

UNIVERSITE DE LIMOGES
Faculté de Pharmacie

ANNEE 1992

THESE N° 42

**Influence des Androgènes Surrénaux
et du Tamoxifène sur les Cellules
Cancéreuses Mammaires en Culture
MCF-7.**

THESE

pour le

Diplôme d'Etat en Pharmacie

présenté et soutenu publiquement le 28 Septembre 1992

par

Florence BOUCHER née AGRINIER

le 13 Décembre 1967 à Limoges

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur HABRIOUX..... Président
Monsieur le Professeur CHULIA Juge
Madame DESMAISON Maître de Conférences Juge
Monsieur BERNARDAUD Pharmacien 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 (2ème Assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT

* PROFESSEUR DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
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
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

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

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 CHULIA,
Professeur des Universités de Pharmacognosie

Monsieur BERNARDAUD,
Pharmacien

Madame DESMAISON,
Maître de Conférence de Biochimie

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

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

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

A mon frère Jean-Luc.

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

pour avoir mis à notre disposition le
Laboratoire Départemental où nous
avans pu manipuler pour les expériences
nécessaire à cette thèse.

A Pierre GERMAIN, Geneviève et
Anne-Marie pour leur collaboration.

A mon mari Patrick avec qui j'ai
partagé la réalisation de cette thèse.

Plan

INTRODUCTION

Chapitre I : Métabolismes des androgènes

I - Biosynthèse

- 1 - Dehydroepiandrosterone (DHA)
- 2 - Δ^4 ou androstènedione
- 3 - 5-androstène- 3β , 17β -diol (Adiol)

II - Métabolisme dans les tissus périphériques

- 1 - Les métabolites hydroxylés
- 2 - Les métabolites cétoniques

III - Accumulation des androgènes au niveau des tissus mammaires

- 1 - Kyste mammaire
- 2 - Tumeur mammaire
 - a - Action de la DHA sulfatase
 - b - Action de la 17β HSD
- 3 - Métabolisme des androgènes surrénaliens par les tumeurs mammaires

Chapitre II : Matériels et méthodes

I - Cellules MCF7

II - Entretien des lignées cellulaires MCF7

- 1 - Préparation du milieu de base
- 2 - Supplémentation du milieu de culture
- 3 - Repiquage des cellules après trypsination
- 4 - Congélation des cellules

III - Préparation du sérum de veau foetal destéroïdé (SVFd)

- 1 - Traitement effectué
- 2 - Résultat du traitement

IV - Méthode de dosage de l'ADN

- 1 - Principe
- 2 - Les réactifs
- 3 - Dosage de l'ADN
- 4 - Gamme étalon

Chapitre III : Résultats

1 - Descriptif des molécules étudiées

- a - 17β -1, 2, 5 (10) estratiène 3,17 β diol
- b - 3β -hydroxy-5-androstène-17 one

- c - 3 β -sulfate-5-androstène-17-one
- d - Dehydrotestostérone
- e - 5 α -androst-9(11)-ène-3 β -ol, 17-one
- f - 5-androstène-3 β , 17 β -diol
- g - 5-androstène-3 β sulfate-17 β -ol
- h - 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol
- i - 5 α -androstane-17 β -ol-3-one

2 - Descriptif du protocole utilisé

3 - Témoins de culture

4 - Résultats

- a - Δ^4 -androstène dione
- b - Déhydroepiandrostérone
- c - Sulfate de déhydroepiandrostérone
- d - Dehydrotestostérone
- e - 5-androstène-3 β , 17 β -diol (Adiol) et son sulfate
- f - 5 α -androst-9(11)-ène-3 β -ol, 17-one
- g - 5 α -androstenediol-3 β , 17 β -diol

CONCLUSION

ABREVIATIONS

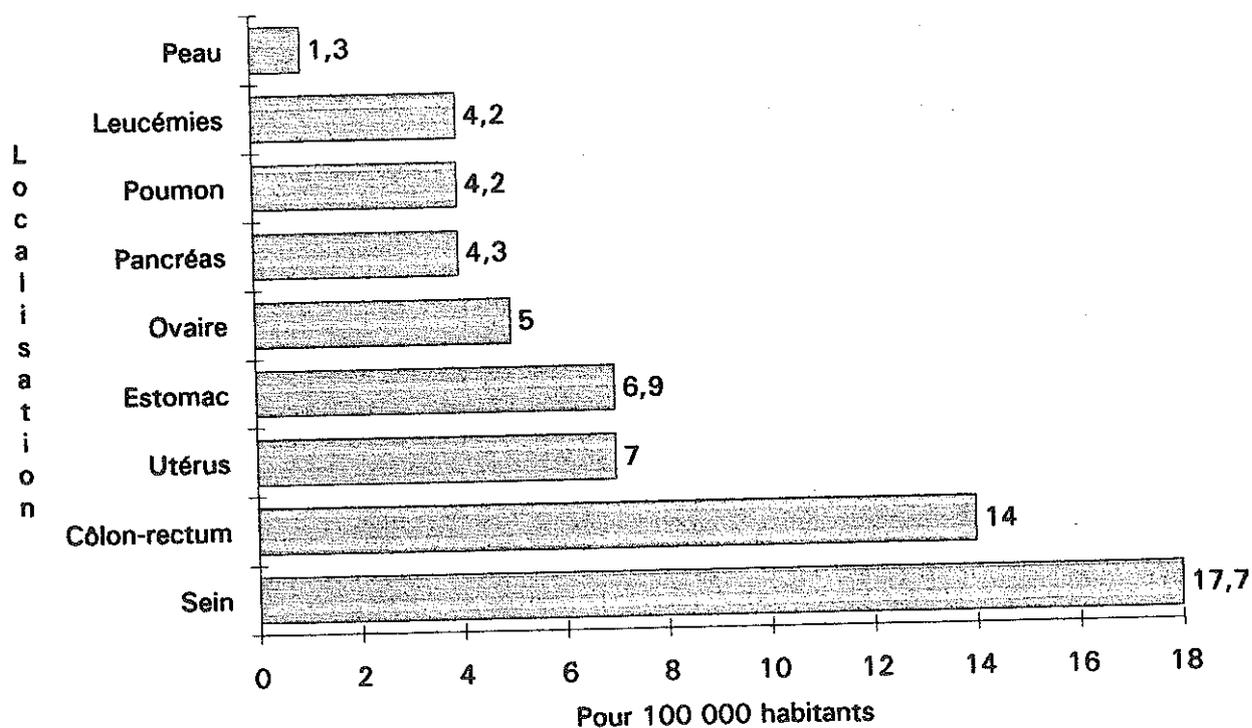
E ₂	Estradiol 17 β
tam	Tamoxifène
Adiol	5 androstène-3 β , 17 β -diol
S Adiol	Sulfate de 5 androstène-3 β , 17 β diol
DHA	Dehydroepiandrosterone
SDHA	Sulfate de dehydroepiandrosterone
Δ 4	Androstènedione
5 α 3 β	5-androstane-3 β , 17 β -diol
DHT	Dihydrotestostérone
17 β HSD	17 β hydroxy sulfo deshydrogénase

INTRODUCTION

En France, la mortalité par cancer du sein, qui occupe le 1^{er} rang de la mortalité par cancer chez la femme, augmente régulièrement depuis une trentaine d'années.

Le taux annuel de décès par cancer du sein est de l'ordre de 28 décès pour 100 000 femmes (Tableau I) et augmente avec l'âge (Fig. 1).

Tableau I : Taux de mortalité et taux relatifs de décès des localisations cancéreuses les plus fréquentes (INSERM 1982) (2,3)



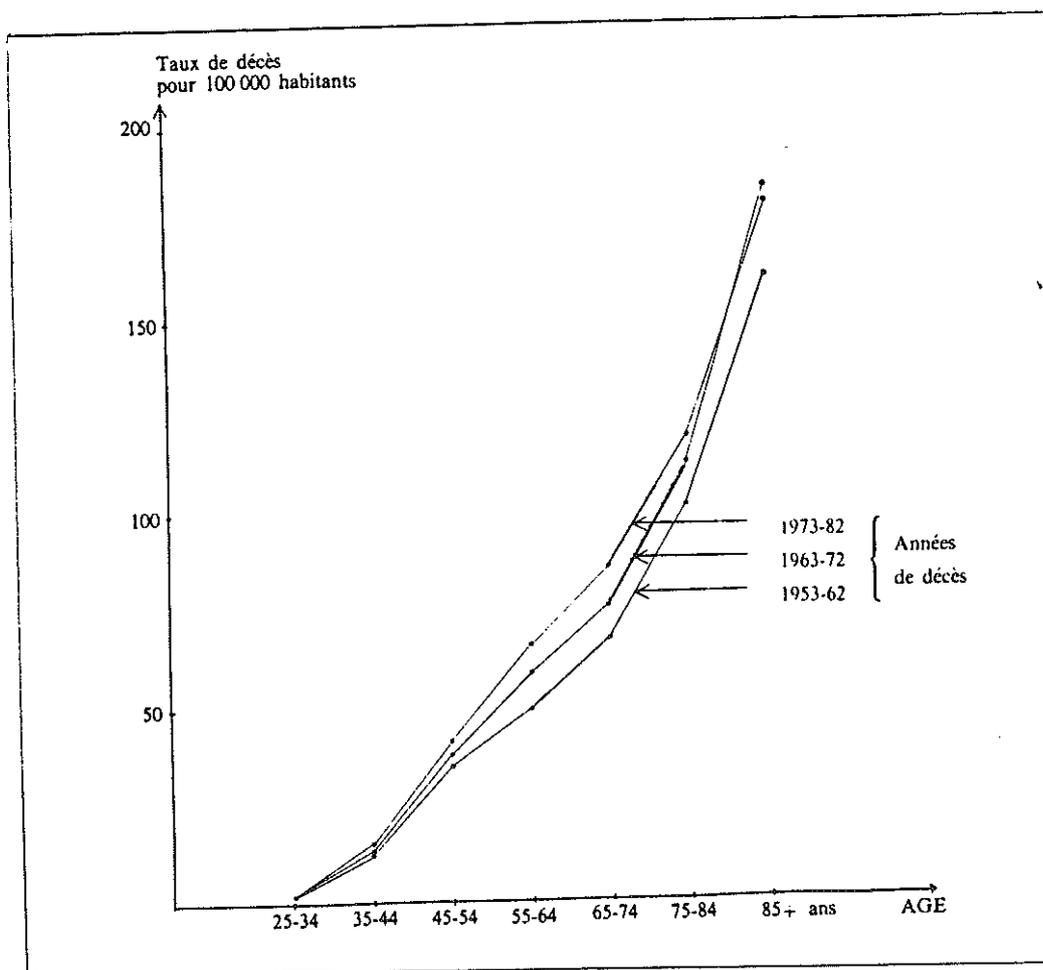


Figure 1 : Evolution au cours du temps de la mortalité par cancer du sein selon l'âge (INSERM 82) (2,3)

Il est à noter aussi une grande diversité des taux d'incidence du cancer du sein dans le monde (Fig. 2).

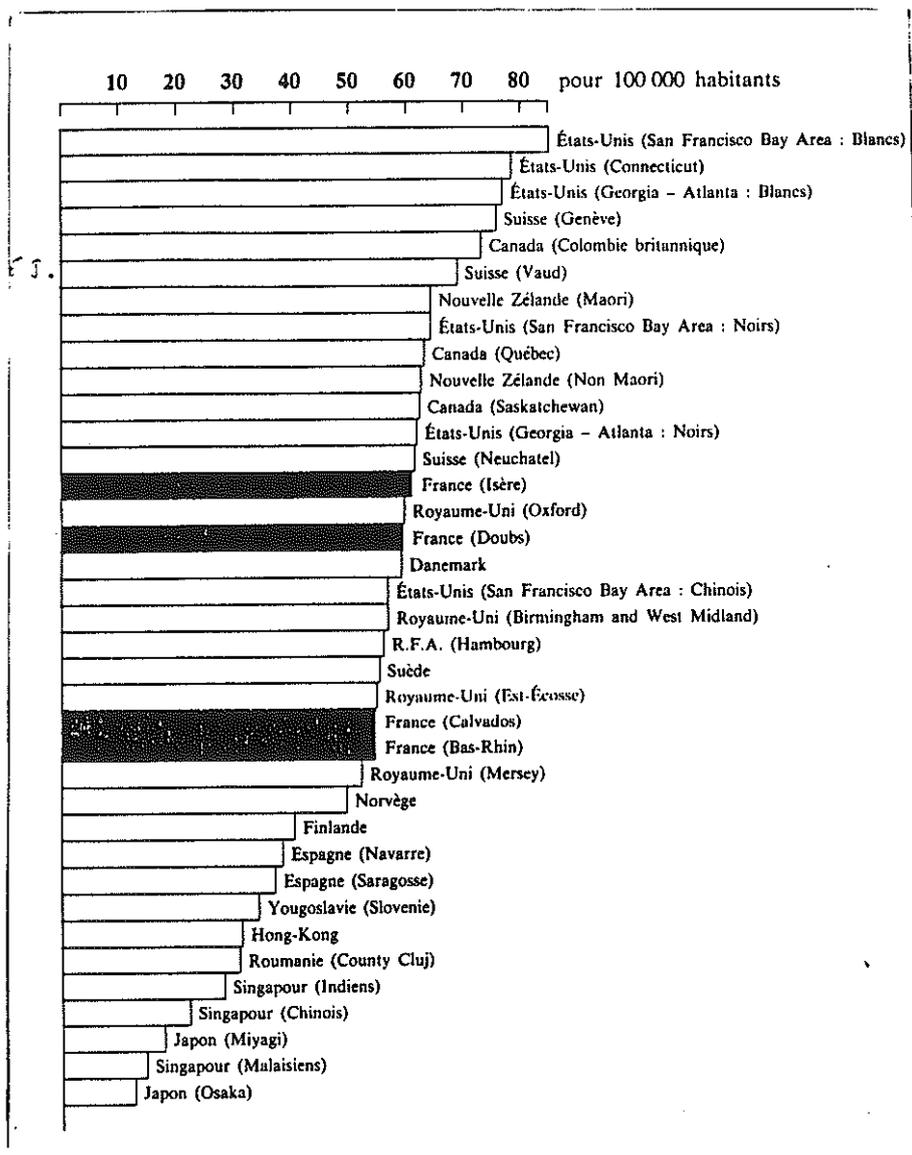


Figure 2 : Comparaison internationale des taux d'incidence du cancer du sein (d'après WATERHOUSE J. et al. 1982)

L'extrapolation pour la France entière situe le taux annuel entre 70 et 73 cas pour 100 000 femmes.

L'origine des cancers est manifestement multifactorielle. En effet ces cancers se développent dans un tissu dont la structure subit des variations cycliques et périodiques en cours des épisodes de la vie génito-obstétricale. Les éléments sont eux-mêmes sous la dépendance de multiples facteurs hormonaux, génétiques et nutritionnels.

En ce qui concerne les facteurs hormonaux il faut noter que le cancer du sein est oestrogéno-dépendant et nous sommes donc amenés à distinguer deux épisodes de la vie génitale chez la femme.

Avant la ménopause les oestrogènes et les androgènes sont produits respectivement par les ovaires et les glandes surrénales.

Après la ménopause, la production des oestrogènes par les ovaires devient négligeable et la synthèse des hormones stéroïdes par les surrénales demeure, en particulier les androgènes surrénaux : la déhydroépiandrostérone et son estersulfate.

En outre il est intéressant de comparer la production journalière respective de ces hormones.

On peut constater sur le tableau II que les productions journalières de la déhydroépiandrostérone (DHA) et de son estersulfate (SDHA) sont extrêmement importantes notamment pour le SDHA dont le taux de production est le plus élevé de toutes les hormones.

Tableau II : Taux de production plasmatique et clearance métabolique des hormones (Baulieu et al. 1972).

Hormones	Production $\mu\text{g/j}$	Concentration plasmatique ng/ml	Mcr l/j
		160**	
Cortisol	15 000	50**	200
Aldostérone	100	0.07	1 500
Progestérone Phase proliférative*	4 200	0.3-1.5	
Phase sécrétoire*	42 000	20-Mar	2 800
Testostérone Homme	7 000	7	1 000
Femmes	200	0.3	700
Androsténone Homme	2 000	1.2	2 300
Femme	4 000	1.6	2 000
Séhydroépiandrostérone	5 000	5	1 600
Déhydroépiandrostérone sulfate	15 000	1 000	15
Oestradiol Phase proliférative	40	0.06	600
24 h avant ovulation		0.6	
Phase sécrétoire	200	0.2	800
Oestrone Phase proliférative	60	0.06	1 000
Phase sécrétoire	120	0.1	1 200

* Du cycle menstruel

** Cycle nyctéméral

Or, jusqu'à ce jour aucun rôle physiologique de la DHA et du SDHA n'a été décrit.

D'autre part parallèlement à la sécrétion (surrénalienne) de SDHA, il faut constater la sécrétion du sulfate d'Androsténediol.

Ce stéroïde a été décrit comme un androgène mineur à activité estrogénique (BONNEY R.C. et al. 1984a, 1984b) dont l'affinité pour la "Sex Binding Protein" plasmatique est plus forte que celle de l'estradiol.

C'est pourquoi au laboratoire nous nous intéressons aux relations oestradiol-Hormones Surréaliennes et le cancer du sein.

Si l'estradiol est un facteur de prolifération des cellules cancéreuses, qu'en est-il après la ménopause ?

Un certain nombre d'auteurs ont démontré que la DHA et l'Androsténediol ont un effet mitogène comparable à celui de l'oestradiol sur les cellules MCF₇ (cellules cancéreuses mammaires humaines).

De plus au laboratoire, il a été montré dans un travail récent (NAJID A. 1990) que la DHA pouvait-être aromatisée en oestradiol avec un faible rendement par les cellules MCF₇ en culture.

On pourrait penser d'après ces travaux que ces androgènes surréaliens pourraient servir de précurseur de l'oestradiol en période post ménopausique.

Dans les associations thérapeutiques utilisées dans le traitement du cancer du sein une place particulière est donnée au tamoxifène (NOLVADEX).

Il peut-être administré de différentes manières

- cyclique : à la dose de 30 mg/jour pendant trois semaines en alternance avec un traitement progestatif

- continue : seule à la dose de 30 mg/jour

Dans ces deux cas les études ont montré des résultats aussi satisfaisants avec l'un comme l'autre.

Le mode d'action de cette molécule dite antiestrogène n'est pas encore bien déterminé.

Or, il a souvent été remarqué qu'il avait une meilleure efficacité chez les femmes ménopausées que chez les non ménopausées (TREVOR-POWLES, 1988).

C'est pourquoi, en utilisant, un modèle cellulaire mis au point au laboratoire (NAJID, et al. 1989) nous allons essayer de déterminer l'interaction des androgènes surrénaux vis à vis du tamoxifène sur les cellules cancéreuses mammaires humaines MCF₇ en culture.

Dans un 1^{er} temps nous allons présenter les conditions expérimentales puis nous relaterons les résultats obtenus lorsque l'on fait agir simultanément le tamoxifène et les androgènes sur les cellules MCF₇ et enfin nous discuterons les résultats obtenus. Mais nous allons tout d'abord présenter rapidement les interrelations métaboliques entre les différents androgènes surrénaux et leurs implications dans le cancer du sein.

Chapitre I

Métabolisme des Androgènes

I - Biosynthèse

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. 3).

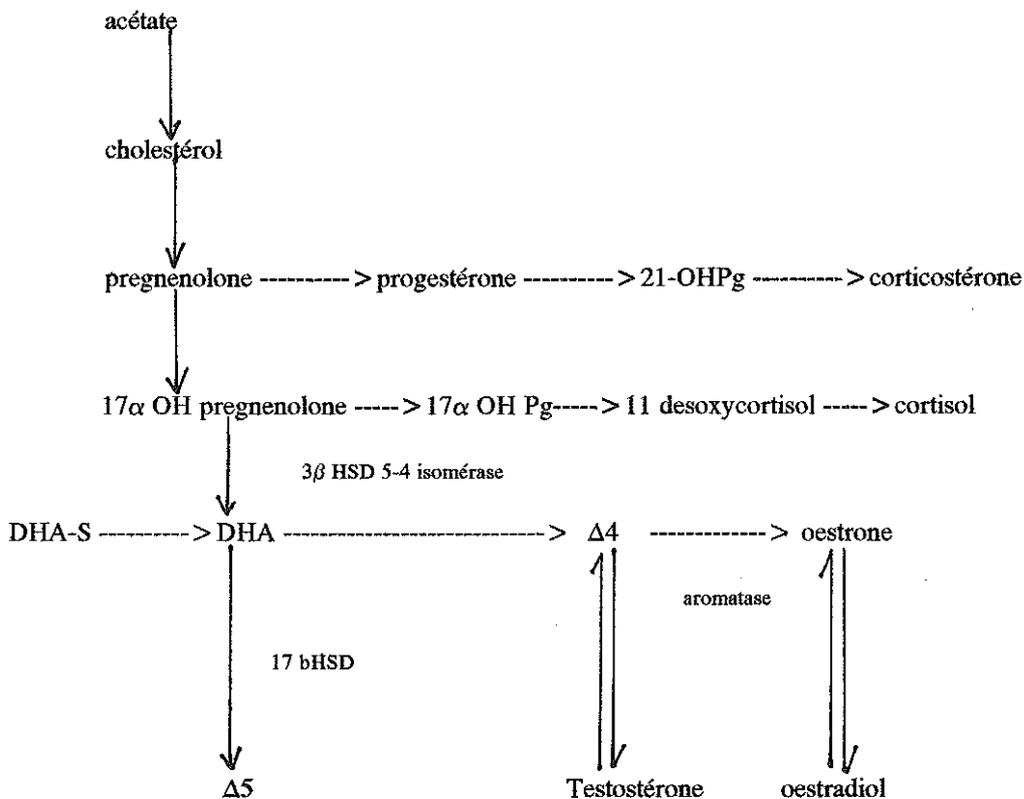


Figure 3 : Biosynthèse des androgènes par les corticosurrénales

Ces différents androgènes sont ensuite métabolisés par le foie selon la figure 2 pour donner des métabolites :

- 17 β 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. 4). 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 Δ^4 et, par conséquent des 17 oxostéroïdes, qui sont ensuite conjugués soit à l'acide sulfurique, soit à l'acide glucuronique (BEAULIEU & al. 1972).

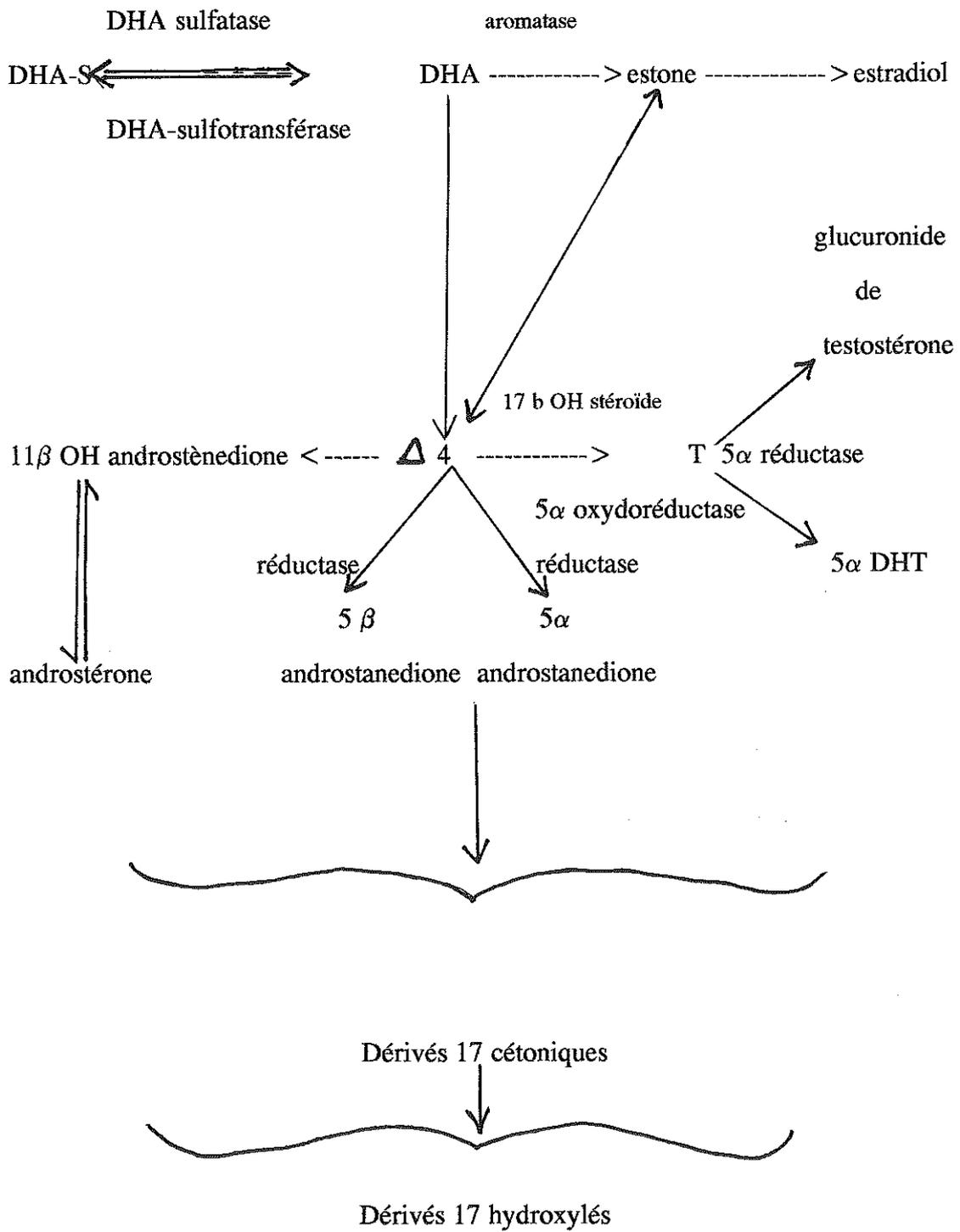


Figure 4 : Métabolisme de la D.H.A

2 - $\Delta 4$ ou Androsténédione

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'oestrogènes. 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, $\Delta 4$ est sécrétée principalement par la glande surrénale à un taux d'environ 1000 $\mu\text{g}/\text{j}$.

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'oestrone et de 0,15 % de celle de l'oestradiol.

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.

3 - 5-androstène-3 β , 17 β -diol ou Adiol

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



3 β ol déshydrogénase

II - Métabolisme dans les tissus périphériques

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 métabolites hydroxylés

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

- 5α androstane 3β 17β diol
- 5β androstane 3α 17β diol
- 5β androstane 3β 17β diol
- 5α androstane 3α 17β diol

Il est nécessaire de rappeler que les isomères en 17α peuvent aussi exister.

2 - Métabolites cétoniques

- androstérone

Il provient de la réduction en 5α et en 3α de la Δ^4 ou du métabolisme de la D.H.T (fig. 4).

- étiocholanolone

Il provient d'une double réduction en 5β et 3α de la Δ^4 (fig. 4).

III - Accumulation des Androgènes 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

Il a été 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., 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

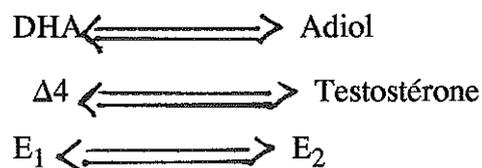
Ces derniers résultats suggèrent que la métabolisation se fait essentiellement dans le sens DHA-S ----> DHA avec une accumulation de cette dernière.

b - Action de la 17 β HSD

Cet enzyme de conversion est encore appelé 17 oxydoréductase, 17 cétostéroïde réductase (17-CSR) ou encore estradiol 17 β déshydrogénase.

Il n'a jamais été isolé et purifié ; de cet 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 β 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 l'Adiol.

3 - Métabolisme des androgènes surrénaliens par les tumeurs mammaires

La DHA est métabolisée en Adiol par la 17 β HSD, en DHA-S par la DHA-sulfotransférase et en 7-hydroxy DHA par la 7 β 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 β .

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 aromatase (O'NEIL & 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.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

I - Cellules MCF7

Cette lignée de cellules d'origine humaine a été obtenue à partir d'une métastase pleurale d'un endocarcinome mammaire apparu chez une femme ménopausée de 69 ans.

La souche a été obtenue et caractérisée par SOULE en 1972. Elle possède des récepteurs pour les hormones polypeptidiques et stéroïdiennes. Elle est dotée d'une importante activité de synthèse.

Les cellules nous ont été fournies par le docteur DEGREMOUX Patricia de l'unité INSERM 204 (Hôpital ST LOUIS Paris).

II - Entretien des lignées cellulaires MCF7

Avant toute étude nous devons entretenir les cellules dans un milieu de culture particulier.

1 - Préparation du milieu de base

Pour 5 l de milieu

- 48,58 g de MEM en poudre additionnée de rouge de phénol (GIBCO Ref. 72-1700)
- 11,9 g d'HEPES (Imperial Laboratory Ref.5-762-72)
- 2,9 g de Bicarbonate de Na
- 55 ml d'AA Non essentiels (GIBCO Ref. 43-1140 H)
(nécessaire à la croissance)
- 60 ml d'un mélange d'antibiotiques pour éviter toute contamination bactérienne
- 0,1 mg.ml⁻¹ de streptomysine (Imperial Laboratory 4-80407)

- 100 U.ml⁻¹ de penicilline

La préparation de ce mélange s'effectue sous agitation magnétique. Le pH est ensuite ajusté à 7,7 par addition de fractions successives d'une solution de NaOH N. Ce milieu est ensuite réparti stérilement en flacon de 250 ml et conservé à +4°C.

2 - Supplémentation du milieu de culture

En plus d'un milieu de base, les cellules ont besoin de sérum de veau foetal (SVF) (GIBCO Ref.13-6290-H) pour proliférer.

Celui-ci sera rajouté stérilement dans des proportions de 5 à 10 %.

L'insuline bovine ajoutée à la concentration de 5 µg/ml est utilisée comme facteur de croissance.

3 - Repiquage des cellules après trypsination

Après quelques jours passées à l'étuve à 37°C, les cellules cancéreuses arrivent à confluence, on doit alors les rediviser.

a - Rinçage des cellules

Les tapis cellulaires, après avoir été débarrassés de leur milieux sont lavés avec 2 ml d'une solution EDTA-STP dont la composition est la suivante.

- 1,38 mM de NaCl Normapur
- 27 mM de KCl (MERCK Réf. 4Q36)
- 81 mM Na₂ HPO₄, 12 H₂O
- 14,7 mM de KH PO₄

- 30 MM d'EDTA Tritiplex III (Merck 9418)

Le pH est ajusté à 7,4 avec NaOH 1N.

Lors de l'utilisation, cette solution sera diluée $1/10$ avec de l'eau pyrodistillée.

Ce lavage préalable permet de débarrasser les cellules des ions Mg^{2+} et Ca^{2+} responsables en partie de leur adhésion à la boîte.

b - La trypsination

Cette opération doit son nom à l'emploi d'une solution de trypsine EDTA (0.05 % - 0.02 %).

Celle-ci, sous un volume de 1 ml , va permettre de décoller les cellules par son activité protéasique.

Après 1 à 2 minutes, elle sera neutralisée par 9 ml de milieu. La suspension cellulaire sera aspirée et remuée plusieurs fois pour bien individualiser les cellules. Ce volume de 10 ml sera réparti dans deux boîtes soit deux nouvelles cultures avec 5 ml de milieu.

4 - Congélation des cellules

a - Milieu de congélation

- milieu de culture 5 % SVF : 75 V

- DMSO : 10 V

- SVF : 15 V

(Sérum de veau foetal)

b - Congélation

Les cellules, après avoir été trypsinées, sont centrifugées stérilement pendant 5 minutes à 1000 g.

Après élimination du surnageant on ajoute 1 ml de milieu de congélation aux cellules.

Les tubes de congélation sont ensuite placés successivement :

- 30 minutes à -20°C

- 24^H à -80°C

puis conservé dans l'azote liquide

c - Décongélation

Le contenu du tube de congélation réchauffé entre les mains, est placé dans 3,5 ml de milieu de culture à 20 % de SVF.

Après une nuit d'incubation à 37°C le milieu est décanté et remplacé par du milieu de base à 10 % de SVF contenant un 3^{ème} antibiotique (la gentamycine).

III - Préparation du sérum de veau foetal destéroïdé (SVFd)

Si l'on veut étudier l'action des stéroïdes sur les cellules en culture, il est nécessaire d'éliminer ceux qui sont contenus dans le SVF. C'est la raison pour laquelle nous préparons un SVF dit destéroïdé (SVFd).

On peut dire aussi que ce traitement équivaut à l'élimination des facteurs de croissance des cellules.

Ces cellules ainsi privées de facteurs de croissance devront synthétiser leurs propres facteurs de croissance (autocrines) pour assurer leur prolifération.

La croissance est donc ralentie mais l'activité des stéroïdes (estrogènes, androgènes) est plus facile à déterminer.

1 - Traitement effectué

On rajoute au serum :

- 1 % de charbon végétal NORIT en poudre
- 0,1 % de Dextran T 70 ou agitation magnétique à 56°C. On effectue ensuite une centrifugation à 3000 g pendant 20 minutes à 37°C. Cette opération est répétée deux fois.

Le surnageant sera ensuite filtré successivement sur filtre Millipore d'abord 0,45 μm puis 0,22 μm .

2 - Résultat du traitement

L'efficacité du traitement a été suivi par le dosage de certains paramètres biologiques.

Le dosage des différents hormones ont été réalisés par radioimmunologie et les protéines par la méthode de LOWRY et al. 1951.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau III.

Tableau III : Dosages de quelques constituants des sérums de veau foetal complets (SVF) et traités au charbon dextran.

	SVF	SVF TCD
	ng/ml	
DHA	0,3	0,035
DHAS	22	ND
Testosterone	0,115	ND
Estradiol	0,056	ND
Insuline (μ U/ml)	27	4
Proteines (mg/ml)	36,7	28,45

ND : non déterminé

On peut conclure que ce traitement élimine efficacement les stéroïdes recherchés ainsi que l'insuline. La concentration des protéines dans le SVF-TCD est diminuée.

IV - Méthode de dosage de l'ADN

Pour estimer la prolifération cellulaire nous avons choisi de doser l'ADN cellulaire en utilisant le bromure d'éthidium.

1 - Principe

On utilise un intercalant fluorescent le bromure d'éthidium dont les caractéristiques physiques sont :

- longueur d'onde d'excitation = 504 nm
- longueur d'onde d'émission = 593 nm

Sous l'action d'un rayonnement excitateur à 503 nm, le bromure d'éthidium fixé à la molécule d'ADN, émet une fluorescence à 593 nm proportionnelle à la quantité d'ADN présent.

Cette fluorescence est mesurée dans une cuve à quartz avec un spectrofluorimètre JOBIN YVON JY3.

2 - Les réactifs

Solution étalon d'ADN (1 mgml⁻¹ dans NaCl 10 mM) dilué au $1/100$ dans de l'eau pyrodistillée.

- bromure d'éthidium (Sigma E 8751) 0,5 mgml dilué $1/40$
- NP 40 dilué au $1/1000$ dans de l'eau pyrodistillée. Il s'agit d'un mouillant dont l'action permet de libérer entièrement l'ADN de la cellule.

3 - Dosage de l'ADN

Les tubes contenant le milieu cellulaire dans le mélange STP EDTA-Trypsine sont décongelés à température ambiante et agités de façon à remettre les cellules en suspension.

Les mesures se font sur un volume de 5 ml =

- 20 ml de bromure d'éthidium $1/40$

- 2 ml de NP 40 $1/1000$
- 500 ml de la suspension à doser
- eau pyrodistillée pour compléter à 5 ml

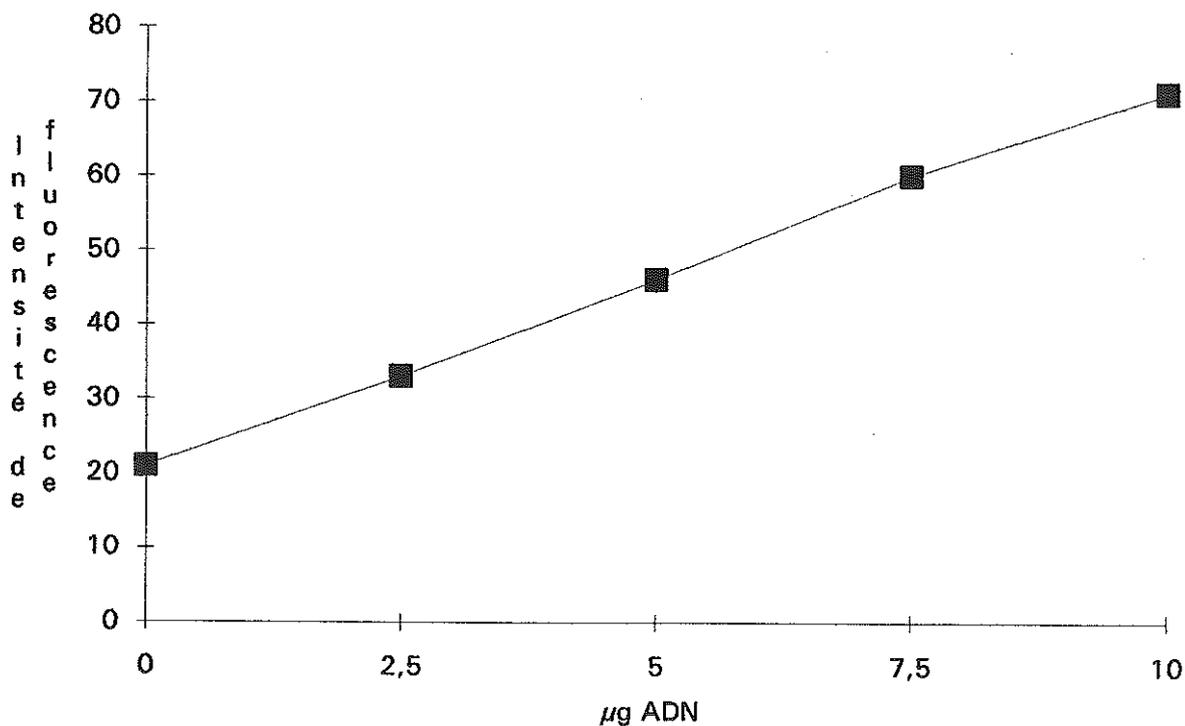
Les tubes sont agités et la lecture est faite à l'aide d'un spectrofluorimètre à une sensibilité de 0,1.

Les densités optiques sont reportés sur une courbe étalon.

4 - Gamme étalon (Figure 5)

Elle a réalisée à partir d'une solution d'ADN (1 mg/ml^{-1} dans NaCl 10 mM) dilué au $1/100$. Les densités optiques lues sur l'appareil correspondent respectueusement à $0 \mu\text{g}$ - $0,25$ - $0,5$ - $1 \mu\text{g}$ d'ADN).

On réalise ainsi une courbe étalon :
densité optique en fonction de la quantité d'ADN.



Chapitre III

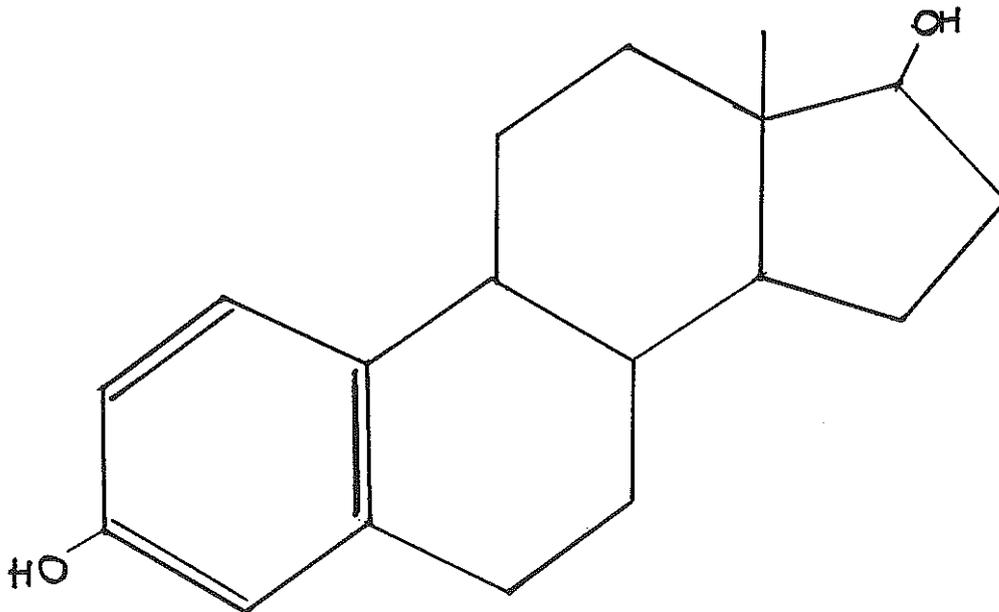
Résultats

Dans un travail antérieur NAJID et al. 1989, avaient montré que pour obtenir un effet mitogène maximum de l'estradiol il fallait que les cellules MCF7 soient cultivées pendant 15 jours dans un milieu de culture contenant 5 % de SVFd. A l'aide de ce protocole nous allons étudier d'une part l'action mitogène des différents androgènes et métabolites sur les cellules et comparer leur action lorsqu'ils sont additionnés simultanément à ces cellules avec du tamoxifène.

1 - Description des molécules étudiées

a - Estradiol 17 β - 1,3,5 (10) estradiol 3, 17 β diol

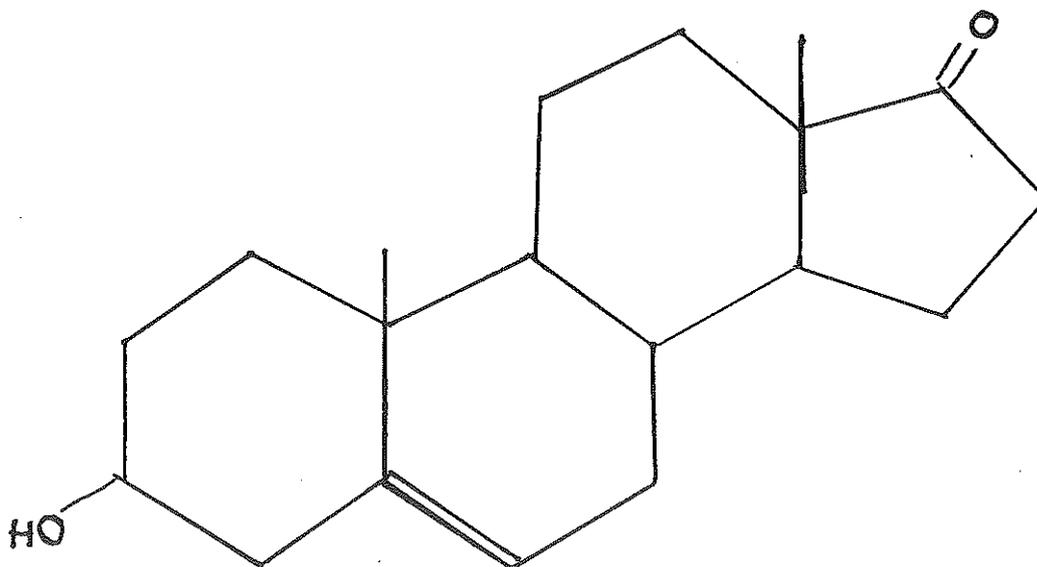
Ref. Sigma E 8875



b - DHA - Dehydroepiandrosterone ou 3 β -hydroxy-5-androstène-

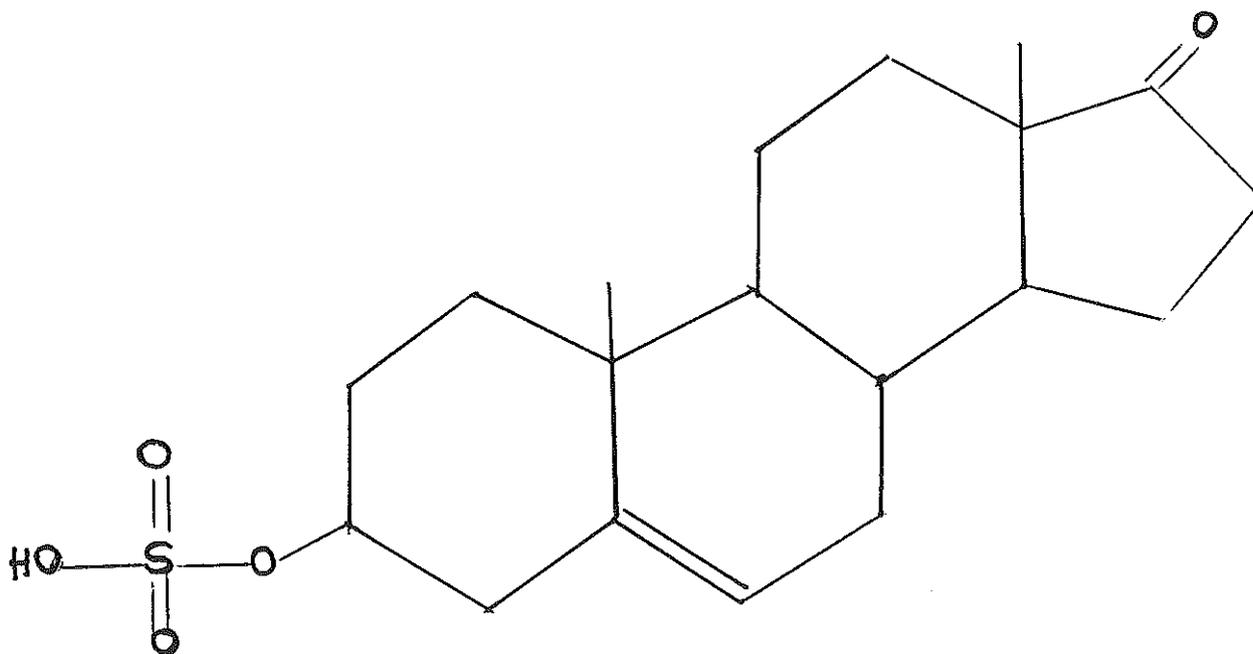
17-one-

Ref. Sigma D 40000



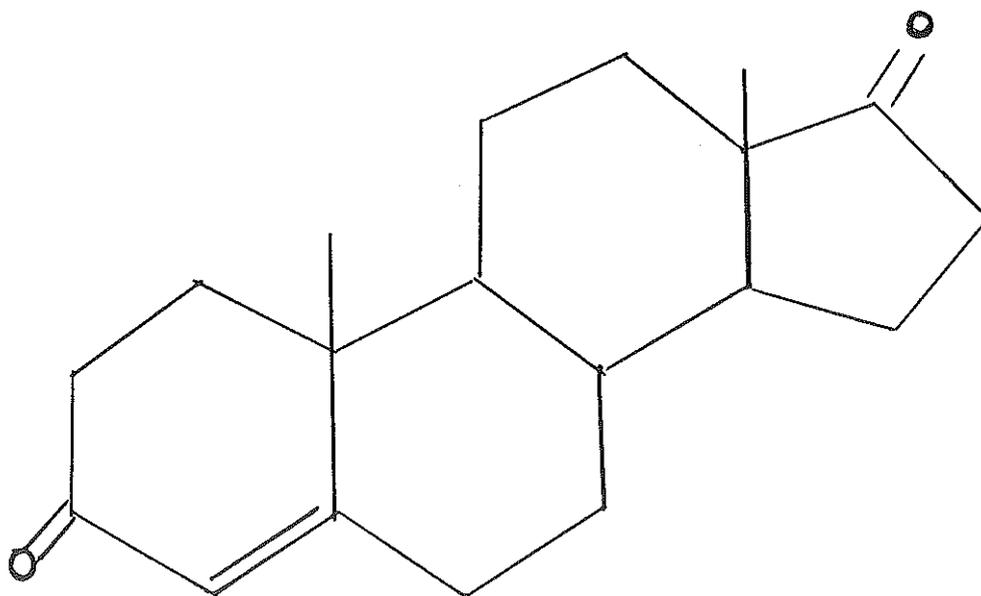
c - SDHA - 3 β -sulfate-5-androstène-17-one

Ref. Sigma D4625



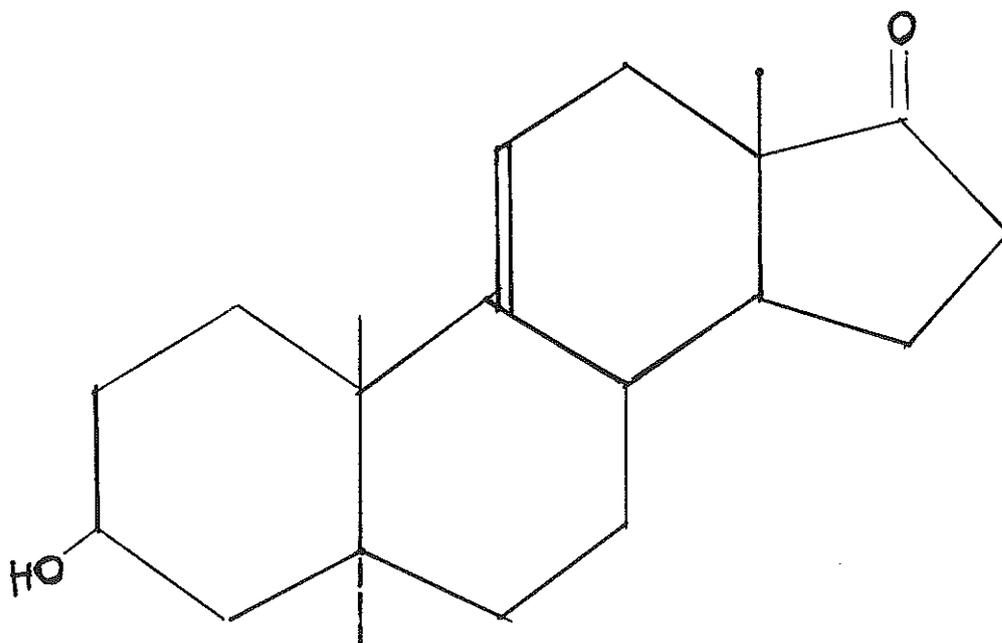
d - Δ 4-Androstènedione ou 4 androstène 3.17 dione

Ref. Sigma A 9630



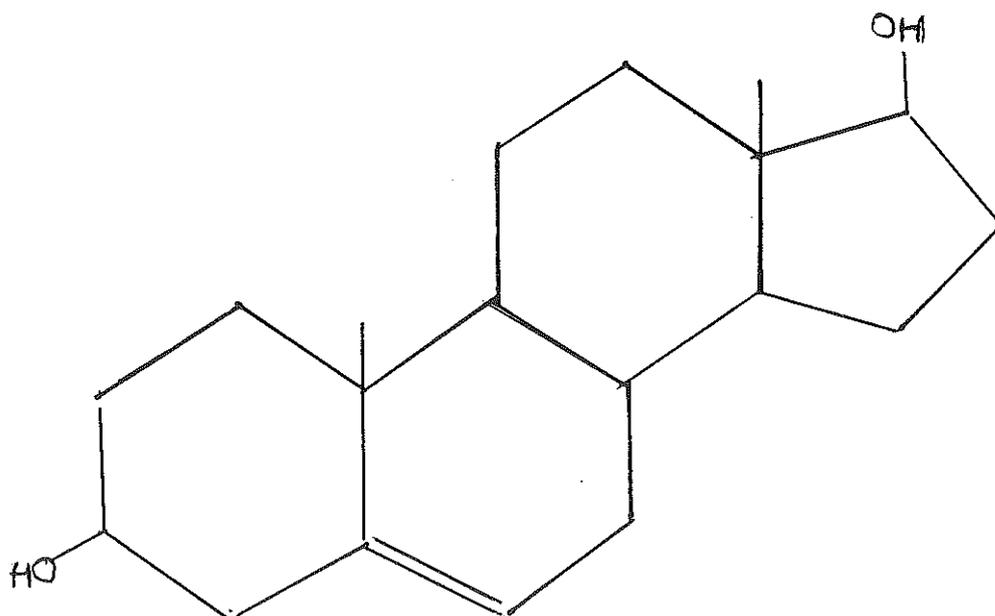
e - Iso DHA 5 α -androst 9 (11)-ène-3 β ol-17-one

Ref. Sigma



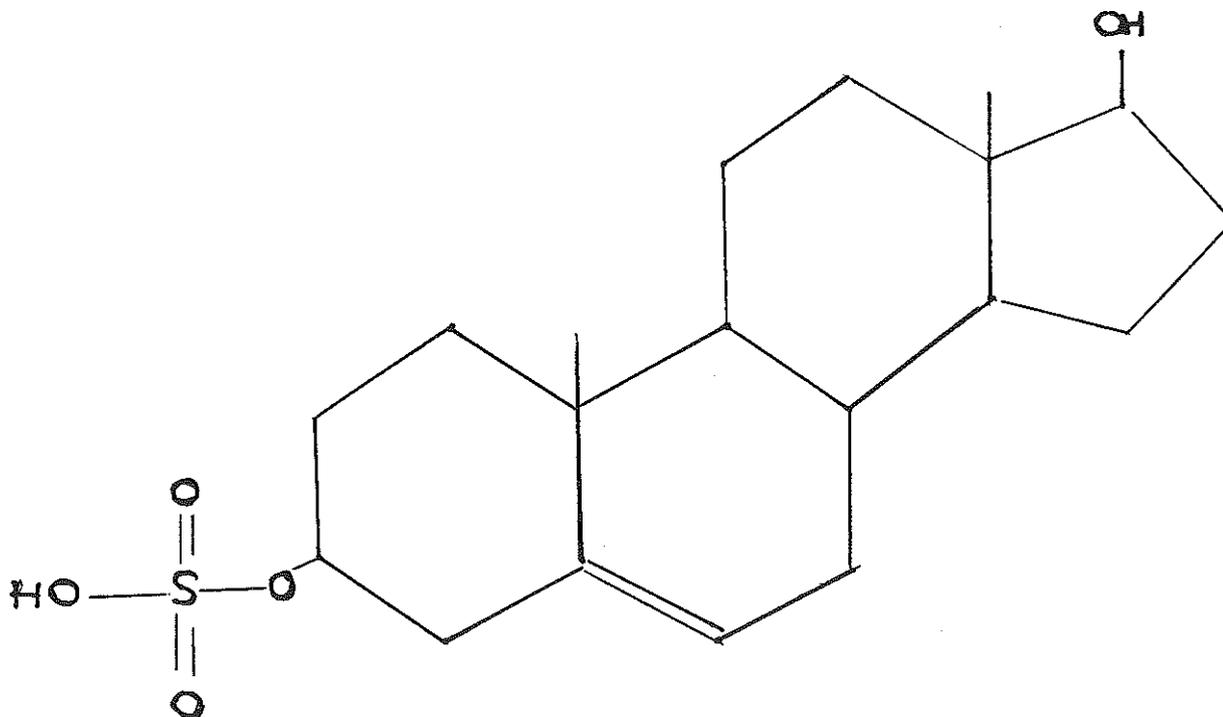
f - Δ 5 ou 5-androstène-3 β , 17 β -diol

Ref. Sigma 5600



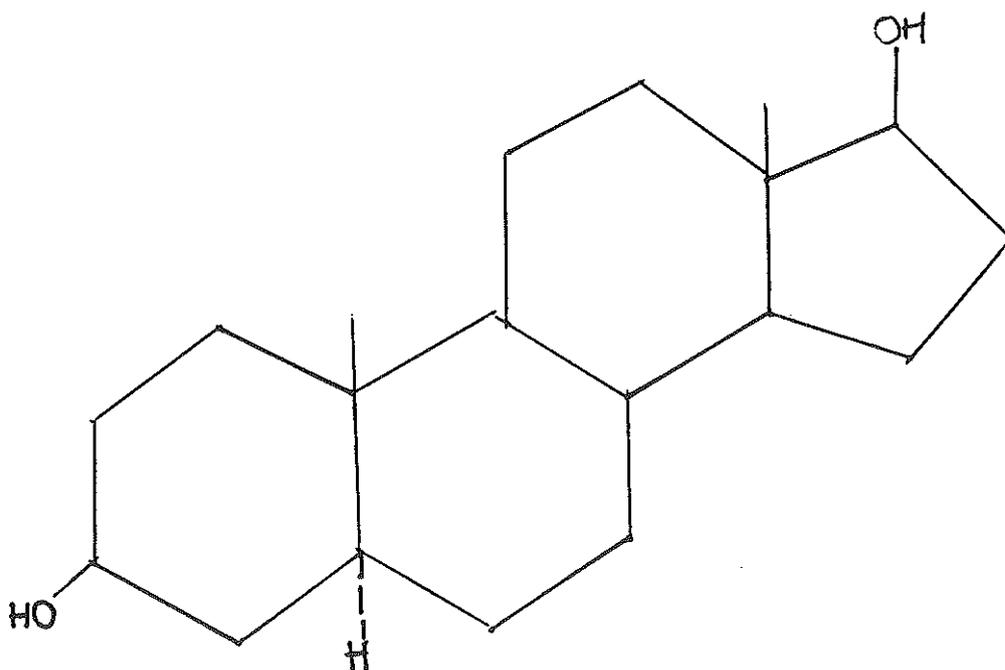
g - Δ^5 ou 5-androstène-3 β Sulfate-17 β -ol

Ref. Sigma 5610



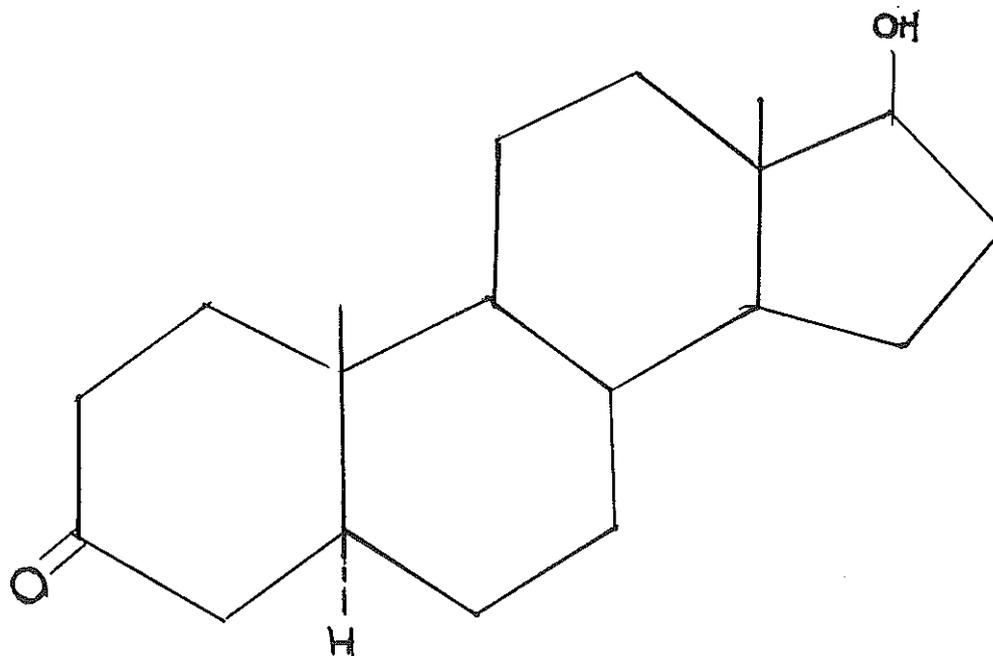
h - 5 α 3 β -5 -androstane-3 β , 17 β -diol-

Ref. Sigma A 1220



i - DHT - Dihydrotestostérone : 5 α -androstane - 17 β ol-3 one

Ref. Sigma A 2570



2 - Description du protocole utilisé

Tous les ensemencements et récoltes se déroulent sous une hotte stérile.

Les courbes de croissance ont pour support des boîtes stériles à 6 puits.

L'expérience se déroule sur 11 jours avec des récoltes à différents temps.

J1 = témoin de culture, J7 et J11.

Les différentes étapes sont les suivantes :

A Jo (Jour 0) les cellules sont trypsinées, comptées à la cellule de Malassez pour déterminer le volume représentant un inoculum de 50 000 cellules/puits.

A J1 (Jour 1)

Après une nuit d'incubation le milieu des puits est prélevé et les cellules sont trypsinées. Ce seront les témoins des cultures cellulaires c'est à dire qu'elles ont poussé en l'absence de tout effecteur.

Dans les différents puits, les effecteurs sont rajoutés.

Sur chaque boîte 6 puits, nous étudions 3 concentrations différentes d'effecteurs, afin de déterminer laquelle sera la plus efficace et de mettre en évidence celle qui éventuellement sera capable de rentrer en compétition avec le tamoxifène.

Tous les effecteurs seront testés en présence de tamoxifène à 10^{-4} M.

A J7 (Jour 7)

Les récoltes s'effectuent par trypsination avec 1 ml de trypsine EDTA après le lavage des puits par un ml de PBS-EDTA.

Les cellules ainsi prélevées seront placées dans des tubes congelés, étiquetées et numérotés.

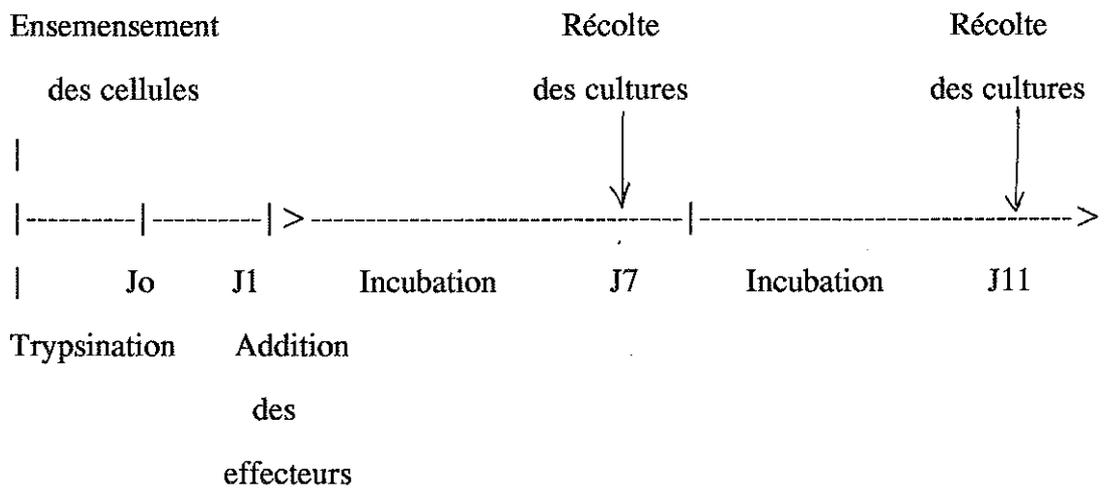
Une succession de congélation-décongélation servira à faire éclater les cellules dans le but de libérer leur ADN pour faciliter son dosage.

A J11 (Jour 11)

Ce sera le dernier prélèvement. Il s'effectue selon la même méthode que pour J7.

La mesure du DNA se fera soit sur 0,5 ml, soit sur 1 ml du trypsimat.

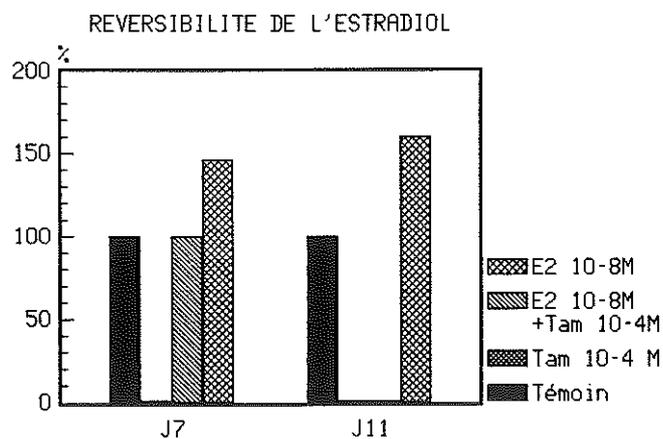
Protocole d'expérimentation



3 - Témoins de culture

Croissance cellulaire en présence d'estradiol (DNA en $\mu\text{g/puits}$)

Jour de travail	10-8 M estradiol	Témoin SVFd	10-8 M estradiol " + 10-4 M Tamoxifène
J7	3,55 146%	0,175 100%	1,75 100%
J11	5,6 160%	0,35 100%	0



Le pourcentage indiqué (entre parenthèses), représente pour un jour de recueil, le rapport entre la croissance en présence d'un effecteur et la croissance témoin SVFd.

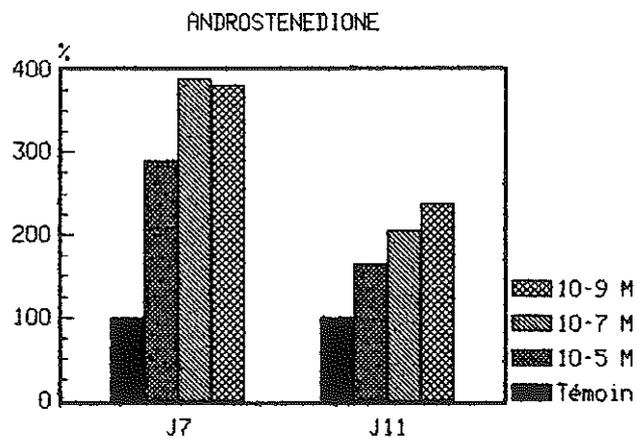
Pour tous les tableaux à venir la présentation sera identique.

A chaque tableau on associe un histogramme construit à partir des rapports obtenus.

5 - Résultats

a - $\Delta 4$ ou androsténedione

Adiol		10-5 M	10-7 M	10-9 M
J7	sans tamoxifène	0,51 "(290)	0,68 "(388)	0,68 "(380)
	avec tamoxifène	0	0	0
J11	sans tamoxifène	0,58 "(165)	0,72 "(205)	0,83 "(237)
	avec tamoxifène	0	0	0



On note une dose dépendance, en effet à J7 et J11, les concentrations les plus actives sont 10^{-9} M et 10^{-7} M.

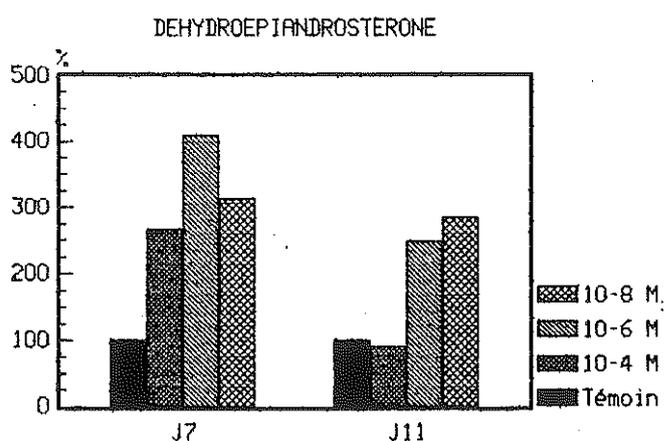
A partir de J11, il y a un ralentissement de la croissance.

Donc la croissance n'est pas temps-dépendant car elle n'augmente pas avec le temps du contact cellules MCF₇/effecteur $\Delta 4$.

Ici la croissance des cellules en présence des effecteurs et du tamoxifène 10^{-4} M est nulle.

b - Dehydroepiandrosterone (DHA)

DHA		10-4 M	10-6 M	10-8 M
J7	sans tamoxifène	0,47 "(268)	0,72 "(411)	0,55 "(314)
	avec tamoxifène	0	0	0
J11	sans tamoxifène	0 "(90)	0,86 "(248)	-1 "(285)
	avec tamoxifène	0	0	0



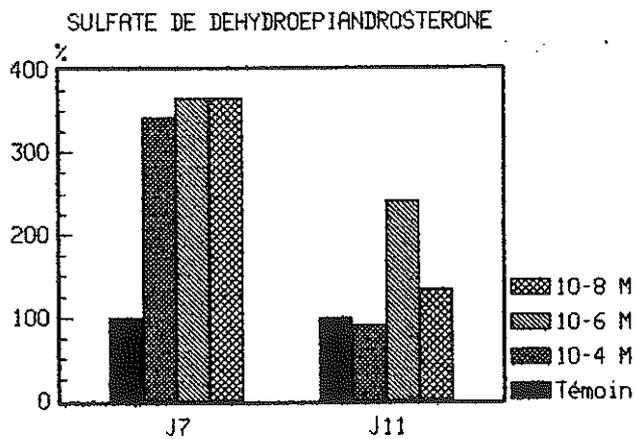
Ici le résultat maximal est à J7 pour la concentration 10^{-6} M, on peut donc remarquer que l'effet mitogénique du DHA est très marqué dès les premiers jours de contact.

On peut comparer ces résultats à ceux de son sulfate (cf. ci-après). On remarque que pour la même concentration à J7 la croissance est plus faible (à 10^{-4} M) par contre à J11 le DHA 10^{-6} M est plus efficace. On peut supposer qu'il y a une réaction de plus à faire : action d'une sulfatase ce qui retarde un peu l'activité de cette molécule.

Ici on peut noter que la croissance avec le tamoxifène est nulle.

c - SDHA ou sulfate de dhydroepiandostérone

SDHA	10-4 M	10-6 M	10-8 M
J7	sans tamoxifène 0,6 "(342)	0,64 "(365)	0,64 "(365)
	avec tamoxifène 0	0	0
J11	sans tamoxifène 0 "(90)	0,95 "(271)	0,68 "(262)
	avec tamoxifène 0	0	0



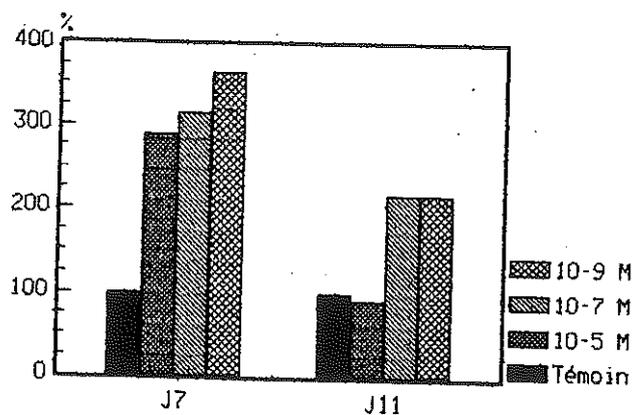
Ici on remarque que l'effet mitogénique à J7 est moins marqué que pour la DHA. Il ne s'installe vraiment qu'à J11 car le temps de contact a été plus important.

On peut noter qu' à 10^{-4} M comme pour la DHA l'effet mitogène du SDHA est nul.

La croissance des cellules avec la tamoxifène est toujours nulle.

d - DHT ou dihydrotestostérone

DHT		10-5 M	10-7 M	10-9 M
J7	sans tamoxifène	0,51 "(290)	0,55 "(314)	0,64 "(365)
	avec tamoxifène	0	0	0
J11	sans tamoxifène	0 "(90)	0,76 "(217)	0,76 "(217)
	avec tamoxifène	0	0	0

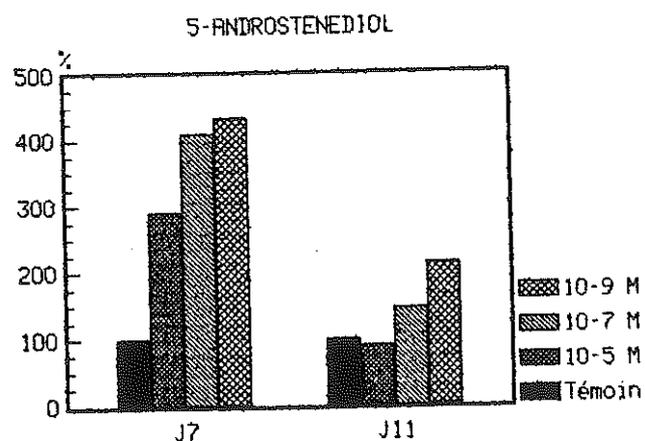
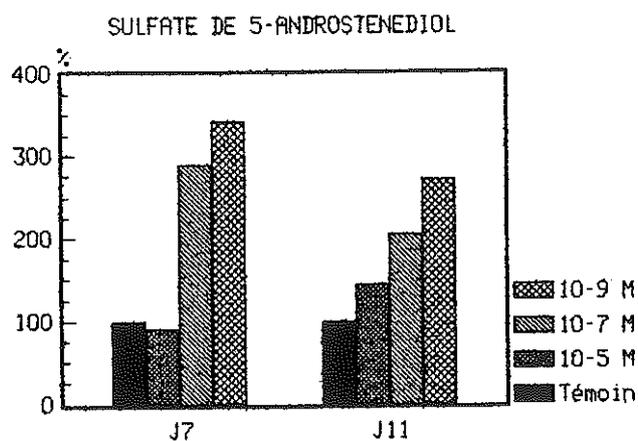


Ici on remarque que l'effet mitogénique est visible à J7 surtout pour la concentration 10^{-9} M. Par contre à J11, l'effecteur semble inhiber la croissance des cellules ce qui confirmerait les résultats précédemment obtenus (PUIGROS D. 1991). En effet, cette substance a déjà été décrite comme à la fois stimulante ou inhibitrice selon les concentrations et le temps de contact.

La croissance cellulaire en présence de tamoxifène est toujours nulle.

e - Androstène-3 β , 17 β -diol (5 diol) et son sulfate

$\Delta 5$		10-5 M	10-7 M	10-9 M
J7	sans tamoxifène	0 "(90)	0,51 "(290)	0,6 "(342)
	avec tamoxifène	0	0	0
J11	sans tamoxifène	0,51 "(145)	0,72 "(205)	0,95 "(271)
	avec tamoxifène	0	0	0



$\Delta 5$ diol		10-5 M	10-7 M	10-9 M
J7	sans tamoxifène	0,51 "(290)	0,72 "(411)	0,76 "(434)
	avec tamoxifène	0	0	0
J11	sans tamoxifène	0 "(90)	0,51 "(145)	0,75 "(217)
	avec tamoxifène	0	0	0

Ici on peut se permettre de faire un parallèle entre le $\Delta 5$ et son sulfate.

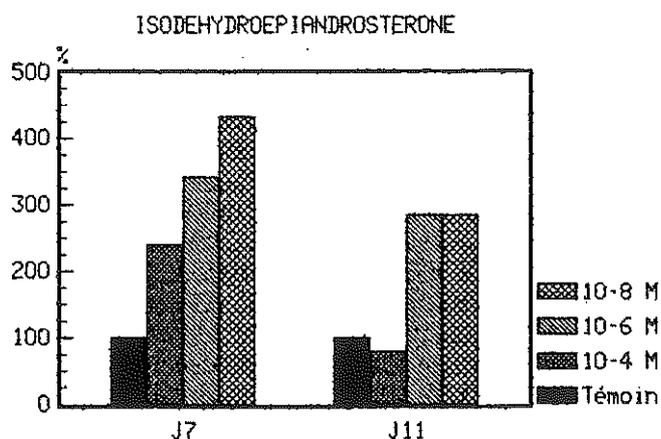
Ici encore l'activité mitogène est visible dès J7 surtout pour les concentrations 10^{-7} M et 10^{-9} M avec une prédominance pour cette dernière.

Par contre pour le S $\Delta 5$ l'activité mitogénique s'installe progressivement à J7 en fonction de la concentration. Elle est plus marquée seulement à J11 pour 10^{-4} M. Sans doute que l'activité du sulfate est liée à son hydrolyse.

Pour ces deux substances la croissance en présence de tamoxifène est nulle.

f - 5 α -androst-9 (11)-ène-3 β ol-17-one (iso DHA)

iso DHA	10-4 M	10-6 M	10-8 M
J7	sans tamoxifène 0,42 "(240)	0,6 "(342)	0,76 "(434)
	avec tamoxifène 0	0	0
J11	sans tamoxifène 0 "(90)	1 "(285)	1 "(285)
	avec tamoxifène 0	0	0



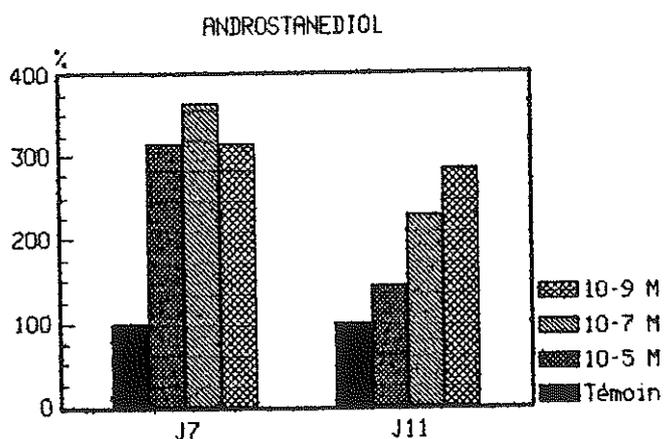
Ici on peut rapprocher cette molécule à son groupe des androgènes mineurs DHA et SDHA.

L'effet mitogénique est très fort autant à J7 que J11. C'est un puissant stimulateur de la croissance surtout aux faibles concentrations à 10⁻⁸ M. Ici la stéréochimie de la molécule ne rentre pas en jeu. Car dès J7 la molécule est active et donne son efficacité maximale.

Ici aussi, la croissance en présence de tamoxifène est nulle.

g - 5 α -androstanediol-3 β , 17 β -diol (5 α β diol)

5 α β diol	10-5 M	10-7 M	10-9 M
J7	sans tamoxifène 0,55 "(314)	0,64 "(365)	0,55 "(314)
	avec tamoxifène 0	0	0
J11	sans tamoxifène 0,51 "(145)	0,8 "(228)	1 "(285)
	avec tamoxifène 0	0	0



Pour cette dernière substance on remarque qu'à toutes les concentrations le 5 α 3 β -17 β diol présente une activité mitogénique. Le résultat maximal se trouve à J7 pour 10⁻⁷ M ainsi qu'à J11 pour 10⁻⁹ M.

C'est également une substance ayant une forte activité mitogénique. Pourtant associé au tamoxifène, la croissance des cellules MCF₇ est nulle.

CONCLUSION

Dans nos conditions opératoires, les androgènes surrenaliens étudiés présentent un effet mitogène pour toutes les concentrations au bout de 7 jours de culture. L'effet maximum est obtenu pour des concentrations allant de 10^{-6} M à 10^{-8} M.

Pour toutes molécules étudiées, la croissance est diminuée à J11 par rapport à J7. On peut remarquer que généralement l'effet mitogène maximal est observé avec la plus faible concentration.

Dans nos conditions, l'androstène donc présente un effet mitogène quelle que soit la concentration. Ce résultat ne reproduit pas celui obtenu par PUIGROS D. 1991., qui avait trouvé pour un même stéroïde un effet inhibiteur de croissance.

Cette différence de résultat pourrait dû à la provenance des cellules. En effet les cellules utilisées dans ce travail proviennent de DEGREMOUX, INSERM 204, alors que celles de PUIGROS proviennent de J.C. NICOLAS et Mr PONS INSERM U58 (Montpellier).

En présence de tamoxifène 10^{-4} M, la croissance cellulaire est totalement stoppée dès J7.

Pour ce temps de culture seul l'estradiol 10^{-8} M en présence de tamoxifène permet une croissance cellulaire sensiblement identique au témoin.

Par contre à J11, dans les mêmes conditions, toutes les cellules sont détruites.

Ce phénomène est observé dès J7 pour tous les androgènes étudiés en présence de tamoxifène.

Or ces androgènes comme l'estradiol présentent un effet mitogène.

La différence de comportement à J7 entre l'estradiol et ces androgènes vis à vis du tamoxifène serait en faveur d'un mode d'action différent de ces stéroïdes.

Il est connu que dans certaines conditions l'estradiol peut annuler l'effet du tamoxifène JOZAN 1984, DABRE 1984, BRIAND 1984, ALLEGRA 1980. Nous avons observé cet effet à J7. Mais il serait nécessaire de confirmer ces observations avec des concentrations différentes à la fois de l'E₂ et du tamoxifène, et en utilisant ces conditions, (concentrations en tamoxifène plus faible, par exemple) renouveler ces expérimentations avec les androgènes surrénaliens.

Si en utilisant des concentrations moins drastiques en tamoxifène, les résultats obtenus se confirmaient, nous serions alors en présence d'un modèle d'étude permettant de mieux comprendre le mode d'action à la fois du tamoxifène et des androgènes surrénaliens et donc l'utilisation du tamoxifène en clinique.

BIBLIOGRAPHIE

Institut National de la Santé et de la Reherche Médicale. Service Commun N° 8
d'information sur les causes médicales de décès.

Institut National de la Santé et de la Recherche Médical. Service Commun N° 17
sur la morbidité et la mortalité en france.

[1] **ABUL-HAJJ Y.L.**

Metabolism of Dehydroepiandrosterone by hormone dependent and hormone independent human brest carcinoma.

Steroids, 1975, 26 : 488-500.

[2] **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. Hormo. Res. 1972, 27 : 351-419.

[3] **BAULIEU E.E., MILLGROM E. et PROBEL**

Les hormones stéroïdes : in Glandes Endocrines, 1972, Baulieu E.E., Bricaire H. et Leprat (Flammarion Médecine) Paris, 1972 pp 57-88.

[4] **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 conujugate content.

Cancer Res., 1988, 48, 5860-5863.

- [5] **BONNEY R.C., SCANLON M.J, REED M.J. , JONES D.L.,
VERANEK 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.
- [6] **BONNEY RC.C, SCANLON M.J., JONES D.L., BERANEK P.A.,
REED M.J. & JAMES V.H.T.**
The interrelationship between plasma 5- α adrenal androgens in normal
women.
J. Steroid Biochem., 1984, **20**, 1353-1355.
- [7] **BRIAND Per and E. LYKKESFELDT Anne**
Effect of Estrogen and Antiestrogen on the Human Breast cancer Cell Line
MCF-7 Adapted to Growth at Low Serum Concentration.
Cancer Research 1984, **44** : 1114-1119.
- [8] **CYPRANI 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.
- [9] **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.

- [10] **JOSEPH C., ALLEGRA and MARC E. LIPPMAN**
The effects of 17 β Estradiol and Tamoxifen on the ZR-75-1 Human Breast Cancer Cell Line in defined Medium.
J. Cancer Vol. 16, pp. 1007-1015.
- [11] **JOZAN Suzanne**
Prolifération cellulaire d'un adénocarcinome mammaire humain (lignée MCF-7) : mise au point de modèles ; effets des oestrogènes, des antiostrogènes et des lipoprotéines.
(Thèse Université Paul SABATIER de Toulouse, 1985)
- [12] **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.
- [13] **LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J.**
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275.
- [14] **NAJID A., HABRIOUX G.**
Biological Effect of Adrenal Androgens on MCF-7 and BT-20 Human Breast Cancer Cell.
Oncology 1990, 47 : 269-274.
- [15] **NAJID A., NICOLAS A., TIXIER M & HABRIOUX G.**
Mitogenic effect of estradiol on human breast cancer MCF-7 cells can be modulated by serum.
Expl. Cell Biol., 1989a, 57 : 139-145.

- [16] **NAJID A.**
Comparision de l'effet des androgènes surrenaliens et de l'estradiol - 17β
sur des cellules cancéreuses mammaires humaines MCF-7 et BT-20 en
culture.
(Thèse Université Claude Bernard-Lyon I, 1990).
- [17] **O'NEIL J.S. et MILLER W.R.**
Aromatase Activity in breast tissue from breast quadrants : a link with tumor
site.
Br. Med. J., 1988, **296** : 741-743.
- [18] **PHILIPPA D., DARBRE, Sally CURTIS AND R.J. KING**
Effects of Estradiol and Tamoxifène on Human Breast Cancer Cell in
Serum-free Culture.
Cancer Research 1984, **44** : 2790-2793.
- [19] **PUIGROS Delphine**
Influence de stéroïdes d'origine surrenalienne sur la croissance des cellules
cancéreuses mammaires en culture (MCF₇).
Limoges, Thèse de docteur en Pharmacie 1991.
- [20] **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.
- [21] **TREVOR J. POWLES**
Advanced Breast Cancer - New Approaches to Treatment : a review.
J. Cancer Clin. Oncol. 1998, **21** : pp. 95-98.

[22] WATERHOUSE J., MUIR C., SHANMUGARATNAM K., POWELL

J.

Cancer Incidence in Five Continents.

Vol IV. Lyon : IARC, 1982.

Table des matières

PLAN	6
INTRODUCTION	10
Chapitre I : Métabolismes des androgènes	17
I - Biosynthèse	18
1 - Dehydroepiandrosterone (DHA).....	19
2 - Δ^4 ou androstènedione	21
3 - 5-androstène-3 β , 17 β -diol (Adiol)	21
II - Métabolisme dans les tissus périphériques	22
1 - Les métabolites hydroxylés	22
2 - Les métabolites cétoniques	22
III - Accumulation des androgènes au niveau des tissus mammaires	23
1 - Kyste mammaire	23
2 - Tumeur mammaire	23
a - Action de la DHA sulfatase	23
b - Action de la 17 β HSD	24
3 - Métabolisme des androgènes surrénaliens par les tumeurs mammaires	24

Chapitre II : Matériels et méthodes	26
I - Cellules MCF7	27
II - Entretien des lignées cellulaires MCF7	27
1 - Préparation du milieu de base	27
2 - Supplémentation du milieu de culture	28
3 - Repiquage des cellules après trypsination	28
4 - Congélation des cellules	29
III - Préparation du sérum de veau foetal destéroïdé (SVFd) 30	
1 - Traitement effectué	31
2 - Résultat du traitement	31
IV - Méthode de dosage de l'ADN	32
1 - Principe	33
2 - Les réactifs	33
3 - Dosage de l'ADN	33
4 - Gamme étalon	34
 Chapitre III : Résultats	 35
1 - Descriptif des molécules étudiées	37
a - 17β -1, 2, 5 (10) estratiène 3,17 β diol	37
b - 3 β -hydroxy-5-androstène-17 one	37
c - 3 β -sulfate-5-androstène-17 one	38

d - Dehydrotestostérone	38
e - 5 α -androst-9 (11)ène-3 β -ol, 17 one	39
f - 5-androstène-3 β , 17 β -diol	39
g - 5-androstène-3 β sulfate-17 β -ol	40
h - 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol	40
i - 5 α -androstane-17 β ol-3 one	41
2 - Descriptif du protocole utilisé	42
3 - Témoins de culture	44
4 - Résultats	45
a - Δ 4-androstène dione	45
b - Déhydroepiandrostérone	46
c - Sulfate de déhydroepiandrostérone	47
d - Dehydrotestostérone	48
e - 5-androstène-3 β , 17 β -diol (Adiol) et son sulfate..	49
f - 5 α -androst-9 (11) ène-3 β ol, 17 one	51
g - 5 α -androstenediol-3 β , 17 β diol	52
CONCLUSION	53
BIBLIOGRAPHIE	55
TABLE DES MATIERES	60

RESUME

En utilisant une méthode d'étude in vitro de la croissance des cellules cancéreuses mammaires estrogéno-dépendantes nous avons pu mettre en évidence l'effet de certains androgènes surrenaliens ainsi que de leurs métabolites :

- Adiol et son sulfate
- DHA et son sulfate
- Dehydrotestostérone
- 5α 3β
- Iso DHA
- $\Delta 4$

Nous avons étudié l'effet de ces androgènes en présence de tamoxifène afin de démontrer la capacité de ces molécules à s'opposer à l'effet du tamoxifène.

Pour chaque substance en présence de tamoxifène 10^{-4} M nous n'avons obtenu aucune croissance cellulaire donc nous pouvons conclure, dans nos conditions et contrairement à l'estradiol, que ces androgènes ne peuvent annuler l'effet du tamoxifène.

Mots clés :

- Sein
- Cancer
- Cellules MCF-7
- Androgènes
- Tamoxifène
- Ménopause