

## ETUDE DES CONSTANTES DE LIAISON ENTRE LES OESTROGENES ET L' $\alpha_1$ -FOETOPROTEINE DE RAT

L. SAVU, O. CREPY, M.A. GUERIN, E. NUNEZ, F. ENGELMANN,  
C. BENASSAYAG et M.F. JAYLE

*Laboratoire de Biochimie médicale (Laboratoire Associé no. 87 du CNRS),  
U.E.R. des Saints-Pères, 45 rue des Saints-Pères, 75-Paris-6ème, France*

Received 22 February 1972

The binding constants of the  $\alpha_1$ -foetoprotein of the rat embryo serum for oestrone and oestradiol-17 $\beta$  have similar values, i.e.  $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  in average at 25°. There is probably one binding site per mole of binding protein. The high  $\alpha_1$ -foetoprotein concentration in the rat embryo serum at 17–19 days of pregnancy explains the exceptionally high levels of fixation of the phenolsteroids by this serum.

### 1. Introduction

Nous avons montré que les embryons de rats et les rats nouveau-nés contiennent une (ou des) protéine(s) sérique(s) ayant une très grande affinité pour l'oestrone et pour l'oestradiol-17 $\beta$  et ne liant pas la testostérone [1, 2]. Cette affinité pour les oestrogènes diminue avec l'âge de l'animal pour disparaître au-delà du 25ème jour. Après fractionnement, nous avons localisé l'activité de liaison au niveau de l' $\alpha_1$ -foetoprotéine [3], identification qui vient d'être récemment confirmée par une méthode immunologique [4].

Nous nous proposons ici de mesurer comparativement les constantes d'association et la concentration des sites caractérisant la fixation de l'oestrone et celle de l'oestradiol-17 $\beta$  avec la (ou les) protéine(s) de liaison du sérum d'embryon de rat.

### 2. Matériel et méthodes

Les ratten Charles Rivers, souche C.D., à 17, 19 et 20 jours de gestation sont saignées par ponction cardiaque après anesthésie à l'éther. Les embryons sont prélevés et lavés dans le sérum physiologique, leur sang est aspiré avec une pipette Pasteur après décapitation et ponction cardiaque. Le sérum est récupéré

après rétractation et centrifugation; les "pools" des sérum correspondant à 20–25 embryons de chaque âge, sont conservés à -20°. Pour comparaison, des sérum sont également obtenus à partir de jeunes ratten âgées de 5 jours.

#### 2.1. Stéroïdes

Oestrone 6-7<sup>3</sup>H C.E.A. 27,5 Ci/mM;  
oestradiol-17 $\beta$ -6-7<sup>3</sup>H C.E.A. 44 Ci/mM;  
oestradiol-17 $\beta$ -6-7<sup>3</sup>H New England Nuclear 55 Ci/mM  
oestrone pure cristallisée Roussel-Uclaf;  
oestradiol-17 $\beta$  pur cristallisé Roussel-Uclaf,  
La pureté des stéroïdes est vérifiée par chromatographie en couche mince sur gel de silice dans plusieurs systèmes de solvants [5].

#### 2.2. Dosage

Des protéines sériques par la méthode de Lowry [6].

#### 2.3. Mesure de la liaison des stéroïdes par le sérum

Nous appliquons la technique de Pearlman et Crepy [7] basée sur le principe de la dialyse à l'équilibre et utilisant le Sephadex G-25 en une série de tubes séparés. Cette méthode permet de déterminer le pourcentage de stéroïdes liés aux protéines sériques dans le volume de la solution tampon externe au Sephadex (Sb) connaissant le coefficient de partage

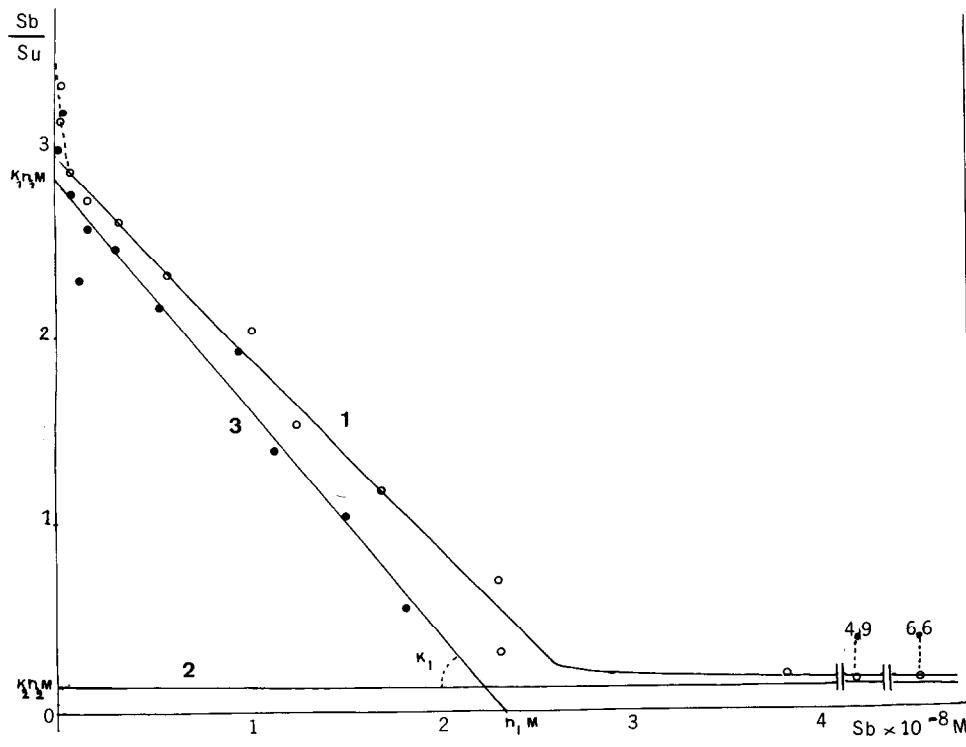


Fig. 1. Liaison entre l'oestrone et le sérum d'embryon de rat âgé de 19 jours. 9 mg protéine sériques/ml. Dilution au 1/100<sup>e</sup>. Représentation selon H.E. Rosenthal. Courbe 1: Points expérimentaux; Courbe 2: liaison à l'albumine; Courbe 3: corrigée d'après Rosenthal et correspondant à l' $\alpha_1$ -foetoprotéine; Courbe en pointillé: existence possible d'une deuxième protéine de liaison (cf. texte).  $K_1 = 1.35 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ;  $n_1 M_1 2.35 \times 10^{-8}/\text{l}$  dans le volume externe.

du stéroïde libre (Su) entre le volume externe et le volume interne.

Dans notre cas, nous maintenons la quantité de protéines constante (en général 0,2 ml de sérum dilué au 1/100<sup>e</sup> par tube), et nous faisons varier la quantité de stéroïdes, ce qui nous permet d'étudier la variation du rapport: stéroïde lié/stéroïde libre (Sb/Su) en fonction des quantités de stéroïdes ajoutées.

Dans chaque expérience, l'intervalle des concentrations de stéroïde libre et lié (Sb + Su), retrouvées dans le volume externe, se situe entre  $0,004 \text{ M/l } 10^{-8}$  et  $50 \text{ M/l } 10^{-8}$ . Pour les concentrations les plus faibles, nous utilisons uniquement les solutions de stéroïdes radioactifs (entre 0,025 et 0,5 ng par tube) et pour les concentrations les plus élevées, nous ajoutons à une quantité fixe de stéroïde tritié (0,5 ng) des quantités croissantes de stéroïde non radioactif (entre 0,5 et 500 ng).

Les mesures sont effectuées à 25° dans un tampon phosphate 0,15 M, pH 7,4.

#### 2.4. Les paramètres de liaison

Les paramètres de liaison sont calculés: pour chaque dosage, à l'aide de trois méthodes graphiques:

- La méthode de Scatchard, modifiée par Rosenthal, basée sur la représentation de Sb/Su en fonction de Sb [8].
- La méthode de Baulieu et Raynaud, où l'on étudie le  $\log \cdot Sb$  en fonction du  $\log \cdot Su$  [9].
- La méthode de Baulieu et Raynaud, où l'on étudie le  $\log \cdot$  du pourcentage de Su et respectivement le  $\log \cdot$  du pourcentage de Sb en fonction du  $\log \cdot (Sb + Su)$  [10].

A titre d'exemple, nous présentons deux courbes de l'une des expériences effectuées avec l'oestrone sur un pool de sérums d'embryons de 19 jours

Tableau 1

Constantes d'association ( $K_1$ ) et produits du nombre de sites de liaison par le nombre de moles d' $\alpha_1$ -foetoprotéine ( $n_1 M_1$ ) rapportés au gramme de protéines sériques.

N° Lot	Sérum	Oestradiol-17 $\beta$		Oestrone	
		$K_1 10^8 M^{-1}$	$n_1 M_1 10^{-6}/g$	$K_1 10^8 M^{-1}$	$n_1 M_1 10^{-6}/g$
a) <sub>1</sub>	Embryons 17 jours	0.55 ± 0.05	2.55 ± 0.01	{ 1.4 ± 0.3 0.6 ± 0.05	1.75 ± 0.25 2.0 ± 0.05
a) <sub>2</sub>	Embryons 19 jours	0.53 ± 0.07	2.6 ± 0.3	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.2
b) <sub>3</sub>	Embryons 20 jours	1.83 ± 0.01	0.65 ± 0.03		
b) <sub>4</sub>	Embryons 20 jours	0.75 ± 0.05	1.6 ± 0.02		
b) <sub>5</sub>	Ratte 5 j.	1.75 ± 0.05	0.20 ± 0.02		

a) Oestradiol-17 $\beta$  ou oestrone NEN Scintillateur Intertechnique

b) Oestradiol-17 $\beta$  CEA Scintillateur Nuclear Chicago

Les chiffres représentent la moyenne des résultats calculés dans chaque expérience par les trois procédés cités dans le texte.

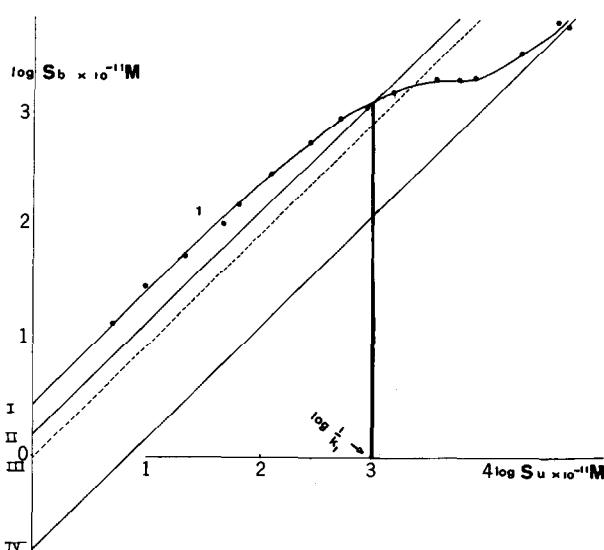


Fig. 2. Même expérience que celle de la fig. 1. Représentation selon E. Baulieu et Raynaud. Courbe 1: points expérimentaux; Courbe I:  $\log (K_1 n_1 M_1 + K_2 n_2 M_2)$ ; Courbe II:  $\log (K_1 n_1 M_1/2 + K_2 n_2 M_2)$ ; Courbe III: bissectrice; Courbe IV:  $\log K_2 n_2 M_2 \cdot \log 1/K_1 = 2.96$ ;  $K_1 = 1.1 \times 10^8 M^{-1}$ ;  $n_1 M_1 = 2.47 \times 10^{-8}/l$  dans le volume externe.

(fig. 1 et 2). L'ensemble des résultats obtenus avec l'oestradiol-17 $\beta$  et l'oestrone sur les différents sérum est présenté dans le tableau 1.

### 3. Résultats et discussion

Les constantes d'association, pour les deux stéroïdes phénoliques sont de l'ordre de  $1 \times 10^8 M^{-1}$ . Les légères différences constatées peuvent dépendre de certaines variations des conditions expérimentales (cf. tableau 1), des limites de précision des méthodes ainsi que de variations entre les sérum utilisés. Notons que dans plusieurs expériences, les points expérimentaux correspondant aux concentrations très basses de stéroïde (inférieures à 0,5 ng par tube) suggèrent la présence d'une protéine dont l'affinité pour les oestrogènes serait encore plus élevée mais dont la concentration serait très faible. Ces points n'apparaissent nettement que dans les représentations de Scatchard, les graphiques logarithmiques de Baulieu et Raynaud atténuant les écarts qui se prêtent à une telle interprétation. La liaison à l'albumine est dans tous les cas très faible, surtout pour l'oestradiol-17 $\beta$ .

Le produit  $n_1 M_1$  ( $n_1$  étant le nombre des sites par mole de protéine liante et  $M_1$  le nombre de mole de cette protéine) rapporté au gramme de protéines

sériques totales est de l'ordre de  $2 \times 10^{-6}$  ( $1,7 \pm 0,9$ ). Dans un seul cas, nous trouvons une valeur plus faible ( $0,65 \times 10^{-6}$ , avec l'oestradiol- $17\beta$  et un pool de sérum d'embryons de 20 jours). Le poids moléculaire de l' $\alpha_1$ -foetoprotéine étant de 64.800 [11] et sa proportion dans les protéines sériques totales, d'environ 17% à 19 jours [12], on peut calculer le nombre moyen de sites par mole de protéine liante, soit  $0,9 \pm 0,1$ . Tout porte donc à croire qu'il existe un seul site par mole, comme c'est le cas par exemple pour la trans cortine humaine et celle de rat. Les constantes d'association sont également du même ordre de grandeur [13]. C'est la concentration très élevée de l' $\alpha_1$ -foetoprotéine qui explique la fixation exceptionnellement importante des oestrogènes par le sérum de l'embryon de rat.

Pour le sérum de la ratte de 5 jours, il n'y a pas de variation significative de la constante d'association mais le produit  $n_1 M_1$  est nettement moins élevée, ce qui correspond bien à la diminution de la synthèse de l' $\alpha_1$ -foetoprotéine après la naissance.

En conclusion, les données que nous présentons ici indiquent que l'oestrone et l'oestradiol- $17\beta$  ont une constante d'association élevée pour l' $\alpha_1$ -foetoprotéine; il n'existe qu'un site de liaison par mole de protéine; la concentration de la protéine liante, rapportée au gramme de protéines de sérum embryonnaire, est exceptionnellement élevée.

Ces résultats posent le problème de la signification physiologique de la liaison  $\alpha_1$ -foetoprotéine-oestrogènes sur le plan de la régulation hormonale dans l'organisme foetal ou de sa protection vis-à-vis des oestrogènes d'origine placentaire.

### Bibliographie

- [1] E. Nunez, F. Engelmann, C. Benassayag, L. Savu, O. Crepy et M.F. Jayle, *Comp. Rend.* 272 (1971) 2196.
- [2] E. Nunez, L. Savu, F. Engelmann, C. Benassayag, O. Crepy et M.F. Jayle, *Comp. Rend.* 273 (1971) 242.
- [3] E. Nunez, F. Engelmann, C. Benassayag et M.F. Jayle, *Comp. Rend.* 273 (1971) 831.
- [4] J. Uriel, communication personnelle.
- [5] B.P. Lisboa et E. Diczfalussy, *Acta Endocrinol.* 40 (1962) 60.
- [6] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr et R.Y. Randall, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265.
- [7] W.H. Pearlman et O. Crepy, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 182.
- [8] H.E. Rosenthal, *Anal. Biochem.* 20 (1967) 525.
- [9] E.E. Baulieu, J.P. Raynaud, in: *Prog. Biochem. Pharmacol.* Vol. 5 (Karger, Basel, New York, 1969) p.46.
- [10] E.E. Baulieu et J.P. Raynaud, *European J. Biochem.* 13 (1970) 293.
- [11] J.A.W. Kirsh, R.W. Wise et I.J. Olivier, *Biochem. J.* 102 (1967) 763.
- [12] B. de Nechaud et J. Uriel, *Intern. J. Cancer* 8 (1971) 71.
- [13] U. Westphal, in: *Steroid-Protein Interactions* (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1971) p. 348.