

**INFLUENCE DE STEROIDES  
D'ORIGINE SURRENALIENNE  
SUR LA CROISSANCE DE CELLULES  
CANCEREUSES MAMMAIRES  
EN CULTURE (MCF-7)**

**THESE**

POUR LE

**DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

*présentée et soutenue publiquement le 1<sup>er</sup> Juillet 1991*

par

**Delphine PUIGROS**

née le 21 Avril 1967 à Saint-Junien (Haute-Vienne)

EXAMINATEURS de la THESE

Monsieur le Professeur HABRIOUX ..... PRESIDENT  
Monsieur le Professeur LABADIE ..... JUGE  
Monsieur le Professeur OLIVIER ..... JUGE  
Madame DESMAISON, *Maître de Conférences* ..... JUGE

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur RABY
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur GHESTEM (1er Assesseur)  
Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences (2e Assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT

. PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie Fondamentale
LEFORT des YLOUSES Daniel	Pharmacie Galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

CELS René

A mon Président de thèse,  
Monsieur le Professeur HABRIOUX  
Professeur des Universités de Biochimie Fondamentale

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Je tiens à lui exprimer tous mes remerciements pour m'avoir fait bénéficier de sa haute compétence et des conseils qu'il m'a prodigués.

Qu'il trouve ici le témoignage de mon profond respect.

Aux membres du jury de cette thèse,

Monsieur le Professeur LABADIE,  
Professeur des Universités de Biochimie

Monsieur le Professeur OLIVIER,  
Professeur des Universités de Cancérologie Radiothérapie  
Electroradiologiste des Hôpitaux  
Chef de Service de Radiothérapie au CHU Dupuytren à Limoges

Madame DESMAISON,  
Maître de conférences de Biochimie

à qui j'exprime ma sincère gratitude pour avoir accepté de juger  
cette thèse.

A mes parents  
qui m'ont guidée, soutenue tout au cours de mes études.

Que cette thèse soit l'aboutissement et la récompense de tant  
d'efforts.

A mes frères.

A Jean-Luc pour son soutien moral.

A Monsieur NICOLAS,  
Professeur des Universités de Bactériologie et Virologie,  
Parasitologie,

pour avoir mis à notre disposition le Laboratoire Départemental où  
nous avons pu manipuler pour les expérimentations nécessaires à  
cette thèse.

A Monsieur NAJID,

qui a supervisé toutes les manipulations.

A Madame SANSILLON épouse HAUPTMAN Chantal,  
pour notre collaboration mutuelle

et Daniel HAUPTMAN qui m'ont motivée et encouragée tout au  
long de la réalisation de ma thèse.

**PLAN**

## Chapitre 1 : INTRODUCTION

## Chapitre 2 : METABOLISME DES ANDROGENES

### I - BIOSYNTHESE

- 1 - D.H.A
- 2 - TESTOSTERONE
- 3 - D.H.T.
- 4 -  $\Delta$ 4 OU ANDROSTENEDIONE
- 5 - 5-ANDROSTENE-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -DIOL OU ADIOL

### II - METABOLISME DANS LES TISSUS PERIPHERIQUES

- 1 - METABOLITES HYDROXYLES
- 2 - METABOLITES CETONIQUES

### III - ACCUMULATION DES ANDROGENES AU NIVEAU DES TISSUS MAMMAIRES

- 1 - KYSTE MAMMAIRE
- 2 - TUMEUR MAMMAIRE

- a - Action de la DHA-sulfatase
- b - Action de la 17  $\beta$  HSD

- 3 - METABOLISME DES ANDROGENES SURRENALIENS PAR LES TUMEURS MAMMAIRES
- 4 - CONCLUSION



## **Chapitre 3 : MATERIEL ET METHODES**

### **I - CULTURES CELLULAIRES**

#### **II - STERILITE**

#### **III - LE MILIEU DE CULTURE**

#### **IV - SUPPLEMENTATION DU MILIEU DE CULTURE**

#### **V - ENTRETIEN DE LA SOUCHE**

1 - PREPARATION DE LA SOLUTION SALINE TAMPONNEE AU PHOSPHATE

2 - PREPARATION DE LA SOLUTION STP-EDTA CONCENTREE 10 FOIS

3 - DILUTION DE LA SOLUTION

4 - SOLUTION DE TRYPSINE-EDTA (0,05 %-0,02%)

5 - DECOLLEMENT DES CELLULES

#### **VI - CONGELATION DES CELLULES MCF-7**

1 - MILIEU DE CONGELATION : PREPARATION EXTEMPORANEE

2 - RECUPERATION DES CELLULES

#### **VII - DECONGELATION DES CELLULES**

#### **VIII - PREPARATION DU SVF-TCD**

#### **IX - COMPTAGE**

#### **X - DOSAGE DE L'ADN**

1 - LES REACTIFS

2 - DOSAGE DE L'ADN PAR LA METHODE DU DAPI

3 - VALIDITE DES METHODES

#### **XI - CONDITIONS DE CULTURE**

#### **XII - STEROIDES : FORMULE ET PROVENANCE COMMERCIALE**

## Chapitre 4 : RESULTATS

### I - INTRODUCTION

### II - ANDROGENES MINEURS

#### 1 - INFLUENCE DE LA DHA, DU DHA-S ET DE L'ADIOL

a - CULTURE DANS SVF

b - CULTURE DANS SVF-TCD à 5%

$\alpha$  - Prolifération cellulaire

$\beta$  - Temps-dépendance

2 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE CES  
STEROIDES SUR LA CROISSANCE DES CELLULES MCF-7

3 - CONCLUSION.

### III - ANDROGENES MAJEURS

1 - TESTOSTERONE

2 -  $5\alpha$  DHT

3 -  $\Delta 4$

### IV - METABOLITES

1 - DERIVES CETONIQUES = METABOLITES OXYDES EN 17

2 - DERIVES DIHYDROXYLES = METABOLITES REDUITS EN 17

a - Dose-dépendance

b - Temps-dépendance

c - Conclusion

## Chapitre 5 : DISCUSSION

### I - EFFET MITOGENIQUE DES ANDROGENES PAR RAPPORT A L'EFFET MITOGENIQUE DE L'E2

- 1 - ANDROGENES MINEURS
- 2 - ANDROGENES MAJEURS

- a - Testostérone et DHT
- b -  $\Delta 4$  ou Adione
- c - Conclusion

### II - PROBLEME DES SULFOCONJUGUES

### III - AROMATASE

### IV - PROBLEME DES METABOLITES

1- RELATION STRUCTURE DANS L'ESPACE DES METABOLITES - AFFINITE POUR LE RE

2 - AFFINITE DES AUTRES ANDROGENES POUR LE RE EN FONCTION DE LEUR STRUCTURE SPATIALE

## CONCLUSION

**Chapitre 1**  
**INTRODUCTION**

Chaque année, la France compte 40 000 cas de **cancer du sein**. Les 2/3 de ceux-ci se déclarent pendant la période post-ménopausique et 50 % de la totalité des cancers mammaires sont liés à l'activité des hormones.

La principale hormone de cancérisation du sein dans les cancers hormonodépendants est l'**ŒSTRADIOL**, mais cette hormone a besoin de cofacteurs pour être active. Ce sont principalement les facteurs de croissance.

Certains ont été isolés et caractérisés :

- facteur épidermique (EGF) ;
- facteur de transformation ( $\alpha$  TGF) ;
- facteur insulinique-like (IGF-I).

Des études récentes ont montré que ces différents facteurs sont impliqués dans l'action de l'œstradiol et le développement du cancer mammaire. (DICKSON & al., 1986 ; FITZPATRICK & al., 1984)

La prolifération cellulaire dans les cancers du sein peut être aussi contrôlée par des facteurs inhibiteurs ; par exemple le facteur  $\beta$  de transformation (TGF- $\beta$ ) est un régulateur négatif de la prolifération cellulaire ; il est inhibé par les hormones stimulatrices type œstradiol alors que les antiœstrogènes stimulent fortement sa sécrétion (DERYNCK & al., 1985 ; KNABBE & al., 1987).

C'est pourquoi le traitement actuel du cancer du sein utilise essentiellement les antiœstrogènes et plus particulièrement le **TAMOXIFENE**.

Son mécanisme d'action le plus probable est sa liaison avec le récepteur œstrogénique (RE) bloquant l'effet de l'hormone. D'autre part, il est capable de diminuer fortement la conversion du sulfate d'œstrone en œstradiol dans différentes lignées cellulaires du cancer du sein humain. Il agit donc en inhibant l'enzyme de conversion 17  $\beta$  HSD.

En outre, VIGNON & coll. ont montré que l'isomère trans du Tamoxifène ou de l'hydroxytamoxifène peut inhiber la prolifération cellulaire stimulée par les facteurs de croissance (insuline, EGF). Ceci n'étant pas observé si les cellules ne possèdent pas de RE (RE<sup>-</sup>), cet effet serait donc médié par RE.

Le Tamoxifène semble aussi stimuler la sécrétion de TGF- $\beta$  par les cellules cancéreuses mammaires, facteur d'inhibition de la prolifération cellulaire.

La liaison du Tamoxifène avec RE ne semble pas être son seul mécanisme d'action puisque certains auteurs émettent l'hypothèse d'un site de liaison spécifique (A.E.B.S.). (SUTHERLAND & al., 1980 ; FAYE & al., 1980)

Chez les femmes, les androgènes sont principalement sécrétés par les glandes surrénales et les ovaires, mais leur fonction physiologique est encore mal connue.

Avant la ménopause, les glandes surrénales et les ovaires contribuent toutes deux à la sécrétion de Testostérone, DiHydroTestostérone (DHT) et Androstènedione ( $\Delta$ 4) (SIITERI, 1979), alors que la DeHydroépiAndrostérone (DHA) et son sulfate (DHA-S) sont principalement sécrétés par les glandes surrénales (BEAULIEU & al., 1975, ABRAHAM, 1974).

Chez les femmes postménopausées, le cortex surrénalien est considéré comme étant la seule source de DHA et DHA-S et la principale source de  $\Delta$ 4 et de Testostérone.

Donc, chez la femme postménopausée, les concentrations des androgènes surrénaux sont relativement élevées par rapport aux concentrations négligeables d'œstradiol et d'œstrone.

La diminution de la concentration des androgènes dans le plasma après la ménopause peut être liée au manque de sécrétion d'œstradiol ovarien, qui stimule la synthèse des androgènes surrénaux (MAROULIS & ABRAHAM, 1976). (tableau I)

De ce fait, ne peut-on suggérer que la croissance des cellules mammaires chez les femmes postménopausées pourrait être liée à la présence des androgènes ?

Ceux-ci pourraient-ils agir par l'intermédiaire des récepteurs aux œstrogènes?

Ou bien, peut-on penser que certains androgènes sont transformés en œstradiol?

En effet, le tissu adipeux mammaire possède une activité aromatasase capable de transformer les androgènes en œstradiol et d'augmenter la concentration de ces derniers au niveau du tissu mammaire (O'NEILL & al., 1988).

**Tableau I : Concentrations plasmatiques moyennes des hormones stéroïdes chez les femmes pré et postménopausées.**

STEROIDES	Préménopausées		Postménopausées	
	µg/l	nM	µg/l	nM
DHA-S	2100	5000	1500	3600
DHA	4,6	16	1,5	5,2
D4	1,9	6	1,1	4
D5	0,8	2	0,33	1,1
T	0,5	2	0,43	1
DHT	0,2	0,7	0,1	0,3
3β diol	0,3	1	-	-
E2	0,06	0,2	0,012	0,04
	(phase proliférative)			
	0,6	2,2	-	-
	(phase lutéale)			
Estrone	0,06	0,2	0,028	0,1
	0,2	0,7	-	-

Aussi, dans ce travail, nous allons nous intéresser aux relations androgènes surrénaliens-tumeurs cancéreuses.

Dans un premier chapitre, nous présenterons rapidement les inter-relations entre les hormones surrénaliennes ainsi que leur catabolisme.

Puis nous établirons l'état actuel des relations androgènes surrénaliens-tumeur mammaire et enfin nous présenterons notre travail expérimental et en discuterons les résultats.

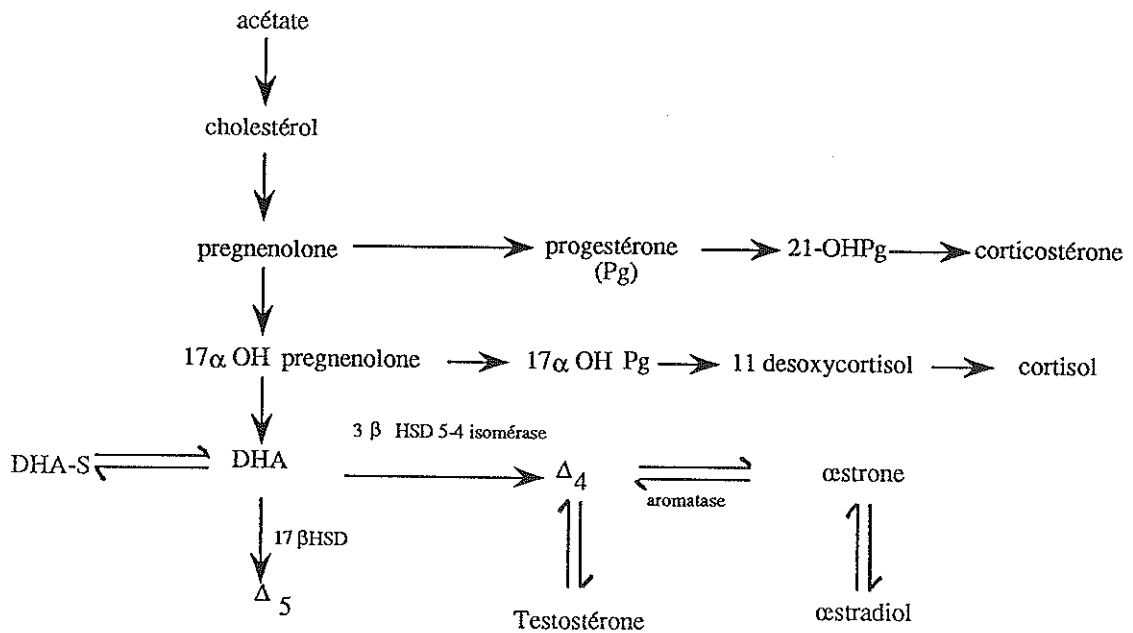
**Chapitre 2**  
**METABOLISME DES ANDROGENES**



## I - BIOSYNTHESE

La principale source d'androgènes mineurs chez la femme est la corticosurrénale.

Parmi ceux-ci la DHA est le stéroïde ayant le taux plasmatique le plus élevé et est à l'origine de la voie principale de biosynthèse de la  $\Delta_4$  (fig. 1).



**Figure 1 : Biosynthèse des androgènes par les corticosurrénales**

Ces différents androgènes sont ensuite métabolisés par le foie selon la figure 2 pour

donner des métabolites :

- 17  $\beta$  hydroxylés : - androstanediols
- 17 cétoniques : - androstérone
- étiocholanolone

Les cellules MCF-7 utilisées pour notre expérimentation sont capables de synthétiser le cholestérol de novo à partir de l'acétate (CYPRIANI & al., 1988).

Elles peuvent aussi réaliser les étapes enzymatiques en aval du cholestérol.

## 1 - D.H.A

Le catabolisme des androgènes est complexe du fait de leur interconversion au niveau du foie (fig. 2). La D.H.A, libérée par l'action d'une sulfatase à partir du sulfate de D.H.A, ainsi que la Testostérone sont en équilibre d'oxydo-réduction avec la  $\Delta_4$  et, par conséquent des 17 oxostéroïdes, qui sont ensuite conjugués soit à l'acide sulfurique, soit à l'acide glucuronique (BEAULIEU & al., 1972).

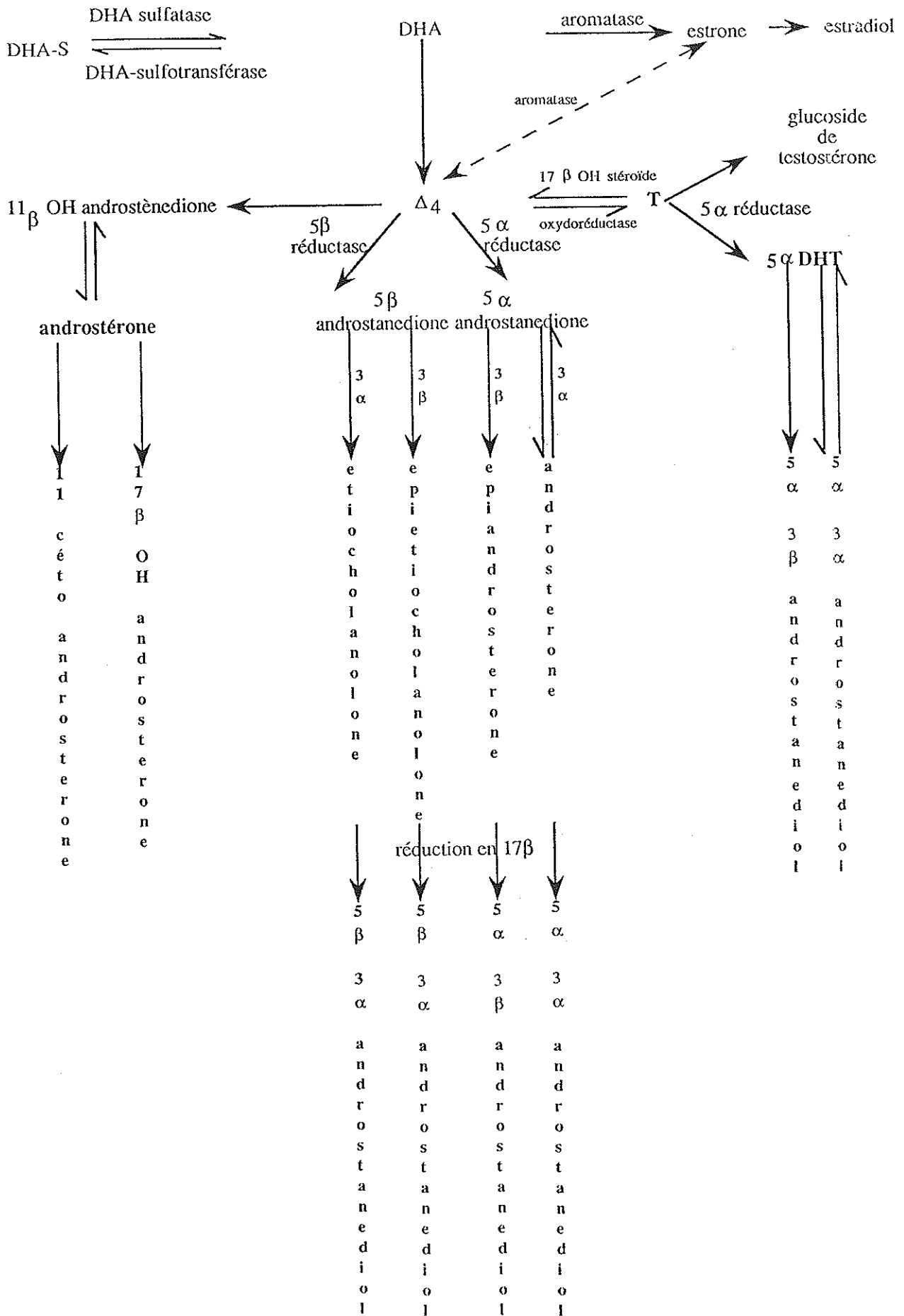


Fig. 2 : Métabolisme de la D.H.A

## 2 - TESTOSTERONE

Chez la femme, environ 25 % de la Testostérone produite provient d'une sécrétion surrénalienne directe, 25 % d'une production ovarienne et 50 à 60 % du métabolisme périphérique des pré-hormones ou androgènes faibles :  $\Delta_4$  principalement; de la D.H.A, du DHA-S et éventuellement de la  $\Delta_5$  (ABRAHAM, 1979).

Au niveau de l'hypothalamus, la Testostérone est en partie transformée en œstradiol.

25 % de la Testostérone est directement réduite en androstenediols dans le secteur extra-hépatique.

## 3 - D.H.T.

C'est en fait l'hormone active essentiellement au niveau tissulaire dont la biosynthèse se fait de façon intracellulaire à partir de la Testostérone grâce à l'action d'une  $5\alpha$  réductase présente dans certains tissus cibles et dans le foie.

Elle présente une forte affinité pour les récepteurs aux androgènes (R.A).

## 4 - $\Delta_4$ OU ANDROSTENEDIONE

Elle est à la base du catabolisme hépatique de la D.H.A.

Avant la ménopause, la  $\Delta_4$  est essentiellement produite par les ovaires et est la principale source d'œstrogènes. Le contrôle de la quantité de substrat est régulé par LH et FSH. De plus, FSH permet la régulation de l'activité de l'aromatase.

Lors de la ménopause, l'hypersécrétion réactionnelle de LH entraîne une augmentation significative de  $\Delta_4$ .

Après la ménopause, la  $\Delta_4$  est sécrétée principalement par la glande surrénale à un taux d'environ 1000  $\mu\text{g/j}$ .

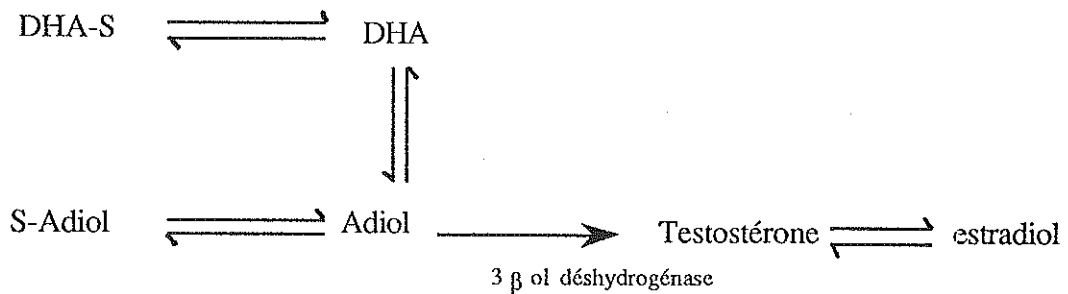
De plus, dans les tumeurs mammaires des femmes ménopausées, on constate une concentration en  $\Delta_4$  de 730 pg/ml (SANTEN & al., 1982).

Au niveau surrénalien, la  $\Delta_4$  et la Testostérone sont responsables de 1,3 % de la production d'œstrone et de 0,15 % de celle de l'œstradiol.

Cette production d'estrogènes, qui reste négligeable chez la femme en période d'activité génitale, constitue l'une des principales sources d'estrogènes chez la femme ménopausée.

#### 5 - 5-ANDROSTENE-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -DIOL OU ADIOL

L'Adiol, d'origine corticosurrénalienne chez la femme, provient de la D.H.A sous l'action de la 17  $\beta$  HSD. Il semblerait que cette action soit réversible.



## II - METABOLISME DANS LES TISSUS PERIPHERIQUES

Ces stéroïdes sont métabolisés au niveau de nombreux tissus et plus spécialement de la peau, des glandes sébacées, du follicule pileux et du foie (fig. 3).

### 1 - LES METABOLITES HYDROXYLES

Ils proviennent essentiellement du métabolisme de la Testostérone et de la D.H.T.

- 5 $\alpha$  androstane 3 $\beta$  17 $\beta$  diol

- 5 $\beta$  androstane 3 $\alpha$  17 $\beta$  diol

- 5 $\beta$  androstane 3 $\beta$  17 $\beta$  diol

- 5 $\alpha$  androstane 3 $\alpha$  17 $\beta$  diol

### 2 - METABOLITES CETONIQUES

- androstérone

Il provient de la réduction en 5 $\alpha$  et en 3 $\alpha$  de la  $\Delta_4$  ou du métabolisme de la D.H.T (fig. 2).

- étiocholanolone

Il provient d'une double réduction en 5 $\beta$  et 3 $\alpha$  de la  $\Delta_4$  (fig.2).

### III - ACCUMULATION DES ANDROGENES AU NIVEAU DES TISSUS MAMMAIRES

#### 1 - KYSTE MAMMAIRE

L'analyse du liquide de kyste mammaire montre une forte augmentation de la DHA et du DHA-S (INAUDI & al., 1987 ; BOCCARDO & al., 1988).

#### 2 - TUMEUR MAMMAIRE

THATCHER (1979) a constaté que la concentration plasmatique de la DHA était plus élevée chez les patientes ayant eu un cancer du sein après la ménopause et était plus faible si le cancer était apparu avant la ménopause. Ceci est en accord avec un risque supérieur de cancer du sein chez la femme obèse puisque l'obésité entraîne une augmentation de la production de DHA.

D'autre part, au niveau de la tumeur mammaire, BONNEY et al., en 1984, ont noté une augmentation significative de la DHA et de la  $\Delta 5$  alors que le taux de DHA-S restait inchangé.

Ces mêmes auteurs avaient montré aussi l'existence d'une corrélation entre les concentrations de DHA-S et de DHA dans les tissus normaux.

#### a - Action de la DHA-sulfatase

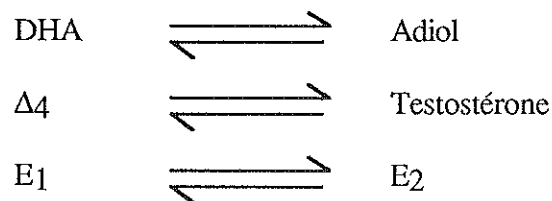
Ces derniers résultats suggèrent que la métabolisation se fait essentiellement dans le sens DHA-S  $\rightarrow$  DHA avec une accumulation de cette dernière.

### b - Action de la 17 $\beta$ HSD

Cet enzyme de conversion est encore appelé 17 oxydoréductase, 17 céstéroïde réductase (17-CSR) ou encore estradiol 17  $\beta$  déshydrogénase.

Il n'a jamais été isolé et purifié ; de ce fait, il n'est pas sûr que ce soit un seul et unique enzyme ou plutôt différents isoenzymes.

Il semblerait cependant qu'il agisse à 3 niveaux :



Dans les tissus tumoraux, il a été noté une augmentation de l'activité de la 17  $\beta$  HSD de 2 à 4 fois par rapport à celle dans les tissus normaux (BONNEY & al., 1984).

Cela pourrait donc expliquer, du fait de l'augmentation du taux de la DHA, le taux élevé de la  $\Delta_5$ .

### 3 - METABOLISME DES ANDROGENES SURRENALIENS PAR LES TUMEURS MAMMAIRES

La DHA est métabolisée en Adiol par la 17  $\beta$  HSD, en DHA-S par la DHA-sulfotransférase et en 7-hydroxy DHA par la 7  $\beta$  hydroxylase (LI & al., 1978).

D'autre part, en incubant de la DHA tritiée in vivo, ABUL-HAJI, en 1975, a obtenu sa transformation en Estradiol 17  $\beta$ .

Cependant ces essais ont été effectués à partir de biopsies qui contiennent un mélange de cellules mammaires normales et malignes, des fibroblastes et des adipocytes. Or le tissu adipeux mammaire possède une activité aromatasase (O'NEILL & al., 1988).

De ce fait, les résultats des transformations de la DHA en Estradiol ne peuvent pas être attribués avec certitude aux seules cellules malignes.



#### 4 - CONCLUSION

En fonction des éléments que nous venons de citer, nous allons effectuer une étude sur la relation androgènes surrenaliens-tumeur mammaire en prenant comme modèle expérimental une lignée de cellules MCF7 en culture pour éviter l'hétérogénéité des tissus, source de controverse.

Ces cellules MCF7 correspondent à une lignée de cellules cancéreuses mammaires humaines hormonodépendantes obtenues à partir d'une métastase pleurale d'un adénocarcinome mammaire apparu chez une femme ménopausée, à l'âge de 69 ans en 1970 au Michigan. (J.C. NICOLAS U58 INSERM MONTPELLIER)

Cette lignée de cellules MCF7 est hormonodépendante, et possède donc des récepteurs sur lesquels se fixent les hormones polypeptidiques et stéroïdiques. Elle répond donc à une stimulation par l'estradiol in vitro et ce, en augmentant la prolifération cellulaire.

Pour étudier cette action in vitro, il est donc nécessaire de maîtriser la composition du milieu de culture en facteurs de croissance.

C'est pourquoi il a été mis au point au laboratoire des conditions de culture répondant à ce critère, que nous utiliserons pour étudier l'action des différents androgènes qui seront :

- hormones androgéniques dites "mineures" :

. DHA et son sulfate

. Adiol et son sulfate

- hormones androgéniques dites "majeures" :

. Testostérone

. D.H.T

.  $\Delta 4$

- métabolites :

. 17  $\beta$  hydroxylés : androstanediols

. 17 cétoniques : androstérone

étiocholanolone

Dans un premier chapitre, nous allons rappeler les conditions de travail.

Puis nous présenterons les résultats de croissance des cellules MCF-7 en présence de ces différents androgènes, en prenant comme témoin positif de la prolifération, l'action de l'estradiol, et comme témoin négatif de la prolifération, l'action du Tamoxifène.

**Chapitre 3**  
**MATERIEL ET METHODES**

## I - CULTURES CELLULAIRES

Les cultures sur lesquelles nous avons manipulé sont les cellules MCF-7. Ces cellules nous ont été fournies par J.C NICOLAS U58 INSERM MONTPELLIER. C'est une lignée cellulaire, d'origine humaine, dite hormonodépendante. Ces cellules proviennent d'une métastase pleurale d'un adénocarcinome mammaire sur une femme ménopausée âgée de 69 ans en 1970. Elles ont des récepteurs pour les hormones polypeptidiques et stéroïdiennes (HORWITZ & al., 1975 ; BROOKS & ADAMS, 1971).

## II - STERILITE

Toutes les manipulations ont été effectuées dans des conditions stériles sous hotte à flux laminaire (ADSO, France). Les pipettes utilisées sont stériles et à usage unique (Sterilin (1 et 5 ml) ou Falcon 10 ml). Les flacons de culture présentent différentes tailles T25, T75, (Corning, USA). Ils sont stériles et sont vidés à l'aide d'une pipette pasteur stérile fonctionnant avec une pompe à vide (Kurt Neuberger, France).

## III - LE MILIEU DE CULTURE

Sauf précision, tous les produits de culture cellulaire sont achetés chez Gibco (Paisley, Ecosse). L'eau utilisée pour la reconstitution du milieu est apyrogène (Biochrom).

Le milieu de culture est préparé par fraction de 5 litres. Un flacon de milieu de culture (Gibco, ref 72-1700) en poudre avec du rouge de phénol est dissous dans 4,25 l d'eau pyrodistillée Aqual (Biochrom, Angoulême ref 1400-B), puis on ajoute 11,9 g d'HEPES (Impérial lab., ref. 5-762-72) dissous dans 100 ml d'eau pyrodistillée, 2,5 g de bicarbonate de sodium (Merck, ref 6329) dissous dans 100 ml d'eau pyrodistillée et 50 ml d'une solution d'acides aminés non essentiels (Gibco, ref 43-1140H). Ensuite, on ajuste le pH à 7,7 à 20°C lentement par addition d'environ 30 ml de NaOH 1N (Merck, ref 9137) filtrée sur filtre 0,22 µm. L'ensemble est agité doucement pendant une heure. Le milieu de culture ainsi préparé est

ensuite stérilisé par filtration : pré-filtre non stérile 0,45  $\mu\text{m}$  (ref AP 200 4700 Millipore) et filtre stérile 0,22  $\mu\text{m}$  (Sterivex-GS, ref SVGS 01015 Millipore, USA) à l'aide d'une pompe péristaltique Masterflex (Cole Parmer Instrument Co, USA) et fractionné en flacons de 450 ml. Ceux-ci sont stockés en chambre froide à 2°C.

Le contrôle de stérilité est effectué par stockage des premiers et derniers 50 ml filtrés, à + 37°C pendant la semaine précédant l'utilisation du milieu de culture.

#### IV - SUPPLEMENTATION DU MILIEU DE CULTURE

Le milieu ainsi préparé est supplémenté extemporanément avec du sérum de veau foetal (Gibco, ref 13-6290H) (5% ou 10% deSVF traité au charbon dextran) à l'aide d'une seringue stérile de 10 ml munie d'une unité Minisart NML de filtration 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius, ref 165-34K), 5  $\mu\text{g/ml}$  de la solution d'insuline bovine de pancréas (Sigma, ref I-5500) et de 2 mM de glutamine à une concentration de 30 mg/ml (200 mM) (Imperial lab. ref 5-702-66) et avec soit 100 U/ml de pénicilline et 0,1 mg/ml de streptomycine (Imperial lab. ref 4-804-07) soit 50  $\mu\text{g/ml}$  de gentamycine sulfate seule (Panpharm).

#### V - ENTRETIEN DE LA SOUCHE

##### 1 - PREPARATION DE LA SOLUTION SALINE TAMPONNEE AU PHOSPHATE

1,38 M de NaCl Normapur (Prolabo, ref 27 810.29)

27 mM de KCl (Merck, ref 4936)

81 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, ref 6579)

14,7 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, ref 8418)

##### 2 - PREPARATION DE LA SOLUTION STP-EDTA CONCENTREE 10 FOIS

. 30 mM d'EDTA Titriplex III (MERCK ; Réf. 8418)

. Le pH est ajusté à 7,4 avec NaOH 1N.

### 3 - DILUTION DE LA SOLUTION

Avant utilisation, cette solution est diluée au 1/10 dans de l'eau pyrodistillée.

### 4 - SOLUTION DE TRYPSINE-EDTA (0,05 %-0,02%)

Elle est préparée par dilution au 1/5 de la solution commerciale de trypsine 0,25% (Imperial lab. ref 4-770-07) dans du STP et par addition de 0,2 mg d'EDTA.

### 5 - DECOLLEMENT DES CELLULES

La souche est cultivée dans des flacons stériles en plastique de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> dans une étuve Narco 5100 à CO<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub> et 95% d'air humidifié) dans 15 ml de milieu de culture. Tous les lundis, les cellules sont repiquées dans de nouveaux flacons après décollement : les cellules sont d'abord rincées avec 2 ml d'une solution stérile de STP-EDTA puis mises en contact 1 à 2 minutes avec 0,5 ml de STP-EDTA et 1 ml de trypsine 0,05%-EDTA 0,02%. La trypsine est ensuite neutralisée avec 8,5 ml de milieu de culture. On aspire et on refoule la suspension cellulaire 2 à 3 fois pour séparer les cellules. On met enfin 0,5 ml et 0,25 ml de la suspension cellulaire dans deux flacons T75 contenant 15 ml de milieu de culture soit une dilution au 1/20 et 1/40 ; ce qui représente environ une densité d'ensemencement égale à 50 et à 100 cellules par mm<sup>2</sup>. Le milieu de culture est changé les mercredis et les vendredis et on refait le repiquage le lundi suivant.

#### Remarque :

- les cellules à confluence depuis 2 ou 3 jours se décolent plus facilement que les cellules juste confluentes.
- les cellules MCF-7 ont facilement tendance à s'aggréger. Au moment du décollement des cellules, le refoulement sera une opération très importante afin de ne pas avoir des amas

cellulaires dans le tube et de permettre une meilleure statistique au moment du comptage.

- le rinçage préalable du tapis cellulaire par la solution de STP-EDTA permet d'éliminer les ions  $Mg^{++}$  et  $Ca^{++}$  indispensables à l'adhésion intercellulaire et diminue donc le "temps de trypsination".

## **VI - CONGELATION DES CELLULES MCF-7**

### **1 - MILIEU DE CONGELATION : PREPARATION EXTEMPORANEE**

Ce milieu est préparé stérilement dans un bain de glace car il serait toxique pour les cellules à température ambiante. Il est obtenu par addition, dans l'ordre, du milieu de culture à 5% de SVF, du DMSO (Merck, ref 16743) et du SVF (75,10,15 : v/v).

### **2 - RECUPERATION DES CELLULES**

Les cellules à congeler doivent être trypsinées avant la confluence car les cellules en phase exponentielle "repartent" mieux que celles qui n'y sont pas. Elles sont décollées comme il a été décrit ci-dessus puis centrifugées 5 minutes à 1000 g à 4°C.

Après élimination du surnageant, on ajoute le milieu de congélation aux cellules (5 millions de cellules soit environ la moitié d'un flacon de culture T75, non confluent, par tube de congélation et par ml de milieu). Les tubes de congélation (Nunc) sont ensuite placés 30 minutes à -20°C puis 24 heures à -80°C et enfin dans de l'azote liquide à -196°C.

## **VII - DECONGELATION DES CELLULES**

3,5 ml de milieu de culture à 20% de SVF sont placés dans un flacon T25. Le tube est réchauffé rapidement et le contenu du tube (stérilisé extérieurement) est transvasé stérilement dans le flacon contenant le milieu de culture. Après une nuit d'incubation, le milieu de culture est changé et on rajoute un troisième antibiotique (gentamycine 100 µg/ml) et la concentration du couple pénicilline-streptomycine est augmentée respectivement à 300 U/ml et 300 mg/ml.

## VIII - PREPARATION DU SVF-TCD

Le sérum de veau foetal décomplémenté est décongelé puis traité par 1% de charbon végétal Norit, en poudre (Prolabo, ref 26008.296) et 0,1% de dextran T 70 ref. 17-0280-01 (Pharmacia fine chemicals, Suède) sous agitation magnétique 30 minutes à 56°C.

Après centrifugation 20 mn à 3000 g, le même traitement est recommencé à 37°C. Après centrifugation 1 heure à 3000 g, le surnageant est filtré deux fois : tout d'abord sur filtre Millipore, Millex-HA 0,45 µm (ref. SLHA 025 BS) et Millex-GS 0,22 µm (ref. SLGS 025 BS) puis seulement sur filtre 0,22 µm.

## IX - COMPTAGE

Le comptage des cellules se fait au microscope grâce à un hémocytomètre (cellule de Malassez) en présence de bleu de trypan. Les cellules mortes incorporent ce colorant et elles ont un aspect brillant au microscope, ce qui facilite le comptage des seules cellules vivantes. Après cette manipulation, le reste du milieu cellulaire contenu dans un volume de 3 ml d'un mélange de solution STP-EDTA et de trypsine est conservé au congélateur, pour nous permettre de faire par la suite le dosage de l'ADN.

## X - DOSAGE DE L'ADN

Ce dosage est effectué selon la méthode de Brunck et al. (20). Il ne tient pas compte des cellules mortes mais il est très précis et les écarts-types obtenus sont très réduits. Il permet aussi de doser des quantités d'ADN de l'ordre du µg soit environ 20000 cellules MCF-7. Ce dosage est basé sur la propriété qu'ont les dérivés du benzimidazol (DAPI, DIPI, Hoechst) de se lier de façon non covalente avec les paires de bases d'adénine-thymine des molécules d'ADN. Le DAPI, (diamidino phényl indole), sous l'action d'un rayonnement excitateur à 390 nm, va



émettre une fluorescence à 526 nm, proportionnelle à la quantité d'ADN présent. Cette fluorescence est mesurée dans une cuve en quartz avec un spectrofluorimètre Mark I FOCI (Farrand optical Co Inc, USA). Après décollement des cellules, une partie est comptée et l'autre est congelée à -20°C.

Au moment du dosage de l'ADN, les tubes sont mis à décongeler et ensuite le milieu cellulaire qui présente des agrégats de cellules est brièvement soniqué grâce à un appareil à ultra-son (CHU, Limoges). La sonication est réalisée sur un temps très court de 20 secondes environ pour ne pas casser la double chaîne d'ADN.

### 1 - LES REACTIFS

ADN de Thymus de veau (type I, Sigma ref.D 1501) 2 mg/ml dans NaCl 10 mM.

DAPI (Sigma, ref. D 1388) 1 mg/ml dans l'éthanol.

### 2 - DOSAGE DE L'ADN PAR LA METHODE DU DAPI

Les solutions d'ADN et du DAPI sont diluées au 1/1000 dans de l'eau distillée et filtrées sur filtre 0,22 µm. Avant le dosage, les solutions d'ADN ainsi que les échantillons sont soniqués brièvement. Le test est réalisé sur un volume de 5 ml : 2 ml de DAPI (1 µg/ml), 0,25 à 3 ml d'ADN (2 µg/ml) et eau distillée et filtrée sur filtre 0,22 µm (QSP. 5 ml). On agite les tubes et on réalise la lecture au spectrofluorimètre .

### 3 - VALIDITE DES METHODES

La figure 3 montre que la fluorescence du DAPI est proportionnelle aux quantités d'ADN présent et la figure 4, montre que la quantité d'ADN est aussi proportionnelle au nombre de cellules MCF-7.

La comparaison des courbes de croissance obtenues à partir des mêmes suspensions cellulaires par les deux techniques donne des profils similaires. Les écarts sont plus réduits avec la mesure de l'ADN (fig.6) qu'avec la numération cellulaire (fig.5). Cette dernière est rendue difficile par la tendance des cellules MCF-7 à s'aggréger. Mais son avantage sur la mesure de l'ADN est qu'elle ne tient compte que des cellules vivantes qui n'incorporent pas le bleu trypan.

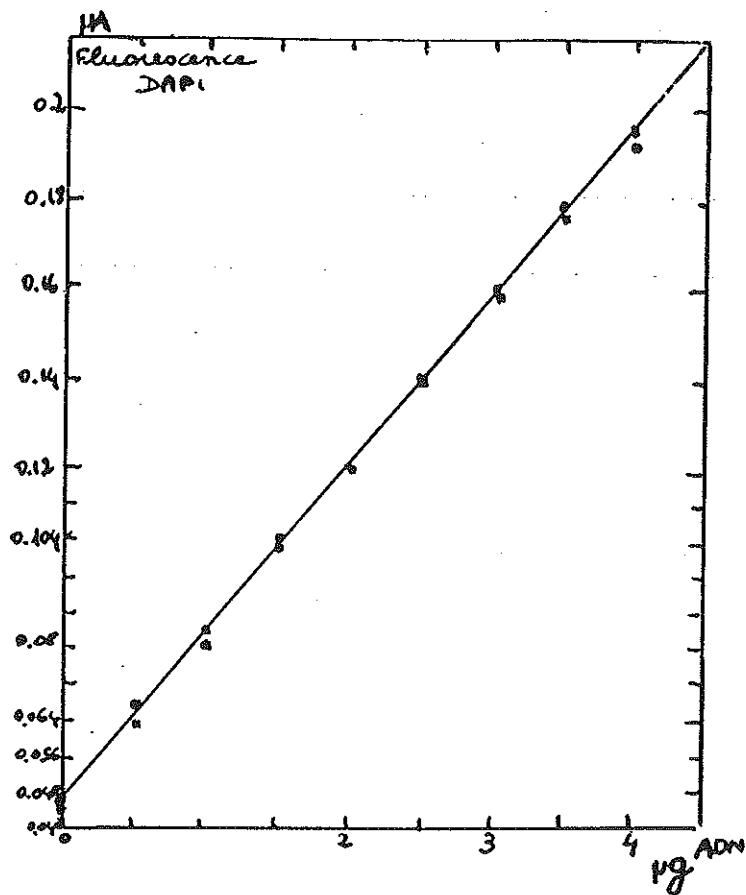


Figure 3 : DOSAGE DE L'ADN PAR LA METHODE DAPI réalisé au laboratoire selon la technique de Brunk et al., (1979).

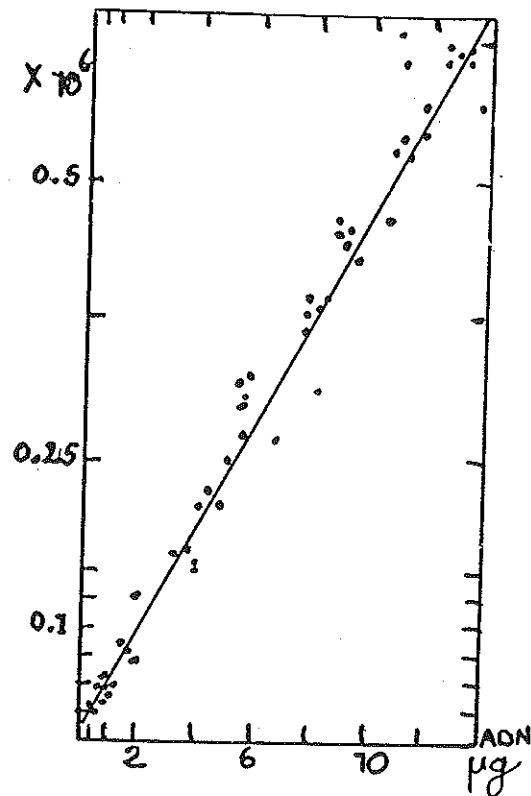


Figure 4 : Relation entre la quantité de cellules MCF-7 (comptées à l'aide de la cellule de Malassez) et la quantité d'ADN exprimée en µg et dosée par la méthode du DAPI.

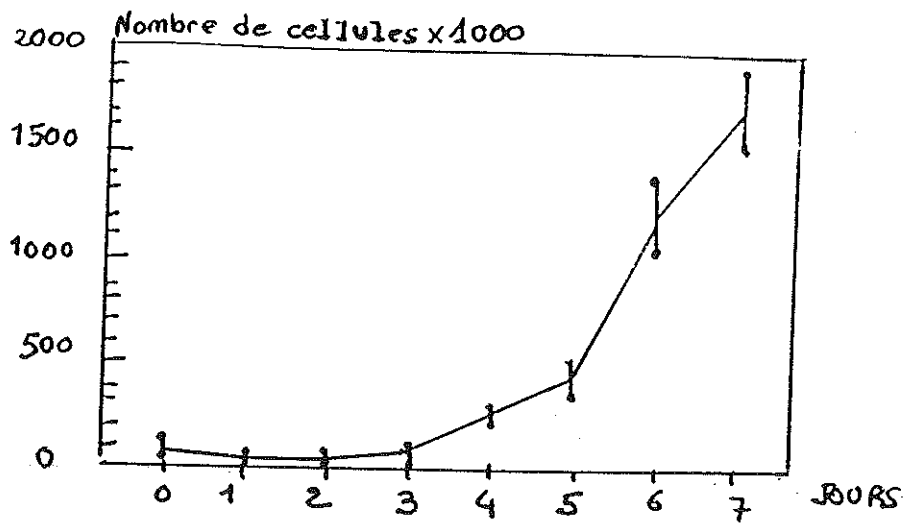


Figure 5 : Etude de la prolifération des cellules MCF-7 dans le milieu MEM à 5% de sérum de veau foetal par la numération à l'hémocytomètre.

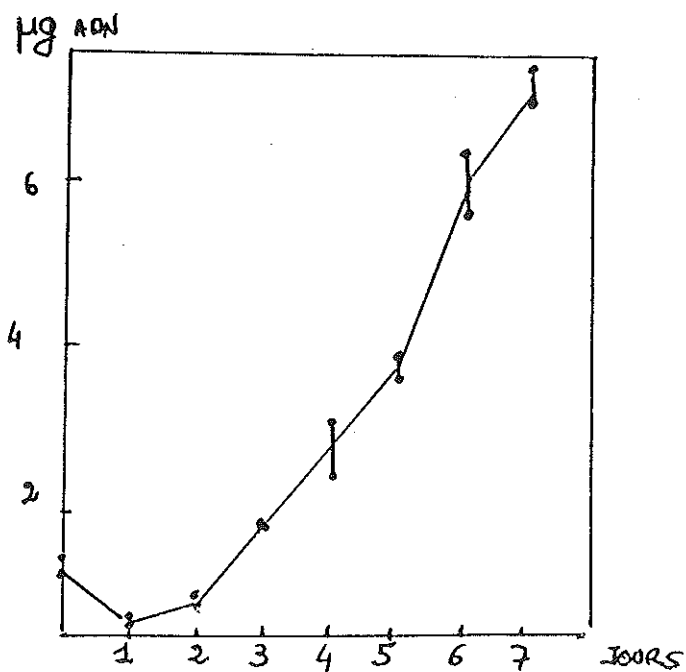


Figure 6 : Etude de la prolifération des cellules MCF-7 dans le milieu MEM à 5% de sérum de veau foetal par le dosage de l'ADN.

## XI - CONDITIONS DE CULTURE

De façon à obtenir des conditions optimales de réponse et une reproductibilité des résultats, Habrioux-Najid, 1989, ont mis au point un modèle d'étude :

- L'ensemencement des cellules MCF-7 se fait dans un milieu de culture dont la composition est bien définie :

- . addition d'antibiotiques de façon à éviter toute contamination microbienne
- . addition de rouge phénol
- . pH maintenu à 7,7 avec HEPES

Ce milieu est enrichi en sérum de veau foetal déstéroïdé à 5% (SVF-TCD), c'est-à-dire du sérum de veau dont on a éliminé toutes les hormones libres présentes (DHA, DHA-S, T et E2) (SANSILLON, 1991).

- En outre, il a été montré que pour obtenir une intensité de réponse maximale il fallait :

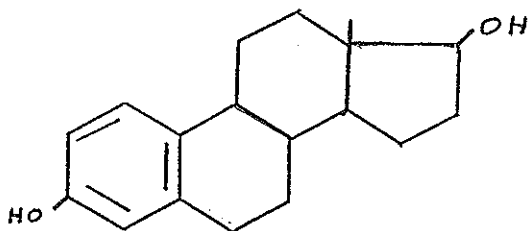
. changer de milieu tous les deux jours pour éviter l'accumulation des facteurs de stimulation et/ou l'inhibition de la prolifération ( DICKSON & LIPPMAN, 1987 ; ROBINSON & JORDAN, 1989 )

. une densité d'ensemencement de 50000 cellules par puits,

. ajouter les hormones à tester après deux "passages".

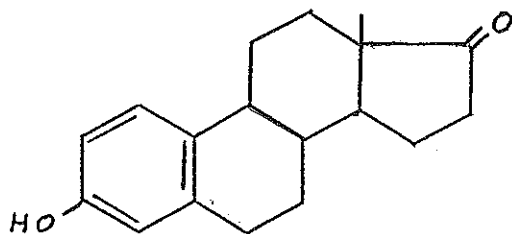
## XII - STEROIDES UTILISES : FORMULES ET PROVENANCE COMMERCIALE

1 - ESTRADIOL-17 $\beta$  1,3,5 (10)-ESTRATRIEN-3, 17 $\beta$  diol



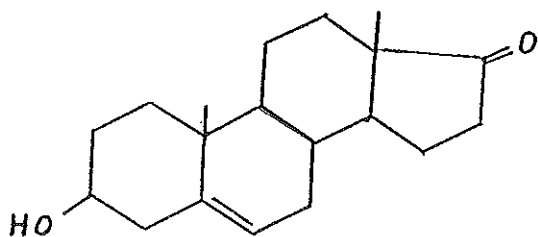
réf. Sigma E.8875

2 - ESTRONE 1,3,5(10)-ESTRATRIEN-3-OL-17-ONE

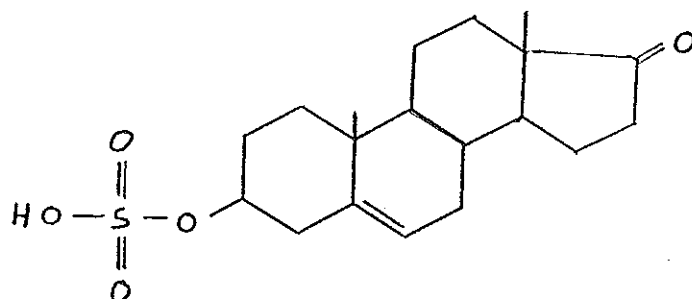


réf. Sigma A.9750

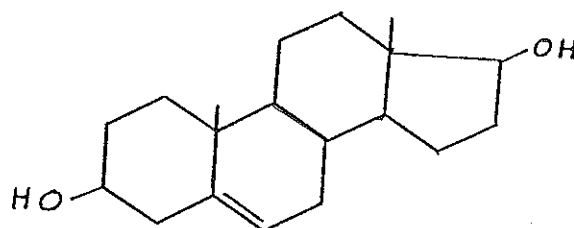
3 - D.H.A : DEHYDROEPIANDROSTERONE OU 3 $\beta$ -HYDROXY-5-ANDROSTEN-17-ONE



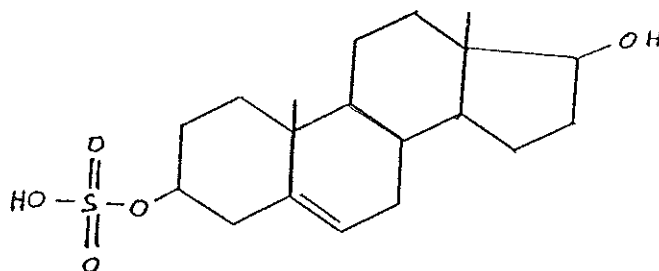
réf. Sigma D.4000

4 - D.H.A-S : SULFATE DE D.H.A. OU 3 $\beta$ -SULFATE-5-ANDROSTEN-17-ONE

réf. Sigma D4625

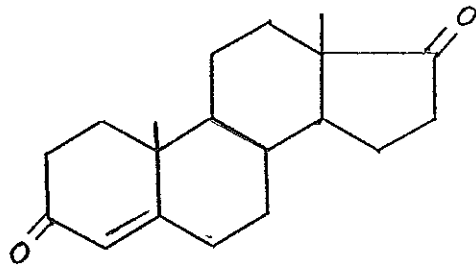
5 - ADIOL : ANDROSTENEDIOL OU 5-ANDROSTENE-3 $\beta$ , 17 $\beta$  DIOL

réf. Sigma A7830

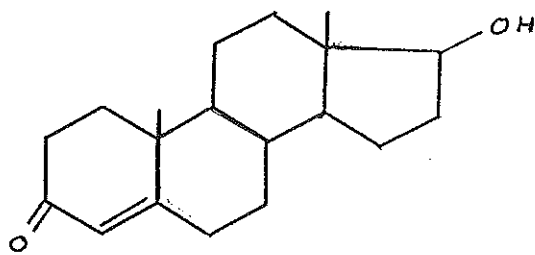
6 - S-ADIOL : SULFATE D'ADIOL OU 3 $\beta$ -SULFATE-5-ANDROSTENE-17 $\beta$ -DIOL

le S-Adiol est préparé par réduction du DHA-S par Na BH<sub>4</sub> dans le méthanol par B.

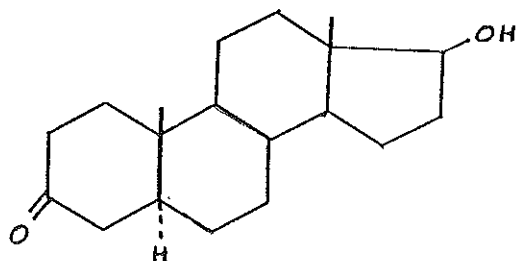
CHANTEGREL (INSA-Lyon)

7 - ADIONE OU  $\Delta^4$  : ANDROSTENEDIONE OU 4-ANDROSTENE-3,17 DIONE

réf. Sigma A9630

8 - TESTOSTERONE : 4-ANDROSTEN-17 $\beta$ -OL-3-ONE

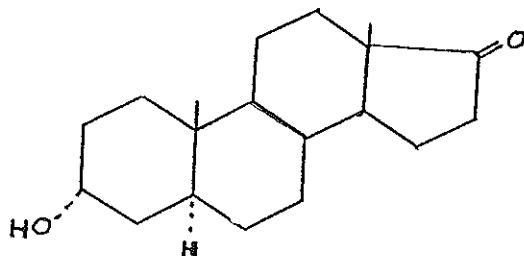
réf. Sigma A6950

9 - 5 $\alpha$  D.H.T OU DIHYDROTESTOSTERONE : 5 $\alpha$ -ANDROSTAN-17 $\beta$  OL-3 ONE

réf. Sigma A2570

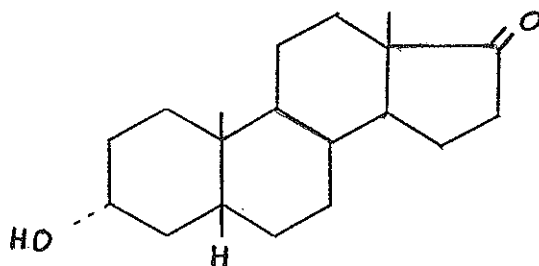


10 - ANDROSTERONE : 5 $\alpha$ -ANDROSTAN-3 $\alpha$ -OL-17-ONE



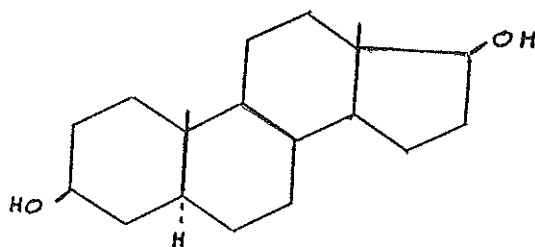
réf. Sigma A2420

11 - ETIOCHOLANOLONE : 5 $\beta$ -ANDROSTAN-3 $\alpha$ -OL-17-ONE



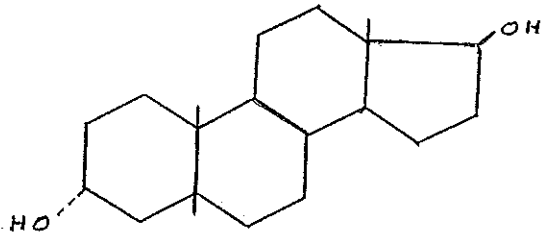
réf. A3610

12 - 5 $\alpha$ -ANDROSTANE-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -DIOL



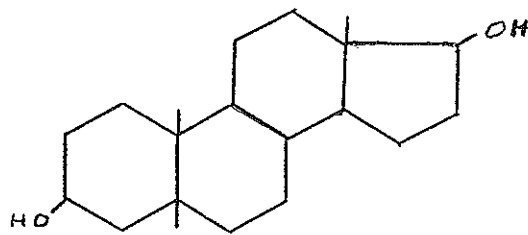
réf. Sigma A1220

13 - 5 $\beta$ -ANDROSTANE-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -DIOL (ETIOCHOLAN-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -DIOL)



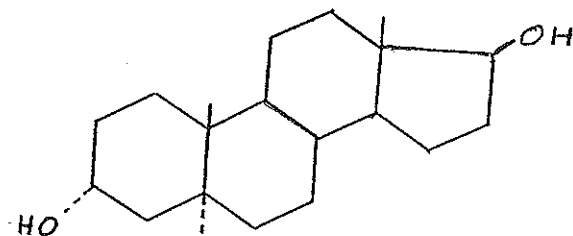
réf. Sigma A3030

14 - 5 $\beta$ -ANDROSTANE-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -DIOL (ETIOCHOLAN-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -DIOL)



réf. Sigma A3060

15 - 5 $\alpha$ -ANDROSTANE-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -DIOL-DIHYDROANDROSTERONE



réf. Sigma A1170

**Chapitre 4**  
**RESULTATS**

## I - INTRODUCTION

On sait qu'après la ménopause, la production des hormones stéroïdes par l'ovaire cesse et que seules les glandes surrénales continuent leur sécrétion.

Alors, le taux plasmatique du DHA-S est de loin le plus élevé. Il semblerait qu'il soit ensuite métabolisé par les cellules mammaires en d'autres hormones ; c'est ainsi que ces cellules modifient leur environnement hormonal.

Nous avons donc essayé, à travers notre expérimentation, de voir quels étaient les effets des métabolites de la DHA sur les cellules mammaires cancéreuses en culture.

Pour cela, nous avons considéré comme référence positive d'activité mitogénique des stéroïdes sur les cellules MCF-7, l'effet de l'œstradiol, et comme référence négative de prolifération, l'effet du Tamoxifène.

L'effet des androgènes surrénaux sur les cellules cancéreuses mammaires est étudié sur l'observation de la prolifération des cellules MCF-7 par des expériences de croissance réalisées sur une semaine avec dosage régulier de l'ADN.

## II - ANDROGENES MINEURS

### 1 - INFLUENCE DE LA DHA, DU DHA-S ET DE L'ADIOL

Pour ces manipulations, trois contrôles ont été effectués :

- cultures témoins sans effecteur mais avec 0,1 % d'éthanol car les solutions stocks ( $10^{-2}$  M) des stéroïdes étudiés sont préparées dans l'éthanol,
- témoin positif de culture en présence d'E2 ( $10^{-8}$  M),
- témoin négatif de culture en présence du Tx ( $10^{-6}$  M).

## a - CULTURE DANS SVF

La culture des cellules MCF-7 est effectuée, dans un premier temps, dans un sérum de veau foetal complet (SVF) à 5%.

On constate alors que la vitesse de prolifération des cellules témoins (sans effecteur ou avec E2) et celle des cellules cultivées en présence de DHA et DHA-S ne sont pas significativement différentes. (Fig. 7)

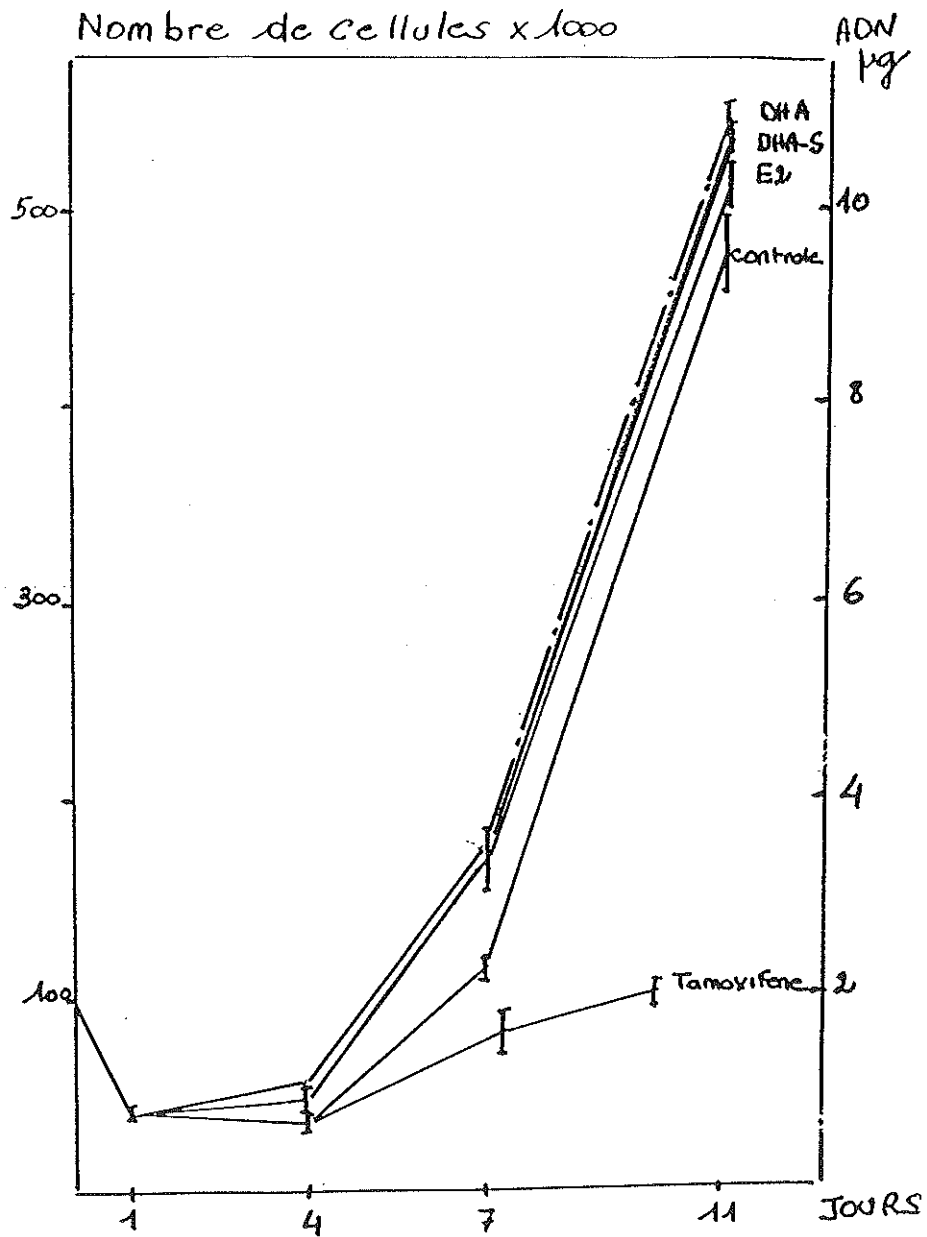


Figure 7 : Prolifération des cellules MCF-7 en présence de E2 10 nM ; du Tx 1  $\mu$ M ; de la DHA 10  $\mu$ M et du DHA-S 10  $\mu$ M dans SVF à 5 %

**b - CULTURE DANS SVF-TCD à 5%** **$\alpha$  - Prolifération cellulaire**

Le modèle d'étude établi par HABRIOUX-NAJID, 1989, propose la culture des cellules MCF-7 dans SVF déstéroïdé par traitement avec du charbon-dextran .

Les cellules sont récoltées à J<sub>1</sub>, J<sub>4</sub>, J<sub>6</sub>, et J<sub>8</sub> et pour chacune de ces récoltes cellulaires, nous ferons le dosage de l'ADN. Les résultats sont présentés sur la figure 8. Dans ces conditions de culture, on constate que l'E<sub>2</sub> stimule la croissance cellulaire.

En outre, la DHA stimule fortement la croissance cellulaire à une concentration de  $10^{-5}$  M.

Il apparaît que la DHA-S provoque la prolifération des cellules MCF-7 à cette même concentration mais la cinétique de la croissance de la DHA-S est décalée par rapport à celle de la DHA. On peut donc se demander si la DHA-S ne subit pas une transformation en DHA avant d'agir.

D'autre part, on peut observer que l'Adiol (Fig. 8) ainsi que son sulfate (Fig. 9) ont un effet mitogénique notable pour une concentration plus faible que la DHA.

En effet, le S-Adiol stimule la prolifération pour une concentration  $10^{-8}$  M (Fig. 9) et l'Adiol avec une concentration de  $10^{-7}$  M. (Fig. 8)

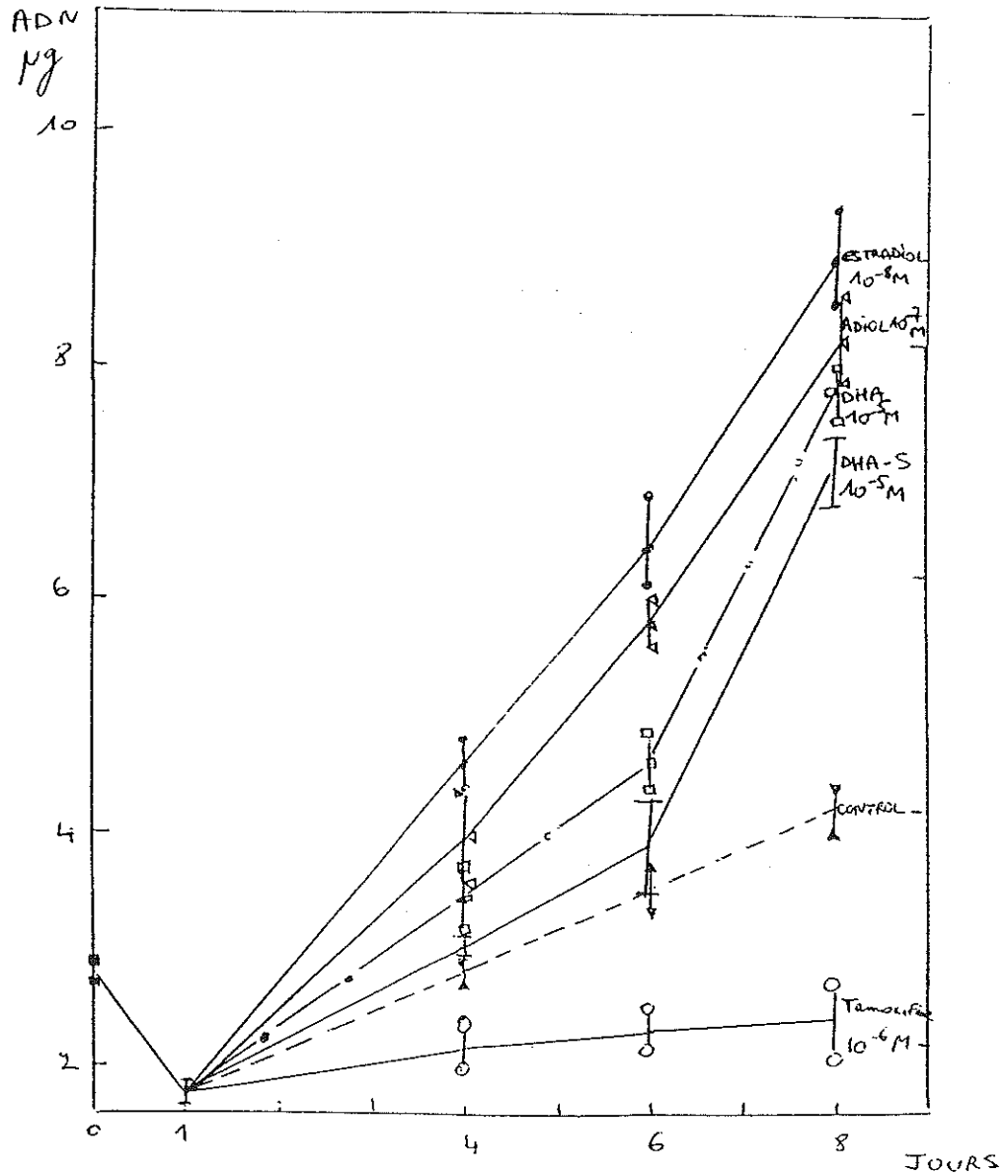


Figure 8 : Effets de E2 10 nM ( $\leftarrow$ ), de l'Adiol 0,1  $\mu M$  ( $\rightarrow$ ), de la DHA 10  $\mu M$  ( $\leftarrow$ ), du DHA-S 10  $\mu M$  ( $\rightarrow$ ) et du Tx 1  $\mu M$  ( $\leftarrow$ ) sur la prolifération des cellules MCF-7 en présence de SVF-TCD à 5 %.

$\beta$  - Temps-dépendance

	Durée du traitement (jours)		
	4	6	8
stéroïdes	% de stimulation		
E2	147	154	188
Adiol	100	117	156
DHA	53	158	141
DHA-S	27	21	116

**Tableau II : Comparaison des pourcentages de stimulation de la prolifération des cellules**

**MCF-7 par rapport aux cultures témoins en fonction de la durée du traitement.**

**Ces pourcentages sont calculés à partir des valeurs moyennes de la figure 8.**

De plus, nous pouvons constater que la multiplication cellulaire se fait de façon dépendante du temps, l'effet mitogénique étant plus marqué quand le temps de contact des cellules avec ces effecteurs est plus long.

La DHA et son ester sulfate provoquent une stimulation moindre par rapport à celle de l'E2 et à l'Adiol jusqu'au sixième jour mais après, la prolifération est plus rapide.

Peut-être, pouvons nous suggérer que la DHA est métabolisée en Adiol puisqu'on a vu qu'il y avait une augmentation de l'activité de la 17  $\beta$  HSD.

Selon ces résultats, on peut établir une hiérarchie des 4 stéroïdes selon leur pouvoir mitogénique vis-à-vis des cellules MCF-7 dans nos conditions de culture :

$$E2 > Adiol > DHA > DHA-S$$



On note aussi la stimulation de la prolifération cellulaire par S-Adiol après neuf jours d'un facteur 3 à la concentration  $10^{-8}$  M et d'un facteur 3,6 au taux  $10^{-7}$  M. (Fig. 9)

Mais l'effet observé avec S-Adiol est beaucoup plus tardif. Il n'apparaît qu'après 8 jours de contact alors que la concentration d'Adiol nécessaire pour l'obtention du même effet est  $0,1 \mu\text{M}$  et apparaît après 4 jours de culture.

Ces différences suggèrent que, comme pour la DHA et son sulfate, l'activité de ce S-Adiol est liée à son hydrolyse en Adiol.

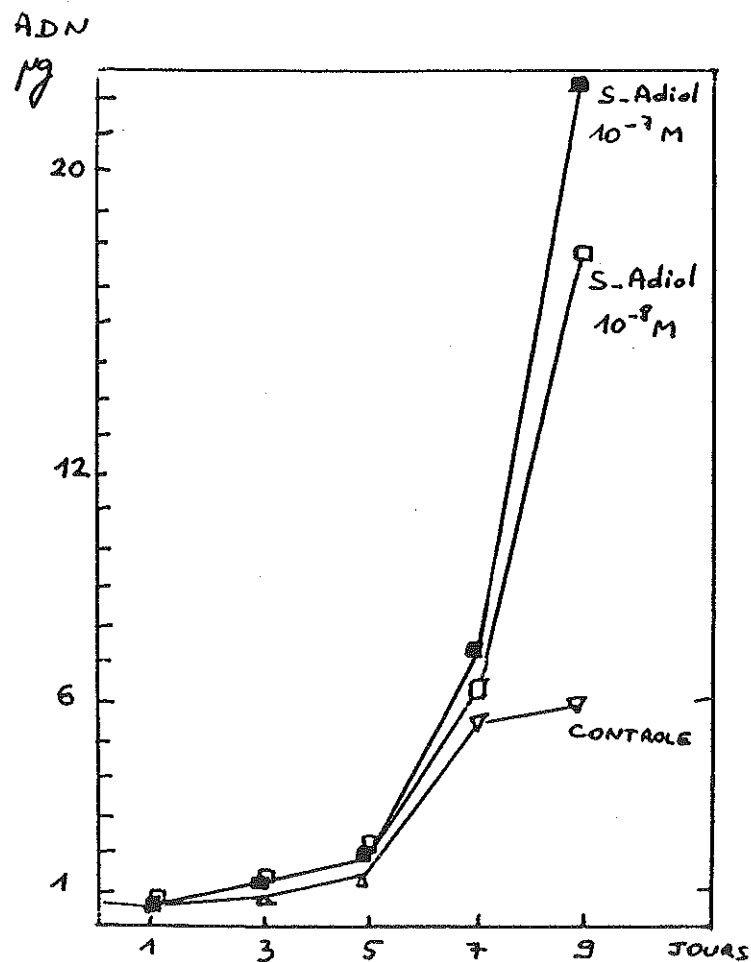


Figure 9 : Effets du sulfate  $3\beta$  d'Adiol (S-Adiol) sur la croissance des cellules MCF-7 en culture depuis 3 passages en présence de 5 % de SVF-TCD.

## 2 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE CES STEROIDES SUR LA CROISSANCE DES CELLULES MCF-7

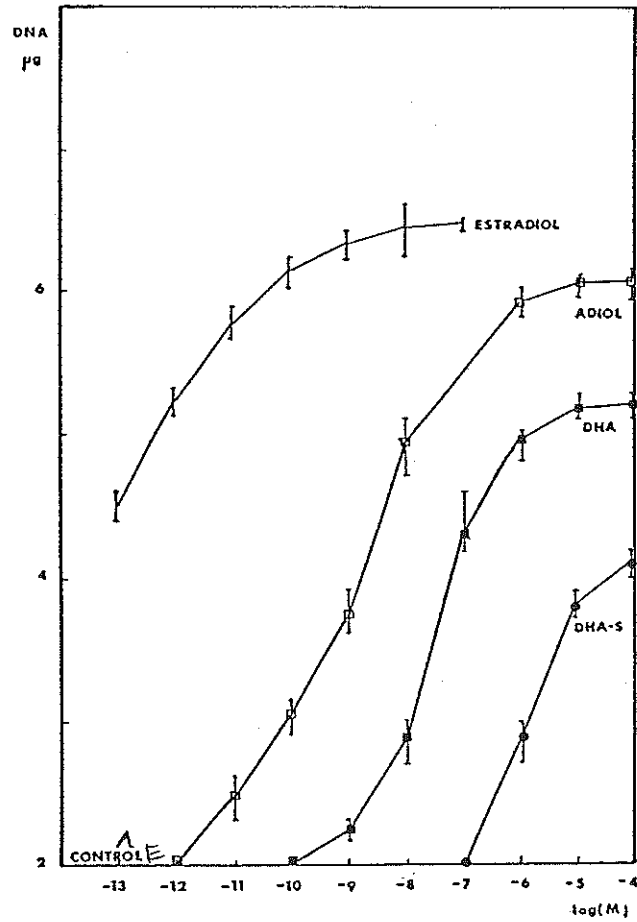


Figure 10 : Réponse des cellules MCF-7 à des concentrations croissantes d'androgènes surrénaliens en présence de 5 % de SVF-TCD.

Les cellules sontensemencées en présence de quatre stéroïdes E2, Adiol, DHA, DHA-S à différentes concentrations. On récupère les cellules au huitième jour, puis on fait le dosage de l'ADN. Les résultats obtenus sont représentés figure 10.

Les concentrations nécessaires pour un effet mitogénique optimal sont :

- E2 : concentrations comprises entre  $10^{-9}$  et  $10^{-7}$  M ;
- Adiol :  $10^{-7}$  et  $10^{-5}$  M ;
- DHA :  $10^{-5}$  M ;
- DHA-S :  $10^{-5}$  -  $10^{-4}$  M.

Nous effectuerons donc nos expérimentations ultérieures avec :

$$[ E2 ] = 10\text{nM soit } 10^{-8} \text{ M}$$

$$[ \text{Adiol} ] = 0,1 \mu\text{M soit } 10^{-7} \text{ M}$$

$$[ \text{DHA} ] = [ \text{DHA-S} ] = 10^{-5} \text{ M}$$

Nous ne l'avons pas figuré sur ce tracé, mais pour des concentrations en E2 supérieures à  $10^{-6}$  M, on note un effet inhibiteur. (RAYNAUD & OJASOO, 1986)

### 3 - CONCLUSION.

Dans nos conditions opératoires définies ci-dessus, nous avons montré d'une part l'effet mitogénique sur les cellules cancéreuses mammaires en culture des androgènes dits mineurs tels que l'Adiol et la DHA ainsi que leur sulfate respectif et ce par comparaison avec l'effet mitogénique de l'E2.

Cet effet mitogénique des androgènes est temps et dose dépendant.

De plus, on peut se demander si la stimulation de la prolifération cellulaire induite par le S-DHA et le S-Adiol ne serait pas liée à leur hydrolyse respective en DHA et Adiol et ce grâce à l'action de la sulfatase dont on a vu que l'activité est augmentée dans les tumeurs mammaires.

### III - ANDROGENES MAJEURS

#### 1 - TESTOSTERONE (figure 11)

La Testostérone a été étudiée à deux concentrations différentes : 10 nM ( $10^{-8}$  M) et 0,1  $\mu$ M ( $10^{-7}$  M). (Fig. 11)

A  $10^{-8}$  M, la Testostérone est sans effet significatif sur la croissance cellulaire alors qu'on peut noter une nette inhibition (environ 30%) de cette prolifération à une concentration plus élevée ( $10^{-5}$  M).

#### 2 - $5\alpha$ DHT (figure 12)

La  $5\alpha$  DHT est l'hormone active responsable de l'effet androgénique chez l'homme à partir de la testostérone par l'action de la  $5\alpha$  réductase et ce, de façon intracellulaire.

Cet androgène stimule la prolifération des cellules MCF-7 en culture aux concentrations  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M.

Par contre, à  $10^{-5}$  M, la  $5\alpha$  DHT inhibe la croissance cellulaire.

#### 3 - $\Delta 4$ (figure 13)

L'étude a été faite avec trois concentrations différentes de  $\Delta 4$  :  $10^{-9}$  M,  $10^{-7}$  M et  $10^{-6}$  M et ce, sur une période de 9 jours.

On note une inhibition dès le sixième jour de culture sur les cellules cancéreuses mammaires. Celle-ci est d'autant plus nette que le contact avec les cellules MCF-7 est plus long et que la concentration est plus élevée.

En effet, après 9 jours de traitement, les pourcentages d'inhibition de la croissance des cellules MCF-7 obtenus avec ces 3 concentrations sont respectivement : 20 %, 45 % et 79 %.

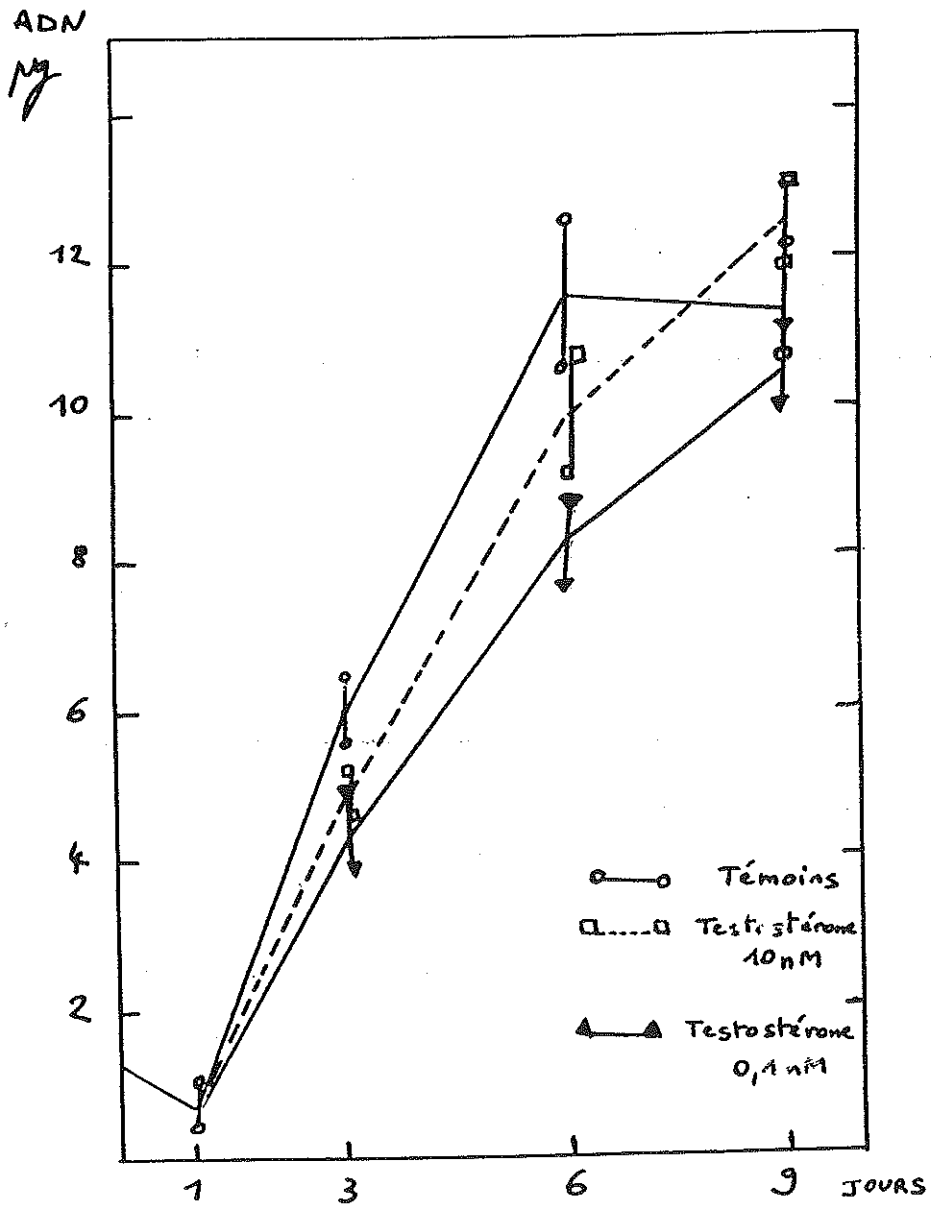


Figure 11 : Effet de la Testostérone sur la prolifération des cellules MCF-7 en culture dans SVF-TCD à 5 %.

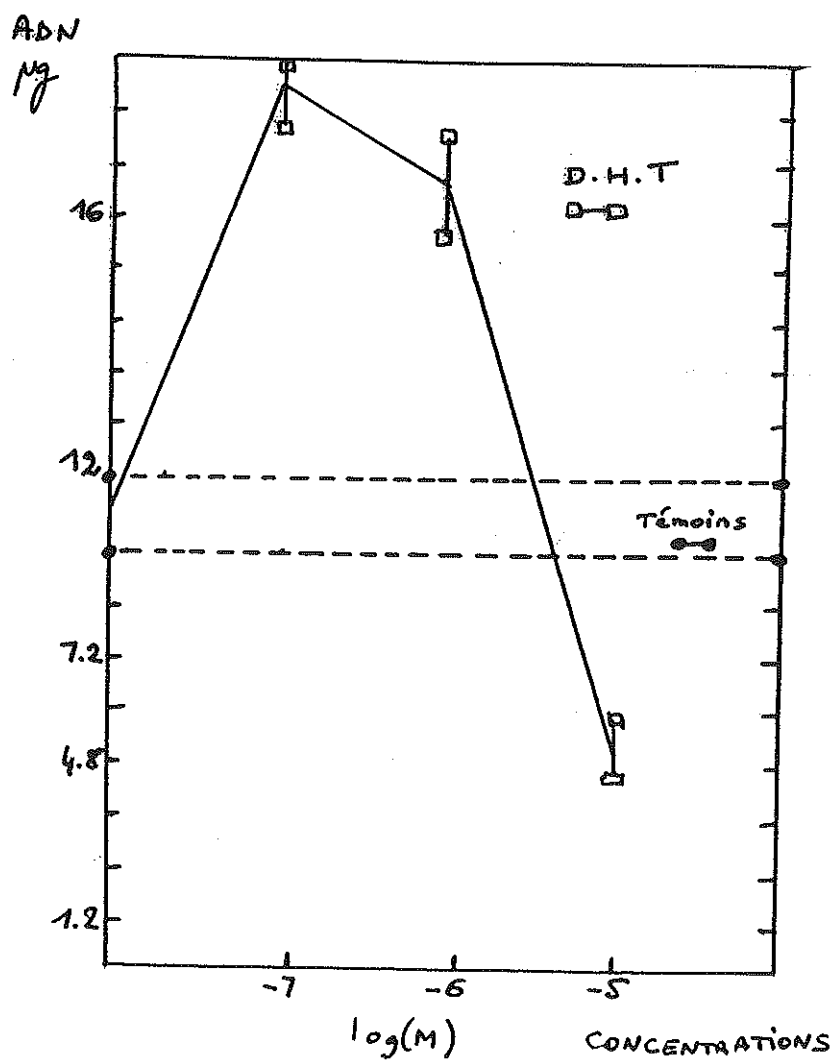
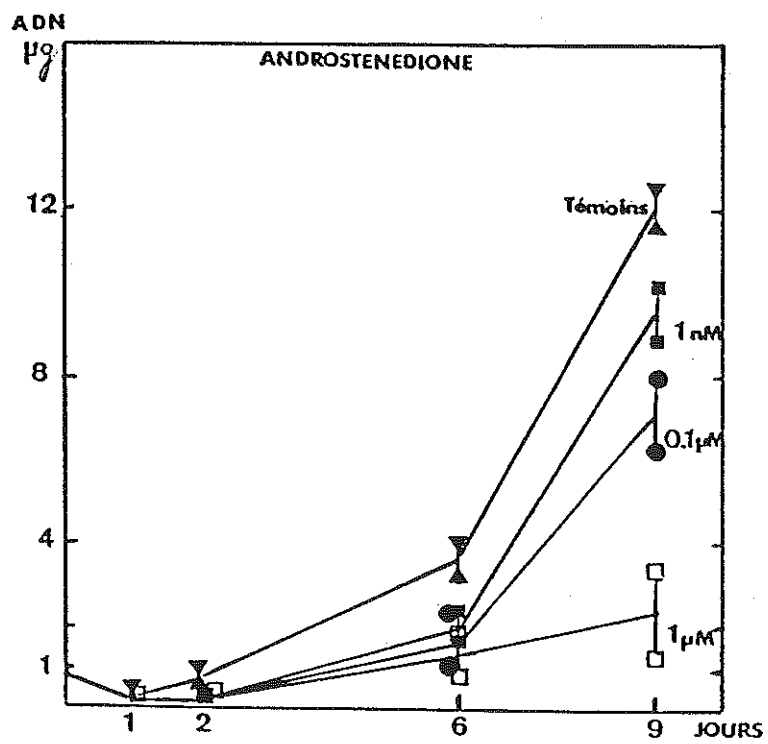


Figure 12 : Effet de la  $5\alpha$  DHT sur les cellules MCF-7 dans SVF-TCD à 5%.



courbe time-dépendant  
dose-dépendant

Figure 13 : Effet de la  $\Delta 4$  sur la croissance des cellules MCF-7 dans SVF-TCD à 5%.

#### IV - METABOLITES

##### 1 - DERIVES CETONIQUES = METABOLITES OXYDES EN 17 (Figure 14)

Ces molécules sont deux épimères différents de par leur configuration spatiale.

###### - Androstérone

- OH en C3 en position  $\alpha$
- H en C5 en  $\alpha$  = position trans par rapport à C19

###### - Etiocholanolone

- OH en C3 en position  $\alpha$
- H en C5 en  $\beta$  = position cis par rapport à C19

Les résultats sont montrés sur la figure 14.

Pour des concentrations comprises entre  $10^{-8}$  et  $10^{-6}$  M, ces deux molécules sont sans effet sur la croissance des cellules MCF-7 en culture.

Par contre, on observe une inhibition pour un taux de  $10^{-5}$  M pour ces dérivés cétoniques.

La configuration spatiale de ces molécules à cycle saturé ne semble donc pas influencer sur la croissance cellulaire.



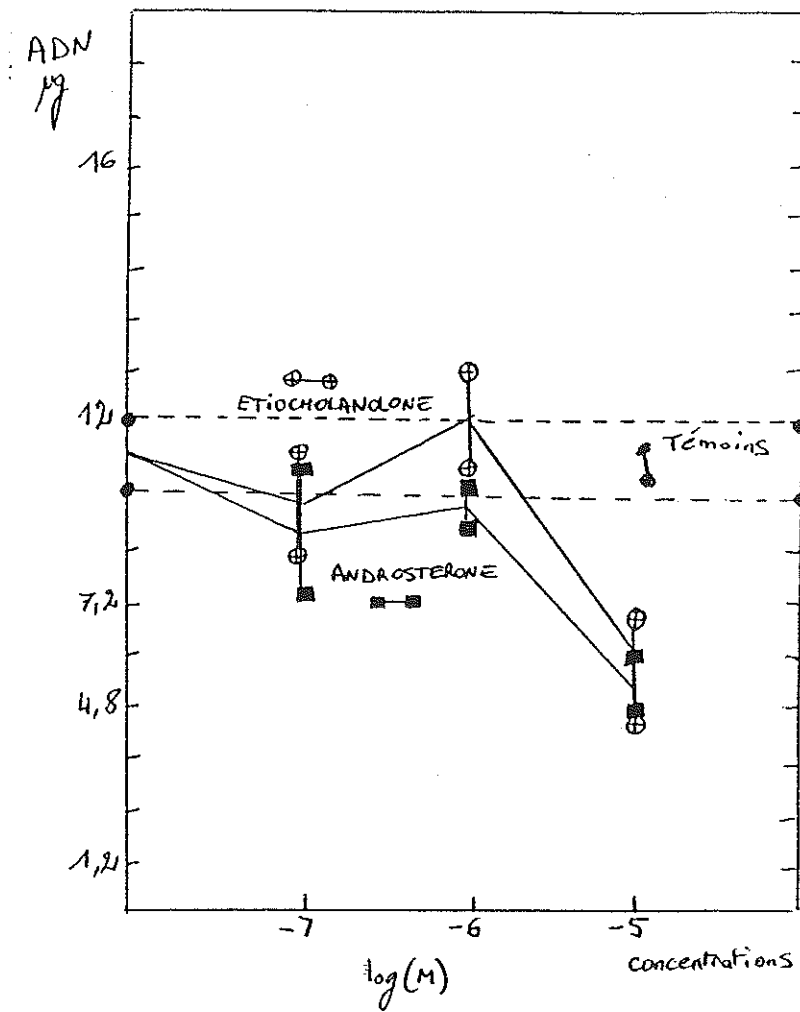


Figure 14 : Effet de l'Androsténone et de l'Etiocholanolone sur la prolifération des cellules MCF-7 mises en culture dans SVF-TCD à 5%.

## 2 - DERIVES DIHYDROXYLES : METABOLITES REDUITS EN 17

Ce sont les quatre composés de la famille des Androstanes-17  $\beta$  diol qui ne diffèrent que par leur configuration en C3-C5.

### a - Dose-dépendance (figure 15)

**A** : 5 $\alpha$  Androstane 3 $\beta$ , 17 $\beta$  diol

**B** : 5 $\beta$  Androstane 3 $\alpha$ , 17 $\beta$  diol

**C** : 5 $\beta$  Androstane 3 $\beta$ , 17 $\beta$  diol

**D** : 5 $\alpha$  Androstane 3 $\alpha$ , 17 $\beta$  diol

On considère trois concentrations différentes :  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M. Pour chacun, on récupère les cellules après 8 jours de culture. Il s'avère que tous ont un effet mitogénique.

Aux concentrations  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M, la stimulation de la prolifération cellulaire est importante surtout pour le 5 $\alpha$  androstane - 3 $\beta$  17 $\beta$  diol.

Par contre, à la plus forte concentration ( $10^{-5}$  M), l'effet mitogénique disparaît pour ces quatre stéroïdes.

### b - Temps-dépendance (Fig. 16)

L'étude s'est étalée sur 8 jours avec récupération et comptage des cellules en culture à J4, J6 et J8. Pour chaque androstane diol étudié, la concentration choisie est  $10^{-6}$  M.

La stimulation de la croissance cellulaire est observable à partir du quatrième jour. Elle augmente avec la durée du traitement.

Les résultats obtenus confirment ceux de l'étude dose-dépendance avec un effet moindre

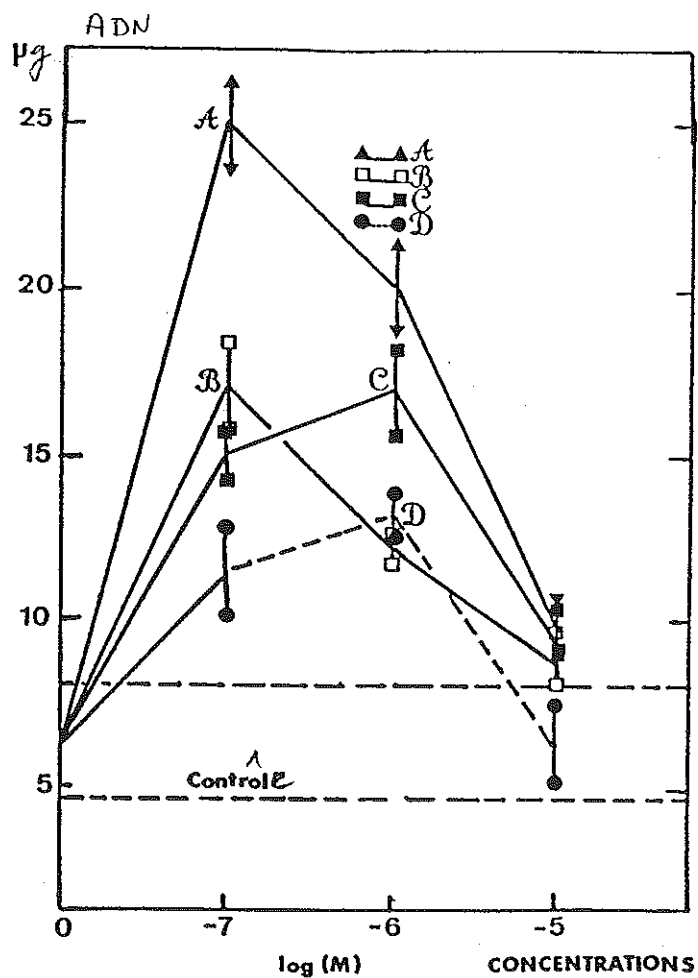
pour le 5 $\alpha$ -androstane 3 $\alpha$ , 17 $\beta$  diol (stimulation qu'à partir du sixième jour), alors que le 5 $\alpha$ -androstane 3 $\beta$ , 17 $\beta$  diol semble être l'épimère le plus nettement mitogénique et ce dès le quatrième jour de contact.

Le 5 $\beta$ -androstane 3 $\alpha$ , 17 $\beta$  diol et le 5 $\beta$ -androstane 3 $\beta$ , 17 $\beta$  diol stimulent la prolifération cellulaire de façon sensiblement identique que ce soit dose ou temps dépendant avec une réponse notable dès le quatrième jour à 10<sup>-6</sup> M croissant jusqu'au huitième jour, et une réponse optimale à la concentration 10<sup>-7</sup> M.

### c - Conclusion

Si ces quatre isomères stimulent la croissance des cellules MCF-7 dans nos conditions de culture, l'intensité de cette stimulation est néanmoins fonction, semble-t-il, de leur stéréochimie.

On constate que pour les deux isomères de la série 5 $\alpha$ -androstane 17 $\beta$  diol, seul le 3 $\beta$  a un effet mitogénique net. Ceci tend donc à prouver que le -OH en 3 $\beta$  est nécessaire pour qu'un stéroïde soit mitogénique. Mais il apparaît que ce ne soit pas une condition suffisante puisque l'isomère de la série 5 $\beta$  ayant un -OH en 3 $\beta$  a des effets mitogéniques similaires à l'épimère de cette même série mais avec le -OH en position 3 $\alpha$ .



Courbe dose-dépendance à J8

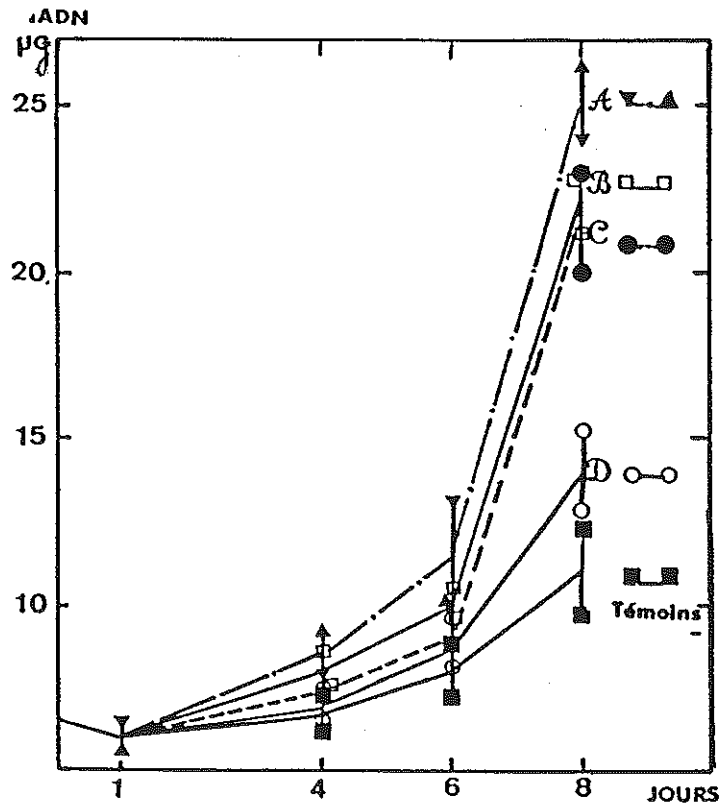
$\mathcal{A}$  = 5 $\alpha$  androstane 3 $\beta$ , 17 $\beta$  diol

$\mathcal{B}$  = 5 $\beta$  androstane 3 $\alpha$ , 17 $\beta$  diol

$\mathcal{C}$  = 5 $\beta$  androstane 3 $\beta$ , 17 $\beta$  diol

$\mathcal{D}$  = 5 $\alpha$  androstane 3 $\alpha$ , 17 $\beta$  diol

Figure 15 : Effet des 4 Androstane-17 $\beta$  diol sur la prolifération des cellules MCF-7 dans SVF-TCD à 5% en fonction des concentrations. Au 8ème jour, les cellules sont récoltées, comptées et leur contenu en ADN est évalué.



Courbe temps-dépendance à  $1 \mu\text{M}$  ( $10^{-6} \text{ M}$ )

Figure 16 : Effet des 4 Androstane- $17\beta$  diol sur la croissance des cellules MCF-7 dans SVF-TCD à 5% en fonction du temps et à une concentration de  $10^{-6} \text{ M}$ .

**Chapitre 6**  
**DISCUSSION**

# I - EFFET MITOGENIQUE DES ANDROGENES PAR RAPPORT A L'EFFET MITOGENIQUE DE L'E2

## 1 - ANDROGENES MINEURS

Après la mise au point des conditions opératoires nécessaires à l'obtention d'une réponse reproductible et proportionnelle des cellules MCF-7 à la stimulation de l'E2, nous avons comparé l'effet des androgènes surrénaliens sur ces mêmes cellules hormonodépendantes et dans les mêmes conditions expérimentales. Nous pouvons alors admettre que les androgènes mineurs ont un effet mitogénique sur la croissance des cellules MCF-7.

Excepté pour la DHA, les concentrations des stéroïdes qui stimulent de 50% la prolifération des cellules MCF-7, dans nos conditions de culture, sont voisines des taux plasmatiques chez les femmes ménopausées (tableau III).

**Tableau III : Comparaison des taux plasmatiques (nM) chez la femme préménopausée et postménopausée avec les doses stimulant de 50% la prolifération des cellules MCF-7.**

Stéroïdes	S50 (nM)	Préménopause	Ménopause
DHA	500	7-30 <sup>a</sup>	5,2 <sup>b</sup>
DHA-S	1000	2560-12804 <sup>c,d</sup>	240-1900 <sup>c,d</sup>
Adiol	1	2,07-3,1 <sup>e,f</sup>	1,14 <sup>b</sup>
estradiol	0,001	0,15-1,47 <sup>e</sup>	0,037 <sup>e</sup>

a (HABRIOUX, 1983)

b (ADAMS & al., 1981)

c (ALEXIEVA-FIGUSH & al., 1987)

d (LAGRELIUS & al., 1988)

e (POORTMAN & al., 1985)

f (HABRIOUX & al., 1978)

La concentration active du DHA-S sur les cellules MCF-7 se situe dans la fourchette des valeurs plasmatiques physiologiques de la femme ménopausée. De plus, elle est identique à celle qui induit la synthèse de la protéine 46 K par les cellules MCF-7 (ADAMS & al., 1981).

L'ensemble de ces résultats montre l'importance du DHA-S, au moins dans le maintien des cancers mammaires chez les femmes ménopausées, voire même dans leur genèse.

Selon nos expérimentations, la DHA présente une réponse maximale pour une concentration de  $10^{-5}$  M mais, bien que dans une proportion moindre, elle stimule aussi la croissance des cellules MCF-7 à la concentration physiologique  $5.10^{-7}$  M.(fig. 10)

D'autre part, il faut tenir compte du fait que la DHA est retrouvée en quantité plus élevée au niveau de la tumeur et du liquide kystique et est alors supérieure à son taux plasmatique (BONNEY & al., 1984).

La concentration de l'Adiol utilisée dans notre expérimentation pour stimuler de 50% la croissance des cellules MCF-7 est voisine du taux plasmatique chez la femme ménopausée. Mais elle est 100 fois inférieure à celle qui stimule l'incorporation de la thymidine tritiée dans les cellules MCF-7 (KREITMAN & BAYARD, 1979) et elle est aussi deux fois plus faible que celle qui induit la synthèse de la protéine 46 K par les cellules MCF-7 (ADAMS & al., 1981).

En effet, ADAMS & al., ont étudié la possibilité pour la DHA et l'Adiol d'induire la synthèse par les cellules MCF-7 d'une glycoprotéine œstrogène-dépendante (M.W 4600). Les concentrations requises pour l'induction de 50% de la prolifération sont 2 nM pour Adiol, 500 nM pour la DHA et 1  $\mu$ M pour DHA-S. (ADAMS & al., 1981)

L'induction par l'Adiol est inchangée en présence d'un inhibiteur de l'aromatase. Cela laisse donc penser que cet effet œstrogène-dépendant est lié à l'affinité de l'Adiol pour le Récepteur aux Estrogènes (RE).

De plus, l'Adiol stimule la sécrétion de LH induite par LH-RH ainsi que celle de la prolactine et celle de l'hormone de croissance. Cet effet stimulateur de l'Adiol sur la sécrétion de ces hormones hypophysaires est antagonisé par un antioestrogène.



En outre, dans les cellules MCF-7, l'Adiol favorise la synthèse de la glycoprotéine 52K œstrogéno-dépendante et stimule la synthèse du Récepteur à la Progestérone (R.P.) (ROCHEFORT & GARCIA, 1984).

L'amplitude des réponses biologiques induites par l'Adiol est voisine de celle de l'E2.

Le rôle œstrogénique de l'Adiol pourrait être particulièrement important chez les femmes ménopausées chez lesquelles la concentration plasmatique de ce stéroïde est 12 à 24 fois plus élevée que celle de l'E2, tandis que l'affinité de ces deux stéroïdes pour le R.E. est identique (ADAMS, 1985).

L'ensemble de ces résultats montre donc l'importance du DHA-S, de la DHA et de l'Adiol, au moins dans le maintien des cancers mammaires chez les femmes ménopausées.

On a pu établir un classement de ces 4 stéroïdes selon l'intensité de leur effet mitogénique.

E2 > Adiol > DHA > DHA-S

## 2 - ANDROGENES MAJEURS

### a - Testostérone et DHT

Dès 1959, HUGGINS & al. avaient observé que la DHT, à fortes doses, stimule la croissance des tumeurs mammaires alors qu'à des doses modérées, elle atténue l'effet des estrogènes sur la prolifération cellulaire. Il semblerait que l'effet obtenu avec de faibles doses s'effectue via le Récepteur aux Androgènes (R.A.) comme le suggère son antagonisation par un anti-androgène (SCHMIDT, 1979).

Il a été montré que la T. et la D.H.T. à forte concentration (10 nM) s'opposent à la synthèse du Récepteur à la Progestérone dans les cellules MCF-7. (MAC INDË & al; 1981)

Par contre, l'action œstrogénique peut s'effectuer par l'aromatisation des androgènes en estrogènes ou par un effet direct via le R.E. (MAC INDË, 1981).

Il a aussi été proposé que la DHT et la T, à fortes doses, puissent augmenter le taux d'E2 libre au niveau des cellules cibles en déplaçant l'E2 de sa protéine de transport SHBG, forme sous laquelle elle est inactive (SÛTERI, 1979).

Cependant, comme nous l'avons indiqué dans le tableau I, les concentrations physiologiques chez la femme ménopausée sont :

- pour la Testostérone :  $\approx 1$  nM
- pour la D.H.T :  $\approx 0,3$  nM

Ce sont des concentrations auxquelles la T. et la D.H.T. sont sans effet sur la prolifération cellulaire.

La dose minimale pour laquelle nous avons obtenu une stimulation de cette croissance par la 5 $\alpha$  DHT (1  $\mu$ M) est donc 3000 fois supérieure au taux physiologique.

LIPPMAN & al., (1976), ont eux-aussi obtenu une stimulation de l'incorporation de la thymidine tritiée dans les cellules MCF-7 par la 5 $\alpha$  DHT à 1  $\mu$ M. A cette concentration, cet

androgène peut se lier aux R.E., entraîner la translocation du complexe RE-(5 $\alpha$ -DHT) dans les noyaux des cellules MCF-7 et stimuler ensuite l'induction de la synthèse des R.P. (ZAVA & MC GUIRE, 1978). La 5 $\alpha$ -DHT (tout comme l'androstérone et le 5 $\alpha$ -androstanedione) inhibe alors de 90% l'activité aromatasique des cellules MCF-7 en culture (MAC INDCE & al., 1982 ; PEREL & al., 1984 et 1988).

Par contre, cette stimulation de la croissance des cellules MCF-7 n'a pas lieu aux concentrations physiologiques de la 5 $\alpha$  DHT, concentrations auxquelles cet androgène a des effets anticœstrogéniques, au niveau de la synthèse des R.E et de l'induction des R.P, de 10 pM à 10 nM (MAC INDCE & ETRE, 1980 et 1981 ; STOVER & al., 1987).

En résumé, la 5 $\alpha$ -DHT se fixerait aux faibles concentrations (physiologiques) sur les R.A. et le complexe RA-(5 $\alpha$ -DHT) inhiberait la synthèse des R.E. et empêcherait l'induction par l'E2 des R.P. (MAC INDCE & ETRE, 1980 et 1981 ; STOVER & al., 1987), alors qu'aux concentrations expérimentales (1  $\mu$ M), cet androgène se fixerait sur les R.E. et entraînerait leur translocation dans les noyaux, d'où les effets œstrogéniques observés à ces doses.

#### **b - $\Delta$ 4 ou Adione**

L'inhibition de la prolifération des cellules MCF-7 par l'Adione à des concentrations physiologiques est très étonnante (Fig. 13). Mais nous nous sommes assurés de la reproductibilité de ces résultats. Ainsi, après 9 jours de traitement, les pourcentages d'inhibition de la croissance des cellules MCF-7 obtenus avec des concentrations de 1 nM, 0,1  $\mu$ M et 1  $\mu$ M sont respectivement : 20 %, 42 % et 79 %.

Par contre, l'effet de la durée du traitement n'est visible qu'avec la plus forte concentration. En effet, si l'on compare les pourcentages d'inhibition pour chacune des trois concentrations, obtenus après 9 jours de traitement et calculés à partir de la figure 13, on ne constate pas d'augmentation pour les deux plus faibles concentrations d'Adione. (Tableau IV)

Concentrations d'Adione	% d'inhibition après	
	6 jours	9 jours
1,0 nM	50	20
0,1 $\mu$ M	62	42
1 $\mu$ M	75	79

**Tableau IV : Pourcentages d'inhibition de la prolifération des cellules MCF-7 par l'Adione après 6 j. et 9 j. de culture.**

D'autre part, il a été mis en évidence la multiplication par 3 de la concentration de cet androgène suite à un traitement de 6 mois par l'Aminogluthétimide de patientes atteintes de cancer mammaires (BRUNING & al., 1989).

Cet inhibiteur de l'aromatase permet une accumulation de l'Adione, empêchant sa transformation en estrone et donc en estradiol. Peut-être que comme l'estrone (JOZAN & al., 1979, 1981, 1985), l'Adione serait un antagoniste naturel de la croissance cellulaire.

### c - Conclusion

L'ensemble de ces études sur les effets biologiques des androgènes sur les cellules MCF-7 nous permet de les classer en 4 catégories :

#### 1- androgènes stimulant la croissance :

- . Adiol et son sulfate
- . DHA et son sulfate
- . Les 4 androstanes-17  $\beta$  diol

#### 2- androgènes inhibiteurs de la prolifération : Adione

3- androgènes à la fois stimulants et inhibiteurs de la croissance des cellules MCF-7 selon la concentration utilisée : D.H.T.

4- Androgènes sans effet sur la prolifération :

- . Testostérone
- . Androstérone
- . Etiocholanolone

## II - PROBLEME DES SULFOCONJUGUES

L'analyse du liquide du kyste mammaire montre des taux de DHA et DHA-S très supérieurs aux taux plasmatiques (INAUDI & al., 1987 ; BOCCARDO & al., 1988). Et, au niveau de la tumeur, BONNEY & al., (1984) ont noté une élévation significative des concentrations de la DHA et de l'Adiol alors que celle de la DHA-S reste inchangée. Ceci laisse donc supposer qu'il y a une augmentation de l'activité de la DHA-S sulfatase. Et MAC INDIE (1988) a montré que le DHA-S peut être transformé en DHA libre.

**Tableau V : Comparaison des pourcentages de stimulation de la prolifération des cellules MCF-7 par rapport aux cultures témoins en fonction de la durée du traitement. Ces pourcentages sont calculés à partir des valeurs moyennes de la figure 8.**

	Durée du traitement (jours)		
	4	6	8
stéroïdes	pourcentages de stimulation		
E2	147	154	188
Adiol	100	117	156
DHA	53	158	141
DHA-S	27	21	116

De plus, les cellules MCF-7 ont une activité DHA-sulfotransférase (ROZHIN & al., 1986). C'est ainsi que la DHA et l'Adiol peuvent être sulfoconjugués en DHA-S et en Adiol-S (ADAMS & al, 1981).

L'hydrolyse de la DHA-S par la DHA-sulfatase conduit aussi à l'Adiol après réduction de la DHA par la 17-CSR ou 17  $\beta$  HSD. Cet enzyme est associé à la présence du RE et serait progestérone-induite alors que la DHA-S sulfatase serait progestérone-indépendante (PROST & al., 1984).

La stimulation de la prolifération des cellules MCF-7 est notable pour E2 et Adiol (dont la cinétique de croissance est très comparable) dès le 4ème jour, alors que celle provoquée par la DHA n'apparaît qu'à partir du 6ème jour et celle de la DHA-S à partir du 8ème jour.

De même, l'effet mitogénique du S-Adiol, qui n'apparaît pas dans ce tableau, n'est observé qu'à partir du 8ème jour (figure 9).

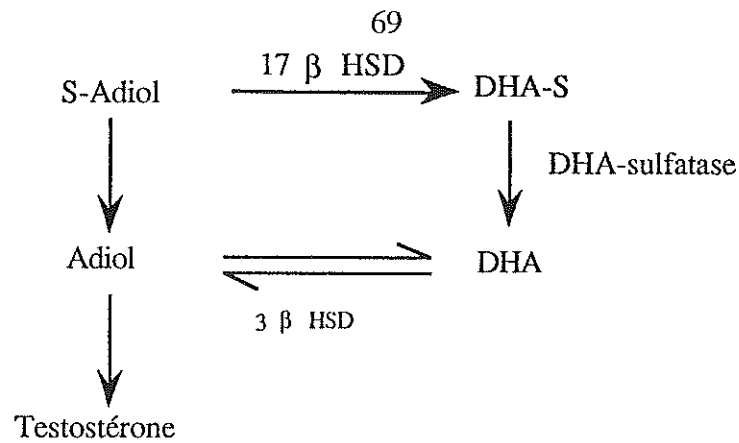
Ces résultats permettent d'émettre les hypothèses suivantes :

- pour que la DHA-S et le S-Adiol soient actifs, il faut qu'il y ait hydrolyse respectivement en DHA et Adiol en présence d'une sulfatase ;

- l'amplitude des réponses biologiques induites par l'Adiol est très voisine de celle provoquée par l'E2. Ceci est d'autant plus important que la concentration plasmatique d'Adiol est 12 à 24 fois plus élevée que celle de l'E2 chez les femmes ménopausées alors que l'affinité de ces 2 stéroïdes pour le RE est identique (ADAMS, 1985) ;

- transformation de la DHA en Adiol : sous l'action de l'enzyme 17  $\beta$  HSD, la DHA est transformée en Adiol.

L'hydrolyse du DHA-S par la DHA sulfatase conduit aussi à l'Adiol après réduction de la DHA par la 17  $\beta$  HSD.



D'autre part, dans les tumeurs mammaires humaines, l'Adiol et la DHA inhibent l'activité de la sulfotransférase qui est responsable de la conversion de l'E2 en E2-sulfate (ADAMS & al.). Dans l'endomètre humain, l'Adiol et son précurseur, le DHA-S, diminuent l'activité de la 17  $\beta$  HSD, empêchant ainsi la transformation de E2 en E1 (œstrogène moins actif) (BONNEY & al., 1984).

Ces deux effets des stéroïdes C19- $\Delta$ 5 (DHA et Adiol) ont pour conséquence d'augmenter la concentration de l'E2 libre et donc de potentialiser son activité en inhibant son catabolisme.

Il faut aussi tenir compte de la concentration plasmatique très élevée d'estrone-sulfate (420 pg/ml) (SANTEN & al., 1982) surtout chez la femme postménopausée présentant un cancer du sein.

Cet estrone-sulfate est ensuite transformé en estrone par action de l'estrone-sulfatase et celui-ci pourrait exercer un effet estrogénique sur la synthèse des protéines après transformation en E2 (GELLY & al., 1987).

### III - AROMATASE

Avant la ménopause, la principale source d'E2 est l'ovaire. Dans l'ovaire, l'aromatase catalyse la conversion de l'Adione en estrone et la T. en E2 ; l'activité de celle-ci étant régulée par FSH.

Mais après la ménopause, les ovaires ne produisent qu'en très faible quantité l'Adiol et l'E2 et les estrogènes proviennent principalement de l'aromatation extragonadique à partir de précurseurs surrenaliens.

Ainsi, on retrouve une activité aromatasique dans de nombreux tissus extragonadiques mais avec une prédominance au niveau du tissu adipeux, du foie et des muscles (LONGCOPE & al., 1982).

L'Adione, principal précurseur, est sécrétée par les surrénales à un taux d'environ 1000 µg/j. In vivo, son taux d'aromatation en estrone peut varier de 0,5 à presque 10 % chez la femme postménopausée. Puis E1 est converti en E2 par l'enzyme 17 β HSD dans les tissus périphériques.

Cela pourrait expliquer pourquoi la concentration en E2 est plus élevée dans les tissus cibles que dans le plasma et que le taux d'E1 plasmatique est supérieur à celui de E2.

Par contre, le taux de T produite par la surrénale et sa conversion périphérique en E2 est négligeable.

D'autre part, l'ensemble de nos résultats montre l'importance de la DHA, du DHA-S et de l'Adiol sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires. Les différences entre les concentrations actives de ces stéroïdes sur les cellules MCF-7 ainsi que la comparaison de la cinétique d'action de ces stéroïdes par rapport à celle de l'E2 montre que l'Adiol stimule la croissance aussi rapidement que l'E2, par contre la DHA et le DHA-S stimulent l'incorporation de la thymidine tritiée beaucoup plus tardivement.

Cela suggère donc que la DHA et la DHA-S agiraient sur la prolifération des cellules



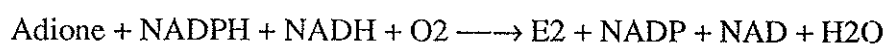
MCF-7 après leur transformation en Adiol et/ou en E2 par action de l'aromatase.

Le tissu adipeux est un site important pour la biosynthèse de E2 et plus particulièrement chez la femme ménopausée, de telle sorte que cette activité périphérique contribue significativement au taux de l'E2 circulant (GRODIN & al., 1973). D'autant plus que, par rapport aux autres glandes, le sein possède un tissu adipeux abondant. Ceci est plus marqué chez les femmes âgées, puisque le taux de tissu adipeux du tissu glandulaire augmente avec l'âge (PRESCHEL, 1979).

Une observation importante était que, en dépit d'une grande variation de niveau de l'activité aromatasique entre les différents spécimens du tissu adipeux, l'activité est significativement plus élevée dans les tissus obtenus à partir de femmes porteuses d'un cancer du sein (82%) comparé à ceux des femmes possédant les lésions bénignes (50%) (O'NEILL & MILLER,).

Sachant que la DHA était concentrée au niveau du tissu adipeux mammaire, on s'est donc demandé si la DHA ne pouvait pas être aromatisée en E2.

Ainsi, en incubant la DHA tritiée, in vitro, avec 6 tumeurs mammaires, ABUL-HAJI en 1975, a pu obtenir sa transformation en 17  $\beta$ -E2 par seulement 3 d'entre elles. Les cellules MCF-7 possèdent une aromatase qui catalyse la transformation des androgènes en E2, notamment Adione et Testostérone (PEREL & al., 1988) selon la réaction :



Et HABRIOUX-NAJID, 1989, ont constaté que la DHA tritiée était transformée par les fractions subcellulaires MCF-7, en E1, E2, en Adione, en Testostérone et en Adiol et en deux produits X, Y non identifiés (Tableau V).

**Tableau VI : Transformation de la DHA tritiée en présence de NADPH et NADH : Analyse de phase organique (H) Homogénat ; (C<sub>1</sub>) et (S<sub>1</sub>), culot et surnageant 1000 g ; (C<sub>15</sub>) et (S<sub>15</sub>), culot et surnageant 15000 g (C<sub>100</sub>) et (S<sub>100</sub>), culot et surnageant 100 000 g. Pourcentages de radioactivité après analyse des produits de la réaction par CLHP.**

Stéroïdes	Volume d'élution en CLHP (ml)	Pourcentage de transformation de la DHA						
		H	C <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	C <sub>15</sub>	S <sub>15</sub>	C <sub>100</sub>	S <sub>100</sub>
X	6-10	0,5	0,5	0,43	0,5	0,5	0,51	0,5
E <sub>1</sub>	16-19	0,8	1,5	0,30	2,3	0,7	1,04	-
Adione	20-23	0,5	5,9	24,58	1,1	1,4	1,2	-
DHA	24-26	96,4	90,1	72,97	94,06	96,4	94,46	98,1
E <sub>2</sub>	38-40	0,4	0,6	1,35	0,43	0,6	0,95	-
T	54-57	-	0,4	-	0,11	-	0,9	-
Adiol	60-63	0,3	-	0,70	0,3	0,4	-	-
Y	75-80	1,1	1,0	-	1,2	-	0,95	-

La comparaison des transformations obtenues avec les différents extraits cellulaires permet de constater que de fortes conversions de la DHA en E<sub>2</sub> sont obtenues avec les surnageants 1000 g (S<sub>1</sub>) et avec le culot 100 000 g (C<sub>100</sub>) : S<sub>1</sub> > C<sub>100</sub> ; ce qui confirme la localisation microsomiale du complexe "DHA-aromatase". Donc les résultats obtenus au niveau des fractions subcellulaires de MCF-7 sont très différents de ceux observés avec ces cellules en culture.

#### IV - PROBLEME DES METABOLITES

##### 1- RELATION STRUCTURE DANS L'ESPACE DES METABOLITES - AFFINITE POUR LE RE

Les différences d'action sur la prolifération des cellules MCF-7 des différents diols ont permis de penser que la structure dans l'espace du stéroïde pouvait influencer sur son affinité pour le RE.

Deux groupes fonctionnels apparaissent importants pour une affinité élevée avec le RE et donc pour la stimulation de la croissance des cellules MCF-7 : ce sont les groupements 17 hydroxyle et 3 hydroxyle et ce respectivement dans une position 17  $\beta$  et 3  $\beta$  sur la molécule. Ainsi, la substitution ou l'absence de ces deux groupes empêcheraient la liaison des androgènes sur le RE (Rocheffort & Garcia, 1984).

En effet, les dérivés diols qui permettent une action mitogénique plus importante sur les cellules MCF-7 sont les deux dérivés 3  $\beta$  17  $\beta$  soit :

- 5  $\alpha$  androstane 3  $\beta$  17  $\beta$  diol (**A**)
- 5  $\beta$  androstane 3  $\beta$  17  $\beta$  diol (**C**)

et les deux autres dérivés **B** et **D** en 3  $\alpha$  17  $\beta$  sont moins efficaces sur la prolifération.

Mais même si ces deux caractères sont essentiels, il semblerait qu'ils soient non suffisants puisqu'on observe une prolifération beaucoup plus nette pour le composé **A**.

Ainsi, l'angle existant entre le groupe hydroxyle en position 3 sur le cycle A de la molécule C<sub>19</sub> comparé à l'angle formé par le groupe phénol des estrogènes apparaît très important. Plus cette différence d'angle sera marquée, moins l'androgène présentera d'affinité de liaison pour le RE (ROCHEFORT & GARCIA, 1984).

Dans ce sens, le groupe 3  $\beta$  hydroxyle avec une configuration en 5  $\alpha$  est plus facilement superposable à la structure correspondante dans l'E<sub>2</sub>. La fonction 17  $\beta$  OH augmente alors l'affinité de l'androgène pour le RE, ce qui expliquerait que **A** est plus actif que **C** (ROCHEFORT & GARCIA, 1984).

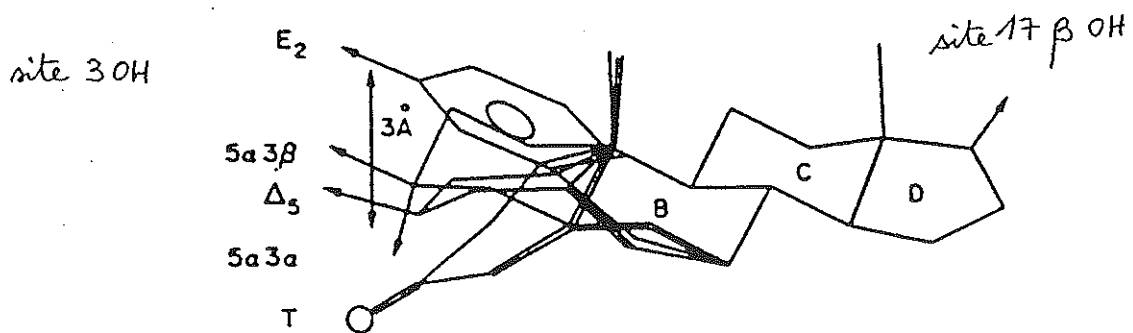


Figure 17 : Comparaison entre les structures spatiales des androgènes et celles de l'estradiol.

## 2 - AFFINITE DES AUTRES ANDROGENES POUR LE RE EN FONCTION DE LEUR STRUCTURE SPATIALE

L'affinité des autres androgènes pour le RE avait déjà été mise en évidence, pour certains d'entre eux, car ils stimulaient, entre autre, la synthèse de la glycoprotéine 52 K œstrogéno-dépendante dans les cellules MCF-7. Ainsi, l'Adiol, le 5  $\alpha$  androstane 3 $\beta$  17 $\beta$  diol et la DHA sont capables d'induire la synthèse de cette protéine (ADAMS & al., 1981 ) et ce à des concentrations voisines des taux plasmatiques physiologiques. On peut constater qu'en effet, l'Adiol a ses groupements 3-hydroxyle et 17-hydroxyle en position  $\beta$ . Cependant, la DHA ne possède que le groupement 3  $\beta$  hydroxyle puisqu'une fonction cétone occupe la position 17 sur le cycle. Ceci est contraire aux conditions nécessaires à une affinité pour le RE. On peut donc à nouveau émettre l'hypothèse de sa transformation préalable en E2 ou en Adiol.

En effet, les affinités de liaison de l'Adiol et des dérivés hydroxylés de l'androstane sont, pour le RE, les plus élevées alors que celle de la DHA est quasiment nulle (tableau VIII).

Stéroïdes	RE	RA	RP
E2	100	11,7	1,2
DHT	0,018	100	1,6
Progestérone	-	7,5	100
Testostérone	0,02	88	0,8
Adiol	2,4	< 1	-
3 $\beta$ -androstanediol	0,7	3,5	-
3 $\alpha$ -androstanediol	0,4	8,3	-
DHA	0,004	< 1	0,001
Adione	< 0,001	3,6	-
DHA-S	< 0,001	-	-

Tableau VIII : affinité de liaison relative des Androgènes in vitro pour RE, RA, RP

Ces différents taux ont été établis par POORTMAN & al (1977), BLONDEAU & al. (1975), RAYNAUD (1977), WESTPHAL (1971).

De plus, l'Adione et le DHA-S ne possèdent pas d'affinité pour le RE (ROCHFORT &

GARCIA, 1984).

Le DHA-S a effectivement une fonction cétone en C<sub>17</sub> et une fonction sulfate en 3 $\beta$ . Ceci confirmerait que son activité mitogénique soit liée à sa transformation en DHA puis Adiol ou E<sub>2</sub>.

L'Adione, qui est un inhibiteur de la croissance cellulaire (fig.13), possède une fonction cétone en position 3 et une autre en position 17. Ceci explique que l'Adione ne puisse pas se lier au RE. On peut cependant constater que cette inhibition n'est pas obtenue avec la Testostérone à forte dose, bien que la structure de cet androgène majeur ne diffère de celle de l'Adione que par la réduction de la fonction cétone du carbone C<sub>17</sub> en fonction alcool. On peut donc en conclure, à priori, que l'effet inhibiteur de l'Adione serait surtout dû à la présence de cette fonction cétone sur le carbone C<sub>17</sub>.

Cette inhibition n'est pas non plus obtenue avec l'androstérone, ni avec l'étiocolanolone. Les résultats obtenus avec ces deux stéroïdes et comparés à ceux obtenus avec l'Adione et la Testostérone, montrent que la fonction cétone en 17 est nécessaire à l'obtention d'une inhibition de la croissance des cellules MCF-7 par l'Adione mais qu'elle n'est pas suffisante. Car la réduction de la fonction cétone en C<sub>3</sub> et la saturation de la double liaison C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> font perdre à l'androstérone et à l'étiocolanolone cet effet inhibiteur sauf à la plus forte concentration testée (10  $\mu$ M) (Fig. 14).

D'autre part, certains androgènes possèdent la capacité d'inhiber certaines réponses biologiques induites spécifiquement par les estrogènes. Cet effet des androgènes a été confirmé dans des lignées de cellules cancéreuses du sein (MAC INDOE & ETRE, 1981 ; PAULIN & al., 1988).

Ainsi il a été montré que la testostérone et la DHT à de faibles concentrations (10 nM) s'opposent à la synthèse du RP dans les cellules MCF-7 (MAC INDOE & ETRE, 1981) et diminuent l'affinité de l'E<sub>2</sub> pour son récepteur (ROCHEFORT & GARCIA, 1976 ; KORACH & MULDOON, 1975).

Par contre à fortes doses, la testostérone est sans effet sur la prolifération cellulaire alors que la DHT présente un effet mitogénique. Ceci confirme donc l'importance de la 5 $\alpha$  réduction de la double liaison C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>.

## CONCLUSION

La mise au point d'un modèle d'étude de la croissance de cellules cancéreuses mammaires estrogéno-dépendantes a permis d'étudier l'effet de 14 androgènes ou dérivés d'androgènes sur cette croissance.

Nous avons pu constater que les androgènes surrénaliens avaient, à des degrés divers, une action mitogénique. En outre, nous avons pu classer les androgènes en 4 catégories selon leur action sur la prolifération cellulaire :

- 1- androgènes stimulant la croissance (Adiol et son 3 sulfate ; DHA et son sulfate et les 4 androstanes 17  $\beta$  diols) ;
- 2- androgènes inhibiteurs de la croissance (Adione) ;
- 3- à la fois stimulant et inhibiteur de la croissance des cellules MCF-7 selon la concentration utilisée (DHT) ;
- 4- sans effet sur la croissance (Testostérone, Androstérone, Etiocholanolone).

Dans nos conditions d'étude, nous pouvons admettre que l'Adiol, du fait de son taux plasmatique chez les femmes ménopausées nettement plus élevé par rapport à l'E<sub>2</sub>, est l'androgène le plus actif sur la prolifération des cellules MCF-7. La cinétique d'action de l'Adiol étant d'autre part comparable à celle de l'E<sub>2</sub>, on pourrait penser que les cellules MCF-7 ne seraient pas exclusivement estrogéno-dépendantes.

D'autre part, il semblerait que les cellules cancéreuses mammaires soient capables de transformer les androgènes surrénaliens (DHA, DHA-S) qui ne se lient ni aux RE, ni aux RA et RP et qui sont donc plutôt inertes, en stéroïdes biologiquement plus actifs :

- soit en Adiol par action de la 17  $\beta$  HSD dont l'activité est augmentée dans les tumeurs,
- soit en E<sub>2</sub> par action d'une aromatasase.

Nous avons, dans nos expérimentations, confirmé le fait que la DHT, hormone active de la Testostérone, était sans effet à forte dose alors qu'à dose inférieure, elle inhibe la stimulation des cellules. Ce phénomène est expliqué par le fait qu'elle diminue l'affinité de l'E<sub>2</sub> par le RE.

L'action inhibitrice de l'Adione a été vérifiée et confirmée. Ainsi, l'Aminogluthétimide,



inhibiteur de la 17  $\beta$  HSD et de l'aromatase, permettrait une diminution de la transformation de la DHA en Adiol, donc une accumulation de l'Adione, inhibiteur naturel, qui ne serait donc pas transformé en estrone.

Enfin, l'action estrogénique peut effectivement s'exercer par l'aromatation des androgènes en estrogènes mais aussi par un effet direct des androgènes via le RE à condition que ces androgènes présentent les critères structuraux suivants :

- un groupe hydroxyle en position 3  $\beta$  ;
- l'angle existant entre le groupe hydroxyle en position 3 sur le cycle A de l'androgène et le groupe phénol de l'E<sub>2</sub> doit être le plus faible possible donc en position 5  $\alpha$  ;
- un groupement hydroxyle en position 17  $\beta$ .

cela expliquant l'action mitogénique importante du 5 $\alpha$ -androstane-1-3 $\beta$ , 17 $\beta$ .

Ces différents résultats indiqueraient que l'hormonodépendance des cellules MCF-7 ne se limiterait pas à l'E<sub>2</sub>.

Il est alors possible de resituer ces résultats dans le domaine clinique. Si la présence d'E<sub>2</sub> en période préménopausique peut contrebalancer l'action d'un antiestrogène (comme le tamoxifène) et donc permettre une stimulation des cellules cancéreuses, il serait intéressant d'étudier les taux de croissance des cellules MCF-7 en présence à la fois des androgènes stimulant leur croissance et du tamoxifène car en période ménopausique, seuls restent secrétés de façon notable les androgènes surrénaliens.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- 1 - ABRAHAM G.E.  
Ovarian and Adrenal contribution to peripheral androgens during the menstrual cycle.  
*J. Chir. Endocr. Métab.*, 1974, 39 : 340-346
- 2 - ABRAHAM G.E., MELDRUM D.R.  
Peripheral and ovarian venous concentrations of various steroid hormones in virilizing ovarian tumors.  
*Obstet. Gynecol.* 53 (1) : 36-43, 1979
- 3 - ABUL-HAJJ Y.L.  
Metabolism of Dehydroepiandrosterone by hormone dependent and hormone independent human breast carcinoma, 1975.  
*Steroids* 26, 488-500
- 4 - ADAMS J.B., GARCIA M. & ROCHEFORT H.  
Estrogenic effects of physiological concentrations of 5-androstene-3 $\beta$ -diol and its metabolism in MCF-7 human breast cancer cells.  
*Cancer Res.*, 1981, 41, 4720-4726
- 5 - ADAMS  
Control of secretion and the function of C19- $\Delta$ 5 steroids of the human adrenal gland.  
*Mol. Cell. Endocrin.*, 1985, 41, 1-17
- 6 - ALEXIEVA-FIGUSCH J., De JONG F.H., LAMBERTS S.W.J., VAN GILSE H.A. & KLIJN J.G.M.  
Endocrine effects of aminoglutethimide plus hydrocortisone versus effects of high dose of hydrocortisone alone in postmenopausal metastatic breast cancer.  
*Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1987, 23, 1349-1356
- 7 - BAULIEU E. E., CORPECHOT C., DRAY F., EMILIOZZI R., LEBEAU M. C., MAUVAIS-JARVIS P., and ROBEL P.  
An adrenal-secreted "androgen" : Dehydroepiandrosterone sulfate. Its metabolism and a tentative generalization on the metabolism of other steroid conjugates in man.  
*Rec. Prog. Horm. Res.*, 1965, 121 : 411-500
- 8 - BAULIEU E.E., ALBERGA A., JUNG I. et al.  
Metabolism and protein binding of sex steroids in target organs : an approach to the mechanism of hormone action.  
*Recent Prog. Horm. Res.* 27 : 351-419, 1972
- 9 - BAULIEU E.E.  
Some aspects of the mechanism of action of steroid hormones.  
*Mol. Cell. Biochem* 7 (3) : 157-74, 1975
- 10 - BOCCARDO F., VALENTI G., ZANARDI S., CERRUTI G., FASSIO T., BRUZZI P., DE FRANCHIS V., BARRECA A., DEL MONTE P. & MINUTO F.  
Epidermal growth factor in breast cyst fluid : relationship with intracystic cation and androgen conjugate content.  
*Cancer Res.*, 1988, 48, 5860-5863
- 11 - BONNEY R.C., SCANLON M.J., REED M.J., JONES D.L., BERANEK P.A. & JAMES V.H.T.  
Adrenal androgen concentration in breast tumours and in normal breast tissue. The relationship to oestradiol metabolism.  
*J. Steroid Biochem.*, 1984, 20, 501-504

- 12 - BROOKS S.C., HORN L.  
Hépatic sulfation of strogen metabolites  
Biochim. Biophys. Acta. 231 : 233-41, 2 Fév. 1971
- 13 - BRUNING P.F., BONFRER J.M.G., HART A.A.M., VAN DER LINDEN E., DE JONG-BAKKER M., MOOLENAAR A.J. & NOOIJEN W.J.  
Low dose Aminoglutethimide without hydrocortisone for the treatment of advanced postmenopausal breast cancer.  
Eur. J., Cancer Clin. Oncol., 1989, 25, 369-376
- 14 - CYPRIANI B., TABACIK C. & DESCOMPS B.  
Effect of estradiol and antiestrogens on cholesterol biosynthesis in hormone - dependent and - independent breast cancer cell lines.  
Biochim. Biophys. Acta , 1988, 972, 167-178
- 15 - DERYNK R., JARETT J.A., CHEN E.Y., EARTON D.H., BELL J.R., ASSSAN R.K., ROBERTS A.B., SPORM M.B., GÆDEL D.V.  
Human transforming growth factor- $\beta$  complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells.  
Nature (Lond.), 1985, 316, 701-704
- 16 - DICKSON R.B., Mc MANAWAY M.E., LIPPMAN M.E.  
Estrogen-induced factors of breast cancer cells partially replace estrogen to promote tumor growth.  
Science, 1986, 232, 1540-1542
- 17 - DICKSON R.B. & LIPPMAN M.E.  
Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma.  
Endocrine reviews, 1987, 8, 29-43
- 18 - FAYE J.C., LASSERRE B & BAYARD F.  
Biochem. Biophys. Res. Commun, 1980, 93, 1225-1231
- 19 - FITZPATRICK S.L., BRIGHTWELL J., WITTLIFF J.L., BARROWS G.H., SCHULTZ G.S.  
Epidermal growth factor binding by breast tumor biopsies and relationship to estrogen receptor and progesterone receptor levels.  
Cancer Res., 1984, 44, 3448-3453
- 20 - GRODIN J.M., SIITERI P.K. et MAC DONALD P.C.  
Source of œstrogenic production in the post-menopausal woman.  
J. Chir. Endocr. Metab., 1973, 36, 207
- 21 - HABRIOUX G., DESFOSSÉS B., CONDOM R., FAURE B. & JAYLE M.F.  
Simultaneous radioimmunoassay of 5  $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ -17 $\beta$ -diol and 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ -17 $\beta$  diol unconjugated and conjugated in human serum.  
Steroids, 1978, 32, 61-71
- 22 - HABRIOUX G.  
Analyse des androgènes dioxygénés conjugués urinaires et plasmatiques : application à l'exploration fonctionnelle du follicule pilosébacé en pathologie humaine. Thèse es-sciences pharmaceutiques, 1983.  
Série E. n° 177. Paris-Sud UER des Saints-Pères

- 23 - HORWITZ K.B., COSTLOW M.E. et Mac GUIRE W.M.  
MCF-7 : a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors.  
Steroids 26,1975, 785-795
- 24 - HUGGINS C., BRIZIARELLI G. and SUTTON H. Jr  
Rapid induction of mammary carcinoma in the rat and the influence of hormone on the tumors.  
J. exp. Med., 1959, 109 : 25-42
- 25 - INAUDI P., BERNABEI A., GIOFFRE W., FRANCHI F., MAZZULLO G., DE LES V. & D'ANTONA  
Plasma and cyst fluid levels of delta 5 and delta 4 steroid hormones in women with gross cystic breast disease.  
Clin. Endocrinol., 1987, 27, 643-648
- 26 - JOZAN S., MANE C., GILLOIS M. & BAYARD F.  
Effects of estrone on cell proliferation of a human breast cancer cells (MCF-7) in long term tissue culture.  
J. Steroid Biochem., 1979, 10, 341-342
- 27 - JOZAN S., KREITMANN B. & BAYARD F.  
Different effects of oestradiol, oestrin, oestetrol and oestrone on human breast cancer cells (MCF-7) in long term tissue culture.  
Acta Endocrinologica, 1981, 98, 73-80
- 28 - JOZAN S.  
Prolifération cellulaire d'un adénocarcinome mammaire humain (lignée MCF-7) : mise au point de modèle ; effets des œstrogènes, des anti-œstrogènes et des lipoprotéines.  
Thèse d'Etat es-Sciences. Université Paul Sabatier de Toulouse (Sciences), 1985
- 29 - JOZAN S., FAYE F.C., TOURNIER J.F., TAUBER J.P., DAVID J.F. & BAYARD F.  
Interaction of estradiol and high density lipoproteins on proliferation of the human breast cancer cell line MCF-7 adapted to grow in serum free conditions.  
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1985, 133, 105-112
- 30 - KNABBE C., HUFF K., WAKEFIELD L., LIPPMAN M.E., DICKSON R.B.  
Evidence that transforming growth factor beta is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells.  
Cell, 1987, 48, 417-418
- 31 - KORACH K.S. and MULDSOHN J.G.  
Inhibition of anterior pituitary estrogen-receptor complex formation by low-affinity interaction with 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone.  
Endocrinology, 1975, 97 : 231-236
- 32 - KREITMANN B. & BAYARD F.  
Receptor in human tissues.  
J. Steroid Biochem, 1979, 11, 1589-1595
- 33 - LAGRELIUS A, FRIDSTRÖM M., MÖLLERSTRÖM G. and CARLSTRÖM K.  
DHAS in saliva.  
Acta Obstet Gynecol Scand, 1988, 67, 359-361
- 34 - LI K., FOO T. & ADAMS J.B.  
Products of dehydroepiandrosterone metabolism by human mammary tumors and their influence of estradiol receptor binding.  
Steroids, 1978, 31, 113-127

- 35 - LIPPMAN M., BOLAN G., and HUFF K.  
The effects of androgens and anti-androgens on hormone-responsive human breast cancer in long term tissue culture.  
Cancer Res., 1976, 36 : 4505-4601
- 36 - LONGCOPE C.  
Cancer Res., 1982, 42 : 33075-33115
- 37 - MAC INDOE J.H.  
Estradiol formation from testosterone by continuously cultured human breast cancer cells.  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 1979, 49 : 272-277
- 38 - MAC INDOE J.H., ETRE L.A.  
An antiestrogenic action of Androgens in human breast cancer cells.  
J. Cell. Endocrina Metab.  
1981, 53, 836-842
- 39 - MAC INDOE J.H., WOODS G.R., ETRE L.A. & COVEY D.F.  
Comparative studies of aromatase inhibitors in cultured human breast cancer cells.  
Cancer Res. (suppl.), 1982, 42, 3378s-3381s
- 40 - MAC INDOE J.H.  
The hydrolysis of estrone sulfate and dehydroepiandrosterone sulfate by MCF-7 human breast cancer cells.  
Endocrinology, 1988, 123, 1281-1287
- 41 - MAC NEILL J.M., REED M.J., LAI L.C., NEWTON C.J., GHILCHICK M.W. et JAMES V.H.T.  
The effect of EGF and TGF $\alpha$  on aromatase activity in cultured adipose tissue from pré- and post- ménopausal women.  
J. Endocrinol., 1986, 111, Abstract 80.
- 42 - MAROULIS G.B. and ABRAHAM G.E.  
Ovarian and adrenal contribution to peripheral steroid levels in post-ménopausal women.  
Obstet. Gynecol., 1976, 48 : 150-154
- 43 - NAJID A.  
Comparaison de l'effet des androgènes surrénaliens et de l'œstradiol-17 $\beta$  sur les cellules cancéreuses mammaires humaines MCF-7 et BT-20 en culture.  
Thèse de Doctorat - Université de Sciences Claude Bernard - Lyon I, 1989
- 44 - O'NEILL J.S. et MILLER W.R.  
Aromatase Activity in breast adipose tissue from women with benign and malignant breast diseases, 1987, 56, 601-604
- 45 - O'NEILL J.S., ELTON R.A. & MILLER W.R.  
Aromatase activity in adipose tissue from breast quadrants : a link with tumor site.  
Br. Med. J., 1988, 296, 741-743
- 46 - PEREL E., STOLEE K.H., KHARLIP L., BLACKSTEIN M.E. & KILLINGER D.W.  
The intracellular control of aromatase activity by 5 $\alpha$ -reduced androgens in human breast carcinoma cells in culture.  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 1984, 58, 467-471

- 47 - PEREL E., DANILESCU D., KHARLIP L., BLACKSTEIN M. & KILLINGER D.W.  
Steroid modulation of aromatase activity in human cultured breast carcinoma cells.  
*J. Steroids Biochem.*, 1988, 29, 393-399
- 48 - POORTMAN J., PRENEN J.A.C., SCHWARZ F. & THIJSEN J.H.H.  
Interaction of  $\Delta^5$ -androstene- $3\beta$ ,  $17\beta$ -diol with estradiol and dihydrotestosterone  
receptors in human myometrial and mammary cancer tissue.  
*J. Clin. Endocrinol. Métab.*, 1975, 40, 373-379
- 49 - POULIN R., BAKER D., LABRIE F.  
Potent inhibition by androgens of basal and estrogen induced cell proliferation in the ZR-  
75.1 human breast cancer cell line.  
*Breast Cancer Res. Treat.* (1989)
- 50 - PROST O., TURREL M.O., DAHAN N., CRAVEUR C. & ADESSI G.L.  
Estrone and DHA sulfatase activities and plasma estrone sulfate levels in human breast  
carcinoma.  
*Cancer Res.*, 1984, 44, 661-664
- 51 - RAYNAUD J.P. and OJASSO TÛU  
The design and use of sex steroid antagonists  
*Stéroïd Biochem.*, 1986, Vol. 25 : 811-833
- 52 - ROBINSON S.P. & JORDAN V.C.  
The paracrine stimulation of MCF-7 cells by MDA-MB-231 : Possible role in antiestrogen  
failure.  
*Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1989, 25, 493-497
- 53 - ROCHEFORT H. and GARCIA M.  
Androgen on the estrogen receptor. I. Binding and in vivo nuclear translocation.  
*Steroids*, 1976, 28 : 549-560
- 54 - ROCHEFORT H. and GARCIA M.  
The estrogenic and antiestrogenic activities of androgens in female target tissues.  
*J. Pharmac. Ther.*, 1984, Vol 23, 193-216
- 55 - ROZHIN J., SLOANE B.F., JOHNSON K., TAYLOR H., CRINMAN J.D., HONN  
K.V.  
Cathepsin B : association with plasma membrane in metastatic tumors.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, Apr. 86 (8) : 2483-7
- 56 - SANSILLON C.  
Détermination des conditions de cultures des cellules cancéreuses mammaires (MCF-7)  
nécessaire pour l'étude de l'action des stéroïdes (thèse : 1991)
- 57 - SANTEN R.J., WORGUL T.J., LIPTON A., HARVEY H., BOUCHER A.,  
SANROJLIK E. and WELLS S.A.  
*Ann. Int. Méd.*, 1982), 96, 94-101
- 58 - SANTEN R.J., LANGECKER P. and SANTNER S.J.  
Sources of estrogen and aromatase inhibitors in breast cancer.  
*Progress in Cancer Research and Therapy*, 1988, vol. 35
- 59 - SCHMIDT W., KATZENELLENBOGEN B.S.  
Androgen uterin interactions : an accessment of androgen interaction with the testosterone  
and estrogen receptor systems and stimulation of uterine growth and progesterone  
receptor synthesis.  
*Mol. Cell. Endocrinol.*, 1979, 15, 91-108

- 60 - SÜTERI P.K., Mac DONALD P.C.  
The role of extraglandular estrogen in human endocrinology  
In : GEIGER S.R., ASTWOOD E.B., GREEP R.O.  
Handbook of physiology section 7 pp. 615-619 New-York  
The American Physiology Society, 1973
- 61 - SÜTERI P.K.  
Sex hormone production and action.  
Arthristis. Rheum, 1979, 22 : 1284-1294
- 62 - STOVER E.P., KRISHNAN A.V. & FELDMAN D.  
Estrogen down-regulation of androgen receptors in cultured human mammary cancer cells  
(MCF-7)  
Endocrinology 120, 2597-2603
- 63 - THATCHER N.  
Gynecological cancer.  
In ; Advances in Medical Oncology, Research and Education, 1979.  
THATCHER N. (ed.) PERGAMON Press
- 64 - VERMEULEN A.  
Hormones stéroïdiennes ovariennes (androgènes, estrogènes, Progestérone).  
Transport, métabolisme, interconversion.  
In : MAUVAIS-JARRIS P., SITRUK-WARE R., Médecine de la reproduction :  
Gynécologie : Gynécologie endocrinienne, pp. 93-107, Paris  
FLAMMARION, 1986
- 65 - ZAVA D.T. and Mac GUIRE W.L.  
Human breast cancer : androgen action mediated by estrogen receptor.  
Science (Wash D.C.), 1978, 199 : 787-788



## TABLE DES MATIERES

PLAN.....	6
<b>Chapitre 1 : INTRODUCTION.....</b>	<b>11</b>
<b>Chapitre 2 : METABOLISME DES ANDROGENES .....</b>	<b>15</b>
<b>I - BIOSYNTHESE.....</b>	<b>16</b>
1 - D.H.A.....	17
2 - TESTOSTERONE.....	18
3 - D.H.T. ....	18
4 - $\Delta^4$ OU ANDROSTENEDIONE.....	18
5 - 5-ANDROSTENE-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -DIOL ou ADIOL.....	19
<b>II - METABOLISME DANS LES TISSUS PERIPHERIQUES.....</b>	<b>20</b>
1 - LES METABOLITES HYDROXYLES.....	20
2 - METABOLITES CETONIQUES.....	20
<b>III - ACCUMULATION DES ANDROGENES AU NIVEAU DES TISSUS MAMMAIRES .....</b>	<b>21</b>
1 - KYSTE MAMMAIRE.....	21
2 - TUMEUR MAMMAIRE.....	21
a - Action de la DHA-sulfatase .....	21
b - Action de la 17 $\beta$ HSD.....	22
3 - METABOLISME DES ANDROGENES SURRENALIENS PAR LES TUMEURS MAMMAIRES .....	22
4 - CONCLUSION .....	23
<b>Chapitre 3 : MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>25</b>
<b>I - CULTURES CELLULAIRES.....</b>	<b>26</b>
<b>II - STERILITE.....</b>	<b>26</b>
<b>III - LE MILIEU DE CULTURE.....</b>	<b>26</b>
<b>IV - SUPPLEMENTATION DU MILIEU DE CULTURE .....</b>	<b>27</b>
<b>V - ENTRETIEN DE LA SOUCHE .....</b>	<b>27</b>
1 - PREPARATION DE LA SOLUTION SALINE TAMPONNEE AU PHOSPHATE .....	27
2 - PREPARATION DE LA SOLUTION STP-EDTA CONCENTREE 10 FOIS .....	27
3 - DILUTION DE LA SOLUTION.....	27
4 - SOLUTION DE TRYPSINE-EDTA (0,05%-0,02%).....	28
5 - DECOLLEMENT DES CELLULES .....	28
<b>VI - CONGELATION DES CELLULES MCF-7.....</b>	<b>29</b>
1 - MILIEU DE CONGELATION : PREPARATION EXTEMPORANEE .....	29

2 - RECUPERATION DES CELLULES .....	29
VII - DECONGELATION DES CELLULES .....	29
VIII - PREPARATION DU SVF-TCD .....	30
IX - COMPTAGE .....	30
X - DOSAGE DE L'ADN.....	30
1 - LES REACTIFS .....	31
2 - DOSAGE DE L'ADN PAR LA METHODE DU DAPI .....	31
3 - VALIDITE DES METHODES .....	31
XI - CONDITIONS DE CULTURE.....	35
XII - STEROIDES UTILISES : FORMULES ET PROVENANCE COMMERCIALE.....	36
<b>Chapitre 4 :RESULTATS .....</b>	<b>41</b>
<b>I - INTRODUCTION.....</b>	<b>42</b>
<b>II - ANDROGENES MINEURS.....</b>	<b>42</b>
1 - INFLUENCE DE LA DHA, DU DHA-S ET DE L'ADIOL.....	42
a - CULTURE DANS SVF.....	43
b - CULTURE DANS SVF-TCD à 5% .....	44
α - Prolifération cellulaire.....	44
β - Temps-dépendance.....	46
2 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE CES STEROIDES SUR LA CROISSANCE DES CELLULES MCF-7 .....	48
3 - CONCLUSION.....	49
<b>III - ANDROGENES MAJEURS.....</b>	<b>50</b>
1 - TESTOSTERONE .....	50
2 - 5α DHT .....	50
3 - Δ4 .....	50
<b>IV - METABOLITES.....</b>	<b>54</b>
1 - DERIVES CETONIQUES = METABOLITES OXYDES EN 17 .....	54
2 - DERIVES DIHYDROXYLES : METABOLITES REDUITS EN 17.....	56
a - Dose-dépendance .....	56
b - Temps-dépendance .....	56
c - Conclusion .....	57
<b>Chapitre 5 : DISCUSSION.....</b>	<b>60</b>
<b>I - EFFET MITOGENIQUE DES ANDROGENES PAR RAPPORT A L'EFFET MITOGENIQUE DE L'E2 .....</b>	<b>61</b>
1 - ANDROGENES MINEURS .....	61

2 - ANDROGENES MAJEURS .....	64
a - Testostérone et DHT .....	64
b - $\Delta$ 4 ou Adione .....	65
c - Conclusion .....	66
<b>II - PROBLEME DES SULFOCONJUGUES .....</b>	<b>67</b>
<b>III - AROMATASE .....</b>	<b>70</b>
<b>IV - PROBLEME DES METABOLITES .....</b>	<b>73</b>
1- RELATION STRUCTURE DANS L'ESPACE DES METABOLITES - AFFINITE POUR LE RE.....	73
2 - AFFINITE DES AUTRES ANDROGENES POUR LE RE EN FONCTION DE LEUR STRUCTURE SPATIALE.....	75
 <b>CONCLUSION.....</b>	<b>77</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>80</b>
 <b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>87</b>

PUIGROS (Delphine). — Influence de stéroïdes d'origine surrénalienne sur la croissance de cellules cancéreuses mammaires en culture (MCF-7). — 90 f.; ill.; tabl.; 30 cm (Thèse : Pharm.; Limoges; 1991).

**RESUME :**

La mise au point d'un modèle d'étude de la croissance de cellules cancéreuses mammaires estrogéno-dépendantes a permis d'étudier l'effet de 14 androgènes ou dérivés d'androgènes sur cette croissance (notamment Déhydroépiandrostérone, Androstènediol, Androstènedione...).

Dans nos conditions d'étude, nous avons montré que l'Adiol est l'androgène le plus actif après l'Estradiol sur la prolifération des cellules MCF-7 et que l'androstènedione a une action inhibitrice sur la croissance cellulaire.

En outre, nous avons pu classer les androgènes en quatre catégories selon leur action sur la prolifération cellulaire :

- androgènes stimulant la croissance (Adiol et son 3 sulfate; DHA et son sulfate et les 4 androstanes 17 $\beta$ -diols);
- androgènes inhibiteurs de la croissance (Adione);
- à la fois stimulant et inhibiteur de la croissance des cellules MCF-7 selon la concentration utilisée (DHT);
- sans effet sur la croissance (Testostérone, Androstérone, Etiocholanolone).

**MOTS CLES :**

- Sein : cancer.
- Cancer : sein.
- MCF-7.
- Androgènes surrénaliens.
- Déhydroépiandrostérone.
- 4-androstène-3,17-dione.
- Croissance cellulaire.

**JURY :** Président : Monsieur le Professeur HABRIOUX.  
Juges : Monsieur le Professeur OLIVIER.  
Monsieur le Professeur LABADIE  
Madame DESMAISON, Maître de Conférences.