

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE



106 026354 2

ANNEE 1996

THESE N° 37/1

**MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE MESURE DE
L'ACTIVITE AROMATASIQUE DANS LES CELLULES MCF-7**



THESE

pour le

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

Présentée et soutenue publiquement le 20 novembre 1996

par

Corinne GIRY

Née le 21 septembre 1971 à Saint Léonard de Noblat (Haute-Vienne)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur Le Professeur HABRIOUX Président
Madame MARRE-FOURNIER, Maître de conférences Directeur de thèse
Monsieur VACARIE, Pharmacien Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

1.10.96

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Axel GHESTEM
ASSESEUR : Monsieur le Professeur Gérard HABRIOUX
ASSESEUR : Monsieur Gilles DREYFUSS - Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
BERNARD Michel	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE

QUE MES REMERCIEMENTS AILLENT

A TOUS CEUX QUI, DANS CE DOCUMENT, RETROUVERONT LA PART
MATERIELLE, INTELLECTUELLE OU MORALE QUI LEUR EST DUE

AUX MEMBRES DU JURY QUI ONT BIEN VOULU ACCEPTER DE JUGER
CE TRAVAIL.

SOMMAIRE

I - INTRODUCTION	p 8
A - Cancer du sein	p 9
1 - Facteurs de risque	p 9
1 - 1 - Facteurs de risque liés aux mastopathies bénignes	
1 - 2 - Facteurs génétiques	
1 - 3 - Facteurs nutritionnels	
1 - 4 - Radiations ionisantes	
1 - 5 - Médicaments et hyperprolactinémiant	
1 - 6 - Autres facteurs	
1 - 7 - Facteurs hormonaux	
1 - 7 - 1 - Facteurs exogènes	
1 - 7 - 2 - Facteurs endogènes	
1 - 7 - 2 - 1 - Hyperestrogénie relative et insuffisance lutéale	
1 - 7 - 2 - 2 - Grossesse	
1 - 7 - 2 - 3 - Allaitement	
1 - 7 - 2 - 4 - Estrogènes	
B - Situation du travail	p 24
1 - Mesure de l'activité aromatasique	p 24
2 - Validation de la méthode	p 25
II - MATERIEL ET METHODE	p 26
A - Matériel Biologique	p 27
1 - Cellules MCF-7	p 27
1 - 1 - Culture cellulaire	
1 - 2 - Entretien des cellules	
1 - 3 - Obtention d'un lysat de cellules MCF-7	
2 - Obtention des microsomes hépatiques	p 28
2 - 1 - Solutions	

2 - 2 - Protocole	
3 - Dosage des protéines microsomales	p 32
3 - 1 - Principe	
3 - 2 - Solutions	
3 - 3 - Matériel	
3 - 4 - Protocole	
3 - 4 - 1 - Préparation de la gamme d'étalonnage	
3 - 4 - 2 - Dosage	
3 - 5 - Résultats	
4 - Contrôle de l'activité enzymatique des microsomes hépatiques : Dosage de l'érythromycine N-déméthylase par la méthode de NASH	p 34
4 - 1 - Principe	
4 - 2 - Solutions	
4 - 3 - Protocole	
4 - 3 - 1 - Réaction enzymatique	
4 - 3 - 2 - Réaction colorimétrique	
4 - 4 - Résultats	
B - Mise en oeuvre de la réaction enzymatique	p 38
1 - Solutions	p 38
2 - Protocole de la réaction enzymatique	p 39
3 - Analyse des produits de la réaction	p 44
3 - 1 - Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	
3 - 1 - 1 - Schéma de principe	
3 - 1 - 2 - CLHP phase inverse	
3 - 1 - 2 - 1 - Matériel	
3 - 1 - 2 - 2 - Solutions	
3 - 1 - 2 - 3 - Principe	
3 - 1 - 3 - CLHP phase normale	
3 - 1 - 3 - 1 - Matériel	

3 - 1 - 3 - 2 - Solutions

3 - 1 - 3 - 3 - Principe

3 - 2 - Mesure de la radioactivité

3 - 2 - 1 - Principe

3 - 2 - 2 - Appareillage : détecteur à scintillation

3 - 3 - Protocole

III - Résultats et discussion	p 50
A - Dosage des protéines microsomales	p 51
1 - Résultats obtenus avec le spectrophotomètre Milton Roy	p 51
2 - Résultats obtenus avec le spectrophotomètre ABC	p 52
B - Activité CYP3A dépendante dans les microsomes hépatiques	p 54
C - Séparation des produits de la réaction	p 55
1 - CLHP phase inverse	p 55
1 - 1 - Isocratique	
1 - 2 - Gradient	
2 - CLHP phase normale	p 66
D - Activité aromatisique des microsomes hépatiques de rat	p 70
1 - Aromatisation de la Δ_4^*	p 70
1 - 1 - Utilisation de la phase mobile A	
1 - 2 - Utilisation de la phase mobile C	
1 - 3 - Action des inhibiteurs	
1 - 3 - 1 - Aminoglutéthimide	
1 - 3 - 2 - Composé X	
2 - Aromatisation de la DHA*	p 80
2 - 1 - Action des inhibiteurs	
2 - 1 - 1 - Aminoglutéthimide	
2 - 1 - 2 - Composé X	

E- Activité aromatasique des lysats de cellules MCF-7	p 84
1 - Aromatisation de la Δ_4^*	p 84
2 - Aromatisation de la DHA *	p 84
IV Conclusion	p 87
Bibliographie	p 89

I - INTRODUCTION

A - CANCER DU SEIN

Parmi les cancers qui affectent les femmes, le cancer du sein occupe la première place. Dans la communauté européenne une femme sur douze présente un risque de développer un cancer du sein contre une femme sur huit aux USA. Ce cancer a une incidence de 25 à 29 % sur l'ensemble des cancers féminins et un taux de mortalité de 15 à 18 %. Les 2/3 des cancers du sein se manifestent après la ménopause (Pasqualini 1994).

L'origine du cancer du sein est manifestement multifactorielle ; en effet, ce cancer se développe dans un tissu dont la structure subit des variations cycliques et périodiques au cours des épisodes de la vie gynécobstétricale ; les facteurs déclenchants ont de multiples origines : hormonales, génétiques, nutritionnelles, médicamenteuses....

1 - Facteurs de risque

1 - 1 - Facteurs de risque liés aux mastopathies bénignes

De nombreux auteurs ont montré que les mastopathies bénignes multipliaient par deux le risque de cancer du sein. Le risque est différent selon la nature des anomalies morphologiques (mastose sclérokystique, métaplasie ou hyperplasie épithéliale), selon leur importance (hyperplasie proliférante, modérée ou légère) et selon le siège (au niveau des galactophores, des lobules ou au sein d'un foyer fibreux). Le risque est également différent selon le degré d'atypie des cellules ou selon les caractéristiques du tissu conjonctif mammaire. En résumé, les diverses études réalisées montrent que le risque le plus élevé semble correspondre aux maladies fibrokystiques associées à une hyperplasie proliférante et à un degré élevé d'atypie cellulaire (Rouëssé et Contesso 1985). Néanmoins seul un très petit nombre de femmes atteintes de maladies bénignes du sein seront atteintes d'un cancer (environ 8 % à 54 ans) et parmi les femmes atteintes d'un cancer du sein rares sont celles qui avaient été opérées pour une lésion bénigne (Bremond 1982).

1 - 2 - Facteurs génétiques

Le risque lié à l'existence d'une lésion pré-cancéreuse est accru s'il existe des antécédents familiaux de cancer du sein.

Une composante héréditaire simple est retrouvée pour au moins 10 % des cas et des études ont permis d'identifier deux gènes prédisposants aux tumeurs mammaires : BRCA 1 pour le cancer du sein précoce et le syndrome sein/ovaire et p53 pour le syndrome de Li-Fraumeni (Sobol 1993).

1 - 3 - Facteurs nutritionnels

Un grand nombre d'arguments est en faveur d'une liaison entre des facteurs nutritionnels et le risque de cancer du sein que ceux-ci entraînent ou non secondairement une obésité. Des études expérimentales chez l'animal, des études géographiques à l'échelon des pays et quelques enquêtes de type cas - témoins ont montré que l'augmentation de la plupart des graisses augmente parallèlement le risque de cancer mammaire. Il semble également que la consommation régulière de boissons alcoolisées pourrait accroître le risque de cancer du sein. En revanche, une consommation importante de sélénium et de vitamine A dans l'alimentation pourrait diminuer ce risque (Rouëssé et Contesso 1985). Des études montrent également qu'un régime alimentaire végétarien est nettement favorable à une baisse de la fréquence d'apparition du cancer au sein par rapport à un régime omnivore (Mousavi et al 1993).

1 - 4 - Radiations ionisantes

Les femmes exposées à de hautes doses de radiations ionisantes ont un risque augmenté de cancer du sein comme en témoignent en particulier les études effectuées sur les survivantes japonaises d'Hiroshima et de Nagasaki et sur les femmes traitées et suivies pour tuberculose pulmonaire, qui ont eu de nombreux contrôles radiographiques. Il a été calculé que l'augmentation du nombre de cancers mammaires pourrait être de 6 cas/an/rad pour un million de femmes. Il semble probable qu'il existe un effet - dose et que les doses reçues au cours d'une longue période aient un pouvoir cumulatif (Rouëssé et Contesso 1985). Le risque maximal se situe lorsque l'irradiation a lieu lors de la puberté ou dans la troisième décennie. Dans ces deux périodes, les cellules épithéliales mammaires ont une grande activité mitotique et ne sont pas sous

l'effet protecteur de la progestérone ou de la première grossesse à terme (Kelsey et al 1983). A l'inverse une irradiation pendant la période ménopausique diminuerait le risque, mais cela peut être dû à l'induction de la ménopause (Boice et al 1979).

Cependant les mammographies de surveillance n'apportent que de faibles doses de rayonnements (Rosenwald 1983), elles ne doivent donc pas être retenues comme un facteur favorisant, d'autant qu'après 50 ans un dépistage mammographique systématique annuel permet de réduire la mortalité par cancer du sein (Shapiro 1977).

1 - 5 - Médicaments et hyperprolactinémisants

La réserpine a été le premier produit accusé d'augmenter le risque de cancer du sein en induisant une hyperprolactinémie. En fait, comme pour d'autres médicaments - dopaminergiques, phénothiazines... -, ce risque n'a jamais été prouvé (Kelsey et al 1983).

1 - 6 - Autres facteurs

D'autres éléments restent à élucider et ne sont encore qu'au stade des études épidémiologiques : le tabac (Rosenberg et al 1984), les teintures de cheveux (Kelsey et al 1983), la lithiase vésiculaire (Adami et al 1984). Enfin, l'existence d'un cancer du sein chez une patiente s'accompagne d'un risque accru de survenue d'une autre tumeur maligne (ovaire, utérus, colon...) l'inverse étant également vrai (Kelsey et al 1983). Ces associations morbides ne sont en fait que le résultat d'influences néfastes communes : terrain, climat hormonal, nutrition...

1 - 7 - Facteurs hormonaux

Ils apparaissent déterminants. Qu'ils soient endogènes ou exogènes, ils modifient le climat hormonal du tissu mammaire et d'éventuelles lésions bénignes pré - existantes, certaines pouvant être améliorées, d'autres aggravées.

1 - 7 - 1 - Facteurs exogènes

- Contraception hormonale

Selon sa composition, elle crée un climat à composante estrogénique ou progestative dominante. Globalement, les études ne montrent pas d'augmentation du risque de cancer du sein chez les utilisatrices (Kelsey et al 1983).

1 - 7 - 2 - Facteurs endogènes

1 - 7 - 2 - 1 - Hyperestrogénie relative et insuffisance lutéale

Les sécrétions hormonales varient au cours du développement mammaire (de la puberté à la première grossesse menée à terme), au cours de chaque cycle menstruel (ovulatoire ou non) et après la ménopause. De cet équilibre hormonal dépend l'eutrophie mammaire. En période pubertaire, la sécrétion des estrogènes est d'abord isolée, jusqu'à ce que les cycles deviennent ovulatoires, la progestérone vient alors contrebalancer leurs effets. Le phénomène inverse est observé dans la période péri - ménopausique : les cycles deviennent anovulatoires et une hyperestrogénie relative réapparaît. Ces deux périodes sont semblables par leur type d'imprégnation hormonale stéroïdienne (Sherman et al 1974, Mauvais-Jarvis et al 1975).

Au cours de ces "fenêtres estrogéniques", l'insuffisance lutéale et l'hyperestrogénie relative joueraient le rôle d'initiation et ou de promotion de la cancérogenèse (Nandi 1978). Pendant la vie génitale, de nombreux symptômes traduisent ce déséquilibre hormonal : mastodynie, irrégularité menstruelle, bouffées de chaleur.... Néanmoins, ces symptômes ne s'accompagnent pas toujours d'un risque accru de cancer du sein (Kelsey et al 1983). Le déséquilibre hormonal doit donc être considéré comme un élément parmi d'autres.

1 - 7 - 2 - 2 - Grossesse

Une première grossesse à terme à un âge précoce, est un élément protecteur (Mac Mahon et al 1970) ; elle permet la maturation complète de la glande mammaire qui peut alors bénéficier pleinement de l'influence protectrice de la progestérone (Drife 1981, Sherman et al 1974). Elle prévient l'initiation tumorale, alors qu'une grossesse tardive favoriserait la promotion de cellules déjà transformées (Mac Mahon et al 1973, Moolgavkar et al 1980). Les modifications

hormonales et tissulaires qui accompagnent une grossesse semblent rendre le sein moins sensible aux effets cancérogènes mais il n'existe pas d'études pour appuyer cette hypothèse (Mac Mahon et al 1970).

1 - 7 - 2 - 3 - Allaitement

Il peut jouer contre le cancer du sein un rôle protecteur (Vorherr 1980), d'autant plus grand que la lactation est prolongée. La suppression de la sécrétion cyclique des estrogènes en serait l'explication.

1 - 7 - 2 - 4- Estrogènes

Les estrogènes jouent un rôle important dans le développement du tissu mammaire : leur contribution dans la croissance de certains cancers du sein a été reconnue il y a environ un siècle, lorsque Beatson a accompli avec succès des ovariectomies chez des patientes atteintes de cancer du sein (Beatson 1896). La majorité des cancers du sein sont initialement hormono-dépendants : l'estradiol est un facteur majeur dans leur développement et leur évolution (Pasqualini 1994). Cependant cette hormone a besoin de cofacteurs pour être active : ce sont principalement les facteurs de croissance - facteur épidermique (EGF), facteur de transformation (α TGF), facteur insuline -like (IGF-I) - qui induisent la prolifération cellulaire (Pasqualini et al 1988). Des études ont montré que ces différents facteurs sont impliqués dans l'activité de l'estrogène et le développement du cancer mammaire (Dickson et al 1986, Fitzpatrick et al 1984). Ajoutés aux cultures de cellules mammaires cancéreuses ayant des récepteurs pour les estrogènes (RE +), les estrogènes font passer les cellules d'un état de quiescence (phase Go du cycle cellulaire), à un état de multiplication cellulaire (Lippman et al 1976).

Après une période qui peut durer plusieurs années, la tumeur devient hormono-indépendante. Le mécanisme de cette conversion n'est pas établi en l'état actuel des connaissances mais la découverte de "variants" du récepteur aux estrogènes pourrait être une explication (Pasqualini 1994).

- Différence pré-et post-ménopause

Avant la ménopause, estrogènes et androgènes sont produits respectivement par les ovaires et les surrénales ; l'ovaire est la principale source d'estrogènes sous l'action stimulante d'hormones hypophysaires : Luteinizing Hormone (LH) et Folliculing Stimulating Hormone (FSH).

Après la ménopause, la production des estrogènes par les ovaires devient négligeable mais la synthèse des stéroïdes par les surrénales demeure, en particulier celle des androgènes surrénaux comme la Déhydroépiandrostérone (DHA) et le Sulfate de Déhydroépiandrostérone (SDHA). Pour les estrogènes les principaux sites de synthèse sont périphériques (Miller 1991) : ce sont la peau (Schweikert et al 1976), le muscle (Longcope et al 1978), le tissu adipeux (Longcope et al 1978, Perel et al 1979) et chez les femmes avec un cancer du sein, la tumeur elle même (Miller et al 1982). La quasi-totalité de l'estrone et de l'estradiol produits chez les femmes post-ménopausées est le résultat de la conversion périphérique des androgènes surrénaux en estrogènes par un complexe enzymatique multicomposant : l'aromatase (Grodin et al 1973, Poortman et al 1973). Cette conversion a été décrite dans un certain nombre de tissus humains comme le foie, le cerveau, les cheveux (Smuk et al 1977, Schweikert et al 1975), mais les sites majeurs pour la formation extra glandulaire d'estrogènes après la ménopause sont le tissu adipeux et le muscle (Longcope et al 1978), qui contiennent la majorité de l'activité aromatasique (Longcope 1982). Cependant de nombreux échantillons de tissu mammaire normal et malin possèdent aussi une activité aromatasique (Miller et al 1974, James et al 1987). Si l'on mesure l'activité de l'aromatase dans le tissu adipeux mammaire (dans le cadre d'un cancer du sein) on constate que la plus forte activité est toujours présente dans un quadrant qui renferme une tumeur, tandis que les quadrants avec la plus faible activité ne sont jamais corrélés à une présence tumorale. Ces résultats montrent une relation significative entre le tissu adipeux mammaire et le cancer du sein (O'Neill et al 1988). Le sein, contrairement aux autres glandes du corps humain, contient beaucoup de tissu adipeux ; cela est plus marqué chez les femmes âgées, la proportion de tissu adipeux mammaire augmentant avec l'âge (Preschtel 1979).

En supposant que l'activité aromatasique élevée dans les quadrants avec tumeur, n'est pas due à une contamination des échantillons par des cellules tumorales, deux explications peuvent être avancées (O'Neill et al 1988) :

- Les tumeurs malignes peuvent stimuler l'activité aromatasique dans les tissus environnants par des facteurs tels que la cytokine IL6, identifiée comme un facteur présent dans le carcinome mammaire capable de stimuler l'activité de l'aromatase (Reed et al 1993)

- Une importante activité dans une région particulière de tissu adipeux pourrait créer un environnement local favorisant la croissance maligne en ce point.

Il faut également noter que les tumeurs mammaires des femmes post-ménopausées contiennent de fortes concentrations d'estrogènes alors qu'à cette période de la vie, les taux plasmatiques d'estrogènes s'effondrent (Edery et al 1981, Fishman et al 1977). D'après ces constatations, il a été montré l'existence d'une production locale in situ d'estrogènes (Abul-Hajj et al 1979) qui est catalysée par l'aromatase mais aussi par une autre enzyme, la sulfatase. En effet, Santner et al (1984, 1986) suggèrent que l'aromatase fournit seulement une petite partie des estrogènes intracellulaires et que l'hydrolyse du sulfate d'estrone circulant - qui est dix fois plus important que l'estrone (Samojlik et al 1982) - par une sulfatase intracellulaire est la principale source de la production in situ d'estrogènes. Le sulfate d'estrone provenant de la transformation de l'androstènedione par une enzyme : la sulfotransférase (Figure I-1). Cependant notre étude s'est portée sur l'aromatase.

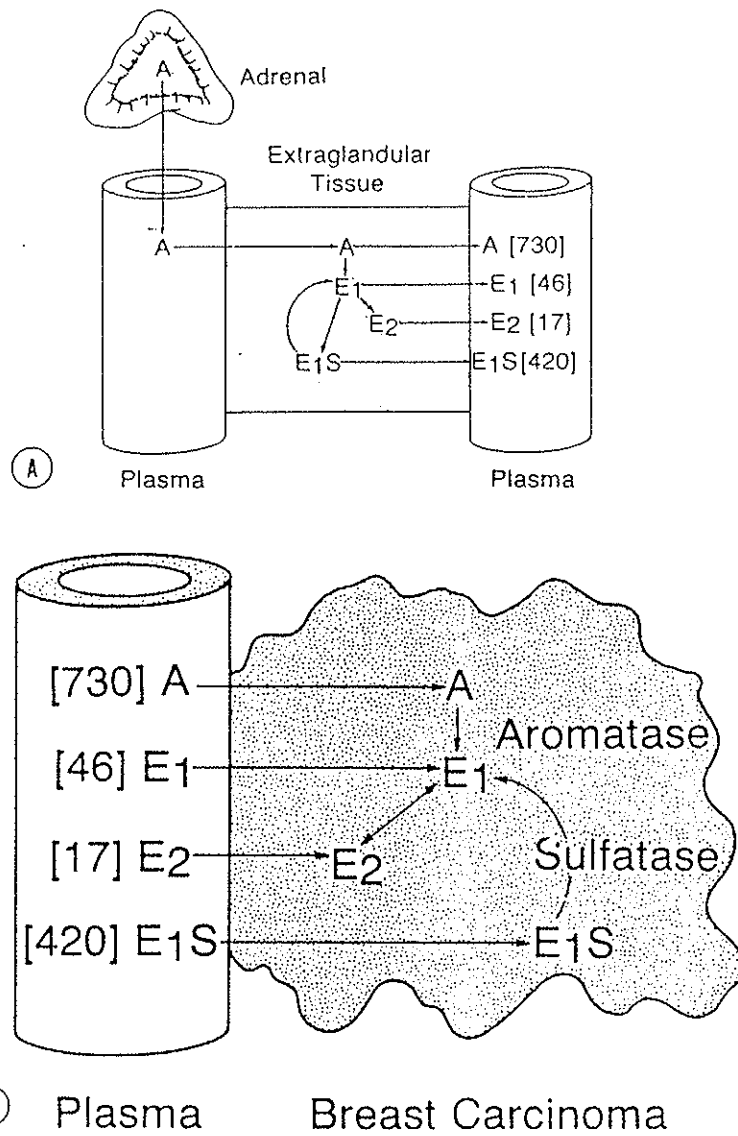


Figure I-1 : Origine des estrogènes chez les femmes après la ménopause
(d'après SANTEN R.J. et al, 1987)

- A : Androstènedione
- E₁ : Estrone
- E₂ : Estradiol
- E₁S : Sulfate d'estrone

- Aromatase

- Substrats

La mesure des concentrations endogènes des hormones pouvant servir de substrats pour l'aromatase révèle des taux élevés d'androstènedione, comparables en différentes zones de tissu adipeux mammaire, ce substrat a été retrouvé mais en plus faible quantité dans les tumeurs ; ceci pourrait être en accord avec l'hypothèse que l'androstènedione serait le principal substrat de l'aromatase et peut-être d'autres enzymes convertissant les stéroïdes dans le sein. En effet, si l'aromatase utilise comme principal substrat l'androstènedione, *in vivo*, le premier produit formé est l'estrone. Secondairement, a lieu la conversion en estradiol et plus spécialement dans les tissus malins du sein où l'estradiol est plus abondant que l'estrone. Cette deuxième conversion est catalysée par une enzyme : la 17 β hydroxystéroïde déshydrogénase (Thijssen et al 1993). Dans le sein la réaction est catalysée dans le sens de la réduction alors que dans l'endomètre c'est la réaction oxydative qui est favorisée (Tseng et al 1979).

- Localisation

L'aromatase a été détectée dans les 2/3 des cancers du sein humains ce qui amène à penser que cette enzyme est importante pour la synthèse d'estrogènes (Lipton et al 1992). Chez les femmes, l'aromatase est exprimée dans l'ovaire, en premier dans les cellules thécales, et par la suite, en plus grande quantité, dans les cellules de la granulosa, au cours du développement folliculaire (Inkster et al 1991). Pendant la grossesse, elle est exprimée dans les syncytiotrophoblastes du placenta (Inkster et al 1989) ; chez l'homme elle est présente dans les cellules de Leydig des testicules adultes (Brodie et al 1993).

Cette enzyme catalyse la conversion des androgènes en estrogènes, étape limitante dans la biosynthèse des estrogènes ; elle a, par conséquent, d'importantes fonctions dans le développement féminin et la reproduction. Dans le tissu adipeux, le principal estrogène formé est l'estrone tandis que dans les cellules de la granulosa le premier estrogène formé est le 17 β estradiol et dans le placenta l'estriol (Means et al 1989).

Le complexe enzymatique est constitué d'une hémoprotéine, le cytochrome P450 (CYP19), et d'une flavoprotéine, la NADPH cytochrome P450 réductase qui est commune aux principaux

types de cellules et fonctionne pour donner les électrons au cytochrome P450 (Brodie et al 1993). Ce complexe est présent dans le réticulum endoplasmique des cellules où il s'exprime (Means et al 1989).

- Mécanisme d'action

L'aromatase se lie aux substrats androgéniques en C19, androstènedione et testostérone, et catalyse leur conversion en estrone et estradiol. Cette réaction met en jeu 3 étapes d'hydroxylation, chacune utilisant un équivalent moléculaire de NADPH et d'oxygène (Thompson et al 1974), qui aboutissent à la perte du groupement méthyle angulaire du C19 et l'aromatisation du cycle A du stéroïde. Les deux premières étapes d'hydroxylation sont des "hydroxylations types" du cytochrome P450 avec maintien de la structure. Dans la troisième étape oxydative les atomes d'oxygène, provenant chacun de la première et troisième molécules d'oxygène consommées, sont incorporés dans l'acide formique formé avec le groupement méthyle du C19 (Akhtar et al 1982). L'hydrogène 1β est éliminé stéréospécifiquement dans le milieu aqueux par le clivage oxydatif de la liaison C10-C19 (Townsend et al 1968) et l'aromatisation du cycle A, pour former l'estrogène (Oh et al 1993). Ce mécanisme peut être traduit par les schémas suivants : (Figures I-2, 3, 4)

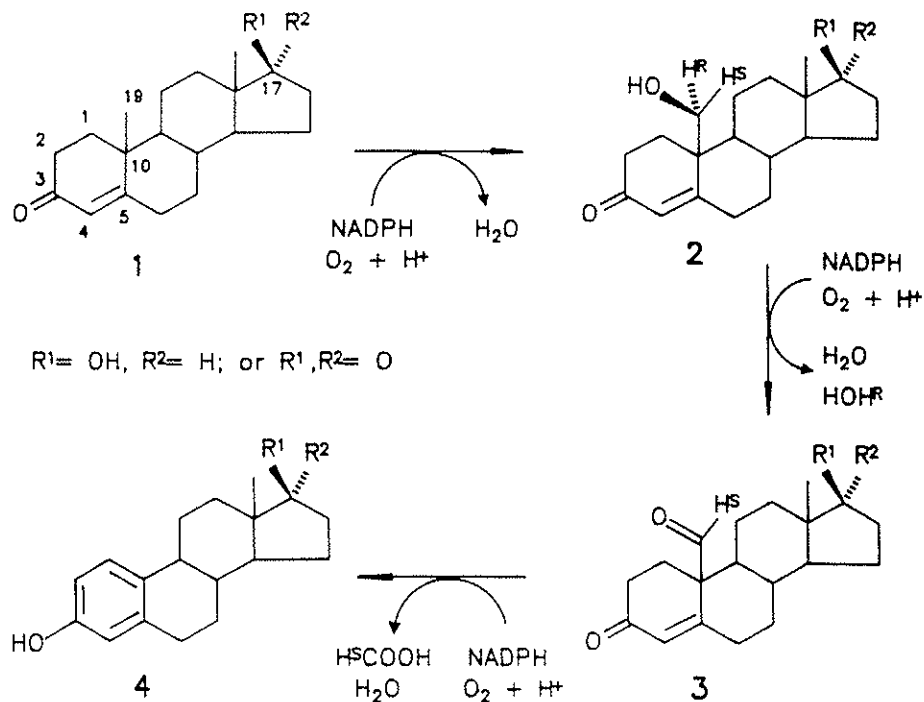


Figure I-2 : Conversion des androgènes en estrogènes par l'aromatase placentaire humaine (d'après OH S.S. et al, 1993)

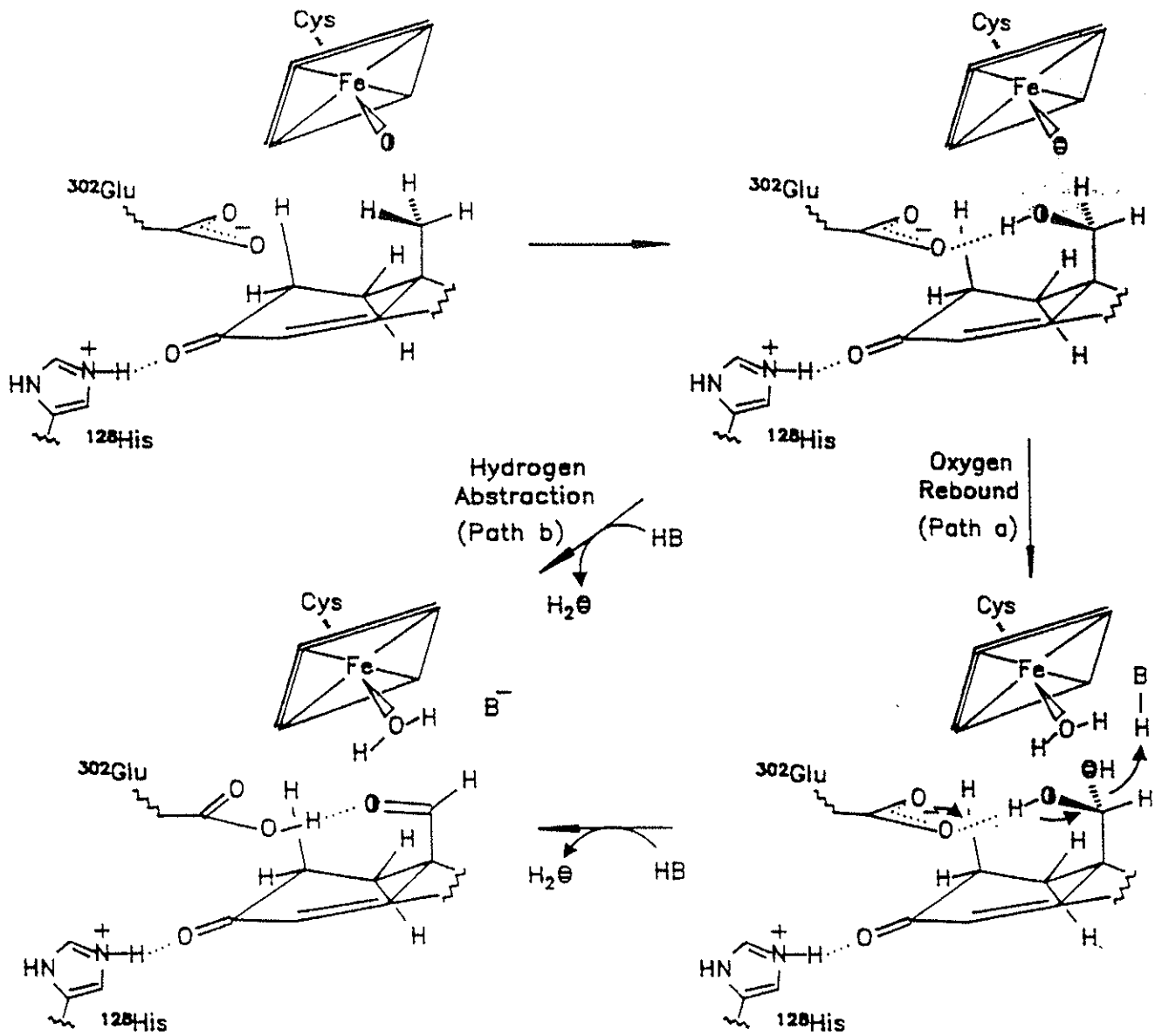


Figure I-3 : Première et deuxième étapes oxydatives du mécanisme d'action de l'aromatase (d'après OH S.S. et al, 1993)

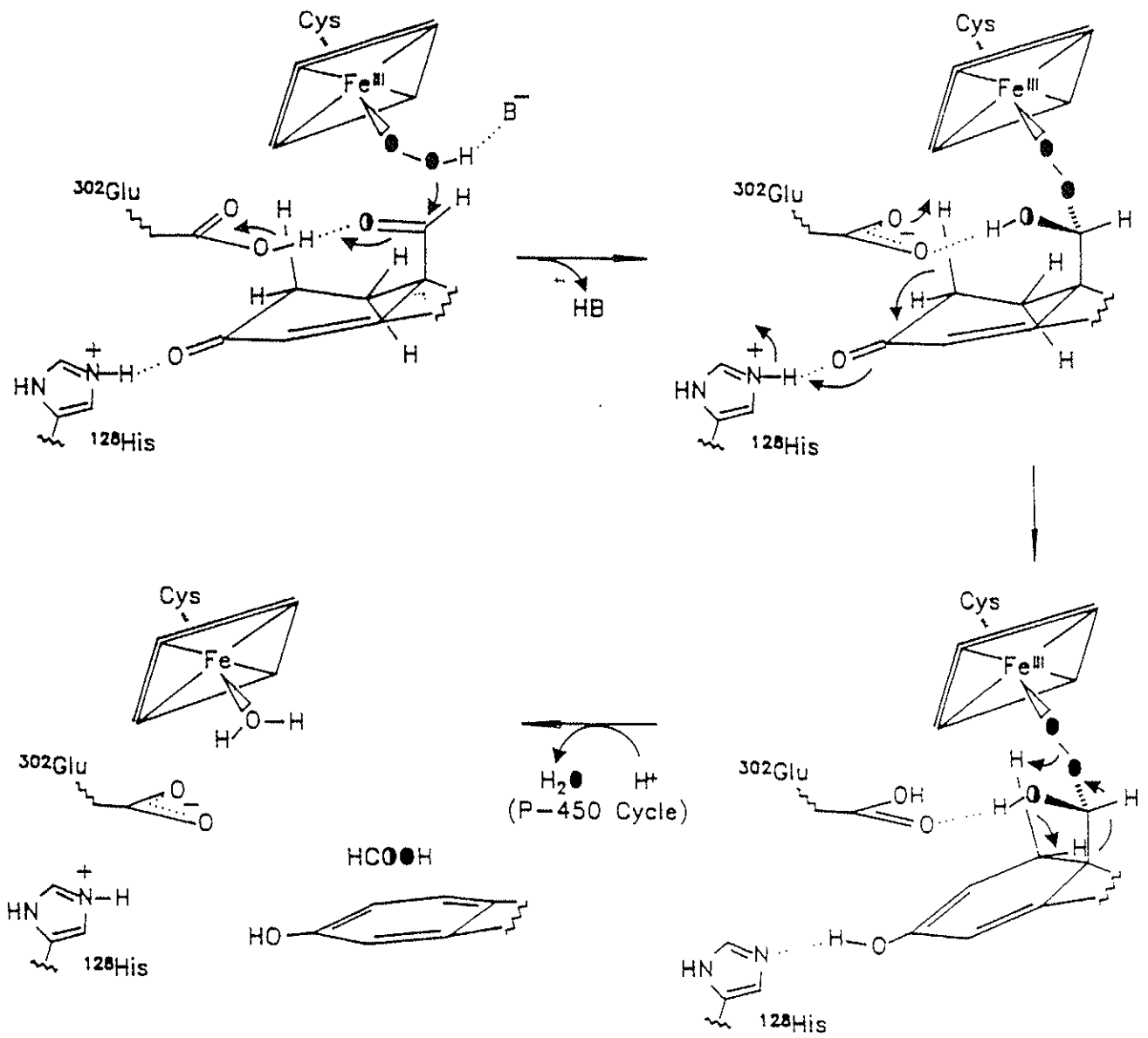


Figure I-4 : Troisième étape oxydative du mécanisme d'action de l'aromatase
(d'après OH S.S et al 1993)

Dans un premier temps il a été suggéré (Osawa et al 1984) que différentes aromatasases existaient dans le placenta, l'ovaire et dans le tissu adipeux puisque l'estrogène majeur produit dans chacun de ces tissus est différent : estriol dans le placenta, estradiol dans l'ovaire, et estrone dans le tissu adipeux. Cependant cela peut être également dû à la présentation à la même enzyme de différents substrats c'est-à-dire des androgènes 16α hydroxylés dans le cas du placenta, testostérone dans le cas de l'ovaire et androstenedione pour le tissu adipeux. Cette question apparaît également importante sur le plan clinique afin d'envisager de nouveaux traitements pour le cancer du sein.

- Inhibition de l'action des estrogènes

Actuellement un grand intérêt est porté sur le développement d'inhibiteurs de l'aromatase plus efficaces pour être utilisés dans le traitement des patientes atteintes de cancer du sein (Reed et al 1993). Cependant la seule source d'aromatase disponible pour tester de tels inhibiteurs est dérivée du placenta humain. Or l'estrogène qui a une incidence sur le développement des tumeurs mammaires serait celui produit par le tissu adipeux entourant cette tumeur ; si l'enzyme catalysant la synthèse de cet estrogène était différente de celle présente dans le placenta, il est clair que les inhibiteurs développés contre cette enzyme placentaire seraient moins efficaces contre l'enzyme présente dans le tissu adipeux. Des études sur l'expression de l'ADN codant (Means et al 1989) ainsi que des études portant sur l'enzyme purifiée suggèrent qu'une seule enzyme est capable de métaboliser les trois catégories de substrats stéroïdiques en C19 et qu'il n'est pas nécessaire de postuler l'existence d'enzymes différentes dans les différents tissus qui synthétisent des estrogènes. D'autres raisons amènent à s'intéresser à la synthèse des estrogènes et à son éventuel blocage dans les perspectives de traitement du cancer du sein. Depuis les travaux pionniers de Elwood Jensen, Williani Mac Guire et coll, il est courant de mesurer les concentrations de récepteurs aux estrogènes et à la progestérone pour identifier les patientes susceptibles de répondre à une thérapie hormonale (Brodie 1993) ; cependant la présence d'une activité aromatasique ne doit pas être systématiquement reliée à la présence de tels récepteurs (Sherman et al 1974). De plus, il a été observé que le cancer du sein est plus fréquent chez les femmes post-ménopausées que chez

les femmes jeunes et qu'une forte proportion de ces patientes ont des tumeurs hormono-sensibles (Mac Guire 1980).

Deux techniques de traitement du cancer du sein ayant pour cible "les estrogènes" ont fait preuve d'efficacité :

- Inhibition de l'action des estrogènes par des antiestrogènes qui interagissent avec les récepteurs aux estrogènes :

Le seul antiestrogène utilisé dans le traitement du cancer du sein est le tamoxifène, avec une tolérance excellente, ainsi qu'une efficacité comme traitement adjuvant ; il est surtout prescrit chez les femmes post ménopausées chez lesquelles il allonge les intervalles libres de récurrence et la survie globale (Early Breast Cancer trialists Collaborative Group 1992).

- Inhibition de la production d'estrogènes par des inhibiteurs de l'aromatase qui agissent par un mécanisme différent des antiestrogènes et donc n'interfèrent pas avec l'activité estrogénique :

L'aromatase est une réaction unique dans la biosynthèse des stéroïdes c'est pourquoi les composés qui interagissent avec ce processus sont sélectifs de l'aromatase. Puisque l'aromatase constitue la dernière étape dans la biosynthèse des estrogènes, le blocage de l'aromatase n'affecte pas la production d'autres stéroïdes et c'est pour ces raisons que l'aromatase est une cible privilégiée à inhiber (Brodie 1993).

* Inhibiteurs stéroïdiens irréversibles (Brodie 1993)

Les premiers inhibiteurs sélectifs de l'aromatase rapportés étaient de nombreux stéroïdes en C19 (Schwarzel et al 1973) :

1,4,6 androstatriène-3,17dione (Schwarzel et al 1973, Brodie et al 1982), 4-hydroxyandrostènedione (4-OH A) (Brodie et al 1976) et 4-acétoxy androstènedione (Brodie et al 1978).

D'autres inhibiteurs stéroïdiens de l'aromatase ont été montrés comme entraînant une inactivation de cette enzyme tels que de nombreux dérivés de l'androstènedione 7α substitués :

1 méthylandrost-1,4 diène-3,17 dione (SH489), 10-(2-propynyl-) estr-4-ène-3,17 dione (MDL 18962), 6 méthylén-androsta-1,4 diène-3,17 dione (FCE 24304), 4 aminoandrosta-1,4,6 triène - 3,17 dione (FCE 24928), 14-hydroxyandrostène-3,6,17 trione.

* Inhibiteurs non stéroïdiens réversibles (Brodie 1993)

L'aromatase est également inhibée par des composés non stéroïdiens tels que l'aminoglutéthimide [3(4-amino-phényl) - 3 - ethylpipéridine - 2,6 dione, AG], ses analogues, plusieurs imidazolés et de nombreux autres composés.

Ces composés inhibent le cytochrome P450 en interagissant avec l'atome de fer de l'hème, ils peuvent donc inhiber d'autres cytochromes P450 tels que ceux impliqués dans la production d'aldostérone et de cortisol.

A ce jour de nombreux inhibiteurs stéroïdiens font l'objet d'essais cliniques.

Les inhibiteurs de l'aromatase peuvent être utilisés comme traitement de première intention chez des patientes qui vont vers un stade avancé de la maladie, en suivant un traitement adjuvant à base de tamoxifène. La variété des composés inhibant l'aromatase offre la possibilité que des médicaments deviennent rapidement utilisables pour améliorer les patientes atteintes de cancer du sein et d'autres maladies influencées par les estrogènes. La combinaison d'un inhibiteur de l'aromatase avec le tamoxifène peut offrir des avantages supplémentaires.

B - SITUATION DU TRAVAIL

Nous nous proposons de mettre au point un test *in vitro* de mesure de l'activité aromatisique des microsomes des cellules MCF-7 (cellules mammaires ayant la faculté d'aromatiser les androgènes en estrogènes (Mac Indoe 1979)) à partir de deux substrats : androstènedione (Δ_4) et dehydroépiandrostérone (DHA) pris comme références dans les travaux antérieurs. Cette mise au point requiert au préalable, une étape d'expériences initiales sur les microsomes hépatiques de rat qui contiennent l'aromatase pour ensuite appliquer la méthode aux cellules MCF-7. Il a été montré que le sulfate de DHA stimule la prolifération des cellules MCF-7 (Najid et al 1990). Ce stéroïde est un androgène surrénalien. Pour comprendre le mécanisme d'action de cette hormone, l'hypothèse la plus simple est qu'elle serait transformée en estrogène à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire d'une suite de réactions enzymatiques dont la dernière serait catalysée par l'aromatase.

Aussi, nous cherchons à mettre en évidence une activité aromatisique dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7.

1 - Mesure de l'activité aromatisique

Différents protocoles pour mettre en évidence une activité aromatisique ont été déjà décrits : cette activité est classiquement mesurée par la méthode de Thompson et Siiteri (Thompson et al 1974) revue par Weisz (Weisz et al 1982) dans laquelle on quantifie la production d'eau tritiée lors de la transformation de d'androstènedione tritiée en estrone.

Bien que cette méthode ait été validée pour les microsomes placentaires (Thompson et al 1974) et l'hypothalamus de rat (Weisz 1982) par mesure directe des estrogènes produits, également validée pour le tissu cancéreux mammaire (Tilson Mallett et al 1983), elle s'est avérée non utilisable pour le tissu hépatique (Siiteri 1982). Cette méthode simple et rapide n'est cependant qu'une mesure indirecte de la synthèse d'estrogènes posant le problème de l'exactitude des résultats car il peut se former d'autres stéroïdes. Nous nous proposons de mettre au point une méthode de mise en évidence de l'activité aromatisique à partir d'androstènedione marquée au carbone 14 ($^{14}\text{C } \Delta_4$), substrat classiquement utilisé, et de mesurer cette activité à partir des

métabolites estrogéniques formés et identifiés : estrone et estradiol. Dans un second temps nous appliquerons cette méthode à la ^{14}C DHA utilisée comme substrat.

Cette méthode nécessite plusieurs étapes :

- Séparation des estrogènes et des substrats de la réaction : Il nous faudra dans un premier temps obtenir, à l'aide d'une méthode chromatographique choisie, une séparation reproductible et efficace (dans un intervalle de temps assez court) des différents produits mis en jeu et susceptibles d'être formés au cours de la réaction : estrone, estradiol, androstènedione, testostérone, déhydroépiandrostérone, estriol.

- Réaction enzymatique : la réaction doit être facile à mettre en oeuvre.

2 - Validation de la méthode

L'activité aromatasique des cellules MCF-7 est faible. Aussi, si nous obtenons un résultat négatif pour ces cellules cela peut provenir soit du contenu cellulaire lui-même, soit d'un mauvais protocole. C'est la raison pour laquelle nous allons utiliser un tissu (que l'on peut obtenir en grande quantité), le foie, qui possède une activité aromatasique pour valider la méthodologie.

La préparation de l'homogénat étant validée par la mesure d'une activité enzymatique dépendant du cytochrome P450, CYP3A.

Dans une première partie, nous allons présenter la méthodologie en décrivant les techniques de dosage, la mise en oeuvre de la réaction enzymatique et l'analyse des stéroïdes obtenus au cours de cette réaction.

Dans une seconde partie, nous présenterons les résultats obtenus pour une réaction enzymatique faite à partir de microsomes hépatiques de rat ainsi que son extrapolation aux cellules MCF-7.

Dans la conclusion du travail, nous décrirons les conditions d'une bonne adaptation du modèle hépatique aux cellules MCF-7.

II - MATERIEL - METHODE

A - MATERIEL BIOLOGIQUE

1 - Cellules MCF-7

Les cellules MCF-7 nous ont été fournies par le Dr P. DEGREMOUX (IGM Hôpital St Louis Paris) ; ces cellules proviennent d'une lignée cellulaire hormono-dépendante issue d'une métastase pleurale d'un adénocarcinome mammaire apparu chez une femme ménopausée à l'âge de 69 ans en 1979 dans le Michigan (USA).

1 - 1 - Culture cellulaire

- Milieux de culture

* Milieu de base (MEM)

Le Milieu Essentiel Minimum d'Eagle (MEM) est préparé par dissolution de 51,48 g de MEM poudre (Sigma, réf MO 268), 11,9 g (2,38 g/l) d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) (Sigma réf H 9136) et 2,5 g (0,5 g/l) de bicarbonate de sodium (Merck réf 6329) dans 4,45 l d'eau pyrodistillée Aqual (Biochem, Angoulême réf 431140 h) ; des antibiotiques (100 µg/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine) (Sigma réf P0781) sont ajoutés au milieu. Ce milieu contient également du rouge de phénol, qui possède une activité mitogénique. Ensuite, le pH est ajusté à 7,7 à 20°C lentement par addition de 30 ml de soude (NaOH) 1N (Merck réf 9137). L'ensemble est maintenu sous agitation pendant une heure. Le milieu de culture ainsi préparé est stérilisé par filtration (filtre stérile 0,22 µm stérivex GS réf SVGSO1015 Millipore, USA), puis fractionné en flacons de 500ml et stocké à + 4°C.

Une fraction de tête et de queue du filtrat sont conservées à 37 °C pendant 48 heures pour le contrôle de la stérilité du milieu.

* Milieu élaboré

Le milieu SVF contient du sérum de veau foetal à des concentrations de 2 à 10 % (v/v)

1 - 2 - Entretien des cellules

Les cellules sont entretenues dans un milieu SVF 10 % à 37 °C en flacons de 25 cm² (Corning) dans une étuve à atmosphère humide enrichie en CO₂ 5 %.

Les différentes étapes de l'entretien des cellules sont les suivantes :

- 1) élimination du milieu par aspiration ;
- 2) rinçage du tapis cellulaire avec 1 ml d'une solution de trypsine - EDTA (acide éthylène diamine tétracétique) (0,05 % - 0,02 % v/v) (Sigma T9395) ;
- 3) Incubation à 37°C avec 1 ml de trypsine-EDTA (0,05% - 0,02 % v/v) ;
- 4) après décollement des cellules, 7 ml de milieu SVF 10 % sont ajoutés.

Les cellules sont alors réparties dans de nouveaux flacons de 25 cm²

1 - 3 - Obtention d'un lysat de cellules MCF-7

Les cellules à confluence dans les boîtes de culture sont décollées avec un mélange trypsine-EDTA (0,05% - 0,02% v/v). La trypsine est neutralisée avec MEM-SVF 5%. Après centrifugation (2000 g pendant 10 minutes à 4°C) les cellules sont lavées avec du tampon phosphate (PBS) ; une seconde centrifugation est effectuée (2000 g, 10 min, + 4°C) et le culot est homogénéisé dans du tampon phosphate (KH₂PO₄ 0,1M, EDTA 1mM, glycérol 20 %). Les cellules sont ensuite séparées par sonication. La concentration protéique est déterminée par la méthode de Bradford (1976) (Bio-Rad Protein Assay Kit) utilisant de l'albumine sérique bovine (BSA) comme étalon.

2 - Obtention des microsomes hépatiques

Les microsomes sont définis comme étant la fraction de surnageant post-mitochondrial qui sédimente après l'application d'une force centrifuge de 100 000 à 250 000 g pendant 60 à 120 minutes.

2 - 1 - Solutions

- Tampon A (pour 1 litre)

Il se prépare par dissolution de 12,11 grammes (100 mM) de Tris base et 7,46 g (100 mM) de chlorure de potassium (KCl) dans 600 à 700 ml d'eau bidistillée puis addition de 20 ml d'une solution d'EDTA dissodique, $2H_2O$ (EDTA Na_2) 50 mM (1,86 g pour 100 ml d'eau bidistillée). Le pH est ajusté à 7,4 avec de l'acide acétique glacial et le volume complété à 1 litre avec de l'eau bidistillée. Le tampon ainsi obtenu est filtré sur filtre 0,2 μm et conservé à + 4°C. Il sera ajouté extemporanément 1 ml de solution de butylhydroxytoluène (BHT) $2 \times 10^{-2}M$ (440 mg pour 100 ml de méthanol).

- Tampon B (pour 1 litre)

33,04 g (0,1M) de pyrophosphate tétrapotassique sont dissous dans 600 à 700 ml d'eau bidistillée ; il est ajouté 20 ml d'une solution mère d'EDTA Na_2 à 50 mM préparée dans de l'eau bidistillée. Le pH est ajusté à 7,4 avec de l'acide chlorhydrique (HCl) concentré et le volume complété à 1 litre avec de l'eau bidistillée. Le tampon ainsi obtenu est filtré sur filtre 0.2 μm et conservé à + 4°C. Il sera ajouté extemporanément 1 ml de la solution de BHT.

- Tampon C (pour 1 litre)

13,61 g (0,1 M) de phosphate monopotassique (KH_2PO_4) sont dissous dans 500 ml d'eau bidistillée. Le pH est ajusté à 7,4 avec de la soude concentrée (5N) ; il est ajouté 20 ml d'une solution mère d'EDTA Na_2 50 mM préparée dans de l'eau bidistillée et 200 ml de glycérol. Le volume est complété à un litre avec de l'eau bidistillée. Le tampon est filtré sur filtre 0,2 μm et conservé à + 4°C.

Rôle de ces différents composés :

- les tampons tris, KH_2PO_4 , KCl sont des tampons physiologiques.
- l'EDTA et le BHT retardent la peroxydation des lipides.
- le glycérol est un cryoprotecteur.

2 - 2 - Protocole

Il faut noter que toutes les opérations sont à effectuer entre 0 et + 4°C en utilisant des bacs à glace pour contenir le matériel ; il faut également réfrigérer la centrifugeuse (Beckman Model J-21B Centrifuge, rotor JA 21) et l'ultracentrifugeuse (Beckman Model L5550 Ultracentrifuge), en plaçant les tubes et rotors à + 4°C. Les foies proviennent de rats fraîchement tués indemnes d'organismes pathogènes spécifiques .

Les foies d'un poids total de 37 g (pour notre étude) sont placés dans un bécher avec 3 volumes de tampon A (soit 111 ml) (auquel a été rajoutée extemporanément la solution de BHT) ; ils sont grossièrement dilacérés à l'aide d'une paire de ciseaux puis transvasés dans une éprouvette de 150 ml et broyés à l'Ultra Turax à une vitesse progressive.

Le broyage est arrêté lorsque le milieu est homogène.

L'homogénat est transvasé dans un potter en verre pour parfaire l'homogénéisation (5 aller - retours).

L'homogénat est recueilli dans des tubes à centrifuger de 9 ml.

L'ensemble des opérations peut être représenté par le schéma suivant :(Figure II-1)

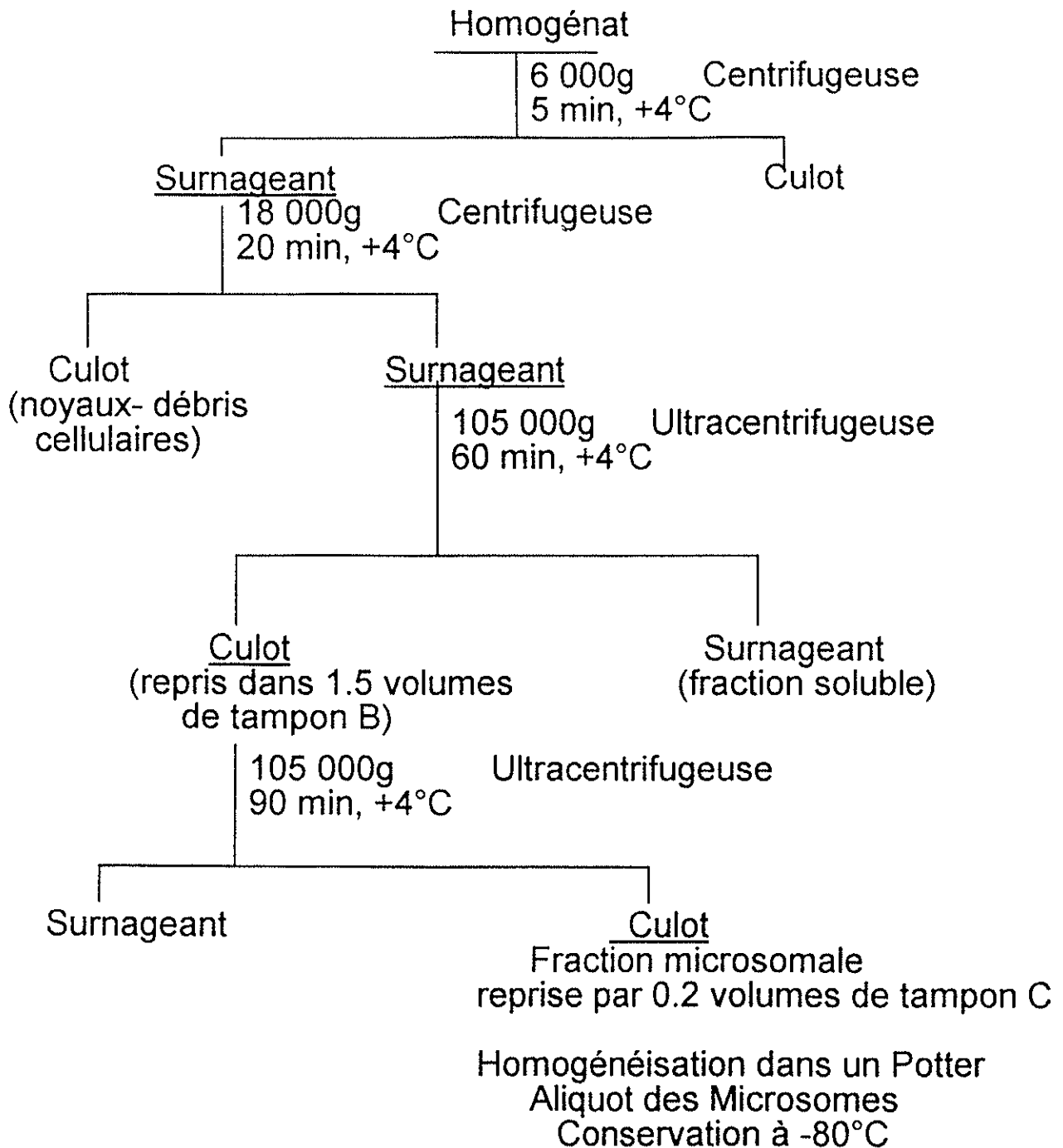


Figure II-1 : Protocole de préparation des microsomes

Le culot obtenu après centrifugation, est constitué de fragments de réticulum endoplasmique lisse et rugueux. Cet organite est désorganisé par l'homogénéisation du culot : les fragments de membrane se réarrangent en vésicules ou microsomes ; la partie externe des vésicules correspond à la face cytoplasmique du réticulum et peut contenir des ribosomes.

La partie interne correspond à la face luminale du réticulum.

3 - Dosage des protéines microsomales

3 - 1 - Principe

Le dosage des protéines microsomales fait appel à une méthode colorimétrique : la technique de Lowry. Les protéines en présence de solution cuivrique et en milieu alcalin donnent un complexe coloré mauve utilisable pour leur dosage colorimétrique (réaction du Biuret). L'addition de réactif phosphotungstomolybdique de Folin Ciocalteu (réactif des phénols) permet de sensibiliser cette réaction.

3 - 2 - Solutions

- Solution étalon d'albumine à 1 g/l

- Solution de chlorure de sodium (NaCl) 9 % nécessaire pour diluer la solution d'albumine pour la réalisation d'une gamme d'étalonnage et pour diluer la fraction microsomale.

- Solution cuivrique préparée extemporanément par addition de 50 ml d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (2 g de Na_2CO_3 dissous dans 100 ml de NaOH 0,1 N) et 2 ml d'une solution de sulfate cuivrique (1 g de tartrate de sodium et potassium, 0,5 g de sulfate cuivrique dissous dans de l'eau distillée en quantité suffisante pour 100 ml).

- Réactif des phénols de Folin Ciocalteu dilué au 1/2 dans de l'eau distillée

- Fraction microsomale employée diluée au dixième dans la solution de NaCl 9 %

3- 3 - Matériel

Les mesures sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Milton Roy (Spectronics 301, Bioblock Scientific) et d'un spectrophotomètre ABC (Stalabo).

3 - 4 - Protocole

3 - 4 - 1 - Préparation de la gamme d'étalonnage

Concentration d'albumine (g/l)	Gamme d'étalonnage					
	1	0.5	0.25	0.2	0.125	0.1
Albumine (µl)	500	250	125	100	62.5	50
Chlorure de sodium (µl)	0	250	375	400	437.5	450
dilution	0	1/2	1/4	1/5	1/8	1/10
Quantité d'albumine (mg)	0.5	0.25	0.125	0.1	0.063	0.05

3- 4 - 2 - Dosage

	Blanc	Etalon	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
Eau (ml)	0.5	-	-	-	-	-
Solution étalon (ml)	-	0.5	-	-	-	-
Fraction microsomale (ml)	-	-	0.05	0.1	0.2	0.3
Chlorure de sodium (ml)	-	-	0.450	0.4	0.3	0.2
Réactif cuivrique (ml)	5	5	5	5	5	5
Homogénéisation ; attente 10 minutes						
Réactif Folin Ciocalteu (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Homogénéisation ; attente 20 minutes puis lecture						

3 - 5 - Résultats

Une droite d'étalonnage est établie à partir des différentes dilutions de solutions protéiques et des densités optiques qui leur correspondent.

La concentration relative en protéines microsomales contenues dans notre échantillon est obtenue grâce à l'équation de la droite calculée par régression linéaire à partir des résultats donnés par le spectrophotomètre.

Les lectures sont faites à 750 nm.

La droite a pour équation $Y = A X + B$

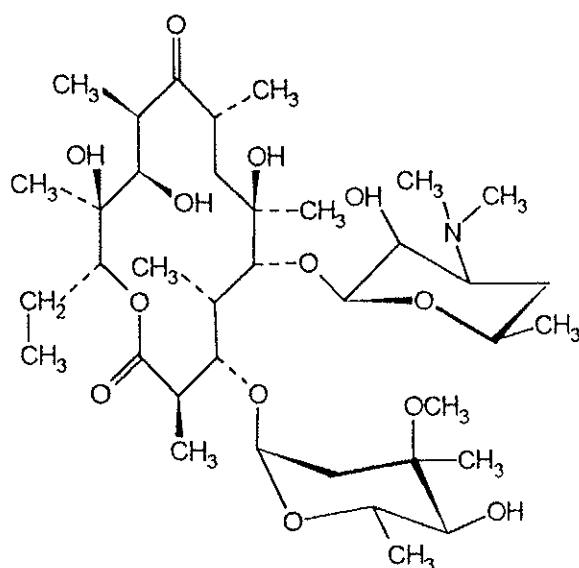
Y étant l'absorbance et X la quantité d'albumine présente dans le tube

4 - Contrôle de l'activité enzymatique des microsomes hépatiques : Dosage de l'érythromycine N-déméthylase par la méthode de NASH

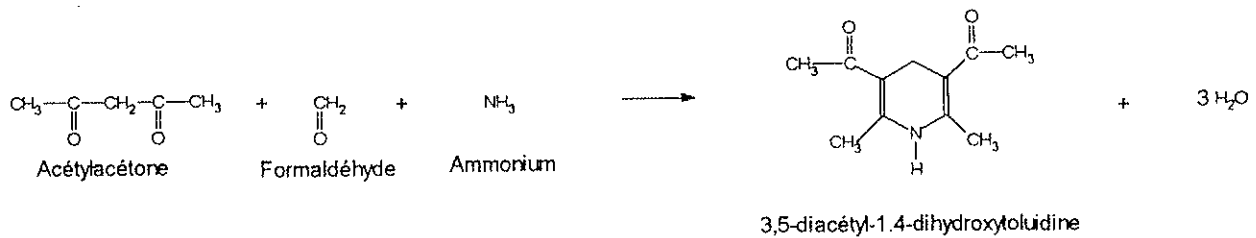
4 - 1 - principe

La N- déméthylation de l'érythromycine est dépendante de l'isoenzyme cytochrome P450 3A.

Erythromycine



Lors de cette réaction il se forme du formaldéhyde qui peut être quantifié grâce au procédé colorimétrique de NASH basé sur la réaction de Hantzsch :



4 - 2 - Solutions

- Tampon phosphate KH_2PO_4 0,1 M : il s'agit du tampon d'incubation des microsomes. Il se prépare par dissolution de 1,361 g de KH_2PO_4 dans 100 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4, pH optimum d'activité des enzymes avec de la soude 1 N ; sa conservation se fait à + 4° C, pendant quinze jours maximum.

- Solution d'érythromycine : préparation d'une solution mère 100 mM dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) soit 733,95 mg d'érythromycine dans 10 ml de DMSO.

- Solution d'acide trichloracétique (TCA) à 25 %

83,3 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 30 % sont complétés à 100 ml avec de l'eau distillée ; la conservation se fait à + 4°C.

- Réactif de NASH

45g de diacétate d'ammonium sont solubilisés à 37°C dans 80 ml d'eau distillée auxquels on ajoute 0,6 ml d'acétyl acétone, 0,9 ml d'acide acétique glacial et on complète à 100 ml avec de l'eau distillée ; la conservation se fait à +4°C, pendant 15 jours maximum.

- Solution de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme réduite (NADPH) : Cette solution doit être à 10 mM final ; elle amorce la réaction enzymatique ; elle est préparée extemporanément par mélange de 4,17 mg de NADPH avec 500 µl de tampon d'incubation.

- Fraction microsomale : elle est utilisée à une concentration finale en protéines de 1 mg/ml, cette concentration est déterminée par la méthode de Lowry. (cf II-3)

4 - 3 - Protocole

4 - 3 - 1 - Réaction enzymatique

Tampon, fraction microsomale et solution d'érythromycine sont mis à incuber 2 minutes à 37°C. La réaction est initialisée par addition de la solution de NADPH et sera arrêtée par la solution d'acide trichloracétique.

	Témoin	Tube1	Tube 2	Tube 3
Tampon (µl)	760	750	750	750
Fraction microsomale (µl)	40	40	40	40
Solution d'érythromycine (µl)	-	10	10	10
Incubation 2 minutes à 37°C				
Solution de NADPH (µl)	100	100	100	100
Incubation 20 minutes à 37°C				
Solution d'acide trichloracétique à 25% (µl)	250	250	250	250
Homogénéisation 30 secondes				
Transfert dans des tubes de type Eppendorf, centrifugation 10 000 t/min pendant 5 minutes				

4 - 3 - 2 - Réaction colorimétrique

	Blanc	Témoin	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Tampon (ml)	0.6	-	-	-	-
Surnageant (ml)	-	0.6	0.6	0.6	0.6
Réactif de NASH (ml)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Homogénéisation 10 secondes					
Incubation pendant 10 minutes dans un bain thermostaté à 60°C					
Retour à température ambiante à l'abri de la lumière					
Lecture de l'absorbance à 412 nm					

Les tissus contiennent une faible quantité de formaldéhyde ; c'est la raison pour laquelle nous effectuons un témoin afin de tenir compte de cette présence dans le calcul de l'activité enzymatique.

4 - 4 - Résultats

L'activité enzymatique est exprimée en nanomoles de produit par minute et par milligramme de protéines.

$$\text{Activité enzymatique} = (\Delta \text{ absorbance} \times d1 \times d2) / (t \times \epsilon \times p \times 10^{-6})$$

Δ absorbance étant la différence d'absorbance entre l'essai et le témoin lue à 412 nm

d1 : la dilution par l'acide trichloracétique = 1.25

d2 : la dilution par le réactif de NASH = 1.5

t : le temps d'incubation = 20 minutes

p : la quantité de protéines en mg = 1

ϵ = le coefficient d'extinction molaire spécifique du NADPH = 8000 Mol⁻¹ cm⁻¹

et le facteur 10⁻⁶ pour ramener la valeur par nmole.

B - MISE EN OEUVRE DE LA REACTION ENZYMATIQUE

1 - Solutions

- Solution de microsomes ou lysat de cellules MCF-7
- Tampon phosphate (KH_2PO_4) 0,1 M

Voir préparation II - A - 4 - 2.

- Solution de NADPH 10 mM.

Voir préparation II - A - 4 - 2.

- Solutions d'arrêt de la réaction enzymatique

3 solutions sont testées (individuellement) afin d'écarter toute interaction avec l'extraction des stéroïdes :

- solution d'acide trichloracétique (TCA) à 25%
- solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0,1 N
- solution méthanol / HCl 1N 50/50 (v/v)

- solutions de stéroïdes et inhibiteurs enzymatiques

Les solutions mères des stéroïdes (non radioactifs) et des inhibiteurs sont préparées dans l'éthanol à des concentrations de 200 $\mu\text{g/ml}$ (10^{-3} M) et conservées à $+4^\circ\text{C}$

- Solutions de stéroïdes

- * Androgènes

- Androstènedione (Δ_4)
 - Déhydroépiandrostérone (DHA)
 - Testostérone (T).

- * Estrogènes

- Estrone (E_1)
 - Estradiol (E_2)
 - Estriol (E_3)

* Androgènes radioactifs

Androstènedione marquée au carbone 14

[4-¹⁴C]- Δ_4 * Activité spécifique : 53,9 mCi/mmol
 Solution à 0,37 μ mol/ml dans l'éthanol

Déhydroépiandrostérone marquée au carbone 14

[5-¹⁴C] -DHA* Activité spécifique : 5,19mCi/mmol
 Solution à 0,385 μ mol/ml dans l'éthanol

• Solutions d'inhibiteurs

* Aminoglutéthimide (AG)

* Composé X : il nous est fourni par le laboratoire de Pharmacognosie du Professeur Chulia ; il est extrait d'une bruyère nommée Erica cinerea, son éventuel effet inhibiteur nous est inconnu.

-Solvant d'extraction des stéroïdes

Les stéroïdes étant plus solubles dans une phase organique que dans une phase aqueuse, ce solvant sert à les solubiliser. Il s'agit d'une solution de cyclohexane et d'acétate d'éthyle, 50/50 (v/v).

- Ethanol 95 % Merck

Pour effectuer les dilutions des solutions de stéroïdes et d'inhibiteurs

2 - Protocole de la réaction enzymatique

- Composition du milieu réactionnel :

- 850 μ l de tampon phosphate KH_2PO_4

- 40 μ l de la solution de microsomes ou de lysat de cellules MCF-7

- 10 μ l de Δ_4

ou DHA 10^{-4} M soit une concentration finale de 10^{-5} M

ou

- 10 μ l de Δ_4

ou DHA 10^{-5} M soit une concentration finale de 10^{-6} M

- 100 μ l de solution NADPH 10 mM préparée extemporanément .

Ceci est la composition d'un milieu réactionnel réalisé avec des substrats androgéniques non radioactifs employés à des concentrations physiologiques ; cependant ces concentrations étant très faibles, nous verrons que ces produits ainsi que les produits formés par la réaction ne sont pas détectés par les ultra-violet et n'apparaissent pas sur le chromatogramme, nous devons donc travailler sur des substrats radioactifs.

Les quantités de substrats radioactifs à introduire sont calculées à partir des concentrations finales souhaitées et des concentrations des produits dont nous disposons.

- Pour la $[4-^{14}\text{C}]-\Delta_4^*$:

Activité spécifique : 53,9 mCi/mmol

Concentration : 0,37 μ mol/ ml soit 19,94 μ Ci /ml

La concentration finale de Δ_4^* doit être de 10^{-6} M dans 1 ml soit 1 nanomole de Δ_4^* , on doit donc prélever 2,7 μ l de solution de Δ_4^* . Pour des problèmes de matériel nous diluons la solution de Δ_4^* au 1/2 dans de l'éthanol et nous en prélevons 5,4 μ l.

Avec le même procédé de calcul et de dilution nous utiliserons 5,2 μ l de DHA*.

Voici la nouvelle composition du milieu réactionnel :

- 850 μ l de tampon phosphate KH_2PO_4 0,1M pH 7,4

- 40 μ l de la solution de microsomes ou du lysat de cellules MCF-7

- 5,39 μl de $[4\text{-}^{14}\text{C}]\text{-}\Delta_4^*$
- ou 5,2 μl de $[5\text{-}^{14}\text{C}]\text{ DHA}^*$ soit une concentration finale de 10^{-6} M
- 100 μl de solution de NADPH préparée extemporanément

Il est impératif de respecter l'ordre d'introduction des différents réactifs et de bien homogénéiser après toute addition d'un nouveau produit.

Le tube est placé dans un bloc chauffant à 37°C ; la solution de NADPH est ajoutée et on déclenche au même moment le chronomètre, on laisse incuber pendant 30 minutes.

La réaction est arrêtée par addition de 500 μl du mélange méthanol/HCl, 1N, 50/50 (v/v) (solution d'arrêt que nous avons choisi d'utiliser après différents tests décrits ci-après).

Le contenu du tube est récupéré dans un tube de type Eppendorf et centrifugé à 5000 tours par minute pendant 10 minutes.

Un volume fixe de surnageant (1,3 ml) est prélevé et transféré dans un tube à extraction. Afin d'extraire les stéroïdes libres nous ajoutons 5 ml du mélange cyclohexane/acétate d'éthyle ; après homogénéisation du contenu du tube nous le plaçons à -20°C jusqu'à congélation de la phase aqueuse. Nous récupérons la phase organique et nous procédons à une deuxième extraction dans les mêmes conditions. Nous récupérons la phase organique que nous ajoutons à la précédente dans un tube à hémolyse et nous évaporons à sec sous azote. Le résidu sec est repris par 100 μl de phase mobile utilisée pour l'analyse chromatographique et nous injecterons 20 μl de cette solution.

Un protocole identique sera utilisé pour tester l'effet inhibiteur de deux substances sur cette réaction enzymatique. Les deux molécules étudiées sont : l'aminoglutéthimide, connu comme inhibiteur des enzymes cytochromes P450, et un composé X fourni par M. Chulia Pr de Pharmacognosie pour être soumis à nos tests.

Pour tester ces inhibiteurs nous prélevons 4,6 μl des solutions 10^{-3}M dont nous disposons (d'où une concentration finale en inhibiteur de $5 \times 10^{-6}\text{M}$). Nous avons choisi 4,6 μl car il ne faut pas dépasser 1% d'éthanol dans le tube soit, si l'on ajoute la solution de substrat et la solution d'inhibiteur : 10 μl pour 1ml (volume final du tube).

L'inhibiteur est ajouté après le substrat et il faut noter que pour conserver le volume final de 1 ml, il faut diminuer la quantité de tampon phosphate à 845 μ l.

Ce protocole étant défini, il est intéressant de pratiquer des tests afin de vérifier qu'aucun des constituants de la réaction n'interfère au niveau de la détection des produits formés, par des pics parasites sur le chromatogramme. Nous profiterons également de ces tests pour tester les différentes solutions d'arrêt.

Nous préparons donc des séries de tubes ne différant les uns des autres que par l'addition d'un constituant, représentant une étape de la réaction ; le contenu de chaque tube sera analysé par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Ces tests sont effectués en CLHP phase normale : il est donc nécessaire d'évaporer les solutions afin d'éviter que l'éthanol présent dans le milieu ne modifie la polarité de la phase mobile employée et composée de 64 % d'isooctane et 36 % d'acétate d'éthyle.

→ première série avec l'acide trichloracétique (TCA) comme solution d'arrêt

Tube A : 10 ml de solvant d'extraction sont évaporés à sec sous azote, repris par 100 μ l de phase mobile ; la phase mobile employée est composée de 64 % d'isooctane et 36 % d'acétate d'éthyle

Tube B : extraction de 2 ml de TCA 25 % avec 2 fois 5 ml de solvant d'extraction soit :

- 2 ml de TCA + 5 ml de solvant d'extraction
- Agitation
- Congélation à - 20°C : la phase aqueuse est congelée, la phase organique reste liquide
- récupération de la phase organique
- phase aqueuse + 5 ml de solvant d'extraction
- agitation
- congélation
- récupération de la seconde phase organique ajoutée à la première
- évaporation à sec sous azote
- reprise du résidu sec par 100 μ l de phase mobile

Tubes C, D, E, F

TUBE	C	D	E	F
Tampon Phosphate (μl)	1000	900	860	850
Microsomes (μl)	-	-	40	40
Ethanol (μl)	-	-	-	10
NADPH (μl)	-	100	100	100

L'éthanol est introduit à la concentration maximale de 1 % pour simuler la présence des solutions de substrats et d'inhibiteurs (car les solutions dont nous disposons sont dans l'éthanol)

- il est impératif de suivre l'ordre d'introduction des différents réactifs
- incubation 30 minutes à 37°C au bain-marie
- addition de 1 ml de TCA 25 %
- agitation (comme après chaque addition d'un réactif)
- Extraction par 2 fois 5 ml de solvant d'extraction
- évaporation à sec sous azote
- reprise du résidu sec par 100 μl de phase mobile

Lors de l'addition du TCA dans les tubes E et F il se forme un précipité, il est donc nécessaire de centrifuger pour ne récupérer que le surnageant.

Lors de l'évaporation à sec dans les tubes B, C, D, E, et F il se forme une "pâte blanchâtre" donnant un aspect opaque à la solution lors de la reprise par la phase mobile, il ne sera pas possible d'injecter ces solutions dans la chaîne de CLHP au risque de détériorer la colonne.

Nous envisageons donc de changer la solution d'arrêt.

→ Deuxième série avec l'acide chlorhydrique (HCl) comme solution d'arrêt

Nous utilisons le même protocole que pour la première série en remplaçant dans les tubes B, C, D, E, F, 1 ml de TCA par 1 ml d'HCl 0,1 N. Dans cette deuxième série il ne se forme pas de précipité dans les tubes E et F, ce qui peut indiquer que la réaction n'est pas ou est incomplètement arrêtée ; donc nous réalisons une troisième série test avec 500 µl d'un mélange méthanol /HCl 1 N 50/50 (v/v) qui arrête convenablement la réaction ; cette solution sera donc celle que nous choisirons pour la suite des manipulations.

3 - Analyse des produits de la réaction

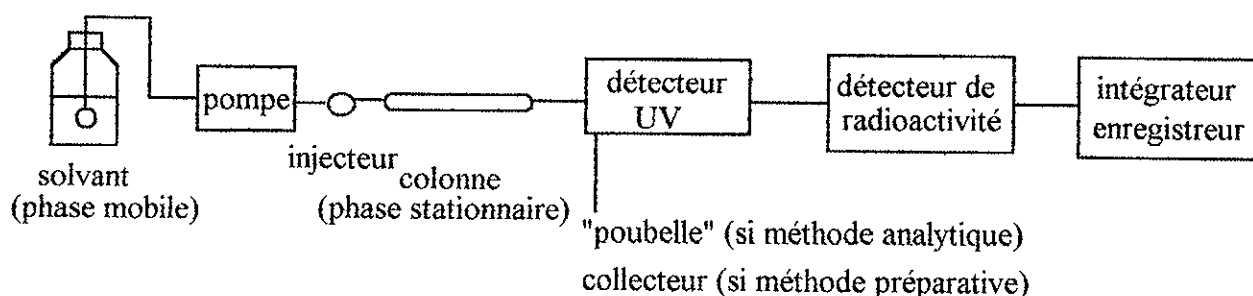
3 - 1 - Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La mise en évidence de l'activité aromatasique nécessite l'identification des produits formés au cours de la réaction enzymatique ; nous avons choisi d'utiliser comme méthode analytique la chromatographie liquide haute performance.

C'est une technique de séparation fondée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases non miscibles : la phase stationnaire et la phase mobile (ces deux phases sont liquides).

La mise au point d'une méthode de CLHP repose sur la détermination du couple phase mobile / phase stationnaire qui donnera la meilleur séparation possible

3 -1- 1 - Schéma de principe



Pour notre étude nous utiliserons deux méthodes chromatographiques : une méthode en phase inverse et une méthode en phase normale.

3 - 1 - 2 - CLHP phase inverse

3 - 1 - 2 - 1 - Matériel

Dans cette chaîne chromatographique nous disposons de :

- deux réservoirs de phase mobile couplés à deux pompes (HPLC Pump 420 Kontron Instrument) permettant de réaliser des mélanges de phases. Le débit total des deux pompes est de 1 ml/minute

- un système d'injection avec une boucle d'injection de 20 μ l

- une colonne contenant une phase stationnaire apolaire composée de grains de silice de diamètre 5 μ m greffés avec des chaînes de 18 atomes de carbone, sa longueur est de 25 cm

- un spectrophotomètre ultra-violet (UV) (Uvikon 720 LC Kontron Spectrophotometer).

Les lectures sont effectuées à 254 nm et 280 nm. Les estrogènes ont un maximum d'absorption à 280 nm grâce à leur noyau aromatique alors que les androgènes ont un maximum d'absorption à 254 nm. Cependant si les estrogènes et les androgènes sont associés nous effectuerons la lecture à 254 nm (les estrogènes absorbent également mais de façon moins importante) ; il faut s'assurer que les composants du solvant d'éluion n'aient pas de longueurs d'ondes maximales proches de celles utilisées pour les mesures

- un intégrateur sous la forme d'un ordinateur couplé à une imprimante pour les tracés , l'ordinateur sert également à commander les pompes (composition des mélanges de phases mobiles).

3 - 1 - 2 - 2 - Solutions

La phase mobile est composée d'un mélange d'eau et d'acétonitrile (ACN) en proportions variables.

3 - 1 - 2 - 3 - Principe

Comme nous l'avons vu la phase stationnaire est composée de silice greffée par des chaînes de carbone qui lui confèrent un caractère apolaire, et la phase mobile est polaire. Ainsi , le constituant le moins polaire s'adsorbe préférentiellement à la surface des chaînes carbonées et plus le solvant est riche en eau, plus la rétention de ces composés est importante.

Nous utilisons comme phase mobile, un mélange d'eau et d'acétonitrile en proportions variables ; la modulation de la composition est aisée grâce au système informatique ; il est possible de faire un mélange isocratique des phases : les pourcentages respectifs d'eau et d'acétonitrile sont fixes et restent identiques au cours du temps mais il est également possible de travailler en gradient c'est-à-dire de faire évoluer la composition du mélange au cours du temps.

Un avantage de cette méthode est la possibilité d'injecter directement les solutions de stéroïdes sans évaporer l'éthanol qu'elles contiennent qui est en faible pourcentage comparé à la polarité de la phase mobile.

3 - 1 - 3 - CLHP phase normale

3 - 1 - 3 - 1 - Matériel

La chaîne chromatographique se compose de :

- un réservoir contenant la phase mobile
- une pompe (HPLC Pump 420 Kontron Instrument) réglée sur un débit de 1 ml/minute
- un système d'injection avec une boucle d'injection de 20 μ l
- une colonne contenant une phase stationnaire polaire composée de grains de silice de 5 μ m de diamètre ; sa longueur est de 15 cm
- un spectrophotomètre UV (Uvikon 720 LC Kontron Spectrophotometer) ; les lectures sont effectuées à 254 et 280 nm.
- un intégrateur (Shimadzu C-R6A Chromatopac)

Nous sommes également amenés au cours des manipulations à utiliser des substrats radioactifs.

Nous utiliserons deux types d'appareillage pour récupérer la radioactivité :

- un collecteur manuel de fractions en sortie du spectrophotomètre
- ou
- un détecteur de radioactivité en flux continu également branché en sortie du détecteur ultra-violet.

3 - 1 - 3 - 2 - Solutions

- Phase A :
 - 64 % isooctane
 - 36 % acétate d'éthyle
- Phase B :
 - 62 % méthanol
 - 34,8 % acétate d'éthyle
 - 3,2 % eau
- Phase C :
 - 90 % Phase A
 - 10 % Phase B

Nous utiliserons les phases mobiles A et C.

3 - 1 - 3 - 3 - Principe

Dans cette méthode la phase stationnaire est polaire et la phase mobile apolaire. L'éthanol contenu dans les solutions de stéroïdes doit être évaporé et le résidu sec et repris dans de la phase mobile.

Par l'utilisation de la phase mobile C nous introduisons la notion de solvants isohydriques : solvants qui conduisent à un même état d'hydratation de la phase stationnaire. Pour conserver au support une activité constante, il faut ajuster les teneurs en eau des divers solvants chromatographiques de façon qu'ils ne cèdent ni ne retirent d'eau au support, c'est-à-dire qu'ils soient isohydriques au solvant de référence. En effet, l'eau inévitablement présente dans les solvants utilisés comme phase éluante (à des teneurs variables selon la nature du solvant, sa provenance...) est responsable de la quasi-totalité des difficultés rencontrées en chromatographie d'adsorption ; de ce fait, l'obtention de résultats reproductibles passe par un contrôle rigoureux de la teneur en eau de la phase mobile, donc de l'activité de la phase stationnaire.

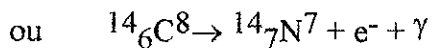
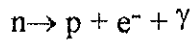
En règle générale, l'addition d'eau à une phase mobile entraîne une diminution des temps de rétention des solutés.

3 - 2 - Mesure de la radioactivité

3 - 2 - 1 - Principe

Pour notre expérimentation nous utilisons des androgènes marqués au carbone 14 .

Le carbone 14 est un isotope radioactif ; l'excès du nombre de neutrons (8) par rapport au nombre de protons (6) conduit à la transformation spontanée d'un neutron n en proton p selon le mécanisme réactionnel suivant :



Au cours de la transformation radioactive, il y a émission de deux particules, un électron (e^{-} ou β^{-}) et un antineutrino ($\bar{\nu}$ ou particule de masse).

Les rayonnements β^{-} étant de faible énergie, ils ne peuvent pas être détectés par les détecteurs classiques donc une conversion sous forme d'énergie lumineuse s'impose.

3 - 2 - 2 -Appareillage : détecteur à scintillation

- Principe

Le détecteur à scintillation est composé d'un scintillateur et d'un photomultiplicateur.

Le scintillateur est constitué d'un solvant, dans lequel est mise une substance fluorescente.

La source dont on mesure la radioactivité est placée dans le solvant. L'énergie β est cédée aux molécules du solvant qui passent à un état excité. Cette excitation est transmise aux molécules du solvant qui restituent l'énergie ainsi absorbée sous forme de photons lumineux.

Le scintillateur est couplé optiquement à un photomultiplicateur composé d'une cellule photoélectrique qui transforme les photons émis par le scintillateur en électrons. Le courant ainsi obtenu est ensuite amplifié par un multiplicateur d'électrons. L'intensité du courant collecté est finalement proportionnelle à l'énergie perdue par le rayonnement. Les détecteurs à scintillation permettent de dénombrer le rayonnement et d'en mesurer l'énergie.

- Phénomène d'affaiblissement des scintillations

La diminution du rendement lumineux ou quenching peut être due à la composition du scintillateur ou à la présence de substances non fluorescentes, en particulier d'oxygène. Cela se

traduit par l'inhibition ou la destruction d'états excités conduisant à des réactions non radioactives et / ou par l'absorption des photons émis. La conséquence du quenching est une diminution de l'efficacité de comptage aux basses énergies et un décalage du spectre vers les basses énergies.

3 - 3 - Protocole

Comme nous l'avons vu les solutions de substrats devant être employées à des concentrations physiologiques leur détection et celle des produits formés au cours de la réaction enzymatique nécessitent que ces produits soient marqués par un élément radioactif.

Ceci impose au niveau du protocole d'injecter 20 μ l du résidu sec (obtenu après évaporation du milieu réactionnel) repris par 100 μ l de phase mobile dans la chaîne chromatographique et de recueillir en sortie par l'intermédiaire du collecteur de fractions l'éluat dans des fioles en polyéthylène ; le recueil s'effectue toutes les minutes (soit 1 ml d'éluat dans chaque fiole la pompe ayant un débit de 1 ml/minute) ou toutes les 30 secondes.

On recueille également dans des fioles 10 μ l de la solution radioactive mise à incuber, 10 μ l de la solution après centrifugation, 100 μ l de la phase aqueuse après extraction, 10 μ l de la solution finale que l'on injecte ; tous ces prélèvements effectués à différentes étapes de la réaction enzymatique servent à contrôler que toute la radioactivité est bien récupérée et si ce n'est pas le cas à rechercher l'origine de la perte.

Dans toutes les fioles nous ajoutons 4 ml de scintillant (Opti Fluor Packard), homogénéisation puis comptage par compteur à scintillation liquide (Tri Carb 1900 CA Packard Instruments).

Pour les manipulations avec le détecteur de radioactivité en flux continu (Flow One Beta Packard Instruments) il est inutile de collecter les fractions, l'éluat à sa sortie de colonne passe dans le détecteur au sein duquel s'effectuent l'addition du scintillant et le comptage.

III - RESULTATS ET DISCUSSION

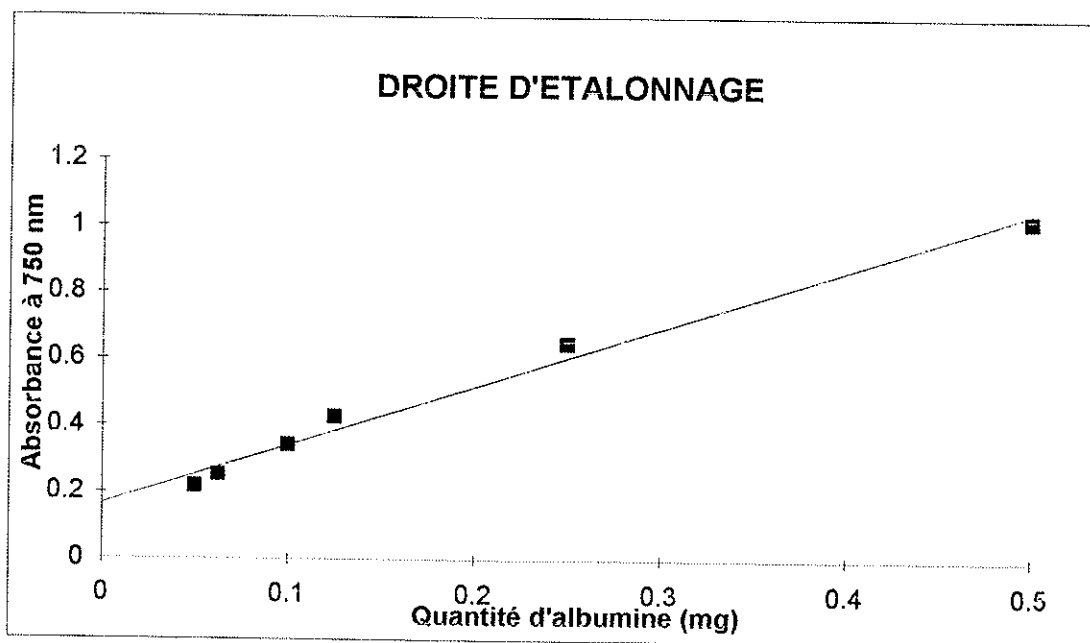
A - DOSAGE DES PROTEINES MICROSOMALES

Ce dosage fait appel comme nous l'avons vu à la technique de Lowry.

Les lectures d'absorbance ont été réalisées sur deux spectrophotomètres.

1 - Résultats obtenus avec le spectrophotomètre Milton Roy

Quantité d'albumine (mg)	Absorbance
0.5	1.022
0.25	0.646
0.125	0.426
0.1	0.344
0.0625	0.251
0.05	0.218



Cette droite a pour équation : $Y = AX+B$ où $A = 1,626$ et $B = 0,650$ calculés par régression linéaire d'où l'équation :

$$\text{Absorbance} = 1,626 \times \text{quantité d'albumine} + 0,1650$$

$$\text{Quantité d'albumine} = (\text{absorbance} - 0,1650) / 1,7626$$

Nous rappelons que la fraction microsomale a été diluée au dixième.

$$\text{Concentration} = (\text{quantité} / \text{prise d'essai correspondante}) \times 10.$$

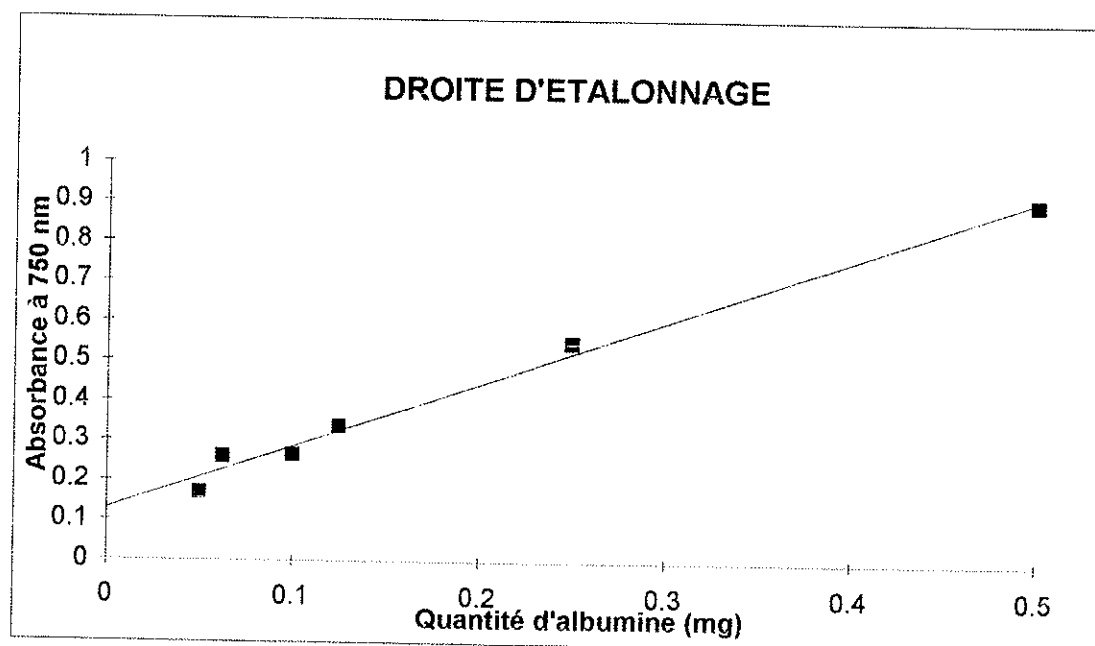
	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Absorbance	0.383	0.648	0.971
Quantité de protéines (mg)	0.1236	0.274	0.457
concentration protéique(g/l)	24.72	27.4	22.85

L'absorbance du contenu du tube 4 étant supérieure à l'absorbance maximale de la gamme d'étalonnage nous avons éliminé cette valeur.

En effectuant une moyenne des valeurs obtenues sur les trois tubes nous obtenons une concentration protéique d'environ 25 g/l.

2 - Résultats obtenu avec le spectrophotomètre ABC (Stalabo)

Quantité d'albumine (mg)	Absorbance
0.5	0.903
0.25	0.547
0.125	0.337
0.1	0.265
0.0625	0.261
0.05	0.169



Dans ce cas, $A = 1,572$ et $B = 0,129$

D'où :

$$\text{Absorbance} = 1,572 \times \text{quantité d'albumine} + 0,129$$

$$\text{Quantité d'albumine} = (\text{absorbance} - 0,129) / 1,572$$

$$\text{Concentration} = (\text{quantité} / \text{prise d'essai correspondante}) \times 10$$

	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Absorbance	0.299	0.533	0.821
Quantité de protéines (mg)	0.107	0.257	0.44
concentration protéique (g/l)	21.6	25.7	22

En effectuant une moyenne des trois valeurs on obtient une concentration de 23,1 g/l de protéines.

B - ACTIVITE CYP3A DEPENDANTE DANS LES MICROSOMES HEPATIQUES

A partir d'une préparation microsomale hépatique contenant 25 g/l de protéines l'activité CYP3A a été déterminée. Nous avons obtenu les résultats suivants :

	Témoin	Tube1	Tube 2	Tube 3
Absorbance	0.089	0.108	0.104	0.103
Différence d'absorbance	-	0.019	0.015	0.014
Activité enzymatique (nmoles/min/mg)	-	0.222	0.176	0.164

NB : différence absorbance = absorbance tube essai - absorbance tube témoin à 412 nm.

Les valeurs de l'activité enzymatique CYP3A se révèlent très faibles mais non nulles, cette activité existante valide la méthode de préparation des microsomes.

C - SEPARATION DES PRODUITS DE LA REACTION

Nous cherchons à obtenir une séparation efficace et reproductible des stéroïdes ; nous utilisons des solutions éthanoliques de stéroïdes $10^{-3}M$.

1 - CLHP Phase Inverse

La phase mobile est constituée d'un mélange eau-acétonitrile dont les pourcentages respectifs sont réglés à l'aide des deux pompes, mélange isocratique ou en gradient.

1 - 1 - Isocratique

Nous débutons notre étude avec une phase mobile composée de 40 % d'eau et 60 % d'acétonitrile. On injecte les différents stéroïdes ensemble (E_1 , E_2 , $\Delta 4$ et T), la détection se fait à 254 nm. Toutes les injections se font à 1 minute du lancement de l'analyse (d'où le temps de rétention d'un composé = sortie du composé -1 minute) ; à ces pourcentages tous les stéroïdes injectés ont le même temps de rétention : 7,5 minutes, ce qui signifie qu'ils ne sont pas du tout retenus par la colonne, le pourcentage d'acétonitrile est trop élevé. Nous décidons d'utiliser différents autres mélanges dans lesquels le pourcentage d'acétonitrile est diminué au profit d'une augmentation du pourcentage d'eau ; les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant : (Tableau I)

Tableau I : Temps de rétention des stéroïdes en fonction des variations de composition de la phase mobile

% ACN/eau (v/v) / Temps de rétention (min)	37/63	39/61	40/60	41/59	42/58	43/57	45/55	46/54
E ₁	18	17	14	12.5	12	11	9.5	9
E ₂	14	14	11	10	9.5	8.5	7	7
Δ ₄	20	18	15.5	14	13.5	13	11	10
T			15			11.5		

Nous remarquons que l'androstènedione et la testostérone sont peu séparées ou même ont des temps de rétention identiques mais ceci ne semble pas poser de problème puisque ces deux stéroïdes ne seront pas injectés ensemble sachant que la testostérone sous l'action de l'aromatase doit se transformer en E₂ et que la Δ_4 , par cette même aromatase doit se transformer en E₁. Ce qui pose plus de problème est la mauvaise séparation de Δ_4 et E₁ susceptibles d'être retrouvés simultanément dans le produit final de la réaction.

D'autre part, malgré un intervalle d'élution intéressant (durée inférieure à 30 minutes) les pics obtenus ne sont pas satisfaisants dans leur aspect (pics épaulés larges, non symétriques...).

Dans un second temps nous essayons donc une phase mobile composée de 50 % eau - 50 % méthanol.

Il faut dans ce cas attendre 45 minutes pour l'élution complète du mélange, ce qui est un peu long d'autant plus que les produits ne sont pas séparés. Nous envisageons donc de conserver la première phase mobile utilisée (eau / acétonitrile) et de faire évoluer les pourcentages respectifs d'eau et d'acétonitrile au cours du temps pour optimiser la séparation des produits.

1 - 2 - Gradient

Nous avons testé différents gradients :

- Gradient de 30 à 40 % d'acétonitrile

- de 1 à 10 minute : 30% d'ACN
- de 10 à 11 minute : passage à 40 % d'ACN
- de 11 à 30 minutes : 40 % d'ACN
- de 30 à 31 minutes : retour à 30 % d'ACN

	E ₁	E ₂	Δ_4	T
Temps de rétention en minutes	24	22	27	24,5 - 27

On constate que les pics de testostérone et estrone se chevauchent.

Même si cela n'est pas un véritable problème comme nous l'avons déjà vu, il serait préférable de bien séparer tous les produits de la réaction pour éviter de mauvaises interprétations.

- Gradients de 20 à 40 % d'ACN

Nous envisageons de débiter le gradient par un faible pourcentage d'acétonitrile, afin que les produits soient bien retenus par la colonne et se séparent, puis d'augmenter ce pourcentage afin d'accélérer leur élution.

Tous nos essais ne diffèrent que par la phase d'augmentation du pourcentage d'acétonitrile qui s'effectue plus ou moins rapidement.

- 1 à 10 minutes : 20 % d'ACN
- 10 à 20 minutes : passage à 40 % d'ACN
- 20 à 30 minutes : 40 % d'ACN
- 30 à 45 minutes : retour à 20 % d'ACN

	E ₁	E ₂	Δ ₄
Temps de rétention en minutes	31	28	32,5

(Figure III-1)

Les pics de E₁ et Δ₄ étant relativement proches nous décidons de maintenir plus longtemps les 20 % d'acétonitrile afin que les produits se séparent le mieux possible, et l'augmentation de 20 à 40 % d'acétonitrile passera par un point à 35 % pour que l'augmentation soit plus lente.

- 1 à 15 minutes : 20 % d'ACN
- 15 à 25 minutes : passage de 20 à 35 % d'ACN
- 25 à 35 minutes : passage à 40 % d'ACN
- 30 à 40 minutes : 40 % d'ACN
- 40 à 41 minutes : retour à 20 % d'ACN.

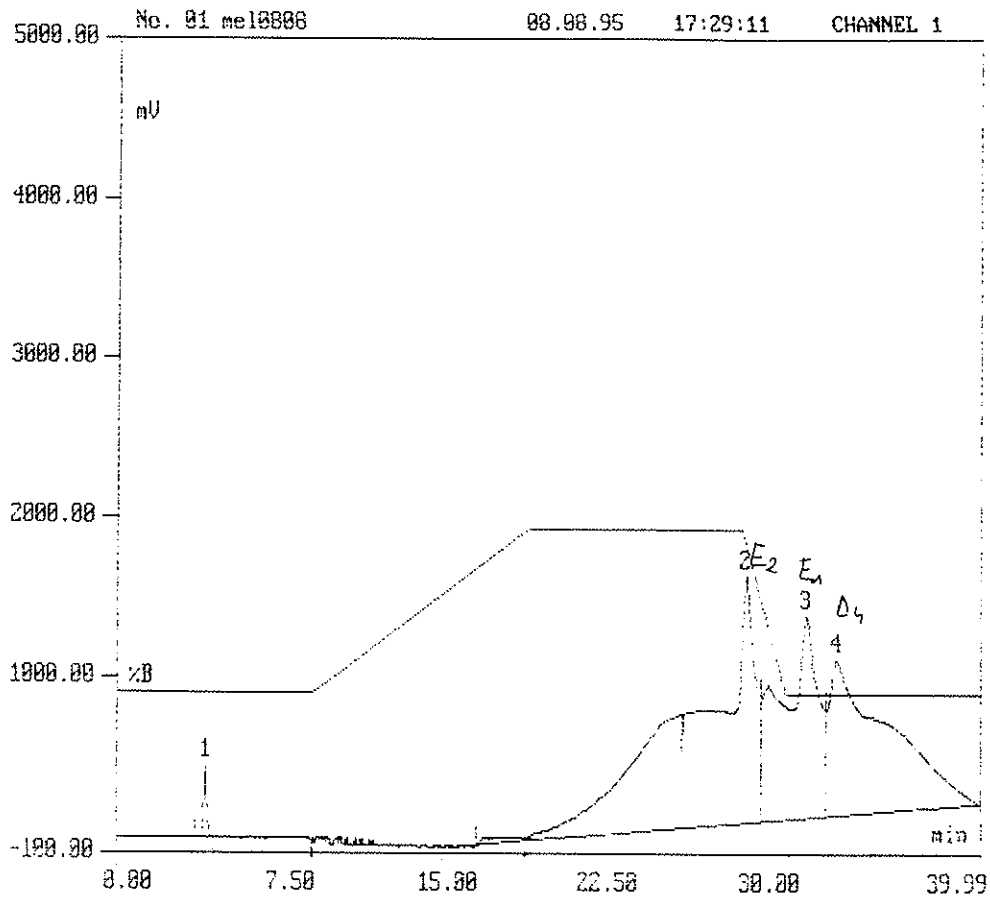


Figure III-1 : Chromatogramme de E_1 , E_2 , Δ_4 avec un gradient de 20 à 40 % d'ACN dans la phase mobile

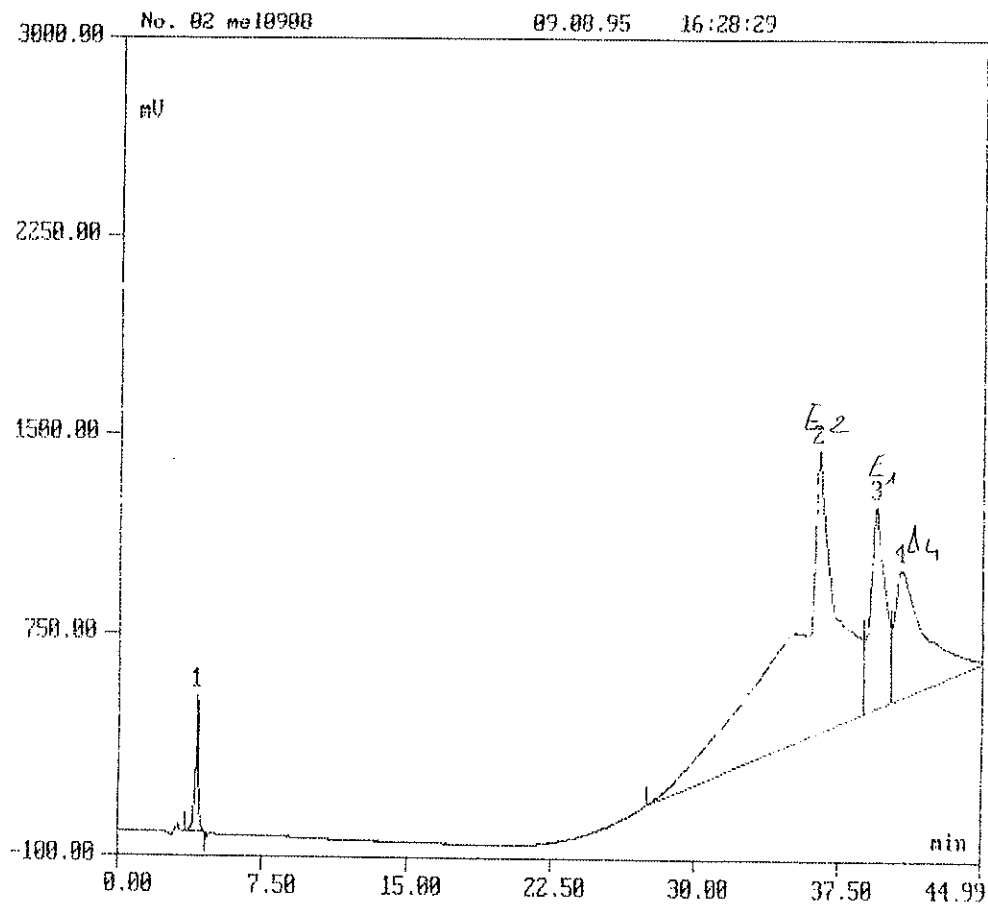


Figure III-2 : Chromatogramme de E_1 , E_2 , Δ_4 avec un gradient de 20 à 40 % d'ACN dans la phase mobile

	E ₁	E ₂	Δ ₄
Temps de rétention en minutes	38	35	39,5

(Figure III-2)

Le pourcentage élevé d'eau dans la phase éluante pendant les quinze premières minutes allonge les temps de rétention. La séparation de E₁ et E₂ est identique à celle obtenue avec le gradient précédent mais nous n'obtenons pas de meilleure séparation de E₁ et Δ₄ ; nous notons même entre ces deux pics un non retour à la ligne de base. Nous envisageons alors de réaliser un palier à 35 % d'acétonitrile pour tenter, tout en maintenant un intervalle de temps d'élution "raisonnable", de séparer E₁ et Δ₄ ; de plus, entre 30 et 40 minutes, intervalle de temps où doit se produire l'élution, nous maintenons le pourcentage d'acétonitrile à 40 %.

- 1 à 10 minutes : 20 % d'ACN
- 10 à 15 minutes : passage à 35 % d'ACN
- 15 à 25 minutes : 35 % d'ACN
- 25 à 30 minutes: passage à 40 % d'ACN
- 30 à 40 minutes : 40 % d'ACN

	E ₁	E ₂	Δ ₄
Temps de rétention en minutes	34,5	31	35,5

(Figure III-3)

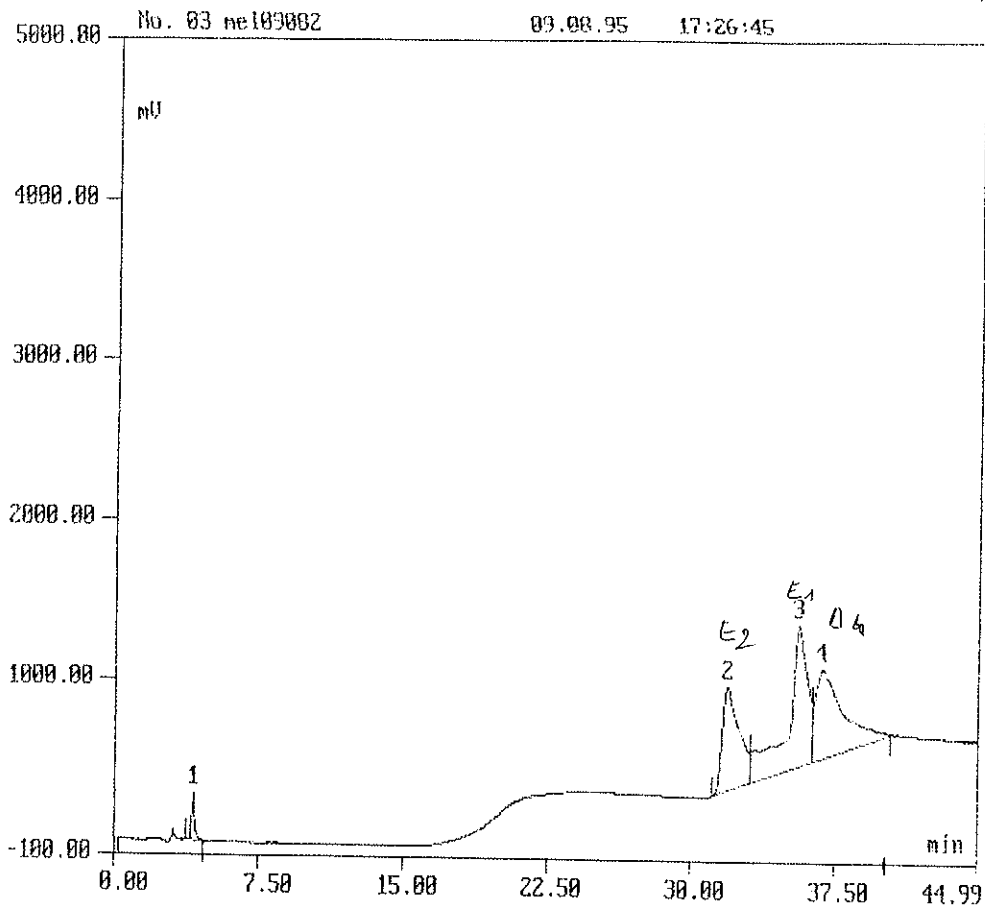


Figure III-3 : Chromatogramme de E_1 , E_2 , Δ_4 avec un gradient de 20 à 40 % d'ACN dans la phase mobile

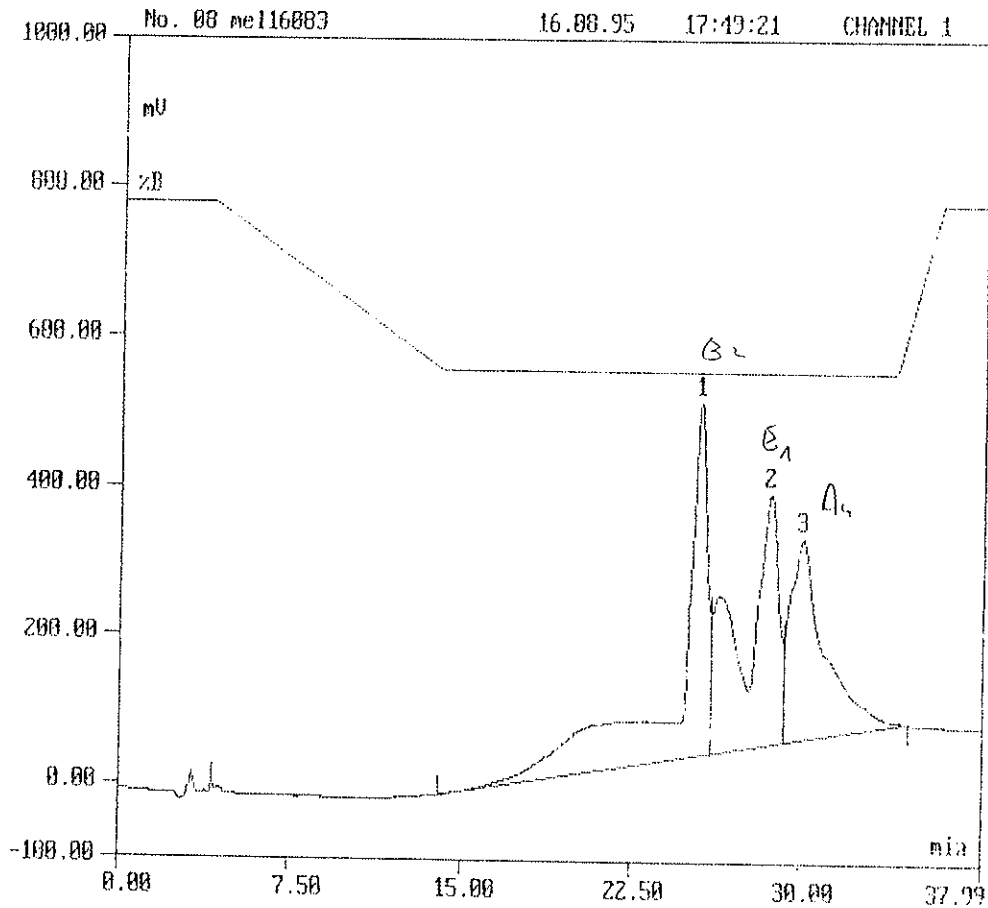


Figure III-4 : Chromatogramme de E_1 , E_2 , Δ_4 avec un gradient de 20 à 40 % d'ACN dans la phase mobile

Là encore E_1 et Δ_4 ne sont pas bien séparés, il n'y a pas de retour à la ligne de base entre les deux pics. Les temps de rétention sont relativement longs pour ne pas obtenir de bonne séparation ; nous envisageons donc, à nouveau, de passer rapidement à 40 % d'acétonitrile, pourcentage avec lequel nous avons obtenu les résultats parmi les plus satisfaisants.

- 1 à 5 minutes : 20 % d'ACN
- 5 à 15 minutes : passage à 40 % d'ACN
- 15 à 35 minutes : 40 % d'ACN
- 35 à 37 minutes : retour à 20 % d'ACN

	E_1	E_2	Δ_4
Temps de rétention en minutes	27,5	24,5	29

(Figure III-4)

La séparation des produits est inefficace : pics épaulés, pas de retour à la ligne de base. Nous testons alors des gradients assez proches de celui de notre premier test.

- 1 à 15 minutes : 20 % d'ACN
- 15 à 25 minutes : passage à 40 % d'ACN
- 25 à 35 minutes : 40 % d'ACN
- 35 à 44 minutes : retour à 20 % d'ACN

	E_1	E_2	Δ_4
Temps de rétention en minutes	36,5	34,5	37

(Figure III-5)

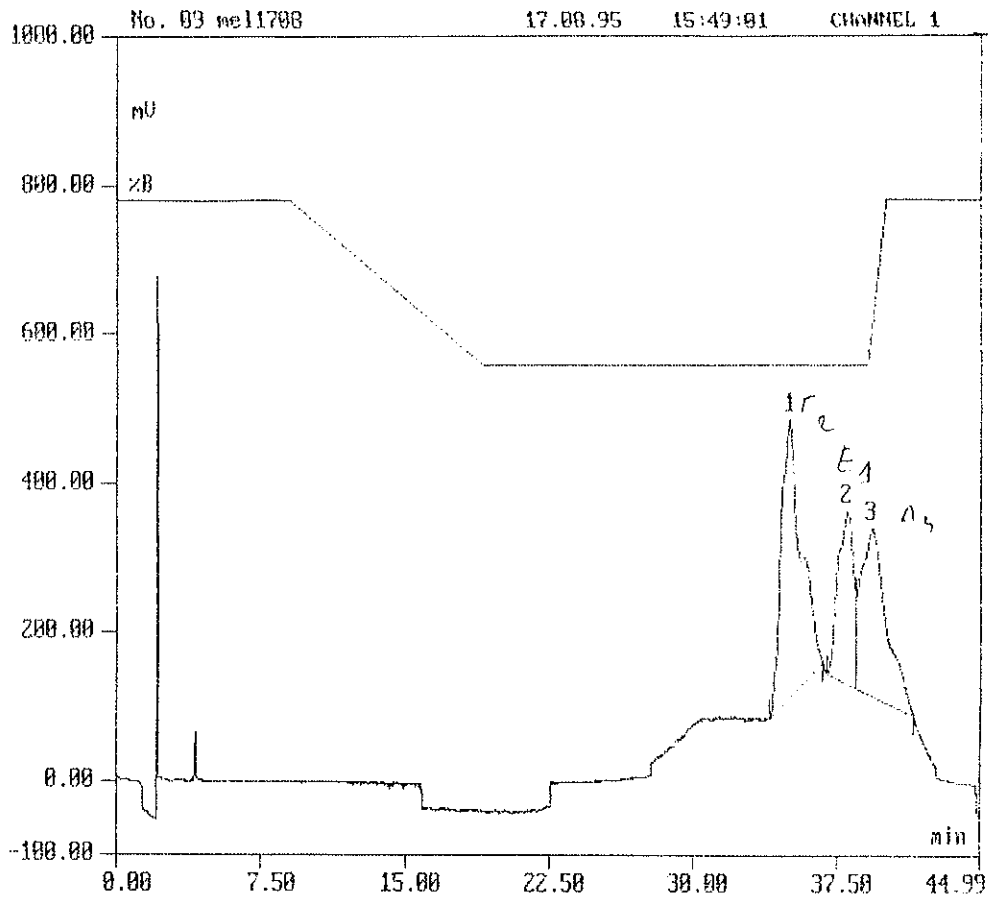


Figure III-5 : Chromatogramme de E_1 , E_2 , Δ_4 avec un gradient de 20 à 40 % d'ACN dans la phase mobile

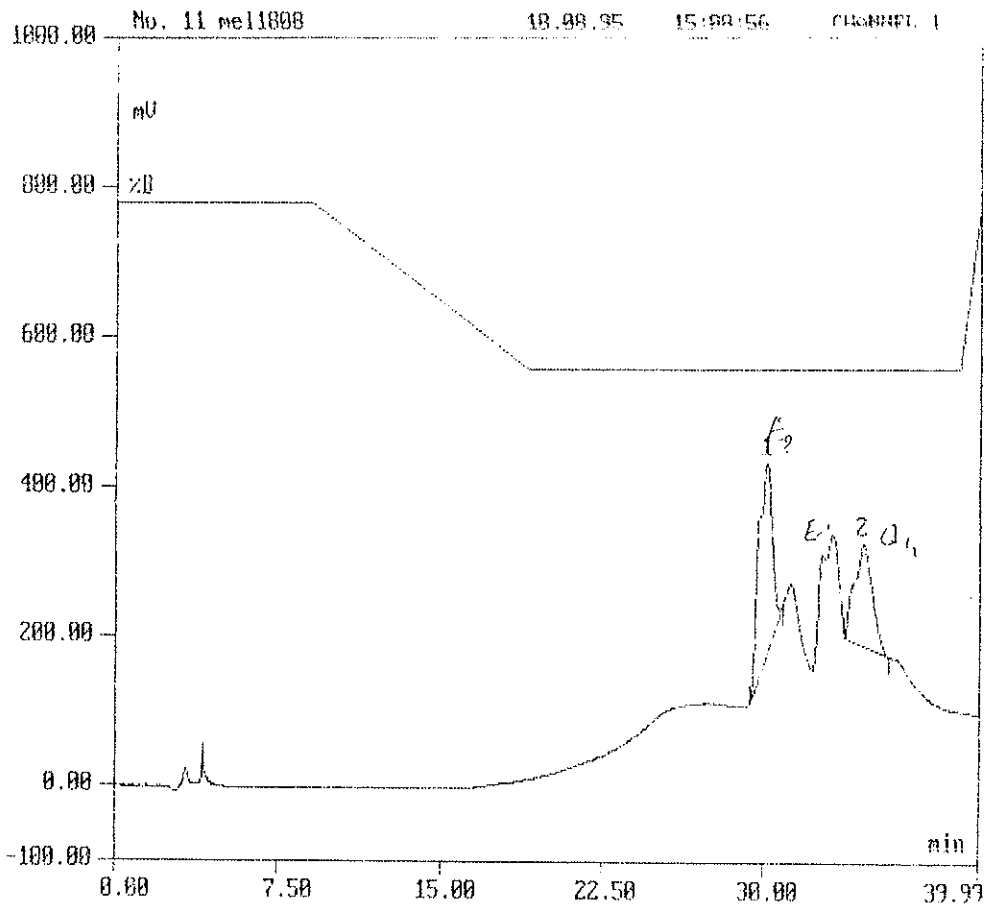


Figure III-6 : Chromatogramme de E_1 , E_2 , Δ_4 avec un gradient de 20 à 40 % d'ACN dans la phase mobile

- 1 à 10 minutes : 20 % d'ACN
- 10 à 20 minutes : passage à 40 % d'ACN
- 20 à 40 minutes : 40 % d'ACN
- 40 à 41 minutes : retour à 20 % d'ACN

	E ₁	E ₂	Δ ₄
Temps de rétention en minutes	31,5	29	33,5

(Figure III-6)

Ces deux gradients, pas plus que les autres, ne résolvent les problèmes de séparation des stéroïdes. Dans cette optique, même si parfois l'on est proche d'une bonne séparation, les pics ne sont pas symétriques, il n'y a pas de retour complet à la ligne de base....

Nous tentons un dernier essai sans atteindre 40 % d'acétonitrile mais en restant à 35 %, nous espérons ainsi une meilleure séparation.

- Gradients de 20 à 35 % d'acétonitrile

- 1 à 10 minutes : 20 % d'ACN
- 10 à 20 minutes : passage à 35 % d'ACN
- 20 à 40 minutes : 35 % d'ACN
- 40 à 45 minutes : retour à 20 % d'ACN

	E ₁	E ₂	Δ ₄
Temps de rétention en minutes	39	34	40,5

(Figure III-7)

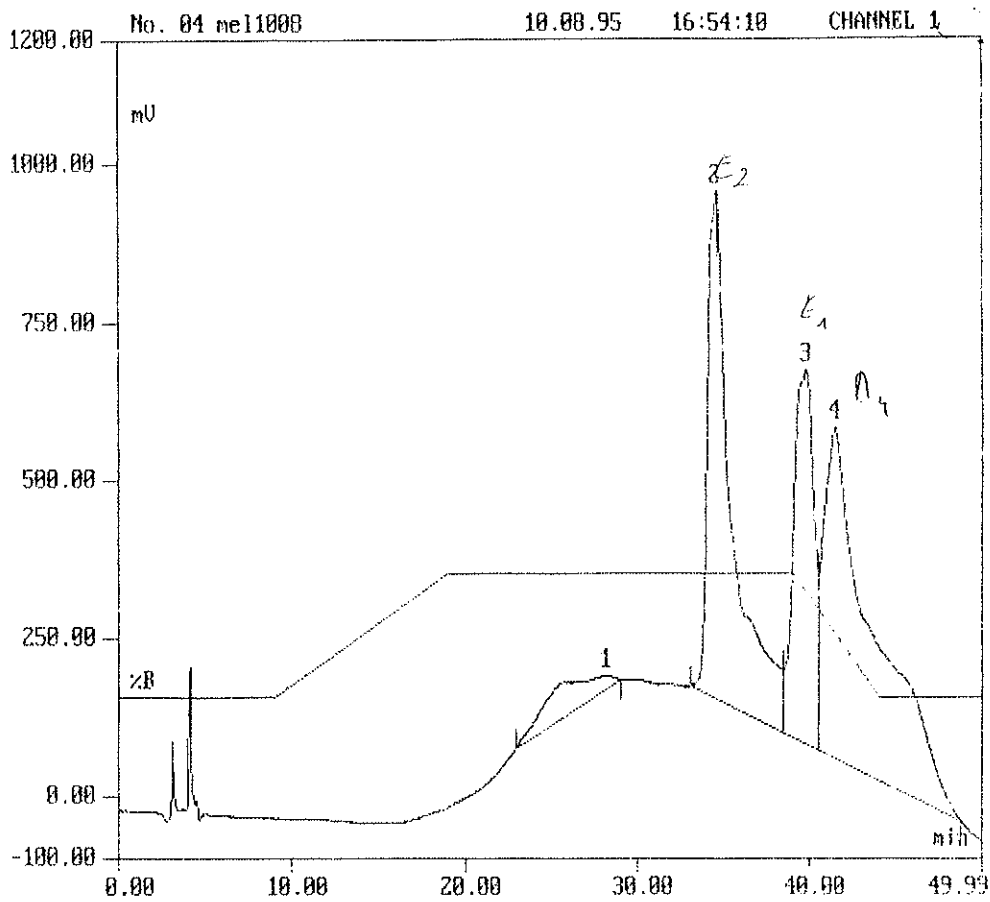


Figure III-7 : Chromatogramme de E₁, E₂, Δ₄ avec un gradient de 20 à 35 % d'ACN dans la phase mobile

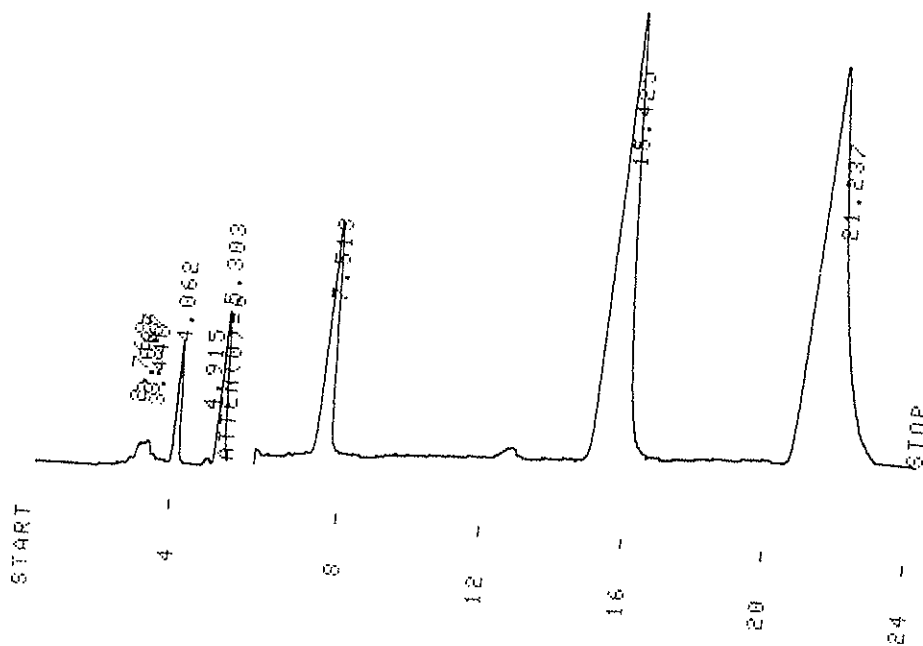


Figure III-8 : Chromatogramme des stéroïdes avec la phase mobile A

Outre une augmentation des temps de rétention, les produits ne sont pas mieux séparés qu'avec les autres gradients.

Dans les premières analyses les pics obtenus sont satisfaisants sur le plan de leur aspect mais les produits ne sont pas suffisamment bien séparés (il n'y a pas entre chaque pic un retour complet à la ligne de base) et de plus l'intervalle d'élution est trop long. C'est pourquoi nous essayons différentes autres possibilités de gradient mais qui ne nous apportent pas plus de satisfaction (toujours un intervalle de temps supérieur à 30 minutes et une plus ou moins bonne séparation des produits).

Cette méthode chromatographique en phase inverse présente l'avantage comparée à une méthode chromatographique en phase normale, d'éviter l'évaporation des solutions de stéroïdes ; d'où une utilisation plus rapide

Cependant, par cette méthode nous n'arrivons pas à obtenir une bonne séparation des stéroïdes ; nous envisageons donc de continuer nos expériences à l'aide d'une méthode chromatographique en phase normale.

2 - CLHP phase normale

Dans un premier temps, nous utilisons la phase mobile A.

	E ₁	E ₂	Δ ₄	T
Temps de rétention en minutes	5.3	7.5	15.4	21

(Figure III-8)

Avec cette phase mobile les pics d'élution sont bien symétriques, non épaulés, et de plus l'intervalle d'analyse est d'une durée intéressante (inférieure à 30 minutes) ; ces résultats sont reproductibles.

Cependant, un essai d'injection de l'estriol s'avère un échec (aucune élution après une attente de 40 minutes). Ce produit semble être très polaire donc très retenu par la phase stationnaire.

Nous faisons appel pour son élution à l'utilisation d'un solvant isohydrique : la phase mobile C.

	E ₁	E ₂	E ₃	Δ ₄	T
Temps de rétention en minutes	4.2	5	10.2	5.5	6.1

(Figures III-9, 10, 11)

Cette phase permet donc l'élution de E₃ et diminue le temps de rétention de la testostérone.

Les pics très rapprochés de E₁, E₂, Δ₄ et T peuvent poser des difficultés pour la suite des manipulations lorsque nous effectuerons une collecte par tube : en effet, deux produits pourront se retrouver élués dans un même tube.

Après avoir obtenu une bonne séparation des différents produits, il s'est posé le problème de la DHA. Nous avons recherché au spectrophotomètre l'absorbance maximum de cette molécule qui est à une longueur d'onde de 213 nm, cependant à cette longueur d'onde la ligne de base du chromatogramme ne peut pas être stabilisée. Pour avoir une idée de son temps d'élution on choisit d'utiliser une solution de DHA marquée au carbone 14 que l'on injecte dans le système CLHP avec la phase mobile A et on recueille l'éluat toutes les minutes. Le radiochromatogramme fait apparaître que la DHA a un temps de rétention de 10-11 minutes, pic bien individualisé sur le chromatogramme des autres stéroïdes (Figure III-12). Avec la phase mobile C, la DHA possède un temps d'élution de 5,5 minutes : temps identique à celui de la Δ₄ mais ceci ne semble pas poser de problème car ces deux produits ne se retrouvent pas simultanément dans les produits de la réaction.

Comme nous l'avons vu dans la préparation du milieu réactionnel, nous devons travailler avec des androgènes radioactifs ; en effet un essai réalisé avec des stéroïdes non radioactifs utilisés aux concentrations physiologiques (10⁻⁵M et 10⁻⁶M) s'est révélé être un échec (aucun pic sur le chromatogramme).

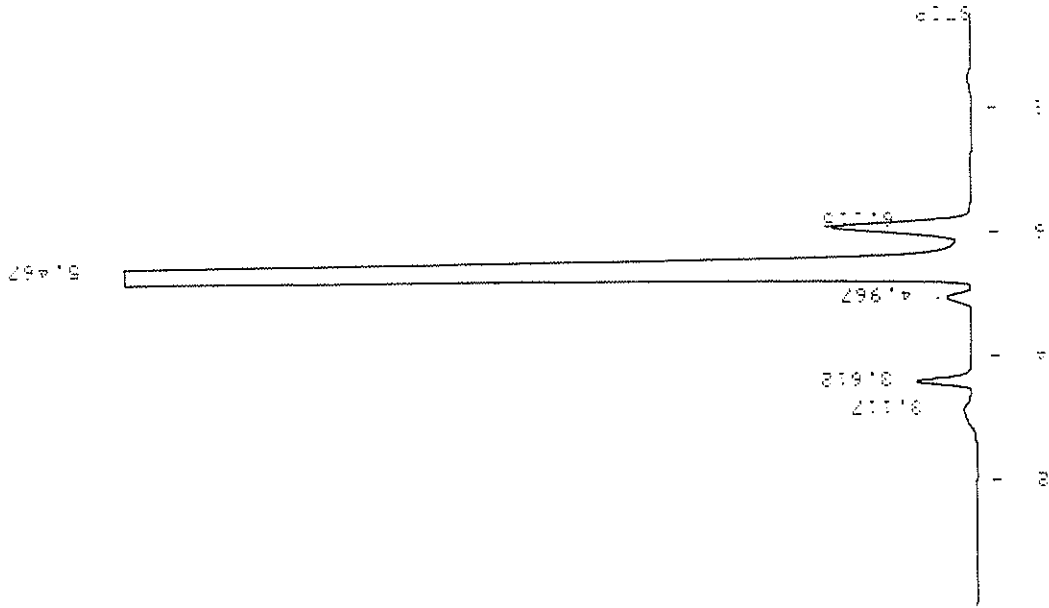


Figure III-9 : Chromatogramme de E₁, E₂, E₃ avec la phase mobile C

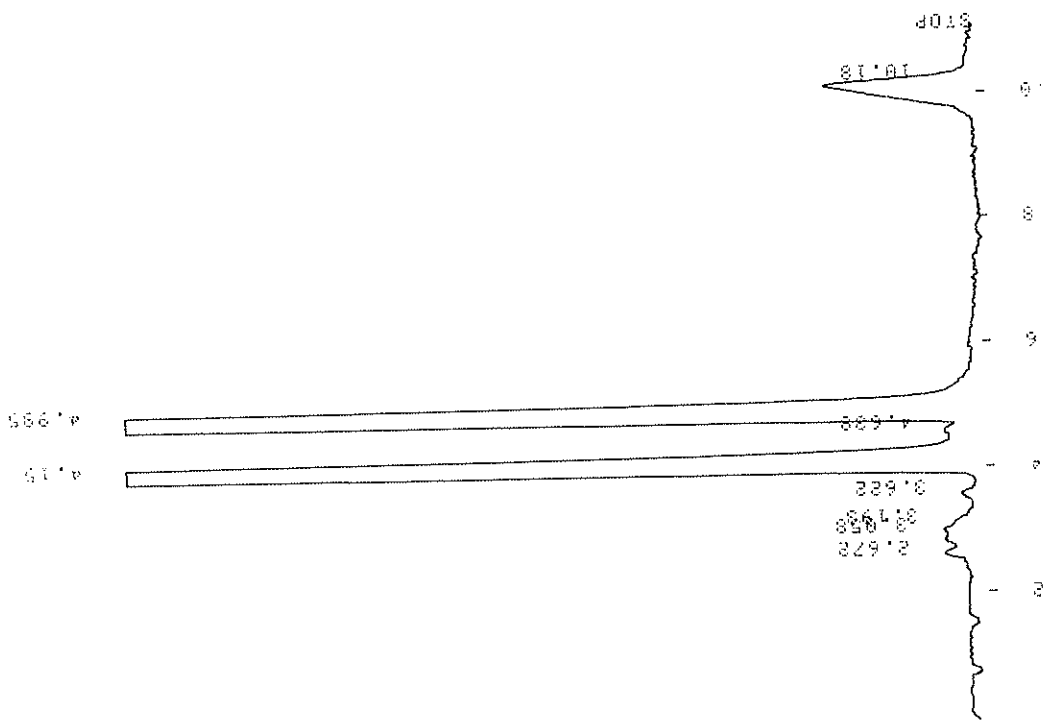


Figure III-10 : Chromatogramme de Δ_4 avec la phase mobile C

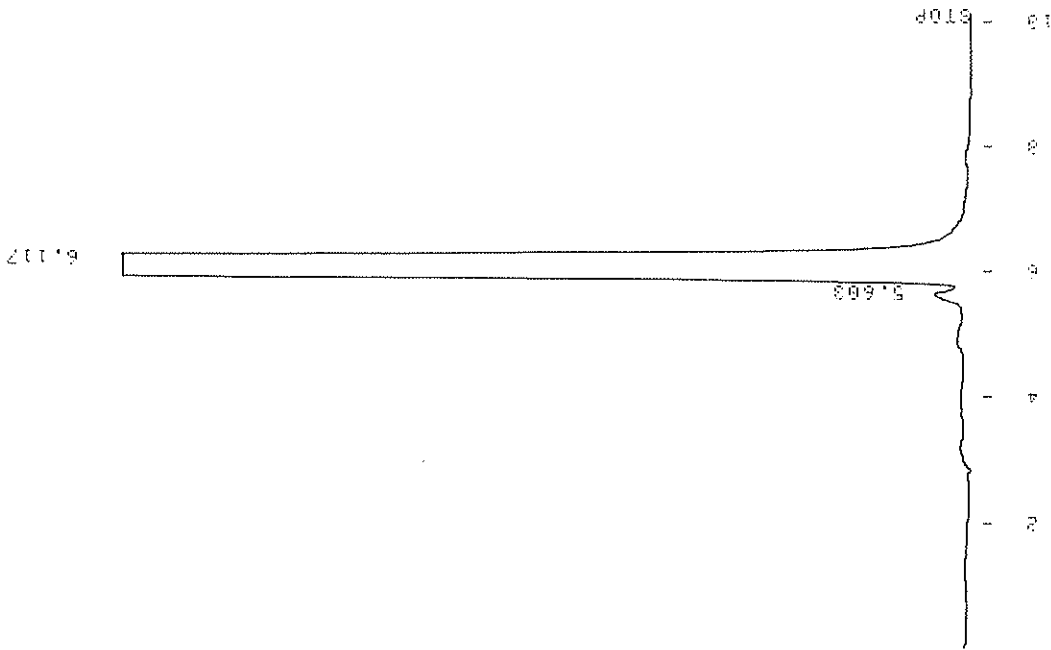


Figure III-11 : Chromatogramme de T avec la phase mobile C

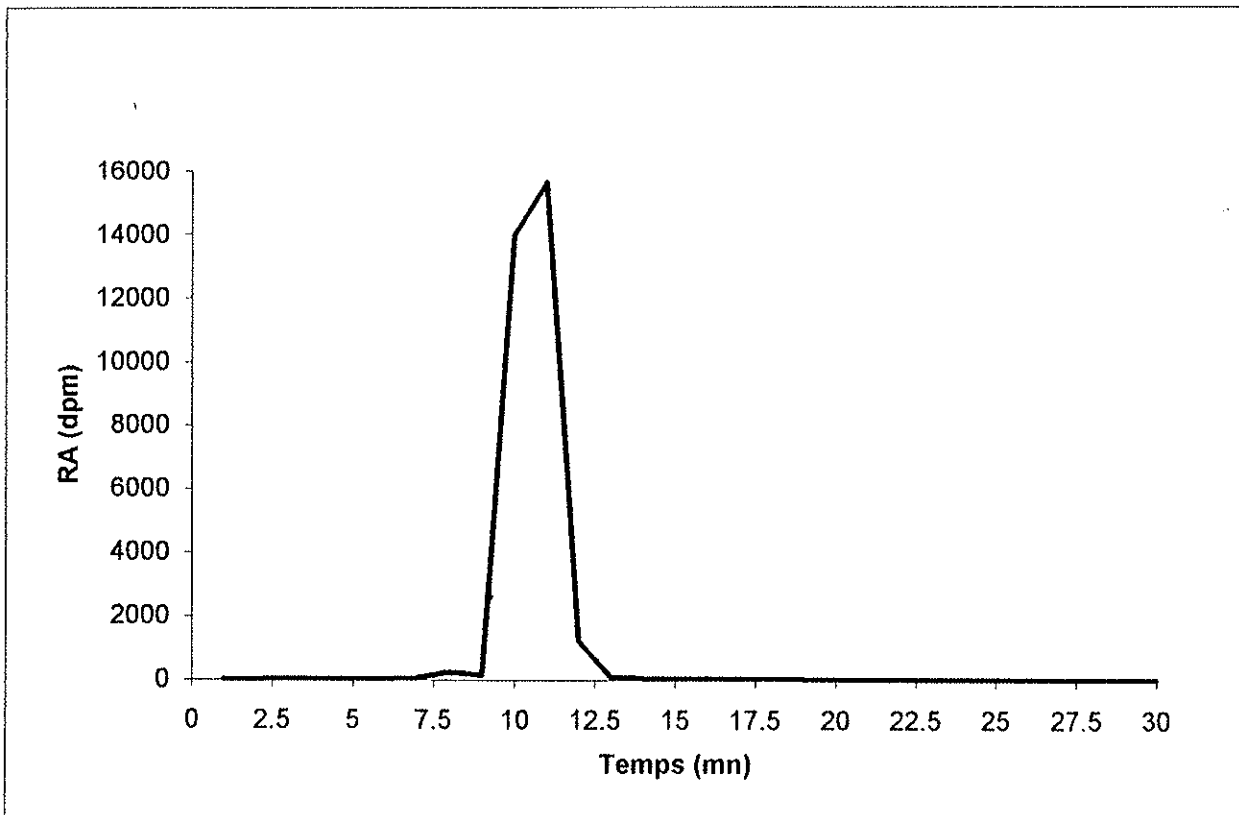


Figure III-12 : Radiochromatogramme de la DHA* avec la phase mobile A

D - ACTIVITE AROMATASIQUE DES MICROSOMES HEPATIQUES DE RAT

1 - Aromatisation de la Δ_4^*

Nous effectuons l'expérience selon le protocole défini. Ces essais sont injectés dans la chaîne CLHP en phase normale que l'on a retenue pour notre étude. On procède ensuite au comptage de la radioactivité sur l'éluat afin d'interpréter les résultats.

1 - 1 - utilisation de la phase mobile A

- Collecteur manuel de fractions

Le débit de la pompe est fixé à 1 ml/min, mais on recueille 0.5 ml/tube soit un recueil toutes les 30 secondes.

(Figure III-13)

Nous notons la présence d'un seul pic nettement visible sur le radiochromatogramme, il semble refléter la présence de Δ_4^* puisque son temps d'élution est compris entre 16 et 17,5 minutes. Les pics des autres produits dont on attend la formation sont à peine perceptibles étant donné la faible différence entre leur nombre de coups et le bruit de fond visualisé par une ligne de base élevée. La seule hypothèse que l'on peut formuler est la présence de E_1 signalée par un pic à 5,5 minutes et la présence de E_2 par un pic à 7,5 minutes ces deux produits étant le résultat de l'aromatisation du cycle A de la Δ_4^* .

De plus nous observons une perte importante de radioactivité à la suite du passage de la solution dans la colonne, le rendement de la colonne est seulement de 20 %. Nous avons en premier lieu émis l'hypothèse d'une erreur de manipulation, nous avons donc refait cet essai à deux reprises et les résultats obtenus se sont révélés identiques.

Pour vérifier que les microsomes ne sont pas à l'origine de réactions parasites nous réalisons deux témoins : une première expérience en l'absence de microsomes et une seconde expérience dans laquelle la Δ_4^* est ajoutée après arrêt de la réaction.

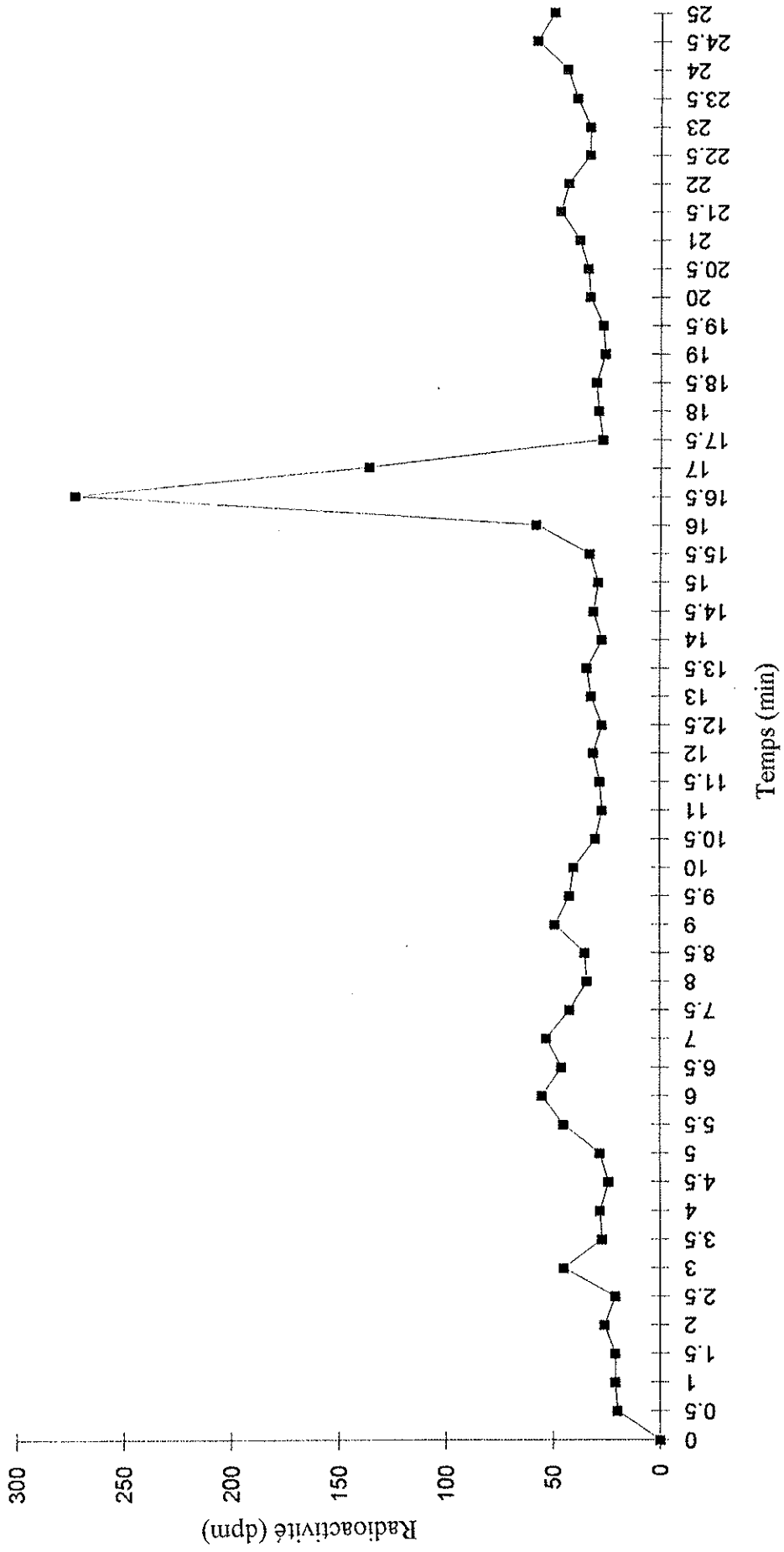


Figure III-13 : Incubation Δ_4^* et microsomes (phase mobile A, collecteur manuel de fractions)

L'analyse des résultats des comptages radioactifs montre que dans les deux cas la totalité de la radioactivité injectée est retrouvée à la sortie de la colonne (rendement de 84 % et 76 %) ; de plus, il apparaît sur le radiochromatogramme un seul pic avec un temps d'éluion de 15,5 à 17,5 minutes correspondant donc à la Δ_4^* et nous notons l'absence de "parasitage" de la ligne de base. Ces deux essais apportent la preuve que ni les microsomes, ni la colonne ne sont à l'origine des pertes de radioactivité observées.

Ces résultats nous amènent à penser que les produits formés lors de la réaction ne seraient pas ceux attendus mais que d'autres métabolites seraient formés dont le temps de rétention excède 25 minutes (temps de l'étude) dans le système chromatographique utilisé. En effet nous pensons que la Δ_4^* se transformerait bien en estradiol mais celui-ci à son tour pourrait se transformer en différents métabolites et notamment en estriol.

Cette hormone est difficile à collecter avec la phase mobile A puisque son temps de rétention est supérieur à 40 minutes (forte polarité de l'estriol) ; c'est pourquoi nous allons refaire l'expérience avec la phase mobile C qui, nous l'avons vu, permet l'éluion de l'estriol en 10 minutes. Nous pouvons donc maintenir l'intervalle d'analyse de 30 minutes.

1 - 2 - utilisation de la phase mobile C :

- Collecteur manuel de fractions

Le débit de la pompe est réglé sur 1 ml/min et on recueille 1 ml / tube.

(Figure III-14)

Nous constatons dans ce cas qu'il n'y a plus de perte de radioactivité, le rendement de la colonne étant de 87 %, donc nous pouvons considérer que nous visualisons l'ensemble des métabolites formés lors de l'incubation ; cependant nous ne pouvons pas identifier l'ensemble des pics. Les pics dont les temps d'éluion sont compris entre 4 et 7 minutes pourraient correspondre à ceux de E_1 , E_2 , Δ_4 bien qu'ils ne soient pas sous la forme de pics séparés.

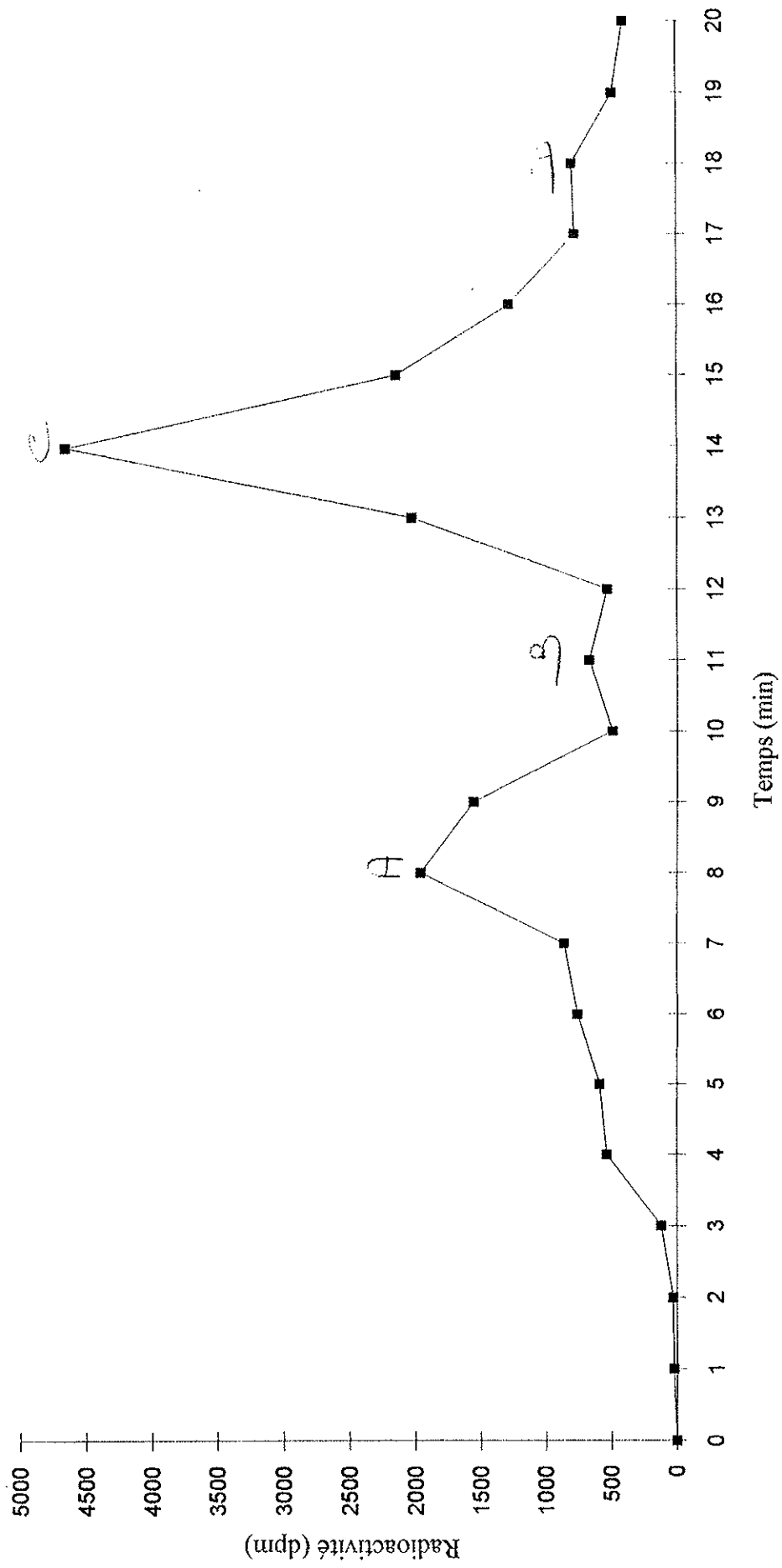


Figure III-14 : Incubation Δ_4^* et microsomes (phase mobile C, collecteur manuel de fractions)

Quatre autres pics apparaissent clairement A, B, C, D dont les temps de rétention sont les suivants :

A : 8-9 minutes

B : 11 minutes

C : 14 minutes

D : 18 minutes

Chacun de ces pics peut correspondre à un ou plusieurs métabolites inconnus, notamment le pic B pourrait être de l'estriol.

La collecte manuelle entraîne de nombreuses contraintes, en particulier l'addition de scintillant et le comptage pouvant être de longue durée si le nombre de tubes est important. Nous avons eu pendant notre étude la possibilité d'utiliser un détecteur de radioactivité en continu qui permet un gain de temps important ; en effet, les opérations de collecte et de comptage sont simultanées. Cet appareil permet aussi une plus grande précision dans la détection des produits et offre une sensibilité plus importante que le comptage manuel.

- Détecteur de radioactivité en flux continu

Dans les mêmes conditions chromatographiques (phase mobile C) nous avons réalisé la séparation des métabolites radioactifs, leur détection étant réalisée en flux continu. Nous constatons de nouveau une bonne récupération de la radioactivité, ce qui peut nous laisser penser que nous visualisons la totalité des métabolites formés.

(Figure III-15)

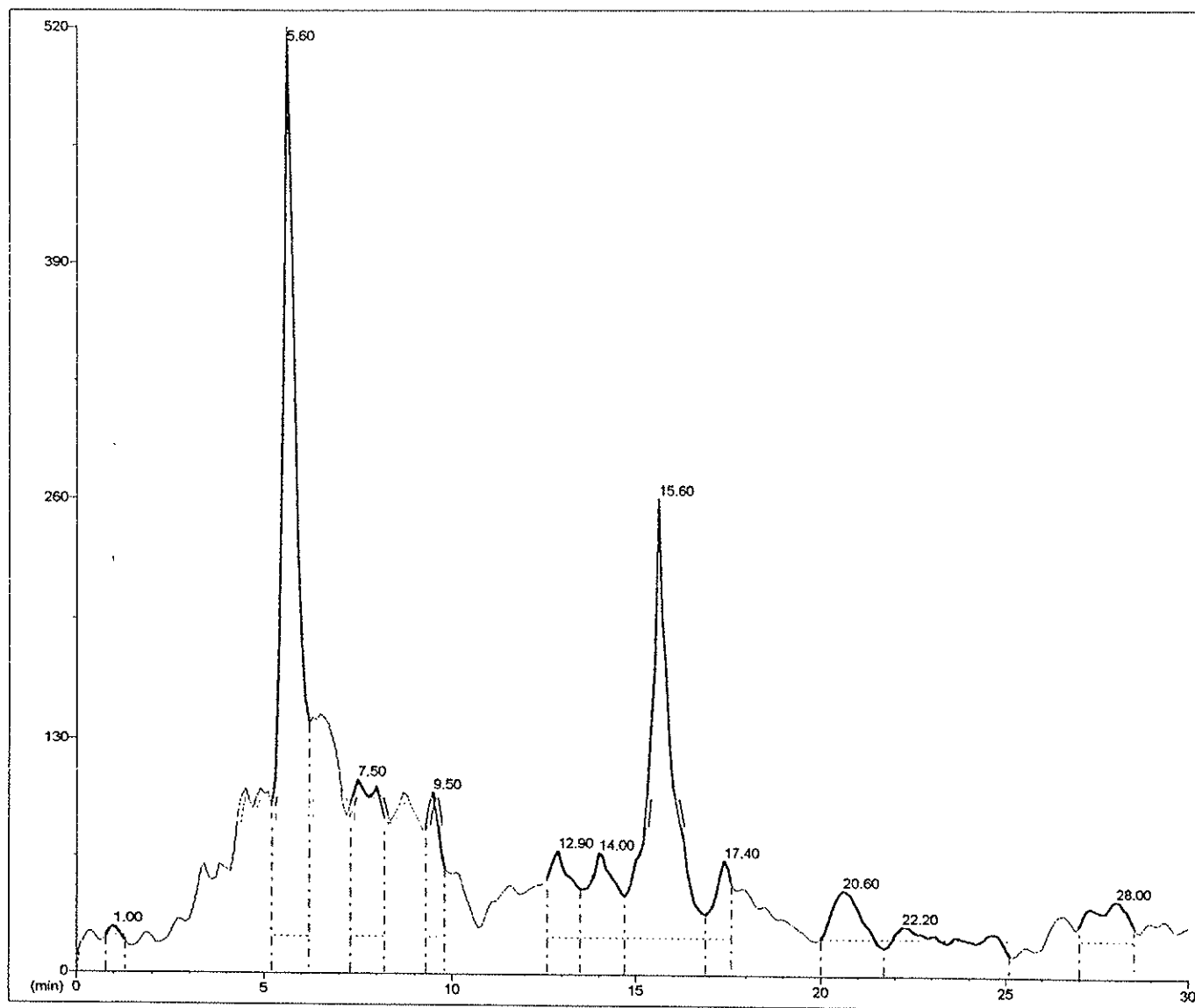


Figure III-15 : Incubation Δ_4^* et microsomes (phase mobile C, détecteur de radioactivité en flux continu)

La Δ_4^* semble bien métabolisée par les microsomes car nous notons l'apparition de nombreux pics bien individualisés, notamment un pic important à 15,6 minutes : s'il s'agit du métabolite principal de la Δ_4^* il ne s'agit d'aucun produit connu (estrone, estradiol) ; ceci peut être dû à la transformation de la Δ_4^* par un (des) système(s) enzymatique(s) différent(s) de l'aromatase. Il nous est également impossible d'extrapoler sur la nature des produits représentés par les autres pics. Nous pouvons seulement noter que le pic à 5,6 minutes représente la Δ_4^* inchangée.

1 - 3 - Actions des inhibiteurs

Etant donné que nous ne pouvons pas déterminer avec certitude les produits formés à la suite de l'incubation, nous avons ajouté à la préparation deux inhibiteurs différents afin de visualiser leur action éventuelle sur l'activité de l'aromatase et donc sur la formation des métabolites à partir de la Δ_4^* .

1 - 3 - 1 - Aminoglutéthimide

Le premier inhibiteur utilisé est l'aminoglutéthimide qui inhibe les cytochromes P450 de façon aspécifique.

- collecteur manuel

Le débit de la pompe est fixé à 1 ml / min et la collecte se fait toutes les minutes.

(Figure III-16)

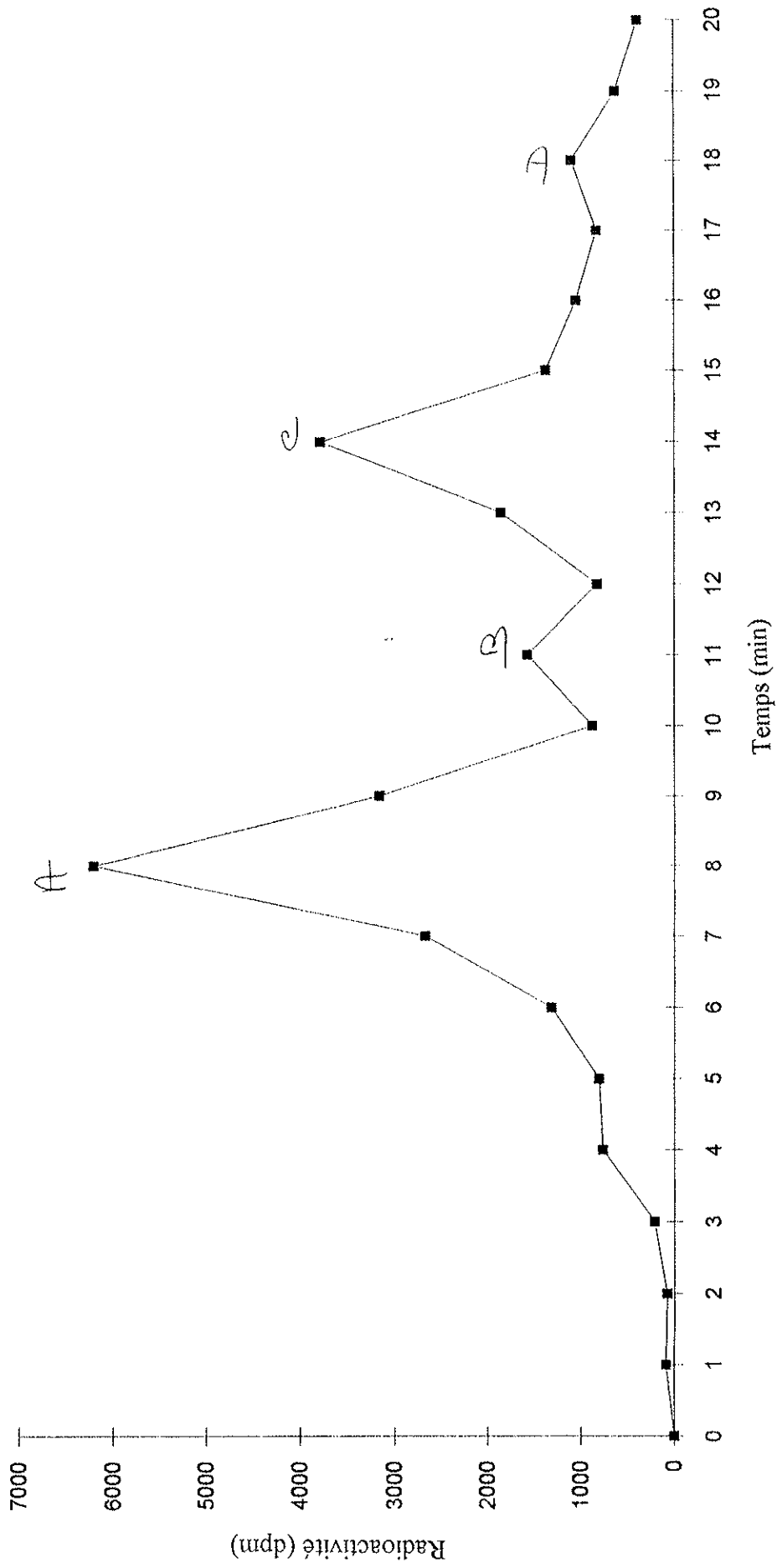


Figure III-16 : Effets de l'aminoglutéthimide sur l'incubation de Δ_4^* et microsomes (phase mobile C, collecteur manuel de fractions)

La présence d'aminoglutéthimide dans le milieu d'incubation entraîne des modifications dans le métabolisme de la Δ_4^* . Nous constatons qu'il n'y a pas de variations notables entre les deux radiochromatogrammes avant 5 minutes, par contre les proportions des pics A, B, C, D sont différentes.

Le pic A est beaucoup plus important que lorsque la Δ_4^* est incubée seule ; ceci peut signifier que nous avons une augmentation soit de la quantité de métabolites formés soit de la quantité de produit non transformé ; (cependant ce pic ne correspond pas au temps d'élution de la Δ_4^* . On note également une augmentation de la hauteur du pic B qui correspond à une augmentation de la quantité de produit correspondant (de l'estriol si l'on maintient notre hypothèse). Par contre, le pic C est réduit : le(s) métabolite(s) qui lui corresponde(nt) n'est (ne sont) pas (tous) formé(s).

Nous pouvons supposer que les deux premiers ensembles de métabolites représentés par les pics A et B seraient des intermédiaires dans la réaction et des précurseurs du (des) métabolite(s) du pic C (produit final).

L'aminoglutéthimide agirait donc sur plusieurs systèmes enzymatiques présents dans les microsomes qui font subir à la Δ_4^* de nombreuses transformations, ce qui rend difficile l'identification des produits.

- Détecteur de radioactivité en flux continu

(Figure III-17)

Nous obtenons les mêmes résultats qu'à l'aide du collecteur manuel de fractions et nous formulons les mêmes hypothèses. En effet, on remarque que le pic de Δ_4^* inchangée est très diminué et le tracé est considérablement modifié avec des pics importants à 6,80 , 8,20 , 10,50 , 11,20 , 14,30 et un très important à 13,00 minutes.

Le détecteur de radioactivité en flux continu offre, par comparaison au collecteur manuel de fractions, des tracés avec des pics bien individualisés et une facilité d'utilisation permettant de multiplier les essais.

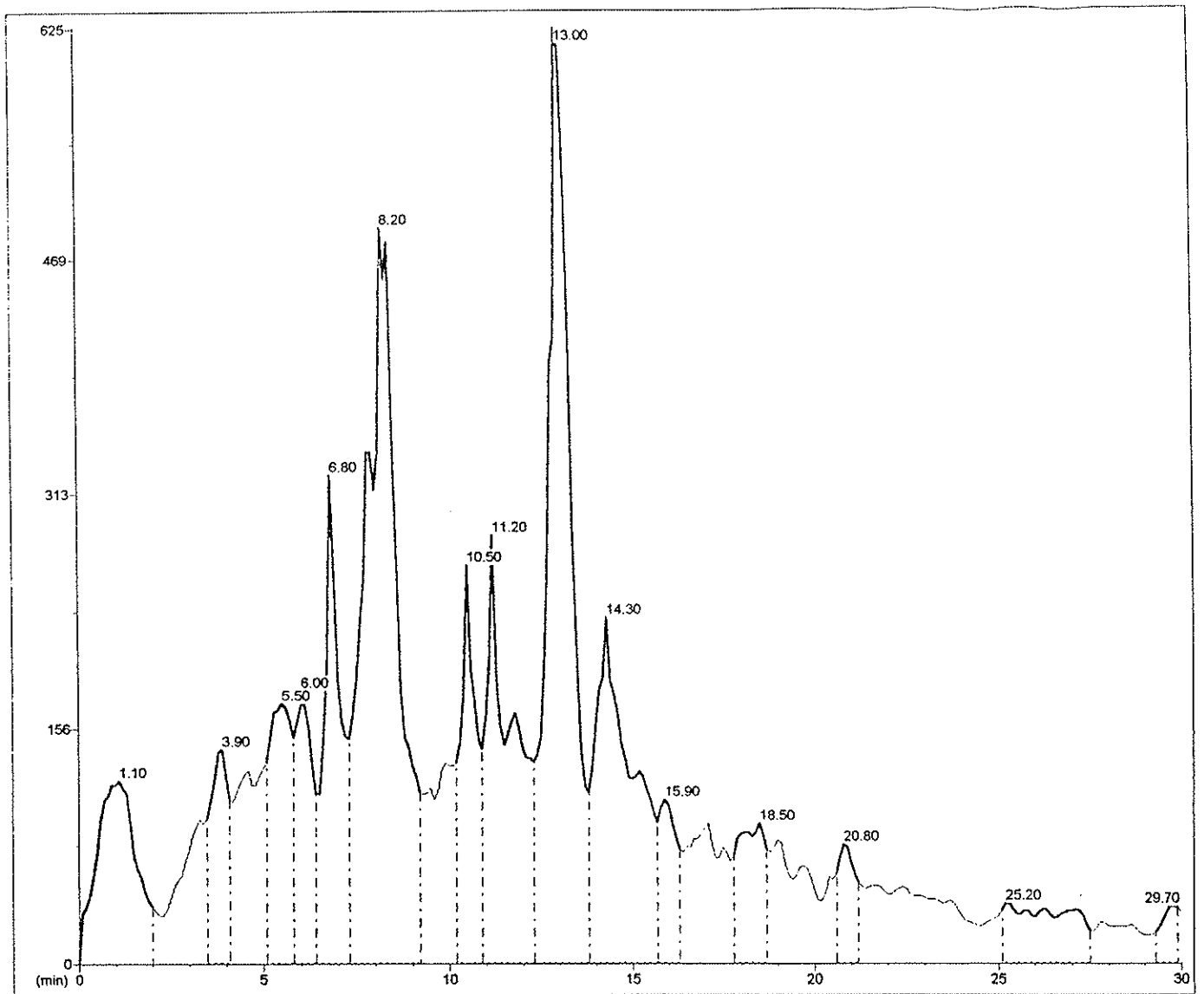


Figure III-17 : Effets de l'aminoglutéthimide sur l'incubation de Δ_4^* et microsomes (phase mobile C, détecteur de radioactivité en flux continu)

1 - 3 - 2 - Composé X

Cet essai a uniquement été réalisé à l'aide du collecteur manuel de fractions.

L'éventuel mode d'action inhibiteur de cette molécule nous est inconnu. Le protocole de manipulation reste identique.

(Figure III-18)

Au vu des résultats obtenus sur le métabolisme de la Δ_4^* par les microsomes nous pouvons émettre l'hypothèse que le composé X possède une action inhibitrice sur ce métabolisme mais nous ignorons les systèmes enzymatiques sur lesquels il intervient. En effet, il modifie les pics des produits de la réaction mais de manière différente de l'aminoglutéthimide. L'action inhibitrice de ce composé semble également concerner la formation des métabolites représentés par les pics A, B, C. On note, comme pour l'aminoglutéthimide, une augmentation des pics A et B mais de plus faible amplitude ainsi qu'une diminution sensible du pic C.

2 - aromatisation de la DHA*

Il faut noter que toutes les manipulations à suivre sont effectuées à l'aide du détecteur de radioactivité en flux continu.

(Figure III-19)

On note un pic à 5,5 minutes qui correspond à la DHA* non transformée, pic de faible amplitude qui prouve que la DHA* est métabolisée.

Il y a présence sur le tracé de nombreux pics dont trois importants à 9,80 , 20,10 et 26,90 minutes. Nous pouvons supposer que le pic visualisé à 9,80 minutes est un pic d'estriol, métabolite qui pourrait provenir de l'aromatisation de la DHA* malgré un léger décalage dans le temps. Ce décalage peut s'expliquer par le vieillissement de la phase mobile qui entraîne une diminution de sa polarité initiale.

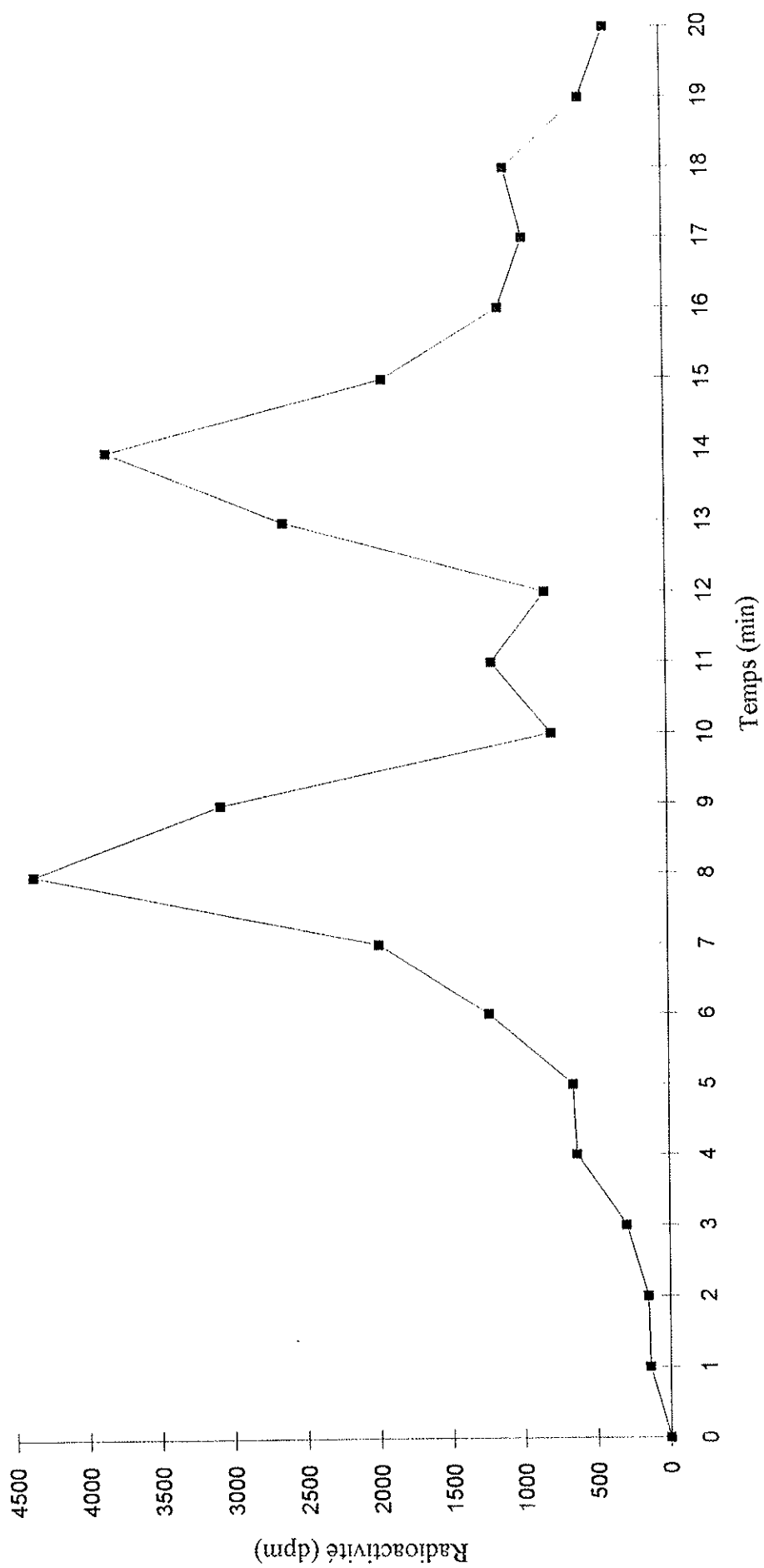


Figure III-18 : Effets du composé X sur l'incubation de Δ_4^* et microsomes

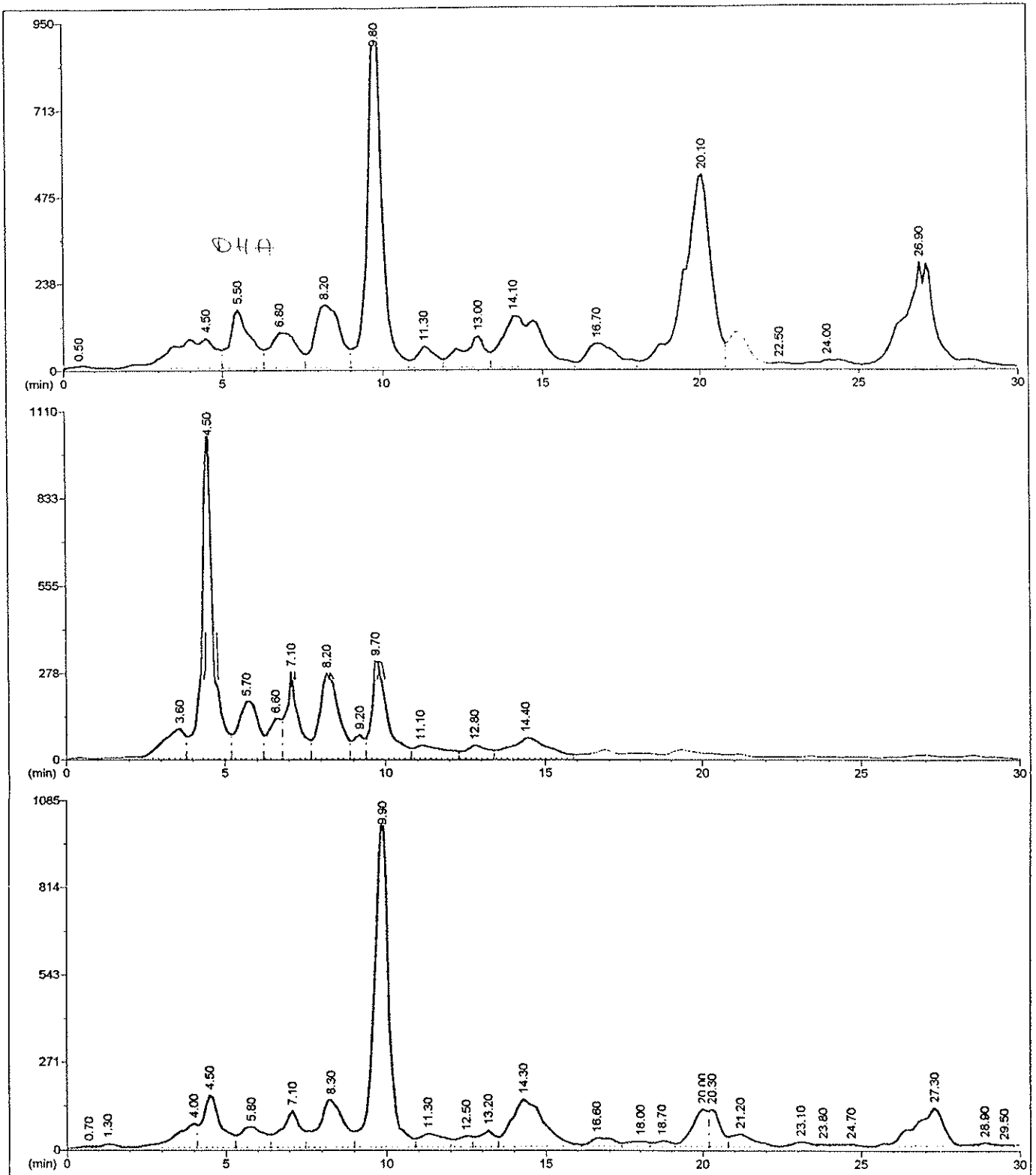


Figure III-19 : Incubation DHA* et microsomes et effets de l'aminoglutéthimide et du composé X

2 - 1 - Action des inhibiteurs

2 - 1 - 1 - Aminoglutéthimide

(Figure III-19)

Par addition d'aminoglutéthimide le pic à 9,80 minutes se trouve très diminué ce qui pourrait renforcer l'idée qu'il s'agissait d'un métabolite formé grâce à l'action d'un système enzymatique à cytochrome P450 ; l'aminoglutéthimide exerce également une inhibition importante sur les pics dont les temps de rétention sont supérieurs à 15 minutes qui disparaissent (là encore nous maintenons l'hypothèse d'un métabolite formé grâce à une enzyme cytochrome P450). Nous notons également l'apparition d'un pic important à 4,5 minutes.

2 - 1 - 2 - Composé X

(Figure III-19)

Par addition de X, le pic à 9,80 minutes n'est pas modifié ; ceci semblerait prouver si l'on maintient l'hypothèse qu'il s'agit d'estriol, que le produit X n'inhibe pas le système enzymatique conduisant à la formation de ce produit. Il y a seulement modification du tracé après 15 minutes, les pics à 20,10 et 26,90 minutes sont diminués.

Pour juger de l'aromatation de la Δ_4^* et de la DHA* par les microsomes nous avons vu qu'il est nécessaire d'utiliser la phase mobile C afin de visualiser le maximum de produits susceptibles de se former dans un intervalle de temps réduit. Nous avons également observé des modifications qualitatives et quantitatives des métabolites formés en présence d'inhibiteurs.

E - ACTIVITE AROMATASIQUE DES LYSATS DE CELLULES MCF-7.

Nous avons voulu appliquer la méthode mise au point sur les microsomes hépatiques au lysat de cellules MCF-7, en suivant le même protocole.

1 - Aromatisation de la Δ_4^*

(Figure III-20)

Sur le tracé nous notons simplement l'existence d'un pic à 5,9 minutes représentant la Δ_4^* non métabolisée et d'autres petits pics de très faible amplitude. De plus la radioactivité est entièrement récupérée en sortie de colonne. Nous en déduisons donc l'absence de métabolisme de la Δ_4^* .

Nous avons alors tenté d'introduire de l'aminoglutéthimide afin de mettre en évidence un métabolisme éventuel qui ne serait pas apparu sur le premier tracé mais le tracé s'est révélé identique.

Il semble que l'activité aromatasique dans le lysat de cellules MCF-7 est très faible et ne peut être détectée par notre méthode.

2 - Aromatisation de la DHA*

(Figure III-21)

Les résultats sont identiques à ceux obtenus avec la Δ_4^* : bonne récupération de la radioactivité mais absence de métabolites. L'addition d'aminoglutéthimide n'a pas entraîné de modifications du chromatogramme.

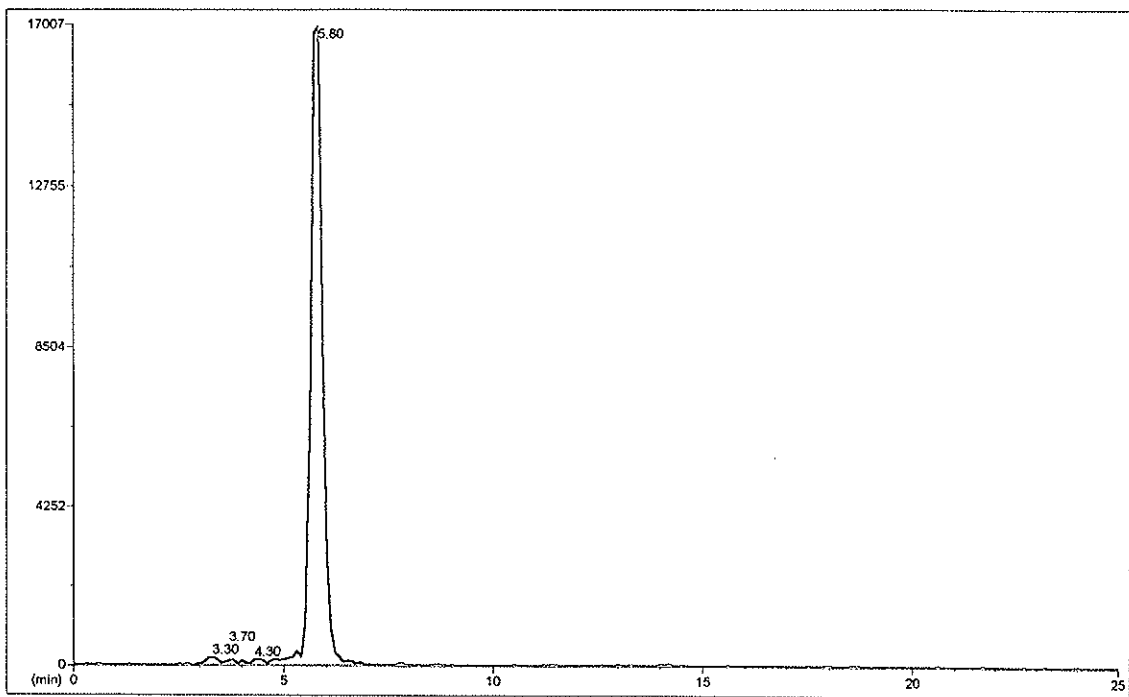
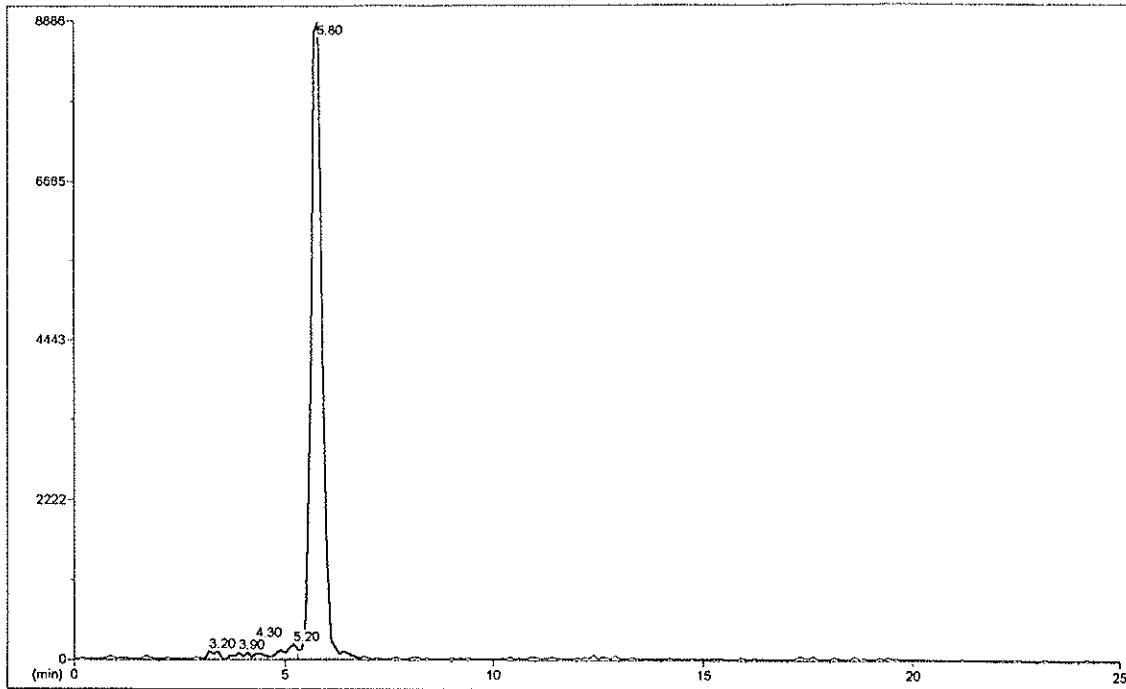


Figure III-20 : Incubation Δ_4^* et lysat de cellules MCF-7 et effets de l'aminoglutéthimide

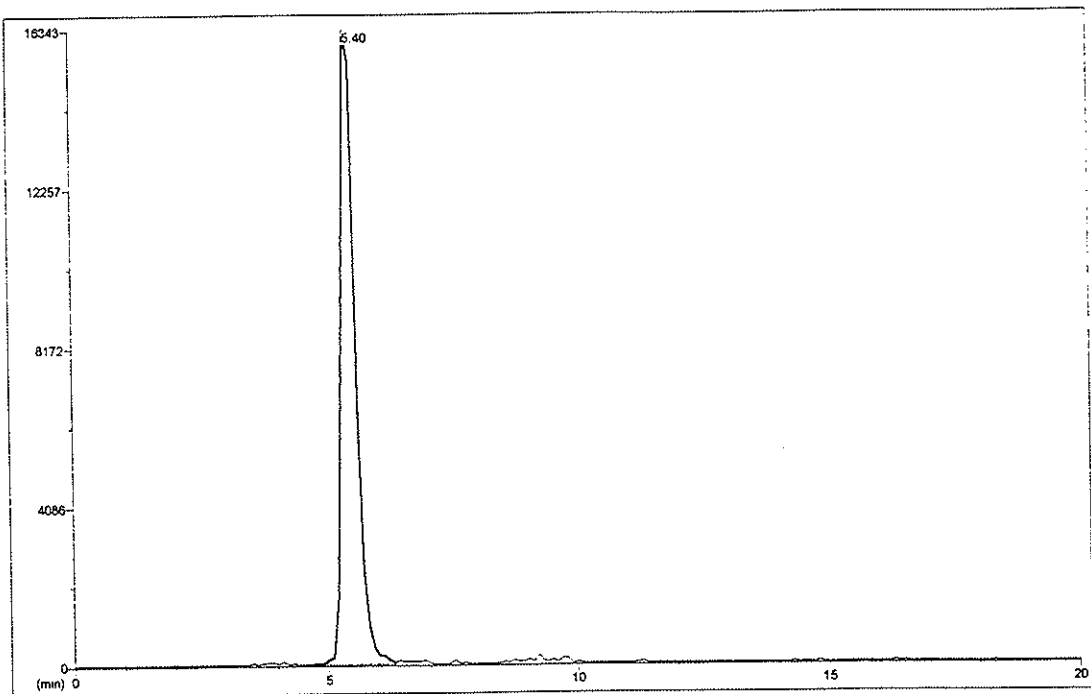
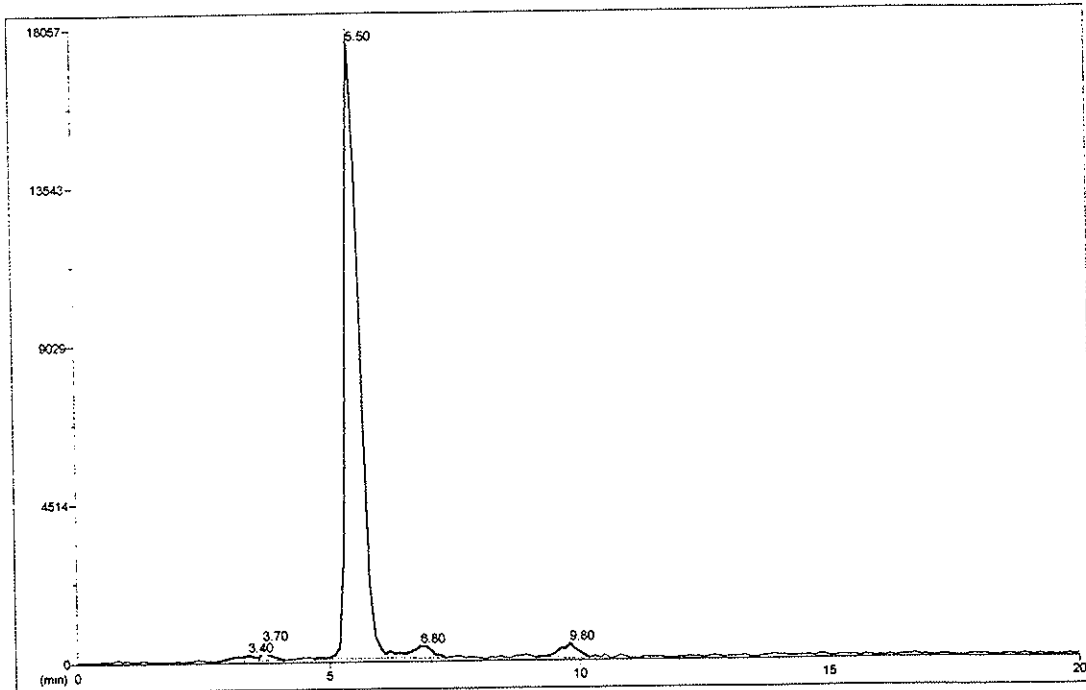


Figure III-21 : Incubation DHA* et lysat de cellules MCF-7, et effets de l'aminoglutéthimide

IV - CONCLUSION

A l'aide de microsomes hépatiques de rat nous avons pu tester un protocole expérimental permettant de mettre en évidence les métabolites formés à partir de la Δ_4 et de la DHA.

Nous proposons donc un protocole d'analyse qui comprend :

1- une extraction des stéroïdes

2- une séparation des stéroïdes par chromatographie liquide haute performance

- phase stationnaire : colonne de 25 cm de long composée de grains de silice de 5 μ m de diamètre

- phase mobile : mélange de deux phases :

	90 %	64 % isooctane
		36 % acétate d'éthyle
et		
	10 %	62 % méthanol
		34,8 % acétate d'éthyle
		3,2 % eau

3- une détection des stéroïdes par un détecteur de radioactivité en flux continu.

Ce protocole a été validé à partir de microsomes hépatiques après incubation avec Δ_4^* et DHA* pour lesquels nous observons un métabolisme important.

Les produits formés sont modifiés qualitativement et quantitativement en présence d'inhibiteurs des cytochromes P450 (aminoglutéthimide et un composé X extrait d'une bruyère).

Il conviendrait cependant de confirmer la nature de ces produits en les séparant sur CLHP à l'aide d'une autre phase mobile (64 % isooctane, 36 % acétate d'éthyle), puis de pratiquer une analyse en spectrométrie de masse.

Ce protocole s'avère donc intéressant pour étudier des inhibiteurs de l'aromatase des cellules MCF-7 ; c'est pourquoi, dans un second temps, nous l'avons appliqué à un lysat de cellules MCF - 7. Par notre technique d'analyse nous ne décelons pas de métabolisme ; il faut donc envisager de travailler sur des cellules entières pour tenter de détecter l'activité aromatasique, qui existe, mais qui est relativement faible. Ceci fera l'objet de travaux ultérieurs au sein du laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

ABUL - HAJJ Y.J., IVERSON R. and KIANG D.T. : Aromatization of androgens by human breast cancer.

Steroids, 1979, 33, 205.

ADAMI H.O., MEIRIK O., GUSTAVSSON S., NYREN O., KRUSEMO U.B. : Cholecystectomy and the incidence of breast cancer : a cohort study.

Br. J. Cancer, 1984, 49, 235-239.

AKHTAR M., CALDER M.R., CORINA D.L. and WRIGHT J.N. : Mechanism studies on C-19 demethylation in estrogen biosynthesis.

Biochem J., 1982, 201, 569-580.

BEATSON G.T. : On the treatment of inoperable cases in carcinoma of the mamma : suggestion for new method of treatment with illustrative cases.

Lancet, 1896, 2, 104-107.

BOICE J.D., LAND C.E., SHORE R.E., NORMAN J.E. and TOKUNAGA M. : Risk of breast cancer following low-dose radiation exposure.

Radiology, 1979, 131, 589-597.

BREMOND A. : Epidémiologie des maladies bénignes du sein (M.B.S.) et des lésions frontières. In : Mastopathies bénignes : états précancéreux, dir (Pouilhès J., Combes P.F., eds) Masson, Paris, 1982, pp 42-50.

BRODIE A.M.H. : Aromatase, its inhibitors and their use in breast cancer treatment.

Pharmac. Ther., 1993, 60, 501-515.

BRODIE A.M.H., GARRETT W., HENDRICKSON J.M., MARSH D.A. and BRODIE H.J. : The effect of 1,4,6 androstatriene -3,17 dione (ATD) on DMBA-induced mammary tumors in the rat and its mechanism of action in vivo.

Biochem. Pharmac., 1982, 31, 2017-2023.

BRODIE A.M.H. and INKSTER S.E. : Human testicular aromatase : immunocytochemical and biochemical studies.

J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 1993, 44, 549-555.

BRODIE A.M.H., SCHWARZEL W.C. and BRODIE H.J. : Studies on the mechanism of estrogen biosynthesis in the rat ovary-1.

J. Steroid Biochem., 1976, 7, 787-793.

BRODIE A.M.H., WU J.T., MARSH D.A. and BRODIE H.J. : Aromatase inhibitors III. Studies on the antifertility effects of 4 acetoxy-4-androstene-3, 17-dione.

Biol. Reprod., 1978, 18, 365-370.

DICKSON R.B., MAC MANAWAY M.E. and LIPPMAN M.E. : Estrogen-induced factors of breast cancer cells partially replace estrogen to promote tumor growth.

Science, 1986, 232, 1540-1542.

DRIFE J.O. : Breast cancer, pregnancy and the pill.

Br. Med. J., 1981, 283, 778-779.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP. : Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic or immune therapy.

Lancet, 1992, 339, 1-15.

EDERY M., GOUSSARD J., DEHENNIN L., SCHOLLER R., REIFFSTECK J. and DROSDOWSKY M.A. : Endogenous estradiol-17 β concentration in breast tumours determined by mass fragmentography and by radiomimmunoassay : relationship to receptor content.

Eur. J. Cancer, 1981, 17, 115-120.

FISHMAN J., NISSELBAUM J.S., MENENDEZ-BOTET C.J. and SCHWARTZ M.K. : Estrone and estradiol content in human breast tumors. Relationship to estradiol receptors.

J. Steroid. Biochem., 1977, 8, 893-896.

FITZPATRICK S.L., BRIGHTWELL J., WITTLIFF J.L., BARROWS G.H. and SCHULTZ G.S. : Epidermal growth factor binding by breast tumor biopsies and relationship to estrogen receptor and progesterone receptor levels.

Cancer Res., 1984, 44, 3448-3453.

GRODIN J.M., SHITERI P.K. and MAC DONALD P.C. : Source of estrogen production in postmenopausal women.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 1973, 36, 207.

INKSTER S.E. and BRODIE A.M.H. : Immunocytochemical studies of aromatase in early and full term human placenta tissues : comparison with biochemical assays.

Biol. Reprod., 1989, 41, 889-898.

INKSTER S.E. and BRODIE A.M.H. : Expression of aromatase cytochrome P450 in premenopausal and postmenopausal human ovaries : an immunocytochemical study.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 1991, 73, 717-726.

JAMES V.H.T., MAC NEILL J.M., LAI L.C., NEWTON C.J., GHILCHIK M.W. and REED M.J. : Aromatase activity in normal breast and breast tumour tissues : in vivo and in vitro studies.

Steroids, 1987, 50, 269-279.

KELSEY J.L. and HIDRETH N.G. : Cancer of the breast.

In : Breast and gynecologic cancer epidemiology. (Boca Raton Floride, ed). CRC Press. *INC.*, 1983, pp 5-50.

LIPPMAN M.E., BOLAN G. and HUFF K. : The effects of estrogens and antiestrogens on hormone responsive human breast cancer in long-term tissue culture.

Cancer Res., 1976, 36, 4595-4601.

LIPTON A., SANTEN R.J., SANTNER S.J., HARVEY H.A., SANDERS S.I. and MATTHEWS Y.L. : Prognostic value of breast cancer aromatase.

Cancer, 1992, 70, 1951-1955.

LONGCOPE C. : Methods and results of aromatization studies in vivo.

Cancer Res., 1982, 42 (suppl), 3307 s.

LONGCOPE C., PRATT J.H., SCHNEIDER S.N. and FINEBERG S.W. : Aromatization of androgens by muscle and adipose tissue in vitro.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 1978, 46, 146-152.

MAC GUIRE W.L. : An update on estrogen and progesterone receptors in prognosis for primary and advanced breast cancer.

In : Hormones and Cancer. (Jacobelli S.,ed Raven press, New York), 1980, 15, pp 337-344.

MAC INDOE J.H. : Estradiol formation from testosterone by continuously cultured human breast cancer cells.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 1979, 49, 272-277.

MAC MAHON B., COLE P., BROWN J. et al : Etiology of human breast cancer : a review

J. Nat. Cancer Inst., 1973, 50, 21-42.

MAC MAHON B., COLE P., LIN T.M., et al : Age at first birth and breast cancer risk.

Bull. Who., 1970, 43, 209-221.

MAUVAIS-JARVIS P. ET KUTTEN F. : L'insuffisance en progestérone est-elle cancérigène ?

Nouv. Presse Méd., 1975, 4, 323-326.

MEANS G.D., MAHENDROO M.S., CORBIN J., MATHIS J.M., POWELL F.E., MENDELSON C.R. and SIMPSON E.R. : Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis.

J. Biol. Chem., 1989, 264, 19385-19391.

MILLER W.R. : Aromatase activity in breast tissue.

J. Steroid. Biochem. Molec. Biol., 1991, 39, 783-790.

MILLER W.R. and FORREST A.P.M. : Estradiol synthesis from C19 steroids by human breast cancer.

Br. J. Cancer, 1974, 33, 16-18.

MILLER W.R., HAWKINS R.A. and FORREST A.P.M. : Significance of aromatase activity in human breast cancer.

Cancer Res., 1982, 42 (Suppl), 3365-3368.

MOOLGAVKAR S.H., DAY N.E. and STEVENS R.C. : Two stage model for carcinogenesis : epidemiology of breast cancer in females.

J. Nat. Cancer Inst., 1980, 65, 559-569.

MOUSAVI Y. and ADLERCREUTZ H. : Genistein is an effective stimulator of sex hormone binding globin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture.

Steroids, 1993, 58, 301-304.

NAJID A and HABRIOUX G : Biological effects of adrenal androgens on MCF-7 and BT-20 human breast cancer cells.

Oncology., 1990, 47, 269-274.

NANDI S. : Role of hormones in mammary neoplasia.

Cancer Res., 1978, 38, 4046-4049.

OH S. S. and ROBINSON C.H. : Mechanism of human placental aromatase : a new active site model.

J. Steroid. Biochem. Molec. Biol., 1993, 44, 389-397.

O'NEILL J.S., ELTON R.A. and MILLER W.R. : Aromatase activity in adipose tissue from breast quadrants : a link with tumour site.

Brit. Med. J., 1988, 296, 741-743.

OSAWA Y, and HIGASHIYAMA T. : In Microsomes, drug oxidations and chemical carcinogenesis (Coon M. J., Conney A. H., Estabrook R. W., Gelboin H. V., Gileete J. R. and O'Brian P. J. eds) Academic Press, New York, 1984, 1, pp 225-232.

PASQUALINI J.R. : Breast cancer, present and future.

J. Steroid. Biochem. Molec. Biol., 1994, 51, 5-6.

PASQUALINI J.R. et GELLY G. : Cancer du sein, mecanisme d'action des antiestrogènes.

Path. Biol., 1988, 36, 979-982.

PEREL E. and KILLINGER D.W. : The interconversion and aromatization of androgens by human adipose tissue.

J. Steroid. Biochem., 1979, 10, 623-627.

POORTMAN J., THIJSEN J.H.H. and SCHWARZ F. : Androgen production and conversion to estrogens in normal postmenopausal women and in selected breast cancer patients.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 1973, 37, 101.

PRESCHTEL K. : Cited in barth, V. Atlas of diseases of the breast .

Year Book Medical Publishers : Chicago, 1979, p 11.

REED M.J., TOPPING L., COLDHAM N.G., PUROHIT A., GHILCHIK M.W. and JAMES V.H.T. : Control of aromatase activity in breast cancer cells : the role of cytokines and growth factors.

J. Steroid. Biochem. Molec. Biol., 1993, 44, 589-596.

ROSENBERG L., SCHWINGL P.J., KAUFMAN D.W. et al : Breast cancer and cigarette smoking.

N. Engl. J. Med., 1984, 310, 92-94.

ROSENWALD J.C. : Irridiation du sein lors des examens mammographiques.

In : Cours de mammographie(Le Trent A, ed) Bordeaux Fondation Bergonié : 1983, pp 23-31.

ROUESSE J. et CONTESSO G. : Le cancer du sein.

Institut Gustave Roussy, Villejuif, HERMAN 1985.

SAMOJLIK E., SANTEN R.J. and WORGUL T.J. : Plasma estrone sulfate : assessment of reduced estrogen production during treatment of metastatic breast carcinoma.

Steroids, 1982, 39, 497-507.

SANTEN R.J., BOUCHER A.E., SANTNER S.J., HENDERSON I.C., HARVEY H. and LIPTON A : Inhibition of aromatase as treatment of breast carcinoma in postmenopausal women.

J. Lab. Clin. Med., 1987, 109, 278-289.

SANTNER S.J., FEIL P.D. and SANTEN R.J. : In situ estrogen production via the estrone sulfatase pathway in breast tumors : relative importance versus the aromatase pathway.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 1984, 59, 29-33.

SANTNER S.J., LESZCZYNSKI D., WRIGHT C., MANNI A., FEIL D. and SANTEN R.J. : Estrone sulfate : a potential source of estradiol in human breast cancer tissue.

Breast Cancer Res. Treat., 1986, 7, 35-44.

SCHWARZEL W.C., KRUGGEL W. and BRODIE H.J. : Studies on the mechanism of estrogen biosynthesis VII. The development of inhibitors of the enzyme system in human placenta.

Endocrinol., 1973, 92, 866-880.

SCHWEIKERT H.U., MILEWICH L. and WILSON J.D. : Aromatization of androstenedione by isolated human hairs.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 1975, 40, 413.

SCHWEIKERT H.U., MILEWICH L. and WILSON J.D. : Aromatization of androstenedione by cultured human fibroblasts.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 1976, 43, 785-795.

SHAPIRO S. : Evidence on screening for breast cancer from a randomized trial.

Cancer, 1977, 39, 2772-2782.

SHERMAN B.M. and KORENMAN S.G. : Inadequate corpus luteum function : a pathophysiological interpretation of human breast cancer epidemiology.

Cancer, 1974, 33, 1306-1312.

SIITERI P. K. : Review of studies of estrogen biosynthesis in the human.

Cancer Res., 1982, 42 (suppl), 3269 s.

SMUK M. and SCHIVERS J. : Aromatization of androstenedione by human adult liver in vitro.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 1977, 45, 1009.

SOBOL H. : Génétique et cancer du sein. Le cancer du sein.

Cours Supérieur Francophone de Cancérologie IV, 14-15-16 Janvier 1993.

THOMPSON E.A. Jr. and SIITERI P.K. : Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione.

J. Biol. Chem., 1974, 249, 5364-5372.

THIJSEN J.H.H., DAROSZEWSKI J., MILEWICZ A. and BLANKENSTEIN M.A. : Local aromatase activity in human breast tissue.

J. Steroid. Biochem. Molec. Biol., 1993, 44, 577-582.

TILSON-MALLET N., SANTNER S.J., FEIL P.D. and SANTNEN R.J. : Biological significance of aromatase activity in human breast tumors.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 1983, 57, 1125-1128.

TOWNSLEY J.D. and BRODIE H.J. : Studies on mechanism of estrogen biosynthesis III. The stereochemistry of aromatization of C19 and C18 steroids.

Biochem., 1968, 7, 33-40.

TSENG L., GURPIDE E. : Stimulation of various 17β - and 20α - hydroxysteroid dehydrogenase activities by progestins in human endometrium.

Endocrinol., 1979, 104, 1745-1748.

VORHERR H. : Conditions potentially protective against breast cancer.

In : Breast cancer epidemiology, endocrinology, biochemistry and pathobiology. (VORHERR H. ed). Baltimore-Munich. Urban and Schwarzenberg, 1980, pp 81-106.

WEISZ J. : In vitro assays of aromatase and their role in studies of estrogen formation in target tissues.

Cancer Res., 1982, 42 (suppl), 3295s.

WEISZ J., BROWN B.L. and WARD LL. : Maternal stress decreases steroid aromatase activity in brains of male and female rat fetuses.

Neuroendocrinol. , 1982, 35, 374.

BON A IMPRIMER N° 37

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME :

Il a été montré que chez les femmes après la ménopause, la quasi-totalité des estrogènes produits résulte de la conversion périphérique des androgènes surrénaliens par un complexe enzymatique : l'aromatase.

Dans ce travail nous présentons un modèle d'étude de cette aromatase applicable aux cellules cancéreuses mammaires MCF-7 pour mesurer son activité.

A l'aide de microsomes hépatiques de rat, un protocole expérimental permettant de mettre en évidence les métabolites formés à partir de deux androgènes radioactifs (androstènedione et déhydroépiandrostérone) est proposé :

- 1- extraction des stéroïdes
- 2- séparation des stéroïdes par chromatographie liquide haute performance
- 3- détection des stéroïdes par un détecteur de radioactivité en flux continu.

Les produits formés sont modifiés qualitativement et quantitativement en présence d'inhibiteurs des cytochromes P450.

Dans un second temps ce protocole a été appliqué à un lysat de cellules MCF-7.

MOTS CLES :

- Cellules MCF-7
- Aromatase
- Estrogènes
- Androgènes
- Microsomes
- Cancer du sein