

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

Année 1992

Thèse n° 2313

**INFLUENCE DES PHYTOOESTROGENES SUR
LA CROISSANCE DES CELLULES
CANCEREUSES MAMMAIRES
EN CULTURE MCF-7**

THESE
POUR LE
DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et Soutenue publiquement le 28 Septembre 1992

par

PATRICK BOUCHER

Né le 08 Juin 1963 à Périgueux (Dordogne)

Examineurs de la thèse

Monsieur le Professeur HABRIOUX
Monsieur le Professeur CHULIA
Madame DESMAISON, Maître de Conférence
Monsieur BERNARDAUD, Pharmacien

Président
Juge
Juge
Juge

F A C U L T E D E P H A R M A C I E

- 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

| | |
|---------------------------|--|
| BENEYTOU 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 bénéficiaire 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 guidé, encouragé et
soutenu tout au cours de mes études.

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

A mon frère Alain.

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 expériences
nécessaire à cette thèse.

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

A ma femme avec qui j'ai partagé
la réalisation de cette thèse.

PLAN

PLAN

PHYTOOESTROGENES ET CANCER DU SEIN

I - Introduction

I-1 Généralités sur le cancer du sein

I-2 Etiologie du cancer du sein

I 2.1. Facteurs environnementaux

I 2.2. Facteurs génétiques

I 2.3. Facteurs hormonaux

I-3 Rôle des oestrogènes

I-4 Aspect nutritionnel

II - Propriétés structurales et biologiques des phytoestrogènes

II-1 Présentation et distribution

II-2 Propriétés biologiques des Isoflavonoïdes

II-3 Molécules étudiées

II 3.1. Groupe des Rotenoïdes

II 3.2. Groupe des Coumestranes

II 3.3. L'Equol

III - Matériels et Méthodes

III-1 Entretien des lignées de cellules MCF-7

III 1.1. Préparation du milieu

III 1.1. a - Le milieu de base

III 1.1. b - Le sérum du veau foetal

III 1.2. Repiquage des cellules après trypsination

III 1.2. a - Rinçage des cellules

III 1.2. b - La trypsination

III 1.3. Congélation des cellules

III 1.3. a - Le milieu de congélation

III 1.3. b - La congélation

III 1.3. c - La décongélation

III 1.4. Traitement du sérum de veau foetal

III-2 Ensemencement et cinétique de croissance

III 2.1. Comptage des cellules

III 2.2. Ensemencement des boites 6 puits

III 2.3. Vérification de la densité cellulaire

III 2.4. J-0 : Mise en culture

III 2.5. J-7 : Première série de prélèvement

III 2.5. a - Prélèvement des boites 6 puits

III 2.5. b - Prélèvement proprement dit

III 2.5. c - Conservation des cellules

III 2.6. J-11 : deuxième série de prélèvement

III-3 Dosage de l'ADN cellulaire

III 3.1. Principe

III 3.2. Préparation de la gamme étalon

III 3.3. Gamme étalon

III 3.4. Dosage du DNA à partir du tapis cellulaire

IV - Résultats

IV-1 Protocole d'expérimentation

IV-2 Effet de l'oestradiol

IV-3 Le Coumestrol

IV-4 La Déguéline

IV-5 L'Equol

IV-6 La Rotenone

IV-7 Récapitulation

V - Conclusion

INTRODUCTION

I - Introduction

I-1 Généralités sur le cancer du sein

Le cancer du sein est un cancer fréquent, puisque c'est le premier cancer de la femme, et il touchera un nouveau-né sur onze de sexe féminin au cours de sa vie. Un cancer sur trois chez la femme âgée de 60 à 65 ans est un cancer du sein. Son taux d'incidence en France se situe entre 80 et 90 pour 100 000 selon les registres et augmente encore de 2 % par an.

Aussi 26 000 nouveaux cas apparaissent chaque année. Malgré les progrès thérapeutiques, le cancer du sein reste encore grave, puisque le taux de survie à 10 ans ne dépasse pas 50 à 60 % tous stades confondus et, même si la mortalité liée à ce cancer tend à diminuer dans certains pays en raison d'un diagnostic plus précoce, 9000 décès surviennent chaque année en France. La meilleure prévention reste donc aujourd'hui, le dépistage au stade le plus précoce possible.

I-2 Etiologie du cancer du sein

Le développement du cancer du sein est comme pour la majorité des cancers, la résultante d'une conjonction entre :

- facteurs environnementaux
- facteurs génétiques

L'importance relative de l'environnement par rapport à l'hérédité est certainement variable d'un type de cancer à un autre et son estimation peut s'avérer délicate.

Si l'influence de l'hérédité peut être considérée comme déterminante dans le cas de cancers où des associations familiales ont été clairement établies, telles que la polyposose multiple du côlon sur certaines tumeurs pédiatriques (Rétinoblastômes ou néphroblastomes), son rôle est beaucoup moins évident dans la plupart des autres néoplasies.

Si 50 années d'études et de recherches ont amené une meilleure connaissance de la biologie du cancer du sein, elle n'auront pas permis d'identifier clairement un élément causal.

I 2.1. Facteurs environnementaux

Les nombreuses études épidémiologiques faites à ce sujet arrivent à peu près toutes à la conclusion que l'appartenance d'un individu à un groupe ethnique semble beaucoup moins déterminante que les habitudes socio-culturelles ou la zone géographique d'habitat (THEILLET C., 1988).

Ceci est clairement démontré par l'étude comparative de l'incidence de cancers du sein au Japon et de l'incidence chez les femmes de souche japonaise vivant à Hawaï où le risque de développer un cancer du sein est multiplié par 2 à 3.

Ce type d'observation a pu être répétée avec d'autres minorités ethniques ou culturelles vivant aux Etats-Unis (chinois et Mexicains). On peut donc en conclure que le mode de vie peut avoir une influence déterminante sur le développement du cancer du sein. (THEILLET C., 1988). Dans le mode de vie on doit aussi comprendre l'alimentation. Il est aujourd'hui reconnu que les femmes vivant dans des régions à régime végétarien ou semi-végétarien ont une incidence de cancer du sein plus faible (WYNDER E.L., 1969) et (REDDY B.S. et al., 1980). Un autre paramètre lié au mode de vie paraît influencer l'incidence de cancer du sein, c'est l'effet des grossesses moins fréquentes et plus tardives chez les femmes vivant dans les pays occidentaux.

De plus ont été incriminés un excès de graisses alimentaires, un apport hormonal exogènes, et un facteur viral. L'influence de l'alimentation fait actuellement l'objet de grandes études épidémiologiques en particulier aux Etats-Unis. Ceci nous intéressera particulièrement dans ce travail. En ce qui concerne l'apport hormonal (contraception ou traitement de la ménopause) la recherche en est au stade des études contradictoires. Quant à l'agent viral, dont certains auteurs ont suggéré la présence par analogie avec le virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV), son existence à ce jour n'a malheureusement pu être clairement établie, mais il semble que l'avenir pourrait se situer vers cette hypothèse.

I 2.2. Facteurs génétiques

Il est impossible de ne pas en parler car le risque de développer un cancer du sein pour une femme dont une soeur ou la mère à déjà été atteinte est multiplié par 2 ou 3. Les femmes présentant des antécédants familiaux représentent une proportion non négligeable des malades traitées pour le cancer du sein.

Cette hérédité est susceptible d'être en cause chez 5 % des malades (THEILLET C., 1988).

I 2.3. Facteurs hormonaux

Du point de vue hormonal, on peut distinguer chez la femme deux périodes génitales

- avant la ménopause ; période durant laquelle les estrogènes et les androgènes sont produits par les ovaires et les glandes surrénales.

- après la ménopause ; les glandes surrénales continuent de fonctionner et de synthétiser des hormones stéroïdes.

Enfin il convient de dire que le cancer du sein est très rare chez l'homme ou sa fréquence est dix fois plus faible que dans la population féminine.

I-3 Rôle des estrogènes

Les estrogènes ont un rôle fondamental durant la vie d'une femme, mais il sont aussi impliqués dans le développement du cancer du sein.

Les estrogènes jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire, dans l'initiation de la tumeur et dans sa promotion (ALBANES D. et WINICK M., 1988).

Les estrogènes oestrone, oestradiol, oestriol, pour les principaux sont synthétisés par les ovaires, sous l'action stimulante de l'hypophyse, et en proportion plus faible par les glandes surrénales, les testicules.

Ils sont en partie métabolisés dans le foie, mais aussi dans les tissus périphériques. Les métabolites sont rapidement conjugués avec l'acide glucuronique ou l'acide sulfurique. Du tiers à la moitié des oestrogènes circulant sont secrétés par la bile, et 80 % de cette fraction est réabsorbée après hydrolyse dans le conduit intestinal. Quand la réaction d'hydrolyse est bloquée ou que la réabsorption au niveau de l'intestin diminue on a augmentation de l'excrétion urinaire d'oestrogènes.

I-4 Aspect nutritionnel

Des études alimentaires effectuées chez les femmes post ménopausée (ADLERCREUTZ H. et al., 1982) montrent que l'incidence du cancer du sein est

plus faible dans les régions du globe où un régime végétarien ou semi-végétarien est consommé. Il existerait donc une corrélation entre quantité de fibres végétales ingérées, et incidence sur le cancer du sein, même si le mécanisme est pour l'instant mal défini.

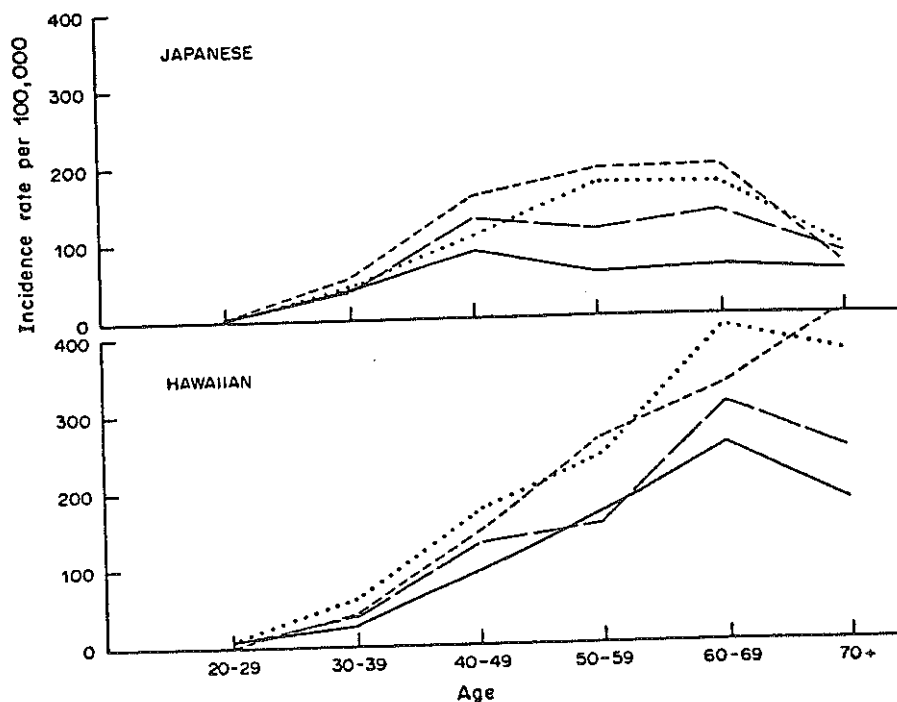


Figure 1 : Age-specific incidence curves for breast cancer by race and diagnosis period, Hawaï, 1960-1979 (d'après LE MARCHAND L., 1987).

TABLEAU I : Distribution of breast cancer cases by race, age and diagnosis period, Hawaï, 1960-1979 (d'après LE MARCHAND L. et al.)

| Race | Diagnosis period | Age (yr) | | | Total |
|------------|------------------|-----------|------------|------------|-------------|
| | | < 45 | 45-54 | ≥ 55 | |
| Japonaises | 1960-1966 | 85 (43.6) | 62 (31.8) | 48 (24.6) | 195 (100.0) |
| | 1967-1972 | 77 (24.9) | 125 (40.5) | 107 (34.6) | 309 (100.0) |
| | 1973-1976 | 49 (17.1) | 116 (40.4) | 122 (42.5) | 287 (100.0) |
| | 1977-1979 | 35 (15.6) | 77 (34.4) | 112 (50.0) | 224 (100.0) |
| Hawaïennes | 1960-1966 | 29 (26.4) | 38 (34.5) | 43 (39.1) | 110 (100.0) |
| | 1967-1972 | 31 (23.5) | 39 (29.5) | 62 (47.0) | 132 (100.0) |
| | 1973-1976 | 28 (19.6) | 48 (33.6) | 67 (46.9) | 143 (100.1) |
| | 1977-1979 | 25 (20.8) | 30 (25.0) | 65 (54.2) | 120 (100.0) |

* Les nombres entre parenthèses indiquent les pourcentages

Comme le montrent la figure 1 et le tableau I, les Américaines d'Hawai ont un régime en protéines animales trois fois plus important que celui des japonaises ; cette différence dans l'alimentation est en rapport avec l'incidence du cancer du sein dans ces deux pays économiquement semblables, comme le montre le tableau : distribution des cas de cancer du sein par race, âge et période de diagnostic, et les courbes d'incidence du cancer du sein par race et période de diagnostic par tranche d'âge (LE MARCHAND L. et al., 1987). Il en est de même avec la consommation en graisse d'origine animale.

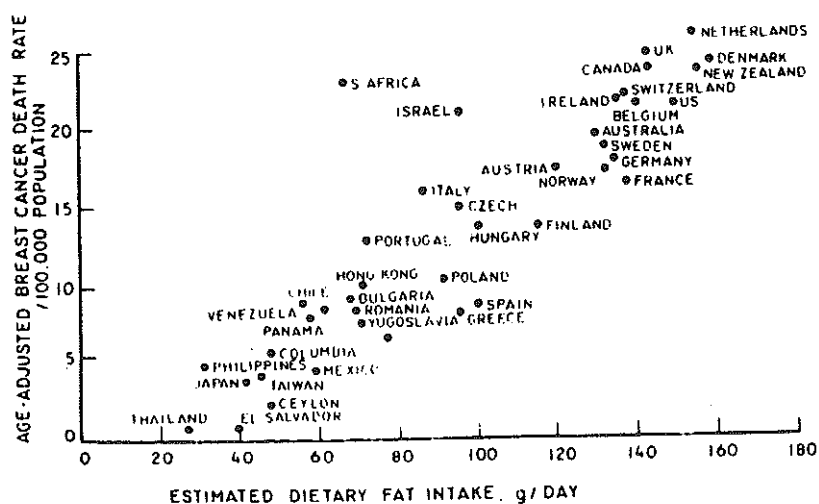


Figure 2 : Daily dietary fat intake in relation to death rates from breast cancer.

Fig. 2 : Taux de mortalité par cancer du sein dans différents pays rapporté à l'estimation de la consommation de matières grasses par habitant ; (WYNDER E.L.).

En examinant le cas d'une femme migrant d'un pays où le taux de cancer du sein est faible (le Japon) vers un pays où le taux est élevé (les USA Hawaii dans l'exemple) il est démontré que le taux de cancer du sein de ces migrants ou de leurs descendance augmente.

Il semble logique d'imputer ce changement à l'alimentation en général, et à une alimentation riche en fibres végétales en particulier. Il a été noté qu'une alimentation riche en fibres et pauvre en graisse est associée à une faible quantité d'oestrogènes dans les urines et une excrétion oestrogénique fécale élevée. Une alimentation riche en graisse entraîne une augmentation de la 16 α hydroxylation des oestrogènes chez les chimpanzé (MUZEY P.I. et al., 1987). Une femme changeant une alimentation riche en protéines animales pour une alimentation riche en fibre va avoir une réduction de l'excrétion d'oestrogènes 16 α hydroxylés. Il faut aussi noter que les femmes ayant un cancer du sein ont une activité 16 α hydroxylation plus forte que les femmes non malades. L'étude du régime végétarien montre que certaines plantes semblent contenir des substances proches des oestrogènes d'origine animale, que l'on nomme phyto oestrogènes et dont l'activité biologique a été décrite. Ces phyto estrogènes ingérés par les animaux, présentent chez ceux ci des propriétés oestrogéniques.

Dans le travail présenté nous avons cherché à mettre en évidence une activité oestrogénique de ces phytoestrogènes sur les cellules cancéreuses mammaires MCF7 en culture qui sont oestrogène-dépendantes. Le phénomène visualisé sera le pouvoir mitogène de ces substances soit par dénombrement cellulaire, soit par quantification du DNA des cellules.

Dans ma première partie, nous ferons un rappel des propriétés structurales et biologiques des phytoestrogènes. Dans une deuxième partie nous décrirons les techniques utilisées, et dans une troisième partie nous présenterons les résultats obtenus que nous discuterons ensuite.

**PROPRIETES STRUCTURALES
ET BIOLOGIQUES DES
PHYTOOESTROGENES**

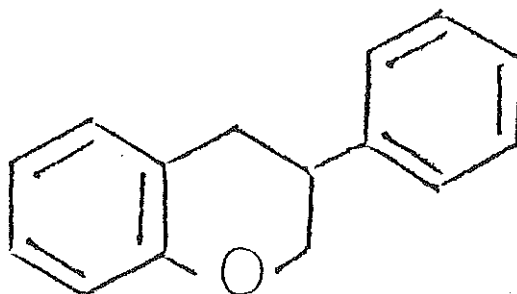
II - Propriétés structurales et biologiques des phytoestrogènes

Les phytoestrogènes sont classés en trois catégories :

- Les isoflavones dont les représentants les plus communs sont la genistéine, la daidzeine, et la biochanine, les lactones de l'acide résorcylique représentées par des mycotoxines, dont la zéaralénone est le plus important de ce groupe ; les coumestranes dont le dérivé le plus commun est le coumestrol (TOUFFET S. et al., 1987).

II-1 Présentation et distribution

Ces molécules appartiennent toutes à la classe des isoflavonoïdes, qui ont la particularité de posséder un squelette phenyl-3 chromane dérivé d'un squelette phenyl-2 chromane des flavonoïdes par la migration d'un radical aryl.



A partir de ce noyau les différents produits étudiés ne varieront que par la présence d'hétérocycles greffés et par différents niveaux d'oxydation.

Les isoflavonoïdes ont une distribution très limitée dans le règne végétal : les légumineuses papilionacées, les chenopodiacées, les crucifères, les ménispermacées, les rosacées, les scrophulariacées...

Parmi les monocotyledones les iridacées forment la source majeure avec différentes espèces d'iris.

Deux gymnospermes *juniperus* et *podocarpus* sont des producteurs d'isoflavonoïdes. Des sources non-végétales sont aussi connues comme le corail marin, et certaines cultures microbiennes.

II-2 Propriétés biologiques des isoflavonoïdes

Parmi la quantité de propriétés que possèdent ces substances, trois propriétés importantes peuvent être dégagées pour leur intérêt particulier pour l'homme.

Celles-ci sont :

- les propriétés oestrogéniques des isoflavones et coumestranes.
- les propriétés insecticides en particulier des rotenoïdes.
- les propriétés antifongiques et antibactériennes des isoflavonoïdes en général.
- les propriétés oestrogéniques des isoflavones tels que Daidzeine, genisteine, biochanine A et des coumestranes comme le coumestrol sont d'un intérêt capital dans l'élevage des animaux.

En effet ces composés peuvent se trouver en très grande quantité dans les cultures fourragères comme le trèfle (*trifolium* sp) et la luzerne (*Medicago sativa*), ce qui entraîne que leur détermination et leur quantification est très recherchée du fait du caractère toxique que peuvent revêtir ces légumineuses à l'égard des animaux. On doit aussi savoir que le niveau de phytoestrogènes comme les isoflavones et les coumestranes peut augmenter en réponse à une attaque par une bactérie ou un champignon. Il semble que cette augmentation soit due à la

production d'un agent antimicrobien et antifongique que l'on nomme phytoalexine. Cette phytoalexine peut être considérée comme une partie de la plante représentant un système de défense contre les microorganismes. Celle-ci est également produite par un traitement de la plante par lumière U.V., par les métaux lourds ou par les herbicides.

On a en effet démontré (Cosio et al., 1985) que la daidzeine et formonétine sont synthétisées dans les feuilles de soja traités par des herbicides. Le coumestrol est synthétisé dans ces mêmes feuilles en réponse à une exposition à la lumière Ultra Violette (Beggs et al., 1985), et la quantité de coumestrol est en rapport avec la dose d'exposition à la lumière ultra violette.

Au niveau des propriétés insecticides, la rotenone paraît être le plus actif des rotenoïdes d'origine naturelle, ceci est démontré par son activité larvicide sur *Aedes aegypti*, et les graines de *Lonchocarpus salvadorensis* sont protégées contre les scarabés, probablement à cause de leur teneur en rotenoïdes. Degueline et Rotenone ont la propriété d'inhiber l'activité mitochondriale des plantes et en particulier le tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum*). Ces propriétés insecticides peuvent aussi être déclenchées en réponse à une attaque fongique ou bactérienne, d'où l'hypothèse de l'existence de phytoalexines à activité insecticides. Enfin, il semble que la structure en trois dimensions des divers isoflavonoïdes soit d'une grande importance dans l'activité anti-microbienne ou insecticide, ou encore oestrogénique, de même que la différence de pouvoir lipophile de ces plantes (BEWICK P.M., 1988).

Pour être complet sur les propriétés biologiques il convient de ne pas oublier de noter que certains isoflavonoïdes sont retrouvés dans l'antidote de venin de serpent extrait d'une plante d'Amérique du Sud "Cabeça de Negra" (Nakagawa et al., 1982), d'autres isoflavonoïdes ont un rôle dans :

- l'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines (Goda et al., 1985),
- l'activité antiathérogène (Laman et Oleksyuk, 1982),

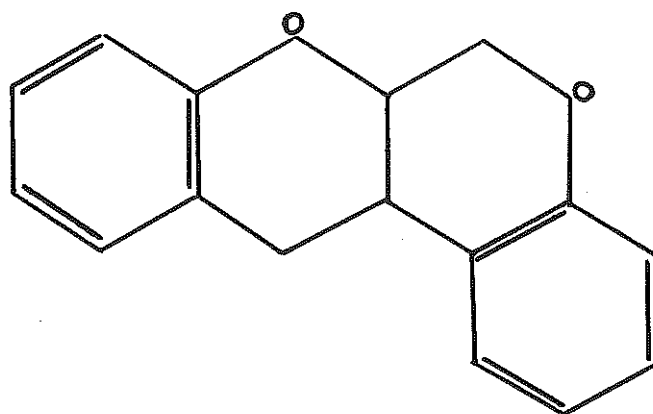
- l'inhibition compétitive sur les récepteurs des prostaglandines (LUK et al., 1983).

Tout ceci montre a quel point il était intéressant d'étudier l'activité mitogénique de quelques isoflavonoïdes sur les cellules cancéreuses mammaires.

II-3 Molécules étudiées

II 3.1. Groupe des Rotenoïdes

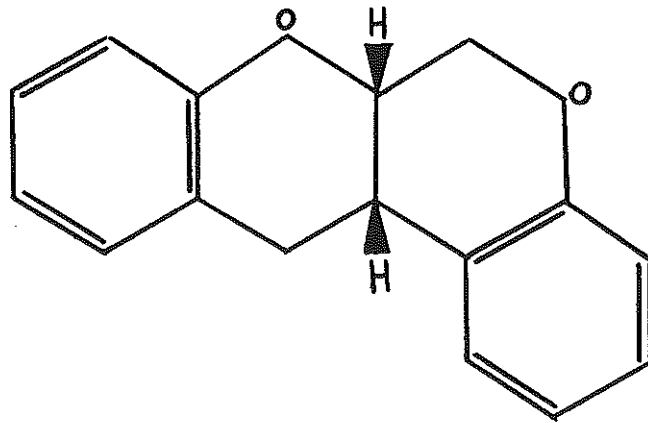
Les rotenoïdes sont une classe d'isoflavonoïdes par la présence d'un carbone supplémentaire sur un heterocyte additionné.



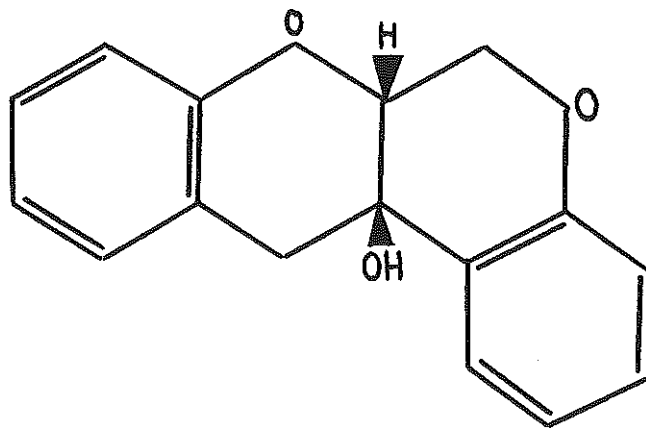
Ce système est dérivé dans la nature par une cyclisation oxydative de la methoxyisoflavone.

Ces composés peuvent être subdivisés en trois groupes majeurs, en rapport avec leur niveau d'oxydation.

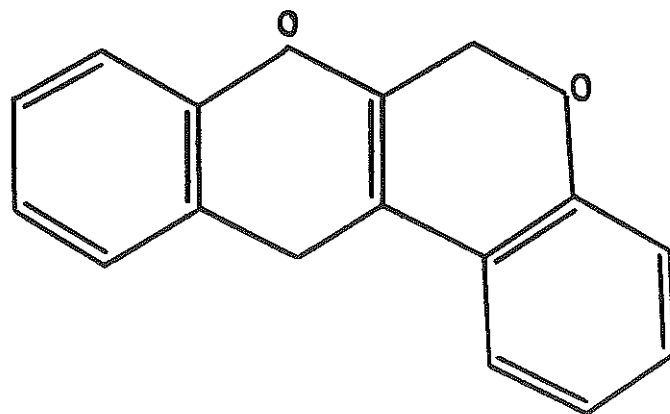
- Les rotenoïdes type



- Les 12 α hydroxyrotenoïdes



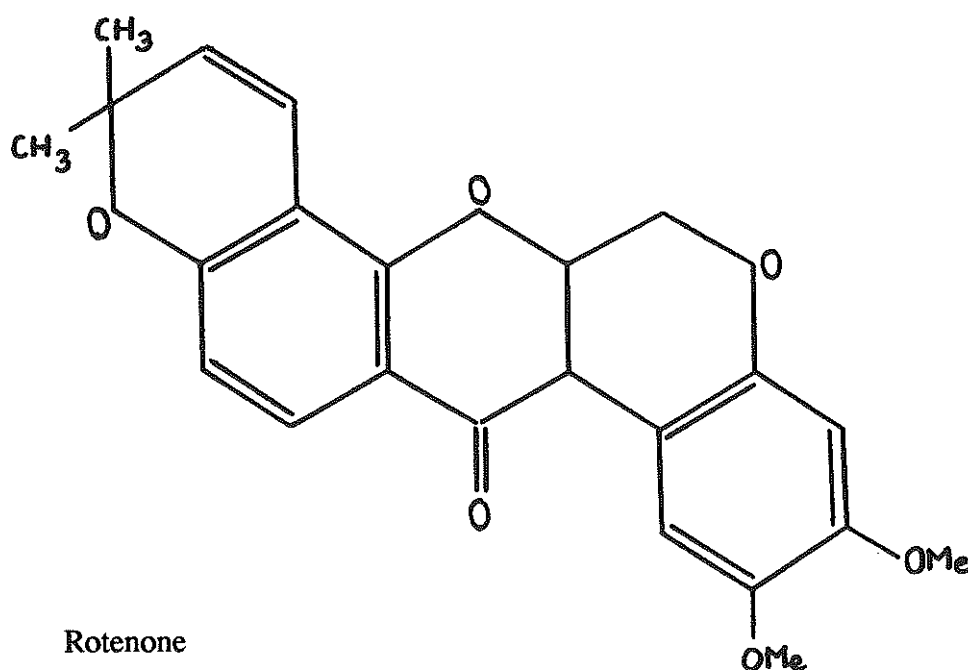
- Les dehydrorotenoïdes



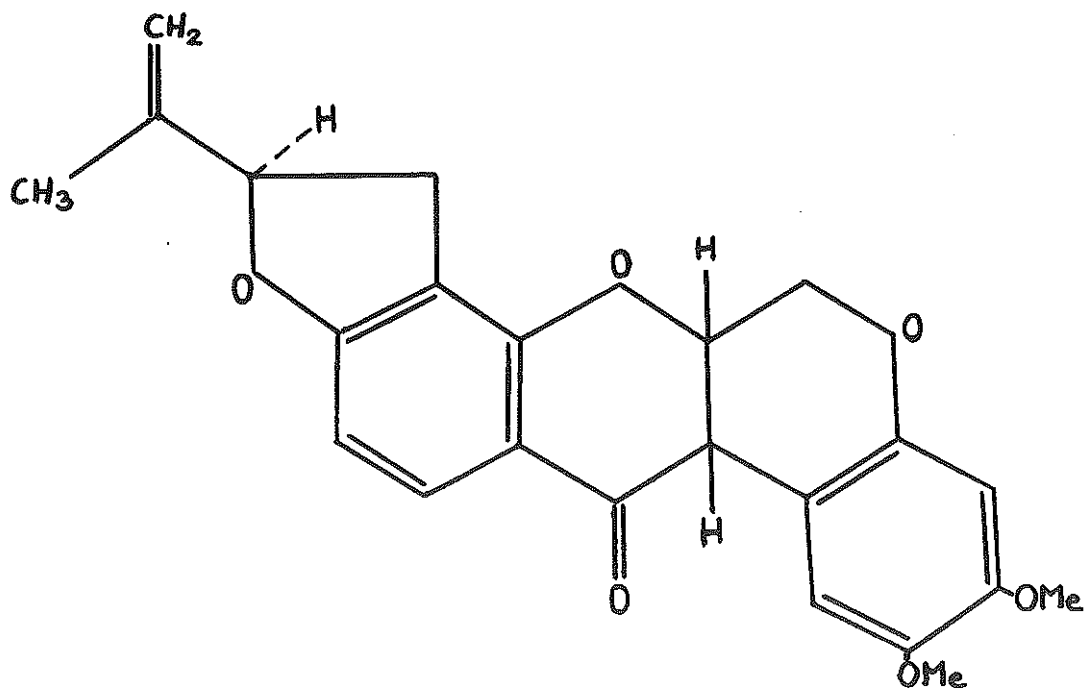
Les autres possibilités étant considérées comme des dérivés de ces précédentes positions.

Les plus importants rotenoïdes connus sont :

Degueline



Rotenone



Les plantes principales sources de Degueline sont :

- *Lonchocarpus longifolius* (Racine)
- *Lonchocarpus salvadorensis* (Graine)
- *Lonchocarpus spruceanus* (Racine)

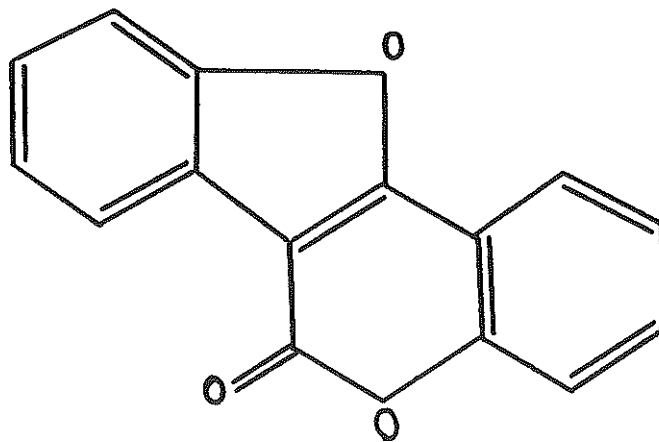
Les plantes principales sources de Rotenone sont :

- *Lonchocarpus longifolius* (Racine)
- *Millettia pachycarpa* (Racine)
- *Tephrosia strigosa* (Partie aérienne)

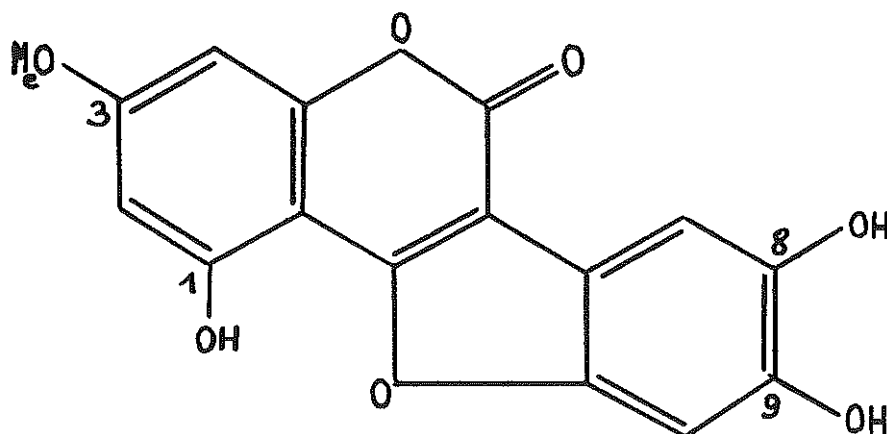
II 3.2. Groupe des coumestranes

Les coumestranes sont des isoflavonoïdes caractérisés par un niveau d'oxydation supérieur aux rotenoïdes types.

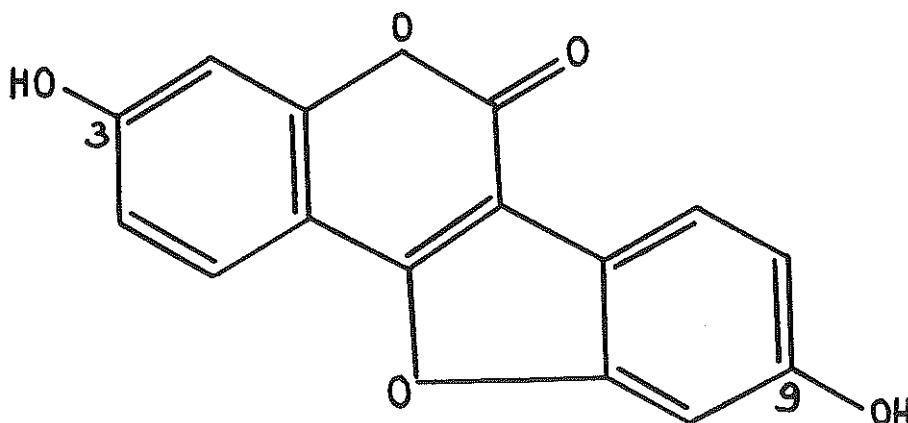
La formule générale des coumestranes est la suivante :



Le premier composé isolé fut la Wedelolactone a partir d'une plante légumineuse (*Origeimia dalbergioides*) caractérisée par la présence de trois groupement hydroxy positionnés en 1, 8, 9 et un groupement metoxy en 3.



Nous nous intéressons dans ce travail au composé le plus remarquable de ce groupe : le coumestrol caractérisé par la présence de deux groupements hydroxy en 3, 9.



Cette substance peut stimuler l'activité de la thymidine kinase se qui confirme ses propriétés oestrogéniques. A ce sujet les auteurs (TOUFFET S. et al., 1987) ont constaté que les estrogènes provoquent une induction massive et

spécifique de la synthèse de thymidine kinase dans l'utérus de ratte immature. En outre cette induction est liée à la synthèse de la thymidine kinase de ce type foetal. Les résultats obtenus avec le coumestrol montrent que cette substance est capable de stimuler l'activité de la thymidine kinase et de son isoenzyme foetale confirmant les propriétés oestrogéniques. Le coumestrol montre un pouvoir inducteur vis à vis de la thymidine kinase comparable à celui du 17β oestradiol.

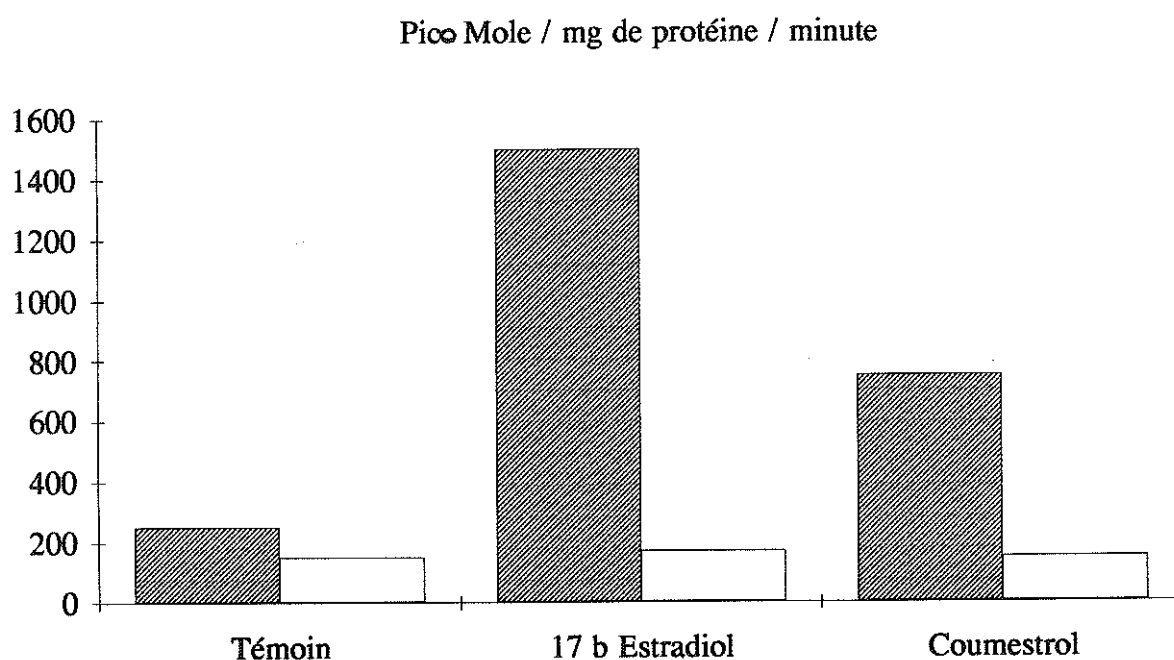
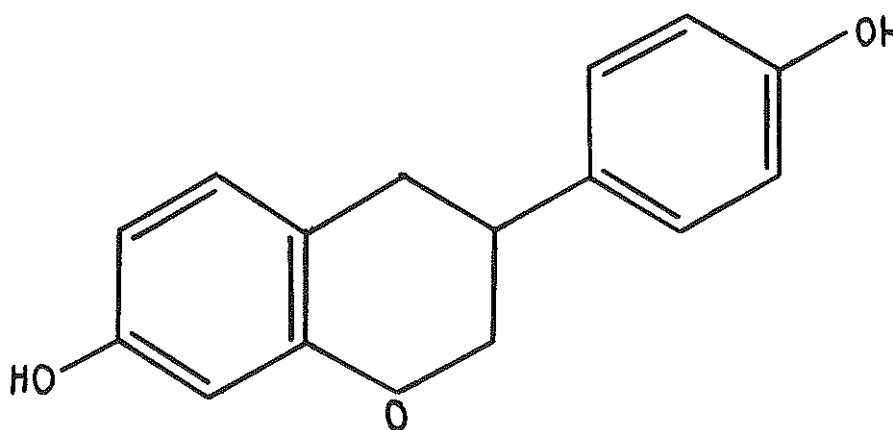


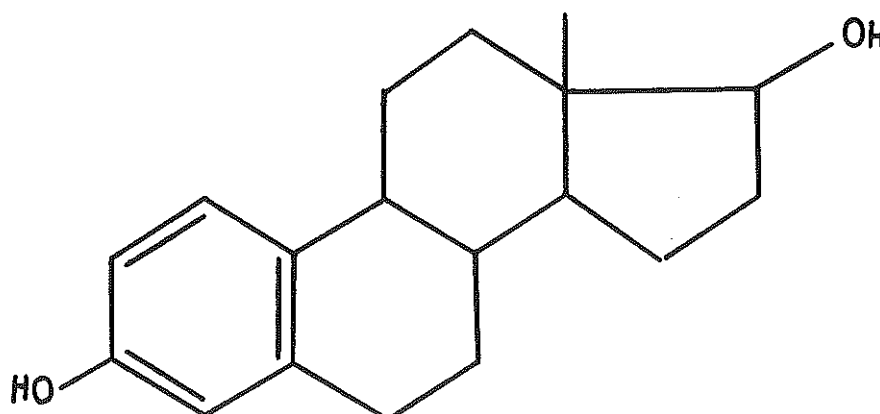
Fig.3 : Effet du coumestrol et du 17β oestradiol sur les activités de la thymidine kinase foetale (colonne blanche) et de la thymidine kinase (colonne hachurée).

II 3.3. L'équol

L'équol est un composé oestrogénique caractérisé par un structure très proche de celle du 17 β oestradiol (TANG et ADAM, 1980). Sa structure en $C_{15}H_{14}O_3$ d'un poids moléculaire $PM = 242$ est la suivante :



On peut remarquer que la position des 2 hydroxy est relativement semblable à celle des hydroxy du 17 β oestradiol.



L'équol est un métabolite des oestrogènes d'origine végétale que sont la Daidzeine et la Formonétine.

MATERIELS ET METHODES

III - Matériels et Méthodes

Le but de la manipulation est de tester divers oestrogènes d'origine végétale, sur des cellules de lignée humaine. Nous devons au préalable réaliser certaines opérations d'entretien de la lignée cellulaire, à savoir :

- nourrir les cellules. Ceci nous amène à la fabrication d'un milieu de culture contenant un milieu de base supplémenté par diverses substances.
- repiquer régulièrement les cellules, de une dans plusieurs boites, afin d'éviter une trop grande prolifération.
- congeler afin de préserver des cellules.
- les placer dans un milieu de moins en moins enrichi.

III-1- Entretien des lignées de cellules MCF-7

III 1.1. Préparation du milieu

III 1.1. a - Le milieu de base

Pour 5 litres de milieu on utilise :

48,58 g de milieu MEM (GIBCO Réf. 72-100) en poudre additionné de rouge de phénol.

11,9 g d'HEPES (Impérial Laboratory Réf. 5-762-72)

2,5 g de bicarbonate de sodium

50 ml d'acides aminés non essentiels (GIBCO Réf. 43-1140 H)

60 ml d'un mélange d'antibiotiques. Ce mélange contient 0,1 mg/ml de streptomycine (Impérial Laboratory 4-80407) et 100 U/ml de pencilline

La préparation de ce mélange s'effectue sous agitation magnétique. On ajustera le pH à 7,7 à 20° par addition d'une solution de NaOH 1N.

Le mélange est ensuite stérilisé par filtration sur le filtre milipore à 0.22 μm à l'aide d'une pompe péristaltique, et reparti dans des flacons de 250 ml.

III 1.1. b - Le sérum de veau foetal (GIBCO Réf. 13-6290-H)

En plus du milieu de base les cellules ont besoin de sérum de veau foetal (GIBCO) pour proliférer. Celui ci sera rajouté dans des proportions de 5 à 10 % à l'aide d'une seringue stérile. On additionne également d'insuline bovine à 5 $\mu\text{g/ml}$ utilise comme facteur de croissance.

III 1.2. Repiquage des cellules après trypsination

III 1.2. a - Rincage des cellules

Le tapis cellulaire après avoir été débarassé de son milieu est rincé avec 2 ml d'une solution de STP-EDTA (3 mM). Ce rincage permet de débarasser les cellules des ions Mg^{++} et Ca^{++} responsables de leur adhésion à la boîte.

III 1.2. b - La trypsination

Cette opération doit son nom à l'emploi d'une solution de trypsine EDTA (0,05 % 0,02 %), qui va décoller les cellules par son activité protéasique. Puis celle ci sera neutralisée par 9 ml de milieu, et enfin la suspension cellulaire sera aspirée puis refoulée plusieurs fois pour bien individualiser les cellules. Ce volume de 10 ml sera séparé dans deux boites.

III 1.3. Congélation des cellules

III 1.3. a - Milieu de congélation

Obtenu par addition :

- du milieu de culture SVF à 5 %
- du DMSO
- du SVF 20 %

III 1.3. b - La congélation

Les cellules, après avoir été trypsinées sont centrifugées 5 minutes à 1000 g. Après élimination du surnageant on ajoute le milieu de congélation. Les tubes de congélation sont ensuite placés 30 mn à -20° C, puis 24 heures à -80° C, et enfin placés dans l'azote liquide à -196° C.

III 1.3. c - La décongélation

Le contenu d'un tube de congélation, est réchauffé entre les deux mains, puis placé dans 3,5 ml de milieu de culture à 20 %. Après une nuit d'incubation, le milieu est changé, et un troisième antibiotique, le gentamicine, est rajouté.

III 1.4. Traitement du sérum de veau foetal

Ce traitement aboutit à la suppression des stéroïdes contenus dans le sérum. Ceci équivaut à l'élimination des facteurs de croissance propres des cellules. Ces

cellules devront alors synthétiser leurs propres facteurs de croissance pour assurer leur prolifération. La croissance des cellules s'en trouve ralentie mais l'activité des phyto-oestrogènes est ainsi plus facile à déterminer. Pour ce traitement on rajoute au sérum :

- 1 % de charbon végétal NORIT en poudre
- 0,1 % de DEXTRAN (Pharmacia fine chemicals)

sous agitation magnétique à 56° C, puis on pratique une centrifugation à 3000 g pendant 20 minutes. Le même traitement est effectué à 37° C. Enfin le surnageant est filtré 2 fois sur filtre millipore à 0,45 μm et 0,22 μm .

NB : Toutes les opérations sont effectuées sous une hotte stérile à flux laminaire (ADSO France).

Le matériel utilisé est le suivant :

- pipettes de 5 ou 10 ml stériles (STERILIN)
- flacon de culture T25 ou T75 (CORNING USA)
- milieu de culture MEM (GIBCO)
- eau pyrodistillée Aqual (BIOCHROM)
- filtres millipores MILLEX-HA 0,45 μm et MILLEX-GS 0,22 μm .

III-2 Ensemencement et cinétique de croissance

Nous mettons en route des séries de boîtes 6 puits afin d'étudier la croissance des cellules en présence de phyto-oestrogènes. Pour cela des solutions sont préparées aux dilutions suivantes :

- | | |
|------------|--|
| Roténone | 10 ⁻⁴ M ; 10 ⁻⁶ M ; 10 ⁻⁸ M |
| Dégueline | 10 ⁻⁴ M ; 10 ⁻⁶ M ; 10 ⁻⁸ M |
| Equol | 10 ⁻⁴ M ; 10 ⁻⁶ M ; 10 ⁻⁸ M |
| Coumestrol | 10 ⁻⁴ M ; 10 ⁻⁶ M ; 10 ⁻⁸ M |

et les deux témoins de prolifération :

17 α estradiol 10^{-6} M ; 10^{-8} M ; 10^{-10} M

17 β estradiol 10^{-6} M ; 10^{-8} M ; 10^{-10} M

Le but de la manipulation est de récolter les cellules à J-7 et J-11. A chaque boîte correspond une substance à tester, et cela aux dilutions citées. Par précaution nous avons deux exemplaires de chaque concentration. L'ensemencement des puits se fait après trypsination des boîtes de culture, et comptage du nombre de cellules contenu dans un volume déterminé.

III 2.1. Comptage des cellules

Ce comptage se fait à l'aide d'une cellule de Malassez :

1 μ l de milieu de culture venant d'être trypsiné, est placé dans la cellule, le comptage nous donne donc le nombre de cellules par μ l. Le nombre de cellules à ensemercer est fixé à 50000, et le volume de milieu fixé à 2 ml.

III 2.2. Ensemencement des boîtes 6 puits

Cet ensemencement pour être régulier est pratique à l'aide d'un rhéomètre, permettant de mettre dans chacun des puits le volume déterminé, le milieu étant agité afin d'obtenir une répartition homogène de l'ensemencement.

III 2.3. Vérification de la densité cellulaire

Afin d'être certain que la quantité de cellules, contenue dans 2 ml de milieu distribué par le rhéomètre, est conforme à ce que nous désirons obtenir, une fraction de ces 2 ml est placée dans une cellule de Malassez, ou un comptage est effectué.

L'ensemencement constitue le jour 0 (J-0) de la manipulation.

III 2.4. J-0 Mise en culture

A J-1 nous mettons en présence les effecteurs avec les cellules. Chaque effecteur est dilué à 10^{-2} M dans l'alcool, ou le DMSO (Rotenone, Déguéline), il est donc nécessaire de le diluer dans du SVFd pour obtenir les dilutions suivantes.

A J-1, les boîtes 6 puits sont vidées du milieu SVFd et celui-ci est remplacé par 2 ml de milieu contenant les effecteurs. Une boîte est donc attribuée à chaque substance, et à chaque jour de prélèvement.

pour une substance X :

Les premiers puits sont pour la plus faible dilution.

Les puits du milieu pour la dilution intermédiaire

Les derniers puits pour la plus forte dilution

Les contenus des puits étant prélevés à J-7, et J-11, il faut deux boîtes différentes pour chaque substance.

III 2.5. J-7, première série de prélèvements

Les boîtes 6 puits sont à incubation depuis 7 jours. La série de boîte qui a été désignée pour être prélevée à J-7, va subir une série d'opérations :

III 2.5. a - Prélèvement des boîtes 6 puits

Cette opération nécessite :

- 1 ml de PBS-EDTA (solution de lavage)
- 1 ml de trypsine (pour décoller les cellules)
- des tubes en verre de 3 ml supportant la congélation

Chaque puit des boîtes J-7, est vidé de son milieu de culture SVF_d contenant les effecteurs, puis lavé à l'aide d'une solution de PBS-EDTA. Cette solution de trypsine que l'on laisse agir quelques minutes. les boîtes sont alors légèrement agitées de manière à bien décoller les cellules.

III 2.5. b - Prélèvement proprement dit

Les cellules en suspension dans la solution de trypsine, sont prélevées, à l'aide de pipettes Pasteur stériles.

III 2.5. c - Conservation des cellules

La suspension des cellules est mise dans des tubes stériles de verre, ceux ci sont soigneusement étiquetés et placés au congélateur à une température de -20° C.

III 2.6. J-11, deuxième série de prélèvement

La méthode est identique à la première série de prélèvements.

III-3 Dosage de l'ADN cellulaire

III 3.1. Principe

Le dosage de l'ADN cellulaire s'effectue par spectrofluorimétrie. On utilise un fluochrome intercalant, le bromure d'ethidium dont les caractéristiques sont :

longueur d'onde d'excitation = 504 nm

longueur d'onde d'émission = 593 nm

on ajoute un mouillant NP 40 afin de libérer entièrement l'ADN des cellules.

III 3.2. Préparation de la gamme étalon

- 20 μ l de Bromure d'éthidium (SIGMA E 8751) dilué au 1/20ème
- 2 ml de NP 40 dilué au 1/1000ème
- 500 μ l de la suspension cellulaire
- 4,5 ml d'eau pyrodistillée

III 3.3. Gamme étalon

Elle est réalisée à partir d'une solution d'ADN (1 mg/ml dans NaCl 10 mM) diluée au 1/100.

Les densités optiques lues sur le spectrofluorimètre (JOBIN et YVON 3) à la sensibilité 0,1 correspondent respectivement à 0 μg / 2,5 μg / 5,0 μg / 7,5 μg / 10 μg de DNA. Elles sont réparties sur une courbe en tenant compte de la sensibilité. La courbe obtenue est représentée sur la figure.

Excitation = 504nm

Emission = 593 nm

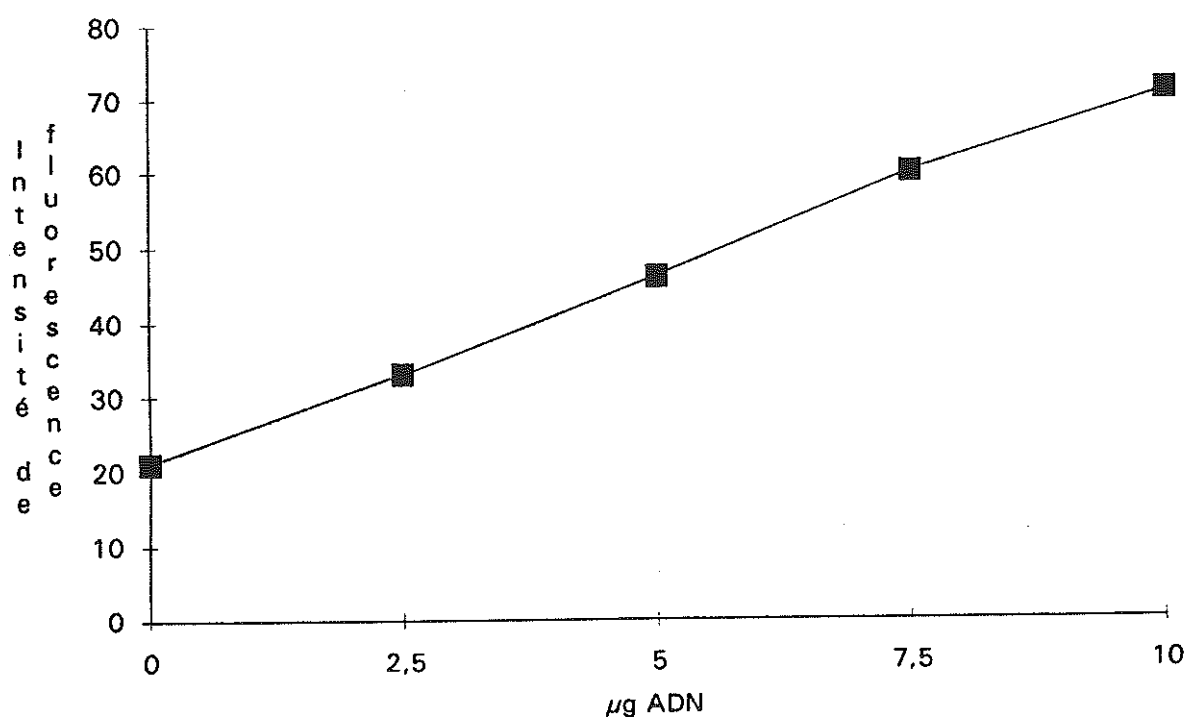


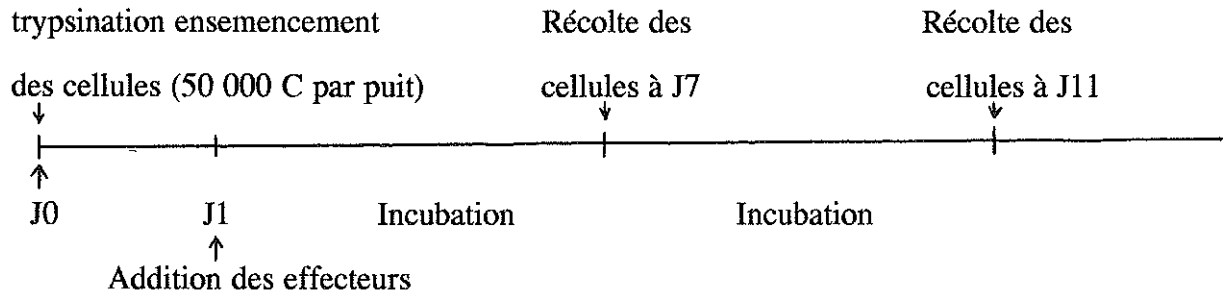
Figure : Gamme étalon : Relation entre intensité de fluorescence et quantité d'ADN en μg par puit de la solution.

| Valeurs | D.O. |
|---------------------------|----------|
| 0,25 μg de DNA | ====> 35 |
| 0,50 μg de DNA | ====> 48 |
| 0,75 μg de DNA | ====> 60 |
| 1 μg de DNA | ====> 71 |

RESULTATS

IV - Résultats

IV-1 Protocole d'expérimentation



IV-2 Effet de l'Estradiol

Le 17β oestradiol et le 17α oestradiol sont des phénol stéroïdes à 18 atomes de carbones appartenant à la famille des estrogènes. Ils représentent un témoin intéressant de l'effet mitogène exercé sur les cellules MCF7 qui sont oestrogènes dépendantes. Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau suivant.

Croissance cellulaire exprimée en DNA ($\mu\text{g/puit}$)

| | | | | |
|---------------|-----------------|--------|--------|---------|
| E2 17β | Jour de récolte | 10-6 M | 10-8 M | 10-10 M |
| | J7 | 5,85 | 6,05 | 10,50 |
| | J11 | 3,50 | 5,60 | 8,10 |
| E2 17α | Jour de récolte | 10-6 M | 10-8 M | 10-10 M |
| | J7 | 6,40 | 5,40 | 4,15 |
| | J11 | 10,65 | 12,15 | 8,75 |

Il est à remarquer que pour l'oestradiol 17β la croissance des cellules à J11 se trouve inférieure à la croissance des cellules à J7. L'explication de ce phénomène réside dans le fait que dans ce type d'expérimentation, les cellules se sont décollées entraînant une valeur par défaut de la croissance cellulaire. En effet on ne peut tenir compte des cellules rejetées avec le milieu de culture avant trypsination du tapis cellulaire. On note que le maximum de croissance cellulaire pour cet oestrogène se situe à la concentration de 10^{-10} M, et ceci au 7^{ème} jour de contact entre l'oestradiol et les cellules MCF7. Dans ce cas l'oestradiol 17α on note une augmentation de croissance au cours du temps, les quantités de DNA étant pour chaque concentration, à chaque fois supérieure à J11 qu'aux concentrations à J7, le maximum de croissance semble se situer à J7 pour la concentration 10^{-6} M alors que le maximum de réponses se situe à 10^{-8} M à J11. On peut enfin remarquer que par rapport aux témoins représentant 100 % de croissance, et à toutes les concentrations la croissance des cellules en présence de 17β oestradiol ou 17α oestradiol est multipliée par des facteurs allant jusqu'à six fois (pour le 17β oestradiol à 10^{-10} M).

Les graphiques croissance cellulaire en présence de 17α oestradiol montrent clairement les fortes croissances en présence de ces deux effecteurs.

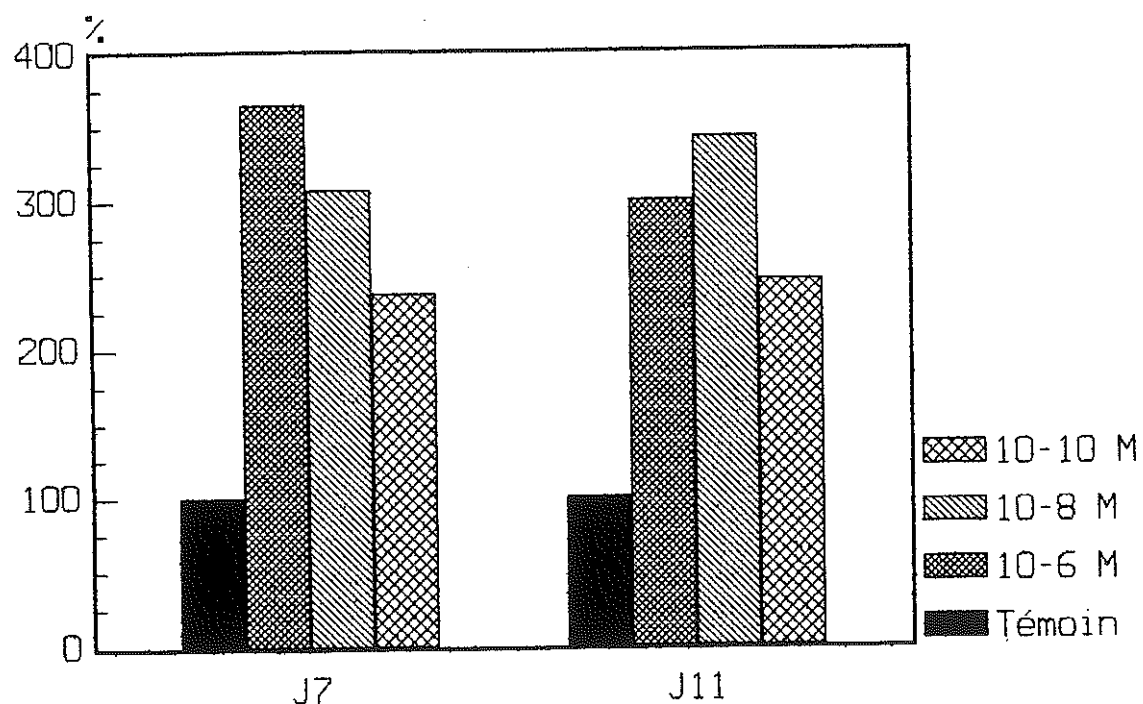


Fig. 1 : Pouvoir mitogène du 17α oestradiol à J7 et J11 en pourcentage de croissance par rapport à la culture témoin sans effecteurs.

17β oestradiol.

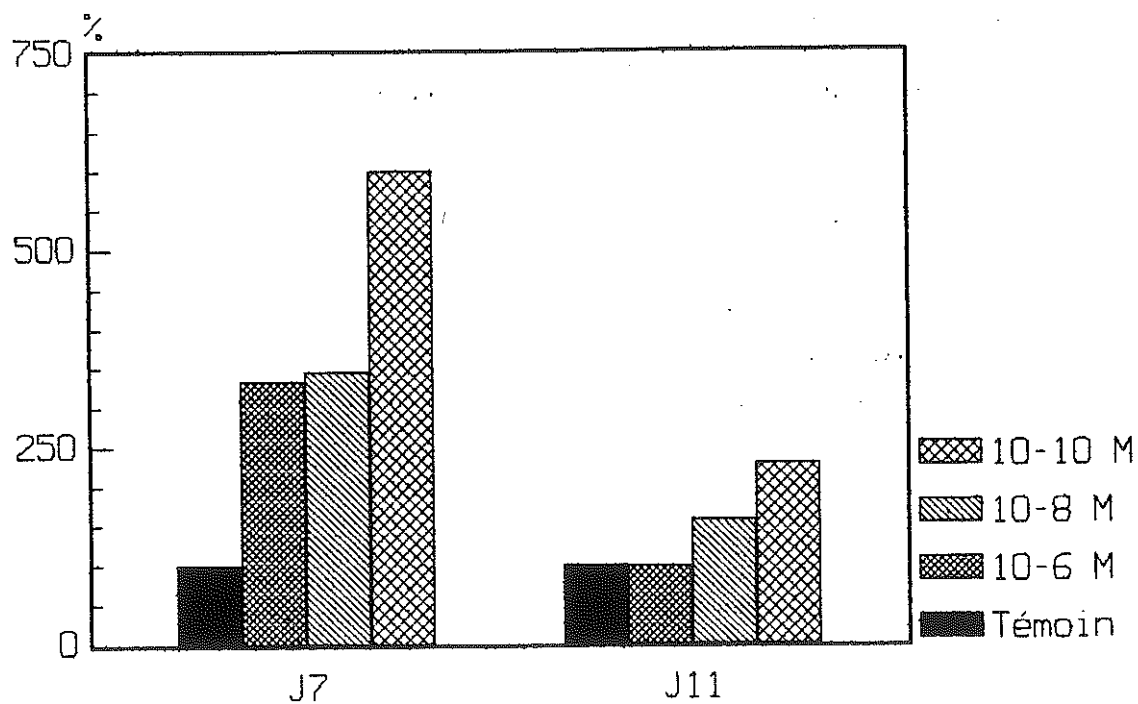


Fig. 2 : Pouvoir mitogène du 17β oestradiol à J7 et J11 en pourcentage de croissance par rapport à la culture témoin sans effecteurs.

IV-3 Le coumestrol

| | | Concentrations | | |
|-----|--|----------------|--------|--------|
| | | 10-4 M | 10-6 M | 10-8 M |
| J7 | Valeur moyenne de DNA ($\mu\text{g/puit}$) | 7,80 | 13,80 | 3,60 |
| | Rapport $\frac{\text{(Stéroïde)}}{\text{(Témoin)}} \times 100$ | 445 | 788 | 205 |
| J11 | Valeur moyenne de DNA ($\mu\text{g/puit}$) | 13,50 | 19,40 | 20 |
| | Rapport $\frac{\text{(Stéroïde)}}{\text{(Témoin)}} \times 100$ | 380 | 546 | 563 |

Les valeurs des témoins étant

à J7 Valeur moyenne du DNA = $1,75 \mu\text{g/puit}$

à J11 Valeur moyenne du DNA = $3,55 \mu\text{g/puit}$

La représentation graphique de ces résultats.

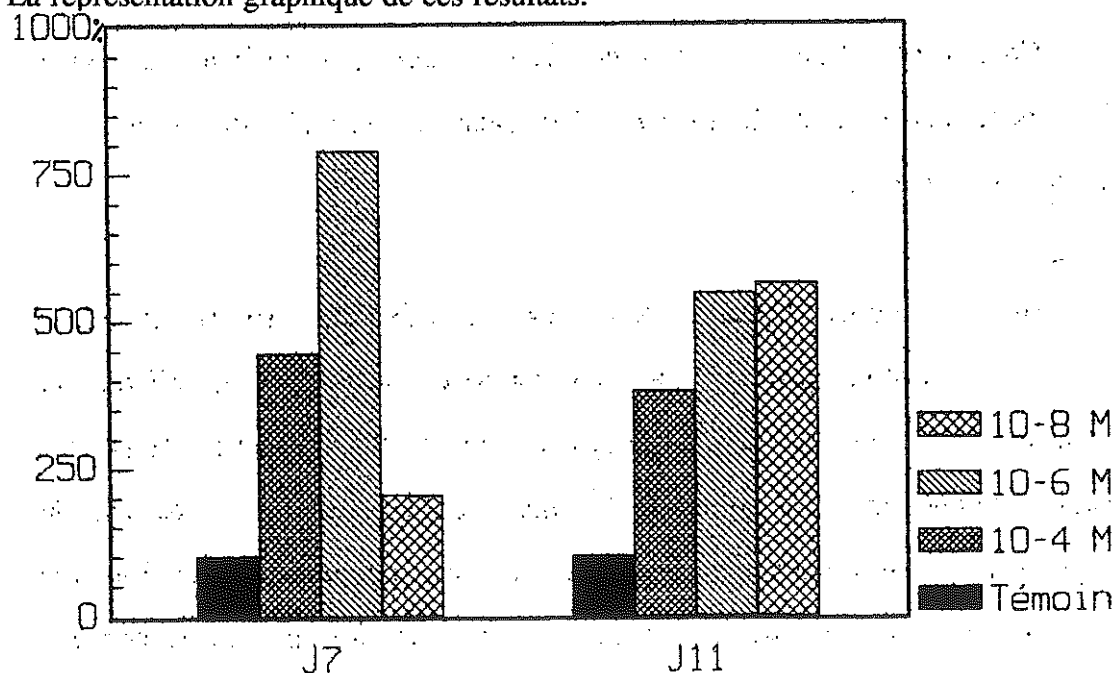


Fig. 3 : Pouvoir mitogène du Coumestrol à J7 et J11 en pourcentage de croissance par rapport à la culture témoin sans effecteurs.

montre qu'à J7 (7ème jour d'incubation en présence de coumestrol) la croissance est très forte à la concentration 10^{-6} M, où l'on obtient une croissance plus de 7 fois et demie celle de la croissance du témoin. On peut noter de plus qu'à toutes les concentrations (10^{-8} M et 10^{-4} M) la croissance en présence de coumestrol est supérieure à la croissance du témoin.

A J11 la forte croissance observée à la concentration 10^{-6} M tend à diminuer, de même que celle observée pour la concentration 10^{-4} M alors que celle observée à la concentration 10^{-8} M, ou l'augmentation d'abord moindre à J7 fait plus que doubler à J11. Il semble donc qu'en présence de coumestrol les cellules MCF7 soient fortement stimulées et présentent un effet mitogène très important à la concentration 10^{-6} M au 7ème jour de mise en contact, alors que cet effet mitogène est très important à la concentration 10^{-8} M au 11ème jour sur une durée de mise en présence du coumestrol de 11 jours, il paraît préférable d'utiliser ce phytoestrogène à la concentration 10^{-8} M en comparant ces résultats avec ceux obtenus avec l'oestradiol on peut déjà noter une réponse supérieure avec le coumestrol à la concentration 10^{-6} M à J7 et à J11 à la concentration 10^{-4} M la réponse avec le coumestrol est légèrement supérieure à celle obtenues avec l'oestradiol, cette augmentation restant peu significative. A 10^{-8} M les réponses obtenues à J11 avec le coumestrol sont supérieures à celles obtenues à la même concentration avec l'oestradiol.

IV-4 La degueline

| | | Concentrations | | |
|-----|--|----------------|--------|--------|
| | | 10-4 M | 10-6 M | 10-8 M |
| J7 | Valeur moyenne de DNA ($\mu\text{g/puit}$) | 2,65 | 3,10 | 7,35 |
| | Rapport $\frac{\text{(Stéroïde)}}{\text{(Témoin)}} \times 100$ | 151 | 177 | 420 |
| J11 | Valeur moyenne de DNA ($\mu\text{g/puit}$) | 1,20 | 1,40 | 1,40 |
| | Rapport $\frac{\text{(Stéroïde)}}{\text{(Témoin)}} \times 100$ | 34 | 39 | 39 |

Les valeurs des témoins étant

à J7 Valeur moyenne du DNA = 1,75 $\mu\text{g/puit}$

à J11 Valeur moyenne du DNA = 3,55 $\mu\text{g/puit}$

La représentation graphique de ces résultats

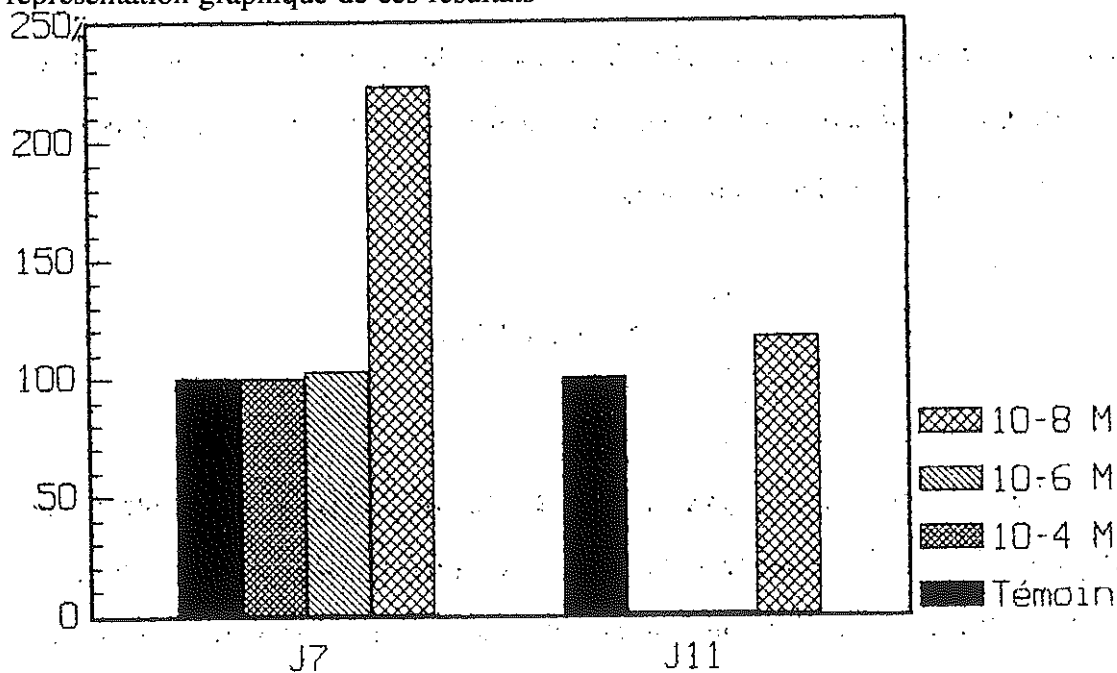


Fig. 4 : Pouvoir mitogène de la Degueline à J7 et J11 en pourcentage de croissance par rapport à la culture sans effecteurs

montre qu'à J7 la différence de croissance des cellules est vraiment significative à la concentration 10-8 M. Aux concentrations supérieures les cellules ne se développent pas plus vite que le témoin sans effecteur. A J11 seul les cellules à la concentration 10-8 M subsistent, les concentrations 10-4 M et 10-6 M ont des résultats effondrés. Ceci est dû à un décollement des cellules. Cependant, il semble qu'à J11 et en raison des résultats obtenus à la concentration 10-8 M le pouvoir mitogène soit nettement inférieur à celui obtenu à J7. En comparant ces résultats avec ceux obtenus avec l'oestradiol, on remarque que la degueline a un pouvoir mitogène moindre.

IV-5 L'équol

| | | Concentrations | | |
|-----|--|----------------|--------|--------|
| | | 10-4 M | 10-6 M | 10-8 M |
| J7 | Valeur moyenne de DNA ($\mu\text{g/puit}$) | 2,65 | 3,10 | 7,35 |
| | Rapport $\frac{\text{(Stéroïde)}}{\text{(Témoin)}} \times 100$ | 151 | 177 | 420 |
| J11 | Valeur moyenne de DNA ($\mu\text{g/puit}$) | 1,20 | 1,40 | 1,40 |
| | Rapport $\frac{\text{(Stéroïde)}}{\text{(Témoin)}} \times 100$ | 340 | 390 | 390 |

Les valeurs des témoins étant

à J7 Valeur moyenne du DNA = 1,75 $\mu\text{g/puit}$

à J11 Valeur moyenne du DNA = 3,55 $\mu\text{g/puit}$

La représentation graphique de ces résultats

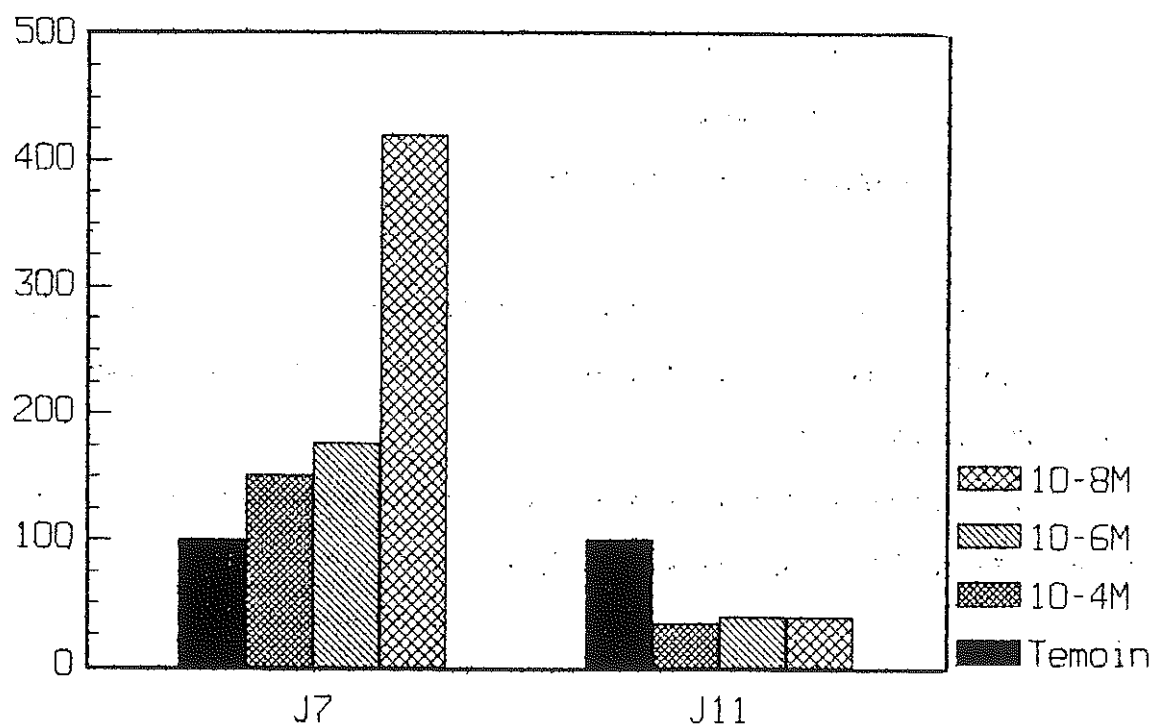


Fig. 5 : Pouvoir mitogène de l'équol à J7 et J11 en pourcentage de croissance par rapport à la culture témoin sans effecteurs.

montre que le pouvoir mitogène avec l'Equol comme effecteur est très supérieur à J7 par rapport à J11, la concentration donnant une croissance la plus élevée est 10-8 M avec une réponse deux fois plus importante qu'aux plus fortes concentrations par contre à J11 la réponse en présence d'Equol est très inférieure à celle du témoin. Seule la concentration 10-8 M donne une réponse équivalente à celle obtenue avec l'oestradiol.

IV-6 La Rotenone

| | | Concentrations | | |
|-----|--|----------------|--------|--------|
| | | 10-4 M | 10-6 M | 10-8 M |
| J7 | Valeur moyenne de DNA ($\mu\text{g/puit}$) | 1,60 | 1,75 | 3,50 |
| | Rapport $\frac{\text{(Stéroïde)}}{\text{(Témoin)}} \times 100$ | 91 | 100 | 200 |
| J11 | Valeur moyenne de DNA ($\mu\text{g/puit}$) | 0,30 | 0,30 | 0,60 |
| | Rapport $\frac{\text{(Stéroïde)}}{\text{(Témoin)}} \times 100$ | 8 | 8 | 17 |

Les valeurs des témoins étant

à J7 Valeur moyenne du DNA = 1,75 $\mu\text{g/puit}$

à J11 Valeur moyenne du DNA = 3,55 $\mu\text{g/puit}$

La représentation graphique des résultats

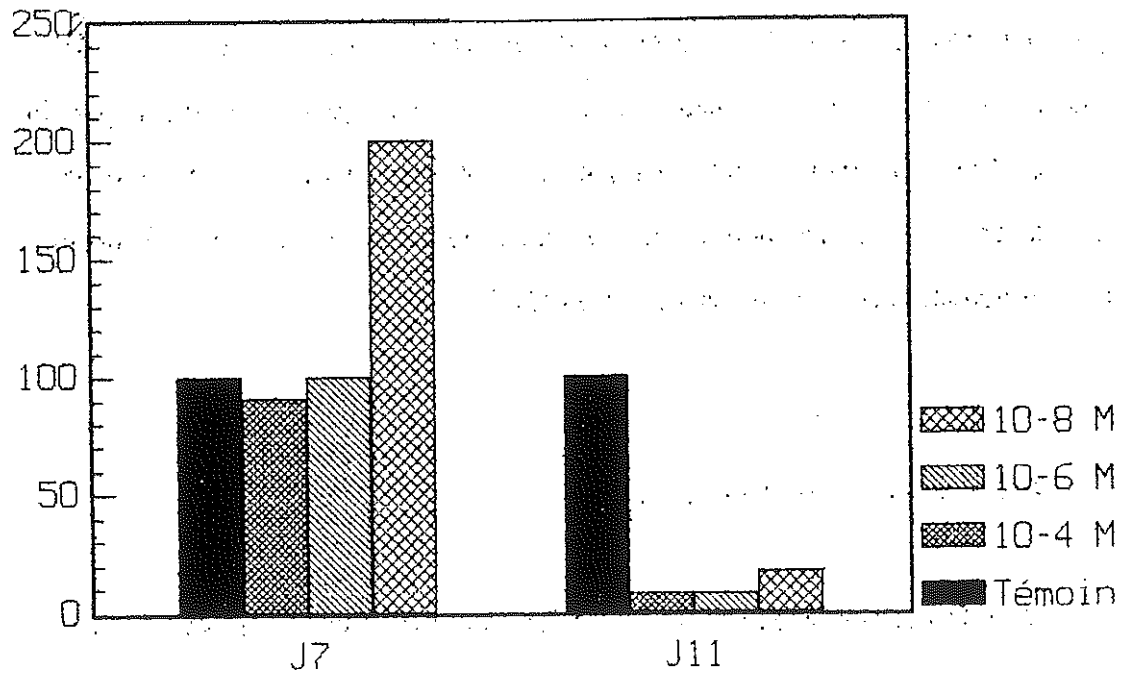


Fig. 6 : Pouvoir mitogène de la Rotenone à J7 et J11 en pourcentage de croissance par rapport à la culture témoin sans effecteurs.

montre un pouvoir mitogène à J7 très supérieur au témoin pour la concentration 10^{-8} M, alors que pour les autres concentrations les résultats sont sensiblement équivalents au témoin. A J11 l'effondrement des résultats est dû à un décollement des cellules. Ces résultats sont toutefois inférieurs à ceux obtenus avec l'oestradiol.

IV-7 Récapitulation

Les différents résultats montrent qu'en moyenne les réponses obtenues au 11ème jour de mise en présence des effecteurs, sont inférieures à celle obtenues au 7ème jour d'incubation, et cela pour les différents phytoestrogènes.

Il ressort de plus de ces résultats que le pouvoir mitogène de ces phytoestrogènes est beaucoup plus important aux faibles concentrations (10^{-8} M) qu'aux fortes concentrations (10^{-4} M). Le 17β oestradiol donne une réponse maximale à la concentration 10^{-10} M, le 17α oestradiol lui donne la meilleure réponse aux concentrations 10^{-6} M et 10^{-8} M.

Le coumestrol donne en moyenne la meilleure réponse à la concentration médiane de 10^{-6} M, la Degueline produit la meilleure réponse à la plus faible concentration, de même que l'Equol et la Rotenone.

On peut enfin insister sur le fait que c'est à la plus forte concentration en effecteurs que l'on a le plus faible pouvoir mitogène.

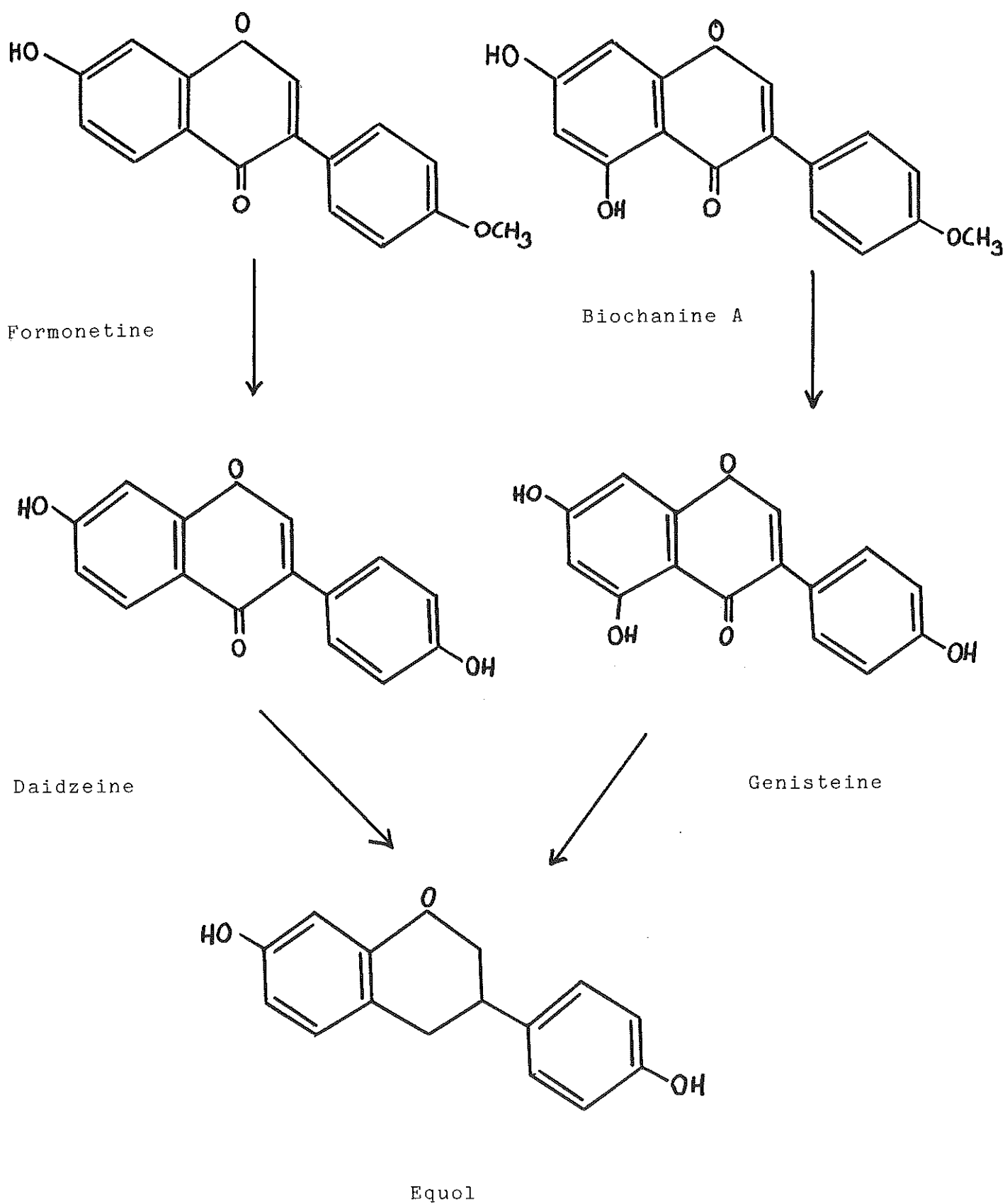
CONCLUSION

V - Conclusion

Tout au long de ce travail nous nous sommes intéressés à l'action mitogénique de substances d'origine végétale : les phytoestrogènes, qui se lient aux récepteurs aux oestrogènes et induisent chez l'homme et l'animal des propriétés oestrogéniques. Notre étude s'est plus particulièrement dirigée vers les isoflavonoïdes qui sont donc des composés diphenoliques que l'on trouve dans la sous famille des légumineuses.

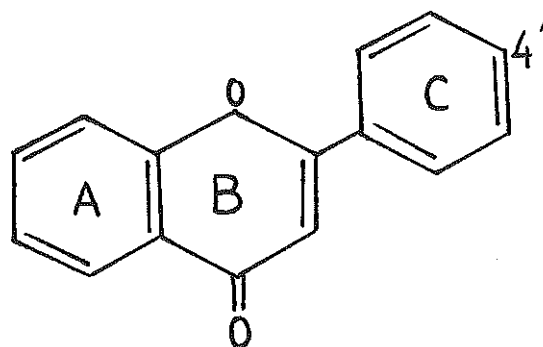
En effet la découverte de ces substances oestrogéniques en quantité significative dans l'urine humaine a entraîné de nombreuses études de leurs effets biologiques. Il a été démontré que la consommation d'un régime de type occidental (Western dietary) entraînait des carences comblées en partie par un régime riche en isoflavonoïdes. De plus l'excrétion d'isoflavonoïdes s'est révélée élevée dans les populations à faible risque de cancer du sein (ADLERCREUTZ, 1982), cancer de la prostate, et accident coronarien, et faible chez les populations à haut risque (WHITTEN ET NAFTOZIN, 1992), ces populations consommant des légumes riches en fibres, et en produits à base de farine de soja (ADLERCRUTZ et al., 1992). Il existe, comme le pensent certains auteurs (ADLERCREUTZ et al., 1992) un mécanisme anticancéreux de ces composés isoflavonoïdes. En effet, les femmes ayant une prédisposition au cancer du sein présentent une 16α hydroxylation élevée des oestrogènes comme nous l'avons vu précédemment. Il semble que cette augmentation de la 16α hydroxylation soit un facteur de risque du cancer du sein. Il existerait une corrélation étroite entre la quantité de SHBG (Sex Hormon Binding Globulin) dans le plasma et l'excrétion d'oestrogène 16α hydroxylé. La concentration plasmatique de SHBG étant d'autant plus faible que l'excrétion de 16α oestrogène hydroxylé est élevée, et ce chez les femmes à haut risque de cancer mammaire. Les auteurs ont donc démontré dans de nombreuses études qu'un faible taux de SHBG signifie une forte cléarence métabolique des hormones sexuelles dans

de nombreux tissus de l'organisme, et en particulier le foie où se produit d'ailleurs la 16 α hydroxylation des oestrogènes (ADLERCREUTZ et al., 1992). A l'opposé la consommation d'isoflavonoïdes est associée à une infertilité constante chez les brebis et les vaches trouvant ces composés dans un fourrage riche en trèfle (*Trifolium subterraneum* L.) et à des problèmes hépatiques chez les guenons en captivité, ces isoflavonoïdes interfèrent dans le processus normal de reproduction en induisant l'oestrus chez l'animal immature. Certains auteurs (WHITTEN et al., 1992) admettent que l'action de phytoestrogènes tels que le coumestrol ne se fait pas uniquement sur l'appareil reproducteur. Un traitement par le coumestrol, à court terme, produit une faible élévation de l'occupation des récepteurs au niveau de la zone préotique de l'hypothalamus (H.P.O.A. : hypothalamic preoptic area), en admettant toutefois que l'effet sur les tissus périphériques est supérieur à l'effet sur le système nerveux central. Il est probable qu'une forte dose de coumestrol entraîne un effet différent ? On sait aujourd'hui qu'un traitement par le coumestrol accélère la maturation du vagin chez le modèle animal qu'est la ratte, avance l'âge du premier oestrus, interférant de la sorte dans le processus normal de reproduction (TORBJÖRN et LUNDH) cette réponse permettant de mettre en parallèle l'activité de certains phytoestrogènes et l'activité du 17 β oestradiol sur de la LHRH. L'infertilité des brebis consommant du trèfle, a longtemps été attribuée aux isoflavones : Gemisteine, Biochanine A, et au Coumestran : Coumestrol. Récemment, la cause en a été la Formonétine, aujourd'hui l'on sait que cette formonétine est déméthylée dans le foie des ruminants en Daidzéine qui elle même n'est qu'un intermédiaire aboutissant à un composé oestrogéniquement actif l'Equol (NILSSON et al., 1987). L'Equol est retrouvé dans l'urine de brebis à qui l'on administre de la formonétine, ce composé l'Equol étant formé par réduction de la Daidzéine dans le foie selon le schéma suivant :



L'Equol a rapidement intéressé certains auteurs : Sur une femelle ratte de trois semaines l'injection de 5 mg d'Equol en sous-cutanée, entraîne une augmentation du poids de l'utérus 24 heures plus tard, équivalente à celle obtenue avec 5 μ g de 17 β oestradiol (TANG et ADAMS, 1979).

Les flavonoïdes sont donc des métabolites secondaires des plantes très importants. Il est estimé qu'un régime normal chez l'homme apporte à peu près 1 g par jour de ces composés naturels. La majorité de ces flavonoïdes sont non toxiques pour l'homme et pour l'animal, et les propriétés pharmacologiques connues sont limitées à quelques substances tirées de ce groupe (ABDEL RAHIM IBRAHIM et YUSUF J ABDUL HAJJ, 1990). Il semble aujourd'hui que seul les composés possédant un groupement hydroxy sur le cycle A, et un hydroxy en position 4' sur le cycle C aient une affinité avec le site récepteur aux oestrogènes.



Tous les résultats peuvent avoir de très importantes implications dans la gestion clinique du cancer du sein chez une femme ménopausée qui désire suivre un régime végétarien. Une grande quantité d'oestrogènes provenant de l'alimentation pourrait réactiver de minuscules métastases chez des patientes n'ayant pas suivie une thérapie à l'aide d'antioestrogène comme le Tamoxifène, sur une durée suffisamment longue. Le mécanisme d'action des phytoestrogènes est de prévenir la production d'oestrone et d'androsténone. Il semble qu'une forte concentration en phytoestrogènes dans la circulation portale hépatique, peut être suffisante pour stimuler *in vivo* la production de SHBG par le foie (WELSHONS et al., 1987), d'autre part cette augmentation de SHBG dans la circulation périphérique d'une

patiente ménopausée peut indirectement prévenir le développement de cancer hormono-dépendant. Cette augmentation de SHBG, diminue la concentration en stéroïdes oestrogéniques libres, ceci pouvant expliquer que les végétariens ont une incidence de cancer mammaires plus faible. Les expérimentations nommées dans ce travail s'impliquent donc dans la recherche d'une explication de l'action de ces phytoestrogènes. Le coumestrol présentant un fort pouvoir mitogène sur les cellules MCF7 font de ce protocole expérimental un bon modèle d'étude pour montrer l'action des métabolites de ces phytoestrogènes connus, par exemple l'Equol qui dans notre travail a montré un pouvoir mitogène significatif à la concentration de 10^{-8} M.

Ces expérimentations présentant un grand intérêt devraient donc être renouvelées en simulant divers environnements hormonaux se rapprochant le plus possible de ceux rencontrés chez la femme.

BIBLIOGRAPHIE

ADLERCREUTZ H., MOUSAVI Y., CLARK J., HÖCKERSTEDT K.,

HÄMÄLÄinen E., WÄHÄLÄ K., MÄKELÄ T. and HASE T.

Dietary phytoestrogens and cancer : in vitro and in vivo studies.

J. Steroid. Bio. Molec. Biol., 1992, 41, 331-337

ADLERCREUTZ H., HEIKKINEN R., WOODS M., FOTSIS T.,

DWYER J.T., GOLDIN B.R. and GORBACH S.L.

Excretion of the lignands enterolactone and enterodiol and of equol in omnivorous and vegetarian postmenopausal women and in women with breast cancer.

The Lancet., 1982, , 1295-1298

ALBANES D. and WINICK M.

Are cell number and cell proliferation risk factors from cancer.

J. Nutr. Cancer Inst., 1988, 80, 772-775

BEGGS M.J., STOLZER-JEHLE A. and WELLMANN E.

Plant Physiol., 1985, 79, 630

BEWICK P.M.

Isoflavonoids.

Chapman and Hall, 1988, 126-209

COSIO E.G., WEISSENBOCK G.W. and Mc CLURE J.W.

Plant Physiol., 1985, 78, 14

**GODA Y., KATAYAMA M., ICHIKAWA K., SHIBUYA M., KIUCHI F. and
SANKAWA U.**

Chem. Pharm. Bull., 1985, 33, 5606

IRBAHIM A.R. and ABUL-HAJJ Y.J.

Aromatase inhibition by flavonoids.

J. Steroid. Bio., 1990, 37, 257-260

LAMAN N.A. and OLEKSYUK L.P.

Chem. Abstr., 1982, 97, 3740

**LE MARCHAND L., YOSHIZAWA C.N., KOLONEL L.N. and
NOMURA A.M.Y.**

Time trends in characteristics at diagnosis and subsequent survival for caucasian,
japanese and Hawaiian women with breast cancer in Hawaii

J. Chron. Dis., 1987, 40, 1099-1110

LUK K., STERN L., WEIGELE M., O'BRIEN R.A. and SPIRT N.

J. Nat. Prod., 1983, 46, 852

LUNDH T.J.O.

Conjugation of the plant estrogens formonnetin and daidzein and their metabolites
equol by gastrointestinal epithelium from cattle and sheep.

J. Agri. Food Chem., 1990, 38, 1012-1016

**MUSEY P.I., COLLINS D.C., BRADLOW H.L., GOULD K.G. and
PREEDY J.R.K.**

Effect of diet on oxidation of 17 b estradiol in vivo.

J. Clin. Endocr. Metab., 1987, 65, 792-795

NAKAGAWA M., NAKANISHI K., DARKO L.L. AND VICK J.A.

Tetrahedron Lett., 1982, 23, 3855

NILSSON A., HILL J.L. and LLOYD DAVIES H.

An in vitro study of form formonetin and biochanin a metabolism in rumen fluid from sheep.

Biochim. Biophys. Acta., 1967, 148, 92-98

**REDDY B.S., COHEN L.A., Mc COY G.D., HILL P., WEISBURGER J.H.
and WYNDER E.L.**

Nutrition and its relationship to cancer.

Advances Cancer Reser., 1980, 32, 237-245

TANG B.Y. and ADAM N.R.

Effect of equol an estrogen receptor and on synthesis of DNA and protein in the immature rat uterus.

J. Endocr., 1980, 85, 291-297

THEILLET C.

Genetique et cancer du sein

Euromedecine 88

Montpellier, 1988, 98-99

TOUFFET S., HANNOUCH N., SAMPEREZ S. and JOUAN P.

Induction de l'activité de la thymidine kinase de type foetal par des phytoestrogènes dans l'utérus de la ratte immature.

C.R. Soc. Biol., 1987, 181, 122-127

**WELSHONS W.S., MURPHY C.S., KOCH R., CALAF G. and
JORDAN V.C.**

Stimulation of breast cancer cells in vitro by the environmental estrogen
enterolactone and the phytoestrogen equol.

Breast Cancer Research and Treatment, 1987, 10, 169-175

WHITTEN P.L. and NAFTOLIN F.

Effects of a phytoestrogen diet on estrogen dependent reproductive processes in
immature female rats.

Steroids, 1992, 57, 56-61

WYNDER E.L.

Dietary factors related to breast cancer.

Cancer, 1980, 46, 899-904

TABLE DES MATIERES

PHYTOOESTROGENES ET CANCER DU SEIN

| | |
|--|-----------|
| I - Introduction | 9 |
| I-1 Généralités sur le cancer du sein | 10 |
| I-2 Etiologie du cancer du sein | 10 |
| I 2.1. Facteurs environnementaux | 11 |
| I 2.2. Facteurs génétiques | 12 |
| I 2.3. Facteurs hormonaux | 12 |
| I-3 Rôle des oestrogènes | 13 |
| I-4 Aspect nutritionnel | 13 |
| | |
| II - Propriétés structurales et biologiques des phytoestrogènes | 18 |
| II-1 Présentation et distribution | 18 |
| II-2 Propriétés biologiques des Isoflavonoïdes | 19 |
| II-3 Molécules étudiées | 21 |
| II 3.1. Groupe des Rotenoïdes | 21 |
| II 3.2. Groupe des Coumestranes | 24 |
| II 3.3. L'Equol | 27 |
| | |
| III - Matériels et Méthodes | 28 |
| III-1 Entretien des lignées de cellules MCF-7 | 29 |
| III 1.1. Préparation du milieu | 29 |
| III 1.1. a - Le milieu de base | 29 |
| III 1.1. b - Le sérum du veau foetal | 30 |

| | |
|---|-----------|
| III 1.2. Repiquage des cellules après trypsination | 30 |
| III 1.2. a - Rinçage des cellules | 30 |
| III 1.2. b - La trypsination | 30 |
| III 1.3. Congélation des cellules | 31 |
| III 1.3. a - Le milieu de congélation | 31 |
| III 1.3. b - La congélation | 31 |
| III 1.3. c - La décongélation | 31 |
| III 1.4. Traitement du sérum de veau foetal | 31 |
| III-2 Ensemencement et cinétique de croissance | 32 |
| III 2.1. Comptage des cellules | 33 |
| III 2.2. Ensemencement des boites 6 puits | 33 |
| III 2.3. Vérification de la densité cellulaire | 34 |
| III 2.4. J-0 : Mise en culture | 34 |
| III 2.5. J-7 : Première série de prélèvement | 34 |
| III 2.5. a - Prélèvement des boites 6 puits | 35 |
| III 2.5. b - Prélèvement proprement dit | 35 |
| III 2.5. c - Conservation des cellules | 35 |
| III 2.6. J-11 : deuxième série de prélèvement | 35 |
| III-3 Dosage de l'ADN cellulaire | 36 |
| III 3.1. Principe | 36 |
| III 3.2. Préparation de la gamme étalon | 36 |
| III 3.3. Gamme étalon | 36 |
| III 3.4. Dosage du DNA à partir du tapis cellulaire | 36 |
| IV - Résultats | 38 |
| IV-1 Protocole d'expérimentation | 39 |
| IV-2 Effet de l'oestradiol | 39 |
| IV-3 Le Coumestrol | 42 |
| IV-4 La Dégueline | 44 |

| | |
|---------------------------------|-----------|
| IV-5 L'Equol | 45 |
| IV-6 La Rotenone | 47 |
| IV-7 Récapitulation | 48 |
| V - Conclusion | 49 |
| Bibliographie | 55 |
| Table des Matières | 60 |

Résumé

En choisissant comme modèle d'étude in vitro, la croissance de cellules cancéreuses mammaires hormonodépendantes MCF-7, nous avons tentés de mettre en évidence le pouvoir mitogène de différents phytoestrogènes : substances d'origine végétales présentant des parentées structurales avec l'oestradiol.

Ces phytoestrogènes étudiés sont : le Coumestrol, la Degueline, l'Equol, la Rotenone, ont été comparés au pouvoir mitogène du 17 α oestradiol et du 17 β oestradiol, et nous avons pu mettre en évidence une réelle action mitogénique de ces substances.

En effet celles-ci ont fortement stimulé sur une période de 11 jours la croissance de ces cellules. Nous en avons donc conclu que les facteurs environnementaux, et en particulier l'alimentation pouvait influencer le développement de cellules cancéreuses mammaires.

Mots clés :

- Phytoestrogènes
- MCF-7
- Cancer
- Sein
- Alimentation
- Oestradiol