

RAPPORT PRELIMINAIRE D'UNE ETUDE COMPARATIVE DES CONCENTRATIONS EN RECEPTEURS STEROIDIENS DE TISSUS PROSTATIQUES ADENOMATEUX ET CANCEREUX

M. C. RIO et M. OFFNER

Laboratoire de Biochimie Medical (P. Chambon) Pavillon Poincare, 67005 Strasbourg Cedex France

(Reçu 18 avril 1981)

SUMMARY

In this preliminary study, we have determined the receptors in normal human prostatic tissue or from patients with benign prostatic hypertrophy and patients with prostatic cancer. A single point assay using a dextran-coated-charcoal treatment of cytosol is utilized. This method permits the elimination of aliquots necessary for multiple steroid receptor analyses. The results are discussed in the light of several problems inherent to this assay. We conclude that adenoma-tissue contains more receptors than neoplastic tissues for the progesterone receptors but that there is no significant difference for the estrogen-receptor and the androgen-receptors. For all the adenoma tissues and some neoplastic tissues the level of the estrogen-receptors is always lower than the one for androgen-receptor which itself is lower than the one for progesterone-receptors. We think that the expression of the results as a ratio of two levels of steroid-receptors gives a better evaluation of the receptors. The ratios Progesterone-receptor/Estrogen-receptor and Androgen-receptor/Estrogen-receptor are always greater than 1.5, except for some neoplastic tissues and we think that, as in breast tumors, there are perhaps two kinds of neoplastic tissues, one hormone-dependent, the other not.

INTRODUCTION

Le caractère déterminant des récepteurs cytosoliques aux oestrogènes et à la progestérone a été largement démontré en ce qui concerne le pronostic et l'éventuel traitement hormonal dans le cancer du sein [1-4]. On peut penser que, de même, le dosage des récepteurs des androgènes sera discriminant dans les cas d'adénomes et de carcinomes prostatiques. De nombreux problèmes retardent la mise au point d'une véritable technique de routine et empêchent d'établir, avec certitude, des corrélations entre les taux en récepteurs hormonaux et les différentes affections atteignant la prostate: quantité de tissus disponible à doser parfois faible, taux normaux en récepteurs inconnus, présence de protéines circulantes liant les hormones de façon non spécifiques [5], concentration en hormones endogènes très importante dans le tissu prostatique [6-8].

Nous avons entrepris d'étudier les récepteurs cytosoliques aux androgènes auxquels nous avons ajouté, en raison de leur rôle dans la thérapeutique des cancers prostatiques, l'étude de récepteurs cytosoliques aux oestrogènes. Nous avons pensé que, comme dans le sein et l'endomètre [9, 10], les récepteurs aux oestrogènes pourraient induire la synthèse de récepteurs à la progestérone dans le tissu prostatique. C'est pourquoi nous avons également dosé les récepteurs cytosoliques à la progestérone. Nous avons pallié le manque de matériel tissulaire en ne prenant en con-

sidération qu'un seul dosage fait en triple exemplaires pour une concentration saturante en hormone radioactive. Nous n'avons pu effectuer qu'une seule série de mesure concernant une prostate saine provenant d'un sujet de 39 ans. L'emploi d'hormones de synthèse radioactives ou non, moxestrol, promégestone et méthyltrienolone remplaçant respectivement l'oestradiol-17 β , la progestérone et la dihydrotestostérone, permet de réduire en grande partie le problème des liaisons non spécifiques.

En effet, ces hormones se lient avec une grande affinité aux récepteurs cytosoliques leur correspondant et contrairement à l'hormone physiologique, ne se lient pas aux protéines circulantes [11, 12]. Au moment du prélèvement, les malades sont souvent en cours de traitement, ce qui augmente encore l'imprégnation hormonale des tissus prostatiques. Certains auteurs observent une compétition entre le diéthylstilbestrol pris par le malade et le moxestrol marqué lors des dosages des récepteurs cytosoliques des oestrogènes [13]. La dilution des hormones radioactives par les hormones endogènes entraîne donc une estimation erronée du nombre des récepteurs cytosoliques [14-15]. Pour cette raison, nous avons traité les cytosols par incubation en présence de charbon dextran avant de doser les récepteurs [16]. Nous avons, par la suite, comparé les concentrations en récepteurs aux oestrogènes, à la progestérone et aux androgènes dans les cas d'adénomes et de carcinomes.

MATERIEL ET METHODES

(a) *Steroides*

Méthyltriénonolone R 1881 (17 β -hydroxyl-17 α -méthyl-4,9,11-oestra-trien-3-one), R 1881[6,7³H], A.S. 87 Ci/mmol; Promégestone R 5020 (17 α ,21-diméthyl-19-nor-4,9-pregnadiene-3,20-dione), R 5020[6,7³H], A.S. 87 Ci/mmol; Moxestrol R 2858 (11 β Méthoxy-17 α -éthynyl-estradiol), R 2858[6,7³H], A.S. 90 Ci/mmol.

Toutes des hormones proviennent de New England Nuclear.

(b) *Tissus*

Ils proviennent de patients âgés de 57 à 84 ans et présentant un adénome ou un carcinome prostatique. Dix échantillons sont obtenus par résection transurétral et cinq par exérèse. Le matériel à doser est adressé au laboratoire par le chirurgien qui choisit des lamelles épaisses, moins altérées par la chaleur. L'autre partie du matériel de résection est envoyé en anatomie-pathologie. Dans les cas d'exérèse, on prélève une section centrale de la prostate. Une moitié est envoyée pour analyse histologique, l'autre nous servira aux dosages des récepteurs au laboratoire. Les tissus sont rapidement congelés dans de l'azote liquide, au maximum une demi-heure après le prélèvement. Ils sont ensuite stockés à -20°C jusqu'au dosage effectué au plus tard un mois après le prélèvement. Nous n'avons pas observé de différence significative du nombre de récepteurs pour un même tissu, entre la conservation à -70°C et à -20°C pendant un mois. L'examen histologique confirme le diagnostic sans toutefois préciser, dans le cas de cancer, le stade de la maladie. Il permet aussi de savoir s'il existe des lamelles non atteintes par l'affection et qualitativement, dans quelle proportion.

(c) *Préparation du cytosol*

Les manipulations faites en vue de l'obtention du cytosol sont effectuées à une température inférieure à 4°C. Les tissus (100 à 500 mg) sont pulvérisés à l'aide d'un thermovac et homogénéisés au potter de verre dans 1/3 (p/v) de tampon tris pH 7,4 (Tris (Hydroxyméthyl)-aminométhane 5 mM; Ethylène-diamine-tétra-acétique acid 1 mM; Dithioérythreitol 0,1 mM; Glycérol 10%). Après ultra-centrifugation à 100 000 *g* pendant 60 min, on obtient la fraction cytosolique correspondant au surnageant. Celle-ci est diluée au 1/5 (v/v) avec une solution de charbon dextran (Dextran T 70 0,5%; charcoal 5%) et incubée pendant 30 mn à 4°C, puis centrifugé à 5000 *g* pendant 10 min.

Le dosage des récepteurs cytosoliques est effectué sur le surnageant ainsi obtenu.

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry *et al.*[17] avec, pour standard, l'albumine du sérum de boeuf. Les concentrations sont ajustées si nécessaire à 1-1,5 mg/ml avec du tampon tris.

(d) *Dosages des recepteurs cytosoliques*

Le protocole est le même pour les récepteurs aux

androgènes, aux oestrogènes et à la progestérone. Une aliquote du cytosol (100 μ l) est mise à incuber toute une nuit à 4°C en présence d'une part, de 100 μ l d'une solution $5 \cdot 10^{-9}$ M d'hormone radioactive (liaisons spécifiques + liaisons non spécifiques), d'autre part, de 100 μ l d'une solution $5 \cdot 10^{-9}$ M d'hormones radioactives et d'un excès (100 \times) d'hormone froide (liaisons non spécifiques). Chaque essai est effectué en triple exemplaire. La fraction d'hormone radioactive restée libre est séparée de celle liée aux récepteurs par incubation avec 500 μ l de charbon dextran (Dextran T 70 0,1%; charbon 0,5%) 10 min à 4°C, suivi d'une centrifugation à 5000 *g* pendant 10 min et à 4°C. Une aliquote (500 μ l) du surnageant est dosée dans 5 ml de liquide de scintillation, sur 1 min. En cas d'exérèse, la quantité de matériel étant plus importante, on effectue parallèlement, une analyse en dix points de concentration croissante en hormone marquée ($0,15 \cdot 10^{-9}$ M à $9,2 \cdot 10^{-9}$ M). Les résultats sont obtenus par la méthode de Scatchard[18] corrigée par Chamnes et McGuire[19] et par celle des inverses de Lineweaver et Burck[20] modifiée par Karr *et al.*[21].

Ces méthodes permettent d'établir aisément la constante de dissociation (K_D) ainsi que la concentration maximale en récepteur (B_{max}). Cependant, comme le décrivent certains auteurs [22], en présence d'un ou de plusieurs points aberrants, ces valeurs peuvent être plus ou moins erronées. L'erreur est plus importante pour de faibles concentrations en hormone marquée ou pour des tissus à faible teneur en récepteurs. L'emploi d'un calculateur préconisé de plus en plus [23-25] doit permettre d'éliminer ces points si nécessaire et de façon non arbitraire. Pour notre part, nous n'utilisons pas de programmeur. Tous les résultats rapportés dans ce manuscrit sont ceux obtenus pour une seule concentration en hormone radioactive à $5 \cdot 10^{-9}$ M, les méthodes en plusieurs points servant à établir le K_D et à comparer la valeur du B_{max} avec la concentration en récepteur obtenue par la méthode en un point.

(e) *Methode statistique*

Comme nous ne disposons que d'un échantillon d'effectif très réduit, nous ne pouvons pas en tester la normalité. Par conséquent, nous avons utilisé pour les comparaisons des valeurs, un test non paramétrique. Nous avons choisi le test de Mann-Whitney, tel que le décrit Siegel[26], parce qu'il est relativement puissant et parce qu'il donne la probabilité exacte du risque.

RESULTATS

Les résultats concernent les récepteurs aux oestrogènes, à la progestérone ainsi qu'aux androgènes. Pour plus de commodité, nous utilisons respectivement les abréviations suivantes: R-M (M = Moxestrol R 2858), R-P (P = Promégestone R 5020), R-MT (MT = Méthyltriénonolone R 1881).

Tableau 1. Nombre de récepteurs aux oestrogènes (R-M), à la progestérone (R-P) et aux androgènes (R-MT) dosés avant et après traitement du cytosol au charbon dextran pour quatre tissus prostatiques différents

	R-M				R-P				R-MT			
-DCC	4	5	2	2	12	19	13	12	10	19	10	7
+DCC	96	41	32	38	87	87	50	108	45	103	78	51

Résultats exprimés en fmol/mg prot

(a) Validité du traitement du cytosol par le charbon dextran (D.C.C.)

Nous avons affectué sur quatre cytosols différents, les dosages des récepteurs avant et après traitement au charbon dextran. Les valeurs obtenus (Tableau 1) montrent l'augmentation du nombre de récepteurs accessibles au dosage après incubation au D.C.C. Ceci est en accord avec la forte imprégnation hormonale existante dans les tissus prostatiques [7-14] et le peu de récepteurs libres dans la fraction cytosolique [27-28].

L'augmentation du temps d'incubation ne permet pas de doser un plus grand nombre de récepteurs. Nous pensons doser ainsi la fraction libre et une grande partie de la fraction liée des récepteurs ou, peut être, comme l'ont décrit certains auteurs, la totalité des récepteurs [16-27].

(b) Validité de la méthode en un point

Nous avons corrélé pour 10 cytosols les résultats obtenus en un seul dosage avec incubation par une concentration saturante en hormone radioactive et ceux obtenus par Lineweaver. Les équations des droites de régression pour lesquelles X représente les valeurs définies par Lineweaver et Y celles en un seul point sont les suivantes:

Pour les androgènes: $Y = 0,81 X + 11,31$; $r^2 = 0,98$
(Méthyltrienolone)

Pour les oestrogènes: $Y = 0,77 X + 1,44$; $r^2 = 0,81$
(Moxestrol)

Pour la progestérone: $Y = 0,92 X + 10,70$; $r^2 = 0,93$
(Promégestone)

Les différentes constantes de dissociation sont de $2 \cdot 10^{-9}$ M pour le Moxestrol $0,8 \cdot 10^{-9}$ M pour la promégestone et de $1,8 \cdot 10^{-9}$ M pour la méthyltrienolone. Elles correspondent à celles trouvées par certains auteurs [24].

(c) Spécificité des sites de liaisons

Elle est étudiée par compétition avec les différents stéroïdes utilisés (Tableau 2). On voit que pour un excès de compétiteur de 200 fois, P et MT n'ont qu'une faible affinité pour les liaisons spécifiques R-M. Les liaisons R-P sont elles aussi peu affectées par la compétition de M, MT peut cependant déplacer 36% des liaisons de grande affinité R-P. Enfin, pour les liaisons spécifiques R-MT, alors que M n'a que peu d'affinité pour ce récepteur, P montre

une grande affinité puisqu'il déplace 82% des liaisons R-MT. Ceci est en accord avec les études faites par de nombreux auteurs et qui décrivent la dualité de la Méthyltrienolone qui se lie aux récepteurs aux androgènes, mais aussi à ceux de la progestérone [27, 29-32].

(d) Liaison de R 1881, R 5020 et R 2858 par les récepteurs cytosoliques de prostatites adénomateuses et cancéreuses

Les concentrations cytosoliques en récepteurs aux androgènes, aux oestrogènes et à la progestérone exprimés en fmol/mg prot, sont reportés sur le Tableau 3, ainsi que les rapports (R-P)/(R-M) et (R-MT)/(R-M).

Nous avons réévalués sur le Tableau 4, les valeurs médianes et les valeurs extrêmes ainsi que la valeur P , issue du test de Mann-Whitney, obtenues pour chacun des récepteurs hormonaux étudiés dans les adénomes et les épithéliomas.

Nous observons (Tableau 3) que les taux en récepteurs à la progestérone sont élevés dans le cas des adénomes. Comme de Vogt [9], nous trouvons toujours, dans les cas d'adénomes, des taux de R-MT supérieurs à ceux de R-M. L'analyse statistique montre que les taux de récepteurs à la progestérone sont plus élevés dans les tissus adénomateux (Tableau 4). La différence entre les rapports (R-P)/(R-M) des tissus cancéreux et adénomateux est significative au seuil de 2% et, entre les rapports (R-MT)/(R-M), elle est significative au seuil de 4%. Les taux de récepteurs

Tableau 2. Une aliquote de cytosol (100 μ l) est incubée avec une solution $5 \cdot 10^{-9}$ M d'hormone radioactive, une nuit à 4°C. Hormones liées et libres sont séparées par la méthode au charbon dextran. Les incubations sont faites en absence (contrôle) ou en présence d'un excès de 200 fois de compétiteur. Après correction pour les liaisons non spécifiques, les liaisons spécifiques sont calculées comme la quantité de récepteurs liés au radioligand en présence de compétiteur et exprimé en pourcentage des liaisons du contrôle.

Liaisons spécifiques (% du contrôle)			
Compétiteur	R-M	R-P	R-MT
Moxestrol	0	85,6	77,3
Promégestone	74,5	0	18,2
Méthyltrienolone	85,0	63,8	0

Tableau 3. Concentrations en récepteurs aux oestrogènes (R-M), à la progestérone (R-P) et aux androgènes (R-MT) des différents tissus étudiés et rapports entre les différentes valeurs

Age du malade	Obtention de l'échantillon	Nature du tissu	R-M (fmol/mg prot.)	R-P (fmol/mg prot.)	R-MT (fmol/mg prot.)	R-M/R-P/R-MT	R-P $\frac{R-P}{R-M}$	R-MT $\frac{R-MT}{R-M}$
39 ans	Exérèse	Normale	81	348	95	R-M < R-MT < R-P	4,30	1,17
62 ans	Exérèse	Adénome	69	271	126	R-M < R-MT < R-P	3,93	1,83
76 ans	Réséction	Adénome	41	135	110	R-M < R-MT < R-P	3,29	2,68
75 ans	Réséction	Adénome	287	1149	459	R-M < R-MT < R-P	4,00	1,60
74 ans	Exérèse	Adénome	61	678	64	R-M < R-MT < R-P	11,11	1,05
62 ans	Exérèse	Adénome	75	248	124	R-M < R-MT < R-P	3,31	1,65
83 ans	Réséction	Adénome	27	179	115	R-M < R-MT < R-P	6,63	4,26
65 ans	Exérèse	Adénome	32	123	73	R-M < R-MT < R-P	3,84	2,28
84 ans	Réséction	Epithélioma	100	246	183	R-M < R-MT < R-P	2,46	1,83
57 ans	Exérèse	Epithélioma	69	114	87	R-M < R-MT < R-P	1,65	1,26
58 ans	Réséction	Epithélioma	65	273	162	R-M < R-MT < R-P	4,20	2,49
61 ans	Réséction	Epithélioma	91	244	153	R-M < R-MT < R-P	2,68	1,68
74 ans	Réséction	Epithélioma	28	157	22	R-MT < E-M < R-P	5,61	0,79
77 ans	Réséction	Epithélioma	127	166	100	R-MT < R-M < R-P	1,31	0,79
61 ans	Réséction	Epithélioma	70	107	54	R-MT < R-M < R-P	1,53	0,77
67 ans	Réséction	Epithélioma	257	94	129	R-P < R-MT < R-M	0,37	0,50

Résultats obtenus pour une seule concentration en hormone radioactive ($5 \cdot 10^{-9}$ M).

Tableau 4. Valeurs extrêmes et médianes pour les différents récepteurs dans le cas de tissus adénomateux et cancéreux et valeurs de *P* calculées par le test de Mann-Whitney

		Medianes (fmol/mg prot.)	Valeurs extrêmes	Valeurs de <i>P</i>
Moxestrol R-M	Adénomes	61	27-287	0,147
	Carcinomes	80	28-257	
Promegestone R-P	Adénomes	248	123-1149	0,076
	Carcinomes	161	94-273	
Methyltrienolone R-MT	Adénomes	115	64-459	0,360
	Carcinomes	114	22-183	
R-P/R-M	Adénomes	3,93	3,29-11,11	0,020
	Carcinomes	2,05	0,37-5,61	
R-MT/R-M	Adénomes	1,83	1,03-4,26	0,037
	Carcinomes	1,00	0,50-2,49	

aux oestrogènes et aux androgènes ne diffèrent pas significativement dans les cas d'adénomes et de carcinomes.

Contrairement à certains auteurs [33], nous ne trouvons pas de corrélation entre l'âge des patients au moment du prélèvement et le nombre de récepteurs, qu'ils soient aux androgènes, à la progestérone ou aux oestrogènes. D'après notre étude (voir Tableau 3) nous pouvons discerner deux catégories d'épithéliomas: le groupe "a" ayant comme les adénomes, $R-M < R-MT$ et le groupe "b", ayant, au contraire, $R-M > R-MT$. En utilisant toujours le même test statistique, nous avons essayé de voir si les différences entre ces deux groupes étaient significatives. Il en résulte que les taux de R-P ($P = 0,057$) et de R-MT ($P = 0,057$) ainsi que les rapports (R-P)/(R-M) du groupe "a" seraient supérieurs à ceux du groupe "b". Par contre, les taux de R-M ($P = 0,557$) restent invariables entre les deux groupes.

Ces résultats viennent fortement étayer notre observation, à savoir l'existence possible de deux sortes de tumeurs malignes, l'une d'entre elle ayant des taux de récepteurs proches de ceux calculés dans le cas des adénomes, l'autre ayant des taux de récepteurs aux oestrogènes analogues mais des concentrations en récepteurs à la progestérone et aux androgènes faibles.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans cette étude préliminaire, nous avons tout d'abord doser les concentrations en récepteurs stéroïdiens des différents tissus étudiés, puis nous avons essayé d'apprécier l'efficacité de ces récepteurs, en particulier des récepteurs aux oestrogènes, en considérant les récepteurs à la progestérone comme marqueurs de leur activité.

En effet, les oestrogènes jouent un rôle important dans le développement des adénomes ainsi que dans le traitement des cancers prostatiques. C'est pourquoi

nous avons calculé les rapports entre concentrations de R-P et de R-M ainsi qu'entre R-MT et R-M, et nous avons cherché à corrélérer les différentes valeurs obtenues avec les deux affections des tissus étudiés, adénomes et carcinomes. Les valeurs obtenues par la méthode en un seul dosage ne correspondent pas exactement à celles calculées par la méthode de Line-weaver. Nous avons choisi une concentration en hormones tritiées à la limite de la saturation afin d'éliminer certains risques d'erreur dus à une concentration massive en hormone radioactive comme cela a été décrit [14].

Des dosages analogues en un seul point ont été proposés et sont utilisés pour définir les concentrations en récepteurs dans les tumeurs du sein [1, 36-38]. Cette technique a de plus, l'avantage de permettre d'étudier plusieurs récepteurs et ceci même pour de petits échantillons. Comme le montrent nos résultats (Tableau 1), l'incubation du cytosol par une solution de charbon dextran permet d'améliorer le dosage des récepteurs stéroïdiens prostatiques en éliminant une grande partie de l'hormone endogène.

Des expériences de compétition nous ont permis de vérifier l'existence d'une affinité de l'hormone synthétique R 1881 pour le récepteur à la progestérone. Nous avons, au cours de ce travail, dosé des tissus obtenus par T.U.R.* et trouvé, comme d'autres auteurs [15], des valeurs positives en récepteurs. Il y a effectivement destruction d'une partie du matériel protéique par la chaleur au cours des résections. En effet, dans ce cas, la moyenne des pourcentages de protéine par rapport au poids frais est diminuée de moitié. Les concentrations en récepteurs étant exprimés en fmol/mg de protéines, la correction est en partie effectuée lors du calcul des résultats.

Les concentrations des récepteurs aux androgènes, à la progestérone et aux oestrogènes sont très différentes selon les auteurs [24, 32-35]. Pour notre part, nous avons toujours eu quelque soit l'état de la prostate et pour les trois récepteurs, des valeurs positives, celles-ci étant néanmoins plus ou moins élevées; c'est

* T.U.R.: Trans-urethral resection.

pourquoi nous avons adopté l'expression proposée par Ekman *et al.*[25]: tumeur "pauvre en récepteur" ou tumeur "riche en récepteur".

Les taux des récepteurs à la progestérone sont moins élevés dans les cas de carcinomes que dans les cas d'adénomes. La grande quantité de récepteurs à la progestérone observée dans les tissus prostatiques adénomateux est en accord avec les nombreux rapports indiquant le rôle des oestrogènes dans le développement des adénomes chez le chien comme chez l'homme [39, 40]. En effet, les récepteurs aux oestrogènes induisant la synthèse de récepteur à la progestérone [9, 10], les taux élevés de ces derniers peuvent être un effet de l'action oestrogénique [32]. Par contre, les concentrations des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes des tissus adénomateux et cancéreux ne sont pas significativement différentes.

Nous n'avons pas encore assez de recul, ni un assez grand nombre d'analyses pour établir des corrélations entre les deux groupes de tumeurs et la qualité de la réponse au traitement hormonal. On peut néanmoins envisager que, comme pour le cancer du sein [1-4], les tissus "pauvres en récepteur" avec, dans le cas de la prostate $RM > R-MT$ et $(R-P)/(R-M)$ faible, répondraient mal au traitement hormonal alors que ce même traitement serait efficace pour les tissus "riches en récepteur" avec avec $R-M < R-MT$ et $(R-P)/(R-M)$ élevé.

Dans les limites de l'échantillon étudié, nous pouvons conclure que l'étude des récepteurs aux androgènes, à la progestérone et aux oestrogènes peut être effectuée sur de petites quantités de tissus provenant de résection trans-urétrale par la méthode en un seul dosage pour une concentration de $5 \cdot 10^{-9}$ M en hormone marquée après incubation préalable du cytosol par une solution de charbon dextran; que les tissus prostatiques adénomateux et cancéreux montrent des différences quant à leurs concentrations en récepteurs à la progestérone; et que les tissus néoplasiques étudiés peuvent être classés en deux catégories: "riches en récepteurs" et "pauvres en récepteurs".

REFERENCES

- Mulder J. and Verhaar M. A. T.: A comparative study on estradiol receptor assays in human breast cancer tissue. *Clin. chim. Acta* **99** (1979) 129-134.
- MacGuire W. L., Carbone P. P. and Vollmer E. P. (Eds): *Estrogen receptors in human breast cancer*. Raven Press, New York (1975).
- Hormones and Breast Cancer*. Inserm, Paris (1965).
- Walt A. J., Singhakaowintaa, Brooks S. C. and Cortez A.: The surgical implications of estrophile protein estimations in carcinoma of the breast. *Surgery* **80** (1976) 506-512.
- Baulieu E. E.: *Hormones. Aspects Fondamentaux et Physio-pathologiques*. Hermann Editeurs des Sciences et des Arts (1978) pp. 1-549.
- Vu Hai M. T. and Milgrom E.: Characterization and assay of the progesterone receptor in rat uterine cytosol. *J. Endocr.* **76** (1978) 21-32.
- Verdonck L., De Slypere J. P., Sayed M. A., Van Sandem, Van Camp K. and Verheulen A.: Subcellular distribution of androgens in hyperplastic human prostate. *J. steroid Biochem.* **13** (1980) 607-611.
- Bartsch W., Krieg M. and Voigt K. D.: Quantification of endogenous testosterone, 5α -dihydrotestosterone and 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol in subcellular fractions of the prostate, bulbocavernosus/levator ani muscle, skeletal muscle and heart muscle of the rat. *J. steroid Biochem.* **13** (1980) 259-264.
- Horwitz K. B., McGuire W. L., Parson O. H. and Segaloff A.: Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis. *Science* **189** (1975) 726-777.
- Milgrom E., Luu Thim, Atger M. and Baulieu E. E.: Mechanism regulating the concentration and the conformation of progesterone receptor(s) in the uterus. *J. biol. Chem.* **248** (1973) 6366-6374.
- Bonne C. and Raynaud J. P.: Methyltrienolone a specific ligand for cellular androgen receptors. *Steroids* **26** (1975) 227-232.
- Asselin J., Labrie F., Gourdeau Y., Bonne C. and Raynaud J. P.: Binding of [3 H]methyltrienolone in rat prostate and benign prostatic hypertrophy (BPH). *Steroids* **28** (1976) 449-459.
- Karr J. P., Wajzman Z., Madajewicz S., Kirdani R. Y., Murphy G. P. and Sandberg A. A.: Steroid hormone receptors in the prostate. *J. Urol.* **122** (1979) 170-175.
- Braunsberg H. and Hammond K. D.: Practical and theoretical aspects in the analyses of steroid receptors. *J. steroid Biochem.* **13** (1980) 1133-1145.
- De Voogt H. J. and Dingjan P.: Steroid receptors in human prostatic cancer. A preliminary evaluation. *Urog. Res.* **6** (1978) 151-158.
- Bonne C. and Raynaud J. P.: Assay of androgen binding sites by exchange with methyltrienolone (R 1881). *Steroids* **27** (1976) 497-507.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193** (1951) 265-275.
- Scatchard G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51** (1949) 660-672.
- Chamness G. C. and McGuire W. L.: Scatchard plots: common errors in correction and interpretation. *Steroids* **26** (1975) 538-542.
- Lineweaver H. and Burk D.: The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56** (1934) 658-666.
- Karr J. P., Kirdani R. Y., Murphy G. P. and Sandberg A. A.: Androgen binding in the baboon prostate. *Archs Androl.* **2** (1979) 123-129.
- Keightley D. D. and Cressie N. A. C.: The Woolf plot is more reliable than the Scatchard plot in analysing data from hormone receptor assays. *J. steroid Biochem.* **13** (1980) 1317-1323.
- Rodbard D. and Levald J. E.: Computer analysis of radioligand assay and radio-immunoassay data. In *Second Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology* (Edited by E. Diczfalusy). Geneva (1970) pp. 79-103.
- Snochowski M., Poussette A., Ekman P., Bression D., Andersson L., Hogberg B. and Gustafsson J. Å.: Characterization and measurement of the androgen receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J. clin. Endocr. Metab.* **45** (1977) 920-930.
- Ekman P., Snochowski M., Zetterberg A., Hogberg B. and Gustafsson J. Å.: steroid receptor content in human prostatic carcinoma and response to endocrine therapy. *Cancer* **44** (1979) 1173-1181.
- Siegel: *Non Parametric Statistics for the Behavioral Sciences, The Mann-Whitney U. Test*. McGraw-Hill. Series in psychology (1960) pp. 116-127.
- Shain S. A., Boesel R. W., Lamm D. L. and Radwin H. M.: Characterization of unoccupied (R) and occu-

- piéd (RA) androgen binding components of the hyperplastic human prostate. *Steroids* **31** (1978) 541-556.
28. Rosen V., Jung I., Baulieu E. E. and Robel P.: Androgen-binding proteins in human benign prostatic hypertrophy. *J. clin. Endocr. Metab.* **41** (1975) 761.
 29. Cowan R. A., Cowan S. K. and Grant J. K.: Binding of methyltrienolone (R 1881) to a progesterone receptor-like component of human prostatic cytosol. *J. Endocr.* **74** (1977) 281-289.
 30. Sirett D. A. N. and Grant J. K.: Receptor properties of progestogen-binding sites in cytosol from benign hyperplastic prostatic tissue. *J. Endocr.* **78** (1978) pp. 52-53.
 31. Gustafsson J. Å., Ekman P., Poussette A., Snochowski M. and Hogberg B.: Demonstration of a progestin receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Invest. Urol.* **15** (1978) 361-366.
 32. Ekman P., Snochowski M., Dahlberg E., Bression D., Hogberg B. and Gustafsson J. Å.: Steroid Receptor content in cytosol from normal and hyperplastic human prostate. *J. clin. Endocr. Metab.* **49** (1979) 205-215.
 33. Vermeulen A., Rubens R. and Verdonck L.: Testosterone secretion and metabolism in male senescence. *J. clin. Endocr. Metab.* **34** (1972) 730-735.
 34. Ekman P., Snochowski M., Dahlberg E. and Gustafsson J. Å.: Steroid receptors in metastatic carcinoma of the human prostate. *Eur. J. Cancer* **15** (1979) 257-262.
 35. Tilley W. D., Keightley D. D. and Marshall V. R.: Estrogen and progesterone receptors in benign prostatic hyperplasia in humans. *J. steroid Biochem.* **13** (1980) 395-399.
 36. Liskowski L. and Rose David P.: Experience with a simple method for estrogen receptor assay in breast cancer. *Clin. chim. Acta* **67** (1967) 175-182.
 37. Pichon M. F. and Milgrom E.: Characterization and assay of progesterone receptor in human mammary carcinoma. *Cancer Res.* **37** (1977) 464-471.
 38. McGuire W. L.: Assays for estrogen and progesterone receptors in human breast cancer tissue. *Application Data Beckman Instruments Inc. Spinco Division* **415** (1970) 326-329.
 39. Walsh P. C. and Wilson J. C.: The induction of prostatic hypertrophy in the dog with androstanediol. *J. clin. Invest.* **57** (1976) 1093-1100.
 40. Skoldefors H., Blomstedt B. and Carlstrom K.: Serum hormone levels in benign prostatic hyperplasia. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **12** (1978) 111-117.