY PA., HOUDEBINE LM., TEYS-SOT B.  
Differential biological activities between monovalent and bivalent fragments of anti-prolactin receptor antibodies.  
ENDOCRINOLOGY, 1984, 114, 1021-1027.
- FARID NR., BRIONES URBINA R., ISLAM MN.  
Anti-idiotypic antibodies as probes for hormone receptor interaction.  
CAN. BIOCHEM. CELL. BIOL., 1984, 62, 1255-1267.
- FONTAINE YA.  
Les hormones et l'évolution.  
LA RECHERCHE, 1984, 153, 310-320.
- GERTLER A., ASHKENAZI A., MADAR Z.  
Binding sites of human growth hormone and ovine and bovine prolactins in the mammary gland and the liver of lactating dairy cow. MOL. CELL. ENDOCRINOL., 1984, 34, 51-57.
- HAEUPTLE MT., AUBERT ML., DJIANE J., KRAEHENBUHL JP.  
Binding sites for lactogenic and somatogenic hormones from rabbit mammary gland and liver.  
J. BIOL. CHEM., 1983, 258, 305-314.
- HALDOSEN LA., GUSTAFSSON JA.  
Characterization of hepatic lactogen receptor : subunit composition and hydrodynamic properties.  
J. BIOL. CHEM., 1987, 262, 7404-7411.

- HARO LS., TALAMANTES FJ.  
Interaction of mouse prolactin with mouse hepatic receptors.  
MOL. CELL. ENDOCRINOL., 1985, 41, 93-104.
- HERBERG JT., CODINA J., RICH KA., ROJAS FJ., IYENGAR R.  
The hepatic glucagon receptor. Solubilization, characterization and development of an affinity adsorption assay for the soluble receptor.  
J. BIOL. CHEM., 1984, 259, 9285-9294.
- HERINGTON AC., VEITH NM.  
Solubilization of a growth hormone-specific receptor from rabbit liver.  
ENDOCRINOLOGY, 1977, 101, 984-987.
- HJELMELAND LM.  
A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry : design and synthesis.  
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1980, 77, 6368-6370.
- HOUDEBINE LM., DJIANE J.  
Effects of lysosomotropic agents and of microfilaments and microtubule disrupting drugs on the activation of casein gene expression by prolactin in the mammary gland.  
MOL. CELL. ENDOCRINOL., 1980, 17, 1-15.
- HOUDEBINE LM., TEYSSOT B., DJIANE J., DEVINOY E.  
Le contrôle de l'expression des gènes des protéines du lait par la prolactine, les glucocorticoïdes et la progestérone.  
ANN. ENDOCRINOL., 1982, 43, 354-369.
- HOUDEBINE LM.  
Données récentes sur le mécanisme d'action de la prolactine.  
ANN. ENDOCRINOL., 1983, 44, 85-100.
- HOUDEBINE LM., DJIANE J., DUSANTER-FOURT I., MARTEL P., KELLY PA., DEVINOY E., SERVELY JL.  
Hormonal action controlling mammary activity.  
J. DAILY SCI., 1985, 68, 489-500.
- HUGHES JP., SIMPSON JSA., FRIESEN HG.  
Analysis of growth hormone and lactogenic binding sites cross-linked to iodinated human growth hormone.  
ENDOCRINOLOGY, 1983, 112, 1980-1985.
- HUNTER WM., GREENWOOD FC.  
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.  
NATURE, 1962, 194, 495-496.

- HUNTER T.  
The epidermal growth factor receptor gene and its product.  
NATURE, 1984, 311, 414-416.
- ISLAM MN., PEPPER BM., BRIONES-URBINA R., FARID NR.  
Biological activity of anti-thyrotropin anti-idiotypic antibody.  
EUR. J. IMMUNOL., 1983, 13, 47-53.
- JAFFE RC.  
Hydrodynamic characterization of the Triton X-100 solubilized lactogenic hormone receptor of rat liver.  
BIOCHEMISTRY, 1982, 21, 2936-2939.
- JARETT L.  
Insulin uptake and receptor reutilization.  
FEDERATION PROC., 1983, 42, 2553-2558.
- JERNE NK.  
Towards a network theory of the immune system.  
ANN. IMMUNOL. (Institut Pasteur), 1974, 125C, 373-389.
- KAHN CR., MEDO J., KASUGA M.  
Structure, biosynthesis and phosphorylation of the insulin receptor.  
In : HORMONE RECEPTORS AND RECEPTOR DISEASES. Imura H., Kuzerya J. Eds. EXCERPTA MEDICAL International Congress Series, 1983, 603, p. 3-11.
- KATOH M., DJIANE J., LEBLANC G., KELLY PA.  
Characterization of antisera to a partially purified prolactin receptor : effect on prolactin binding in different target tissues.  
MOL. CELL. ENDOCRINOL., 1984, 34, 191-200.
- KATOH M., DJIANE J., KELLY PA.  
Prolactin-binding components in rabbit mammary gland : characterization by partial purification and affinity labeling.  
ENDOCRINOLOGY, 1985a, 116, 2612-2620.
- KATOH M., DJIANE J., KELLY PA.  
Monoclonal antibodies against rabbit mammary prolactin receptors : specific antibodies to the hormone binding domain.  
J. BIOL. CHEM., 1985b, 260, 11422-11429.
- KATOH M., RAGUET S., ZACHIWIEJA J., DJIANE J., KELLY PA.  
Hepatic prolactin receptors in the rat : characterization using monoclonal antireceptor antibody.  
ENDOCRINOLOGY, 1987, 120, 739-749.
- KELLY PA., BRADLEY C., SHIU RPC.  
Prolactin binding to rat mammary tumor tissue.  
PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 1974, 146, 816-819.

- KELLY PA., POSNER BI., FRIESEN HG.  
Effects of hypophysectomy, ovariectomy and cycloheximide on specific binding sites for lactogenic hormones in rat liver.  
ENDOCRINOLOGY, 1975, 97, 1408-1415.
- KELLY PA., LEBLANC G., DJIANE J.  
Estimation of total prolactin-binding sites after in vitro desaturation.  
ENDOCRINOLOGY, 1979, 104, 1631-1638.
- KELLY PA., DJIANE J., DE LEAN A.  
Prolactin-receptor dissociation and down-regulation.  
PROG. REPROD. BIOL., 1980, 6, 124-136.
- KELLY PA., DJIANE J., KATOH M., FERLAND LH., HOUEBINE LM., TEYSSOT B., DUSANTER-FOURT I.  
The interaction of prolactin with its receptors in target tissues and its mechanism of action.  
REC. PROG. HORM. RES., 1984, 40, 379-437.
- KIM U., FURTH J.  
The role of prolactin in carcinogenesis.  
VITAM. HORM., 1976, 34, 107-136.
- KLEINBERG DL., TODD J.  
Alpha-lactalbumin in human and sub-human primate normal mammary tissue and in human breast cancer as a marker for prolactin activity.  
CANCER RES., 1978, 38, 4318-4322.
- KLEVJER-ANDERSON P., CASE-BUEHRING G.  
Effects of hormones on growth rates of malignant and non-malignant human mammary epithelial in cell culture.  
IN VITRO, 1980, 16, 491-501.
- LAEMMLI UK.  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
NATURE, 1970, 227, 680-685.
- LEROY-MARTIN B., PEYRAT JP., BONNETERRE J., LOUCHEZ MM., DEMAILLE A.  
Prolactin receptor turnover and down-regulation in cultured human breast cancer cells.  
3rd International Congress on Hormones and Cancer, Hambourg, 6-11 Septembre 1987.  
J. STEROID BIOCHEM., 1987, 28, 154S, D-038.

- LEUNG DW., SPENCER SA., CACHIANES G., HAMMONDS RG., COLLINS C., HENZEL WJ., BARNARD R., WATERS MJ., WOOD WI.  
Growth hormone receptor and serum binding protein : purification, cloning and expression.  
NATURE, 1987, 330, 537-543.
- LEWIS UJ., SINGH RNP., LEWIS LJ., SEAVEY BK., SINHA YN.  
Glycosylated ovine prolactin.  
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1984, 81, 385-389.
- LEWIS UJ., SINGH RNP., SINHA YN., VANDERLAAN WP.  
Glycosylated human prolactin.  
ENDOCRINOLOGY, 1985, 116, 359-363.
- LI CH.  
Chemistry of ovine prolactin.  
In : Handbook of physiology. KNOBIL E., SAWYER WH. Eds. American Physiology Society, Washington DC, 1974, Section 74, part 2, 103-110.
- LISCIA DS., ALHADI T., VONDERHAAR BK.  
Solubilization of active prolactin receptors ny a nondenaturing zwitterionic detergent.  
J. BIOL. CHEM., 1982a, 257, 9401-9405.
- LISCIA DS., VONDERHAAR BK.  
Purification of a prolactin receptor.  
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1982b, 79, 5930-5934.
- LOWRY OH., ROSEBROUGH NJ., FARR AL., RANDALL RJ.  
Protein measurement with the Folin phenol reagent.  
J. BIOL. CHEM., 1951, 193, 265-275.
- MALARKEY WB., KENNEDY M., ALLRED LE., MILLO G.  
Physiological concentrations of prolactin can promote the growth of human breast tumor cells in culture.  
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1983, 56, 673-677.
- MANNI A., WRIGHT C., DAVIS G., GLENN J., JOEHL R., FEIL P.  
Promotion by prolactin of the growth of human breast neoplasms cultured in vitro in the soft agar clonogenic assay.  
CANCER RES., 1986, 46, 1669-1672.
- MARASCO WA., BECKER EL.  
Anti-idiotypic antibody against the formyl peptide chemotaxis of the neutrophil.  
J. IMMUNOLOGY, 1982, 128, 963-968.



- MARX JL.  
A new view of receptor action.  
SCIENCE, 1984, 224, 271-274.
- MATUSIK RJ., ROSEN JM.  
Prolactin regulation of casein gene expression : possible mediators.  
ENDOCRINOLOGY, 1980, 106, 252-259.
- MEITES J.  
Relation of prolactin and estrogen to mammary tumorigenesis in the rat.  
J. NAT. CANCER INST., 1972, 48, 1217-1224.
- MEITES J.  
Role of neuro-endocrine system in regulation of mammary tumors in different species.  
ARCH. TOXICOL., 1979, 2, 47-58.
- MEITES J.  
Relation of neuroendocrine system to the development and growth of experimental mammary tumors.  
J. NEUROL. TRANSMISSION, 1980, 48, 25-42.
- MEURIS S., SVOBODA M., CHRISTOPHE J., ROBYN C.  
Evidence for a glycosylated prolactin variant in human pituitary and amniotic fluid.  
In : Prolactin : basic and clinical correlates. McLeod RM., Thorner MO., Scapagnini U. Eds. serum prolactin values in rats. Liviana Press, Padova, 1985, p. 487.
- MITTRA I.  
Somatomedins and proteolytic bioactivation of prolactin and growth hormone.  
CELL., 1984, 38, 347-348.
- MURPHY LJ., MURPHY LL., VRMOVSEK E., SUTHERLAND RL., LAZARUS L.  
Correlation of lactogenic receptor concentration in human breast cancer with estrogen receptor concentration.  
CANCER RES., 1984a, 44, 1963-1968.
- MURPHY LJ., VRHOUSEK E., SUTHERLAND RL., LAZARUS L.  
Growth hormone binding to cultured human breast cancer cells.  
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1984b, 58, 149-156.
- NAGASAWA H., CHEN CL., MEITES J.  
Relation between growth of carcinogen induced mammary cancers and serum prolactin values in rats.  
PROC. SOC. EXP. BIOL., 1973, 142, 625-627.

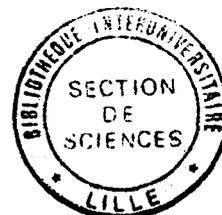


- SHIU RPC., IWASIOU BM.  
Prolactin-inducible proteins in human breast cancer cells.  
J. BIOL. CHEM., 1985, 260, 11307-11313.
- SHORR RGL., HEALD SL., JEFFS PW., LAVIN TN., STROHSACKER MW., LEFKOWITZ RJ., CARON MG.  
The beta-adrenergic receptor : rapid purification and covalent labeling by photoaffinity cross-linking.  
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1982, 79, 2778-2782.
- SIMON WE., PAHNKE VG., HOLZEL F.  
In vitro modulation of prolactin binding to human mammary carcinoma cells by steroid hormones and prolactin.  
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 1985, 60, 1243-1249.
- SIMONDS WF., KOSKI G., STREATY RA., HJELMELAND LM., KLEE WA.  
Solubilisation of active opiate receptors.  
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1980, 77, 4623-4627.
- STRICKER P., GRUETER F.  
Action du lobe antérieur de l'hypophyse sur la montée laiteuse.  
C.R. SOC. BIOL., 1928, 99, 1978-1980.
- STROSBURG AD., COURAUD PO., DURIEU-TRAUTMANN O., DELAVIER-KLUTCHKO C.  
Biochemical and immunochemical analysis of beta-adrenergic receptor adenylate cyclase complexes.  
T.I.P.S., 1982, 3, 282-285.
- THEINTZ GE., NUSSLE D., COX J., CARMIGNAC D., DUHAMEL D., SIZONENKO PC.  
Prolactin and the gut : a controversy.  
J. PEDIATR. GASTROENTEROL. NUTR., 1984, 3, 523-528.
- TOWBIN H., STAHELIN T., GORDON J.  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications.  
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1979, 76, 4350-4354.
- TOPPER UJ., FREEMAN CS.  
Multiple hormone interaction in the developmental biology of the mammary gland.  
PHYSIOL. REV., 1980, 60, 1049-1106.
- TURCOT-LEMAY L., KELLY PA.  
Characterization of estradiol, progesterone and prolactin receptors in nitromethylurea induced mammary tumors and effect of anti-estrogen treatment on the development and growth of these tumors.  
CANCER RES., 1980, 40, 3232-3240.

- NAGASAWA H.  
Prolactin and human breast cancer : a review.  
EUR. J. CANCER, 1979, 15, 267-279.
- NECESSARY PC., HUMPHREY PA., MAHAJAN PB., EBNER KE.  
Purification of rabbit mammary prolactin receptor by acidic elution from a prolactin affinity column.  
J. BIOL. CHEM., 1984, 259, 6942-6946.
- NICOLL CS., BERN HA.  
On the actions of prolactin among the vertebrates : is there a common denominatory.  
In : "Lactogenic Hormones". Wolstenholme GEW., Knight J. Eds. Edinburgh, London, Churchill Livingstone, 1972, pp. 299-317.
- PANKOV YA., BUTNEV VY.  
Multiple forms of pituitary prolactin, a glycosylated form of porcine prolactin with enhanced biological activity.  
INT. J. PEPTIDE PROTEIN RES., 1986, 28, 113-123.
- PARKE L., FORSYTH IA.  
Assay of lactogenic hormones using receptor isolated from rabbit liver.  
ENDOCR. RES. COMMUN., 1975, 2, 137-149.
- PEYRAT JP., DEWAILLY D., DJIANE J., KELLY PA., VANDEWALLE B., BONNETERRE J., LEFEBVRE J.  
Total prolactin binding sites in human breast cancer biopsies.  
BREAST CANCER RES. TREAT., 1981, 1, 369-373.
- PEYRAT JP., DJIANE J., KELLY PA., VANDEWALLE B., BONNETERRE J., DEMAILLE A.  
Characterization of prolactin receptors in human breast cancer.  
BREAST CANCER RES. TREAT., 1984a, 4, 275-281.
- PEYRAT JP., DJIANE J., BONNETERRE J.  
Stimulation of DNA synthesis by prolactin in human breast tumor explants. Relation to prolactin receptors.  
ANTICANCER RES., 1984b, 257-262.
- PEYRAT JP., VENNIN Ph., BONNETERRE J., HECQUET B., VANDEWALLE B., KELLY PA., DJIANE J.  
Effect of bromocriptin treatment on prolactin and steroid receptor levels in human breast cancer.  
EUR. J. CANCER CLIN. ONCOL., 1984c, 20, 1363-1367.

- PEYRAT JP.  
La réceptivité aux hormones polypeptidiques en situation physiologique et en pathologie tumorale.  
Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Lille I.
- 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.
- PEYRAT JP., BONNETERRE J., LAURENT JC., LOUCHEZ MM., AMRANI S., LEROY-MARTIN B., VILAIN MO., DELOBELLE A., DEMAILLE A.  
Presence and characterization of insulin-like growth factor I receptors in human benign breast disease.  
EUR. J. CANCER CLIN. ONC. (in press).
- POSNER BI., KELLY PA., SHIU RPC., FRIESEN HG.  
Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding : tissue distribution, species variation and characterization.  
ENDOCRINOLOGY, 1974, 95, 521-531.
- POSNER BI., JOSEFSBERG Z., BERGERON JM.  
Intracellular polypeptide hormone receptors : characterization and induction of lactogen receptors in the Golgi apparatus of rat liver.  
J. BIOL. CHEM., 1979, 254, 12494-12499.
- POSNER BI., KHAN NM., BERGERON JM.  
Endocytosis of peptide hormones and other ligands.  
ENDOCRINE REV., 1982, 3, 280-297.
- RAE-VENTER B., DAO TL.  
Hydrodynamic properties of rat hepatic prolactin receptors.  
ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS., 1983, 222, 12-21.
- RUSSELL DH., MATRISIAN L., KIBLER R., LARSON DF., POULOS B., MAGUN BE.  
Prolactin receptors on human lymphocytes and their modulation by cyclosporine.  
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM., 1984, 121, 899-906.
- RUSSELL DH., KIBLER R., MATRISIAN L., LARSON DF., POULOS B., MAGUN BE.  
Prolactin receptors on human T and B lymphocytes : antagonism of prolactin binding by cyclosporine.  
J. IMMUNOL., 1985, 134, 3027-3031.

- SAKAI J., KATOH M., BERTHON P., KELLY PA.  
Characterization of prolactin receptors in pig mammary gland.  
BIOCHEM. J., 1985, 224, 911-922.
- SCATCHARD G.  
The attraction of proteins for small molecules and ions.  
ANN. N.Y. ACAD. SCI., 1949, 51, 660-672.
- SCHECHTER Y., MARON R., ELIAS D., COHEN IR.  
Auto-antibodies to insulin receptor spontaneously develop as anti-idiotypes in mice immunized with insulin.  
SCIENCE, 1982, 216, 542-545.
- SCHREIBER AB., COURAUD PO., ANDRE C., VRAY B., STROSBERG AD.  
Anti-alprenolol anti-idiotypic antibodies bind to beta-adrenergic receptors and modulate catecholamine-sensitive adenylate cyclase.  
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1980, 77, 7385-7389.
- SEGE K., PETERSON PA.  
Use of anti-idiotypic antibodies as cell-surface receptor probes.  
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1978, 75, 2443-2447.
- SERVELY JL., TEYSSOT B., HOUDEBINE LM., DELOUIS C., DJIANE J.  
Evidence that the activation of casein gene expression in the rabbit mammary gland can be elicited by a low amount of prolactin firmly retained on its receptors.  
BIOCHIMIE, 1982, 64, 133-140.
- SHIU RPC., FRIESEN HG.  
Solubilization and purification of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland.  
J. BIOL. CHEM., 1974a, 249, 7902-7911.
- SHIU RPC., FRIESEN HG.  
Properties of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland.  
BIOCHEM. J., 1974b, 140, 301-311.
- SHIU RPC.  
Prolactin receptors in human breast cancer cells in long-term tissue culture.  
CANCER RES., 1979, 39, 4381-4386.
- SHIU RPC., FRIESEN HG.  
Mechanism of action of prolactin in the control of mammary gland function.  
ANN. REV. PHYSIOL., 1980, 42, 83-96.



- TURKINGTON RW.  
Prolactin receptors in mammary carcinoma cells.  
CANCER RES., 1974, 34, 758-763.
- VAN DER GUGTEN AA., WATERS MJ., MURTHY GS., FRIESEN HG.  
Studies on the irreversible nature of prolactin binding to receptors.  
ENDOCRINOLOGY, 1980, 106, 402-411.
- WASSERMANN NH., PENN AS., FREIMUTH PI., TREPTOW N., WENTZEL S., CLEVELAND WL., ERLANGER BF.  
Anti-idiotypic route to anti-acetylcholine receptor antibodies and experimental myasthenia gravis.  
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1982, 79, 4810-4814.
- WELSH CW.  
Interaction of estrogen and prolactin in spontaneous mammary tumorigenesis of the mouse.  
J. TOXICOL. ENVIRONMENTAL HEALTH, 1976, 1, 161-175.
- WELSCH CW., NAGASAWA M.  
Prolactin and murine mammary tumorigenesis : a review.  
CANCER RES., 1977, 37, 951-963.
- YMER SI., HERINGTON AC.  
Water-soluble hepatic growth hormone receptors : structural studies using gel chromatography and chemical cross-linking.  
ENDOCRINOLOGY, 1984, 114, 1732-1739.