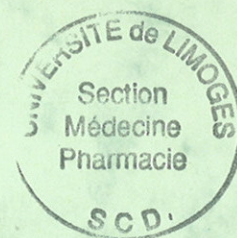


UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE



ANNEE 2003

THESE N° 345/11

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 130346 9

**INFLUENCE DE L'APIGENINE ET
DE SES METABOLITES SUR LA
PROLIFERATION DES
CELLULES MCF-7**

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 2003

Par

Laurent MONGER

Né le 19 février 1975 à Limoges

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : Madame C. DELAGE, Professeur des Universités

Juges : Madame D. ALLAIS, Maître de Conférences

Monsieur J.P. BASLY, Maître de Conférences, Directeur de Thèse

Monsieur S.BERNARDAUD, Docteur en Pharmacie

Monsieur A.SIMON, Maître de Conférences.

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

ASSESEURS

Madame le Professeur **CHULIA** Dominique

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis

BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOSGIRAUD Claudine

BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE - PARASITOLOGIE

BOTINEAU Michel

BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE

BROSSARD Claude

PHARMACIE GALENIQUE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACIE GALENIQUE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE - CHIMIE MINERALE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE

GHESTEM Axel

BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE - HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT

LOUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Madame **ROCHE** Doriane

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy

BASLY Jean-Philippe

BATTU Serge

CALLISTE Claude

CARDI Patrice

CLEDAT Dominique

COMBY Francis

DELEBASSEE Sylvie

DREYFUSS Marie-Françoise

EA KIM Leng (CLM)

FAGNERE Catherine

FROISSARD Didier

FOURNIER Françoise

JAMBUT Anne Catherine

LAGORCE Jean-François

LARTIGUE Martine

LIAGRE Bertrand

LOTFI Hayat

MARION-THORE Sandrine

MOREAU Jeanne

PARTOUCHE Christian

ROUSSEAU Annick

SIMON Alain

TROUILLAS Patrick

VIANA Marylène

VIGNOLES Philippe

ASSISTANT

FAURE Monique

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel

ATER

BELLETT Virginie

DUCHIRON Cécile

PHARMACOGNOSIE

CHIMIE ANALYTIQUE

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BIOPHYSIQUE

PHYSIOLOGIE

CHIMIE ANALYTIQUE

CHIMIE THERAPEUTIQUE

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

PHARMACODYNAMIE

CHIMIE ORGANIQUE

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE

BIOCHIMIE

CHIMIE THERAPEUTIQUE

CHIMIE ORGANIQUE

PHARMACODYNAMIE

SCIENCES BIOLOGIQUES

TOXICOLOGIE

CHIMIE THERAPEUTIQUE

IMMUNOLOGIE

PHYSIOLOGIE

BIOMATHEMATIQUE

CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE

BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

PHARMACIE GALENIQUE

INFORMATIQUE

PHARMACIE GALENIQUE

ANGLAIS

**A MADAME LE DOCTEUR C.DELAGE
PROFESSEUR DES UNIVERSITES**

Madame, nous avons été votre élève et nous vous remercions de la qualité exemplaire de l'enseignement que vous nous avez prodigué.

Nous vous exprimons ici notre reconnaissance pour la considération que vous avez bien voulu apporter à ce travail .

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury, soyez assuré de notre respectueuse gratitude.

**A MADAME LE DOCTEUR D.ALLAIS
MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES**

Vous nous avez enseigné les travaux pratiques de pharmacognosie avec un intérêt communicatif.

Voyez dans ce travail le prolongement de cet intérêt partagé pour cette discipline.

Nous vous remercions de participer à notre jury.

**A MONSIEUR LE DOCTEUR J.P. BASLY
MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES**

Vous nous avez fait confiance. Vous nous avez communiqué votre dynamisme et aidé à construire ce travail de recherche. Que ce travail soit le témoignage de notre profonde et respectueuse reconnaissance.

**A MONSIEUR LE DOCTEUR S.BERNARDAUD
PHARMACIEN A LIMOGES**

Vous avez été notre maître de stage Vous nous avez toujours enrichi de votre expérience en nous accueillant dans votre officine. Nous vous exprimons notre chaleureuse reconnaissance pour nous avoir fait partager avec générosité votre intérêt et votre rigueur de l'exercice de la Pharmacie . Nous vous remercions de participer à notre jury.

A MONSIEUR LE DOCTEUR A.SIMON
MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES

Vous nous avez guidé dans les travaux de cultures cellulaires. Vous avez fait preuve d'une grande disponibilité à notre égard.

Nous vous remercions de participer à notre jury.

A mes parents

A ma famille

A mes amis musiciens

PLAN

I. INTRODUCTION

II. GENERALITES SUR LE CANCER DU SEIN. LA LIGNEE

CELLULAIRE MCF-7

II.1. Généralités sur le cancer.

II.1.1. Epidémiologie du cancer du sein

II.1.2. Origine du cancer

II.1.3. Bases génétiques

II.1.4. Fonctions des facteurs oncogènes au niveau cellulaire

II.2. La lignée cellulaire carcino-mammaire MCF-7

II.2.1. Origine des cellules

II.2.1.1. Historique

II.2.1.2. Anatomie-histologie

II.2.1.2.1. Le sein

II.2.1.2.2. Le canal galactophore

II.2.2. Les différentes découvertes

II.2.2.1. Les récepteurs

II.2.2.1.1. Les récepteurs œstrogéniques

II.2.2.1.2. Les autres récepteurs

II.2.2.2. Les enzymes de cette lignée cellulaire

II.2.2.2.1. Les enzymes de la biosynthèse des stéroïdes

II.2.2.2.2. Les enzymes de détoxification

II.2.2.2.2.1. Les cytochromes (CYP 450) (phase I)

II.2.2.2.2.2. Les sulfotransférases (SULT) (phase II)

II.2.2.2.2.3 Les sulfatases

II.2.2.2.2.4. La catéchol-O-méthyltransférase

II.2.2.2.2.5 Les UDP-glucuronosyltransférases

II.2.2.3 Les facteurs de croissance

III. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'APIGENINE

IV. COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE

LIQUIDE/SPECTROMETRIE DE MASSE

IV.1. Appareillage

IV.1.1. Chromatographie liquide haute performance

IV.1.2. Le Spectromètre de masse

IV.1.2.1. La source d'ionisation : l'électrospray

IV.1.2.2. L'analyseur quadripolaire

V. PROLIFERATION CELLULAIRE

V.1. Matériels et méthodes

V.1.1. Matériels et produits chimiques pour la culture cellulaire

V.1.1.1 Récipients de culture cellulaire à usage unique

V.1.1.1.1. Boîte de 25 cm²

V.1.1.1.2. Plaques 6 puits

V.1.1.2. Le milieu de culture

V.1.1.3. Produits chimiques

V.1.1.4. La hotte

V.1.1.5. L'incubateur

V.1.2. Cellules MCF-7

V.1.3. Protocole

V.2. Résultats

V.2.1. Résultats des boîtes de 25 cm²

V.2.2. Résultats sur plaques 6 puits

VI. METABOLISME CELLULAIRE

VI.1. Matériels et méthodes

VI.1.1. Extraction solide/liquide

VI.1.2. Sonication des culots cellulaires

VI.1.3. Analyse par CLHP/SM

VI.1.3.1. Colonnes

VI.1.3.2. Gradient

VI.1.3.3. Paramètres d'acquisition en électrospray négatif

VI.2. Résultats

VI.2.1 Analyse des culots cellulaires

VI.2.2 Analyse des surnageants

VI.2.2.1 Quantification des métabolites

VI.2.2.2. Relation entre mort cellulaire et excrétion

VII. DISCUSSION

VIII. CONCLUSION

ANNEXES

TESTS STATISTIQUES

TABLE DES FIGURES

TABLE DES TABLEAUX

STRUCTURE CHIMIQUE DES METABOLITES DE L'APIGENINE

I. INTRODUCTION

Le fait qu'une alimentation riche en fruits et légumes (ex : régime méditerranéen, régime asiatique) soit associée à une diminution du risque de cancer est aujourd'hui acquise. Ce fait serait pour partie dus aux effets biochimiques (antioxydants, antimutagènes, antiproliférateurs...) de certains composés (caroténoïdes, flavonoïdes et autres polyphénols, terpénoïdes). Certains ont également des propriétés endocriniennes (phytoestrogènes), ou sont capables de moduler le métabolisme de cancérigènes (flavonoïdes, caroténoïdes, terpénoïdes). L'identification des mécanismes expliquant leurs effets biologiques a permis d'apporter des arguments en faveur d'un effet préventif entraînant un engouement pour la consommation de plantes qui en contiennent (ex : produits dérivés du soja). Un suivi épidémiologique des populations asiatiques, gros consommateurs de phytoestrogènes tels que la génistéine et la daidzéine, présents en quantités importantes dans le soja, montre une incidence plus faible de cancers hormonodépendants du sein par comparaison avec les populations des pays industrialisés occidentaux dont la consommation de viande est croissante au détriment des fruits et légumes.

L'apigénine s'inscrit parmi les nombreux phytomicronutriments que nous ingérons dans une alimentation occidentale (*méditerranéenne*). Ce phytoestrogène a fait l'objet d'un nombre important d'études et présente des analogies structurales avec les stéroïdes endocriniens endogènes tels que les œstrogènes (œstradiol et œstrone). Cette analogie de structure lui confère une affinité de liaison pour les récepteurs œstrogéniques et ce flavonoïde présente par conséquent des propriétés agonistes/antagonistes envers ces récepteurs.

L'étiologie des cancers du sein hormonodépendants est due à un climat œstrogénique endogène important des tissus possédant des récepteurs œstrogéniques. Ainsi, une puberté précoce, une ménopause tardive, la nulliparité, la consommation d'hormone exogènes (contraceptifs oraux, traitements des effets de la ménopause) sont des facteurs de risques vis à vis des cancers hormonodépendants .

Ce travail de thèse s'inclut dans un projet de recherche sur le rôle des phytoestrogènes dans la genèse et la prévention des cancers hormonodépendants et vise à préciser l'influence de l'apigénine sur la lignée cancéreuse mammaire hormonodépendante MCF-7.

Les résultats s'articulent autour de trois études :

- a) l'influence de l'apigénine sur la prolifération cellulaire de lignées MCF-7 (cellules hormonodépendantes du sein) à des concentrations croissantes jusqu'à obtenir la dose létale. l' IC_{50} (concentration en apigénine provoquant 50% de mortalité dans notre culture cellulaire) sera déduite de cette étude ;
- b) de préciser le métabolisme de ce flavonoïde dans cette lignée cellulaire ;
- c) de relier prolifération cellulaire et métabolisme par le biais des différents mécanismes biochimiques propres aux cellules cancéreuses hormonodépendantes trouvés dans la littérature.

II. GENERALITES SUR LE CANCER DU
SEIN. LA LIGNEE CELLULAIRE MCF-7.

II.1. Généralités sur le cancer.

II.1.1. Epidémiologie du cancer du sein.

Le taux d'incidence du cancer du sein, c'est à dire le nombre de nouveau cas de cancer apparaissant chaque année pour 100 000 ajustés sur la population mondiale, est de 83. C'est actuellement le cancer le plus fréquent chez la femme (figure 1).

Taux d'incidence des cancers /100 000 ajustés sur la population mondiale

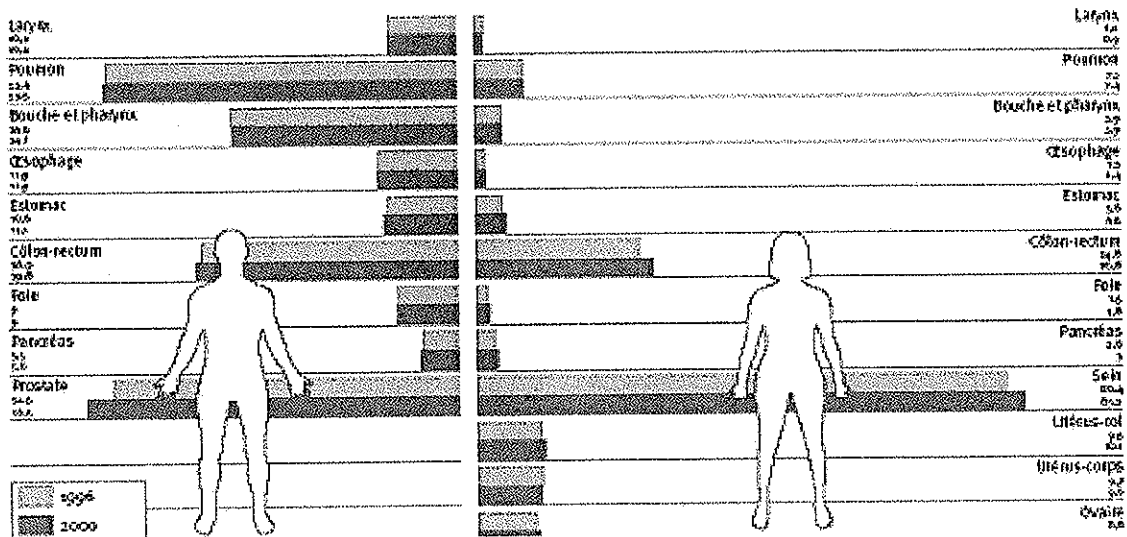


Figure 1 : Taux d'incidence des cancers (Gentry *et al*, 2002)

En France, le cancer du sein est la première cause de mortalité féminine avec un nombre annuel proche de 10 000 (INSERM 1994) et le taux de mortalité a augmenté entre 1950-1980.

Cette augmentation trouve sûrement une explication dans le mode de vie des femmes :

- (i) changements des habitudes alimentaires (obésité) ;
- (ii) caractéristiques de la vie reproductive (diminution de l'âge des premières règles, nulliparité ou première grossesse menée à terme tardive, baisse du nombre d'enfant, ménopause tardive).

Le taux de mortalité est de 35/100 000 femmes depuis 1980 et l'incidence croit avec l'âge : 56% des personnes atteintes de cancer du sein ont plus de 60 ans.

Dans les pays occidentaux (Europe du Nord, Etats-Unis), le cancer du sein est celui dont l'incidence est la plus élevée. Les plus faibles sont observés principalement en Asie. Ainsi, les cancers du sein présentent des taux 3 à 4 fois supérieurs dans les pays occidentaux (Hollande, Royaume Uni, Etats-Unis, France) comparés aux populations asiatiques (RP Chine, Taiwan, Japon ou Thaïlande). Ces populations asiatiques ont une alimentation traditionnelle végétale, l'aliment de base restant le soja riche en phytoestrogènes (daidzeine et génistéine). Une incidence faible est également à noter pour les populations végétariennes qui présentent de fortes concentrations en phytoestrogènes dans leurs urines. Ces populations s'opposent aux pays riches occidentaux dont la consommation en protéines animales ou en graisse animale (charcuteries, fromages, beurre) est quatre fois supérieure aux pays asiatiques (figure 2).

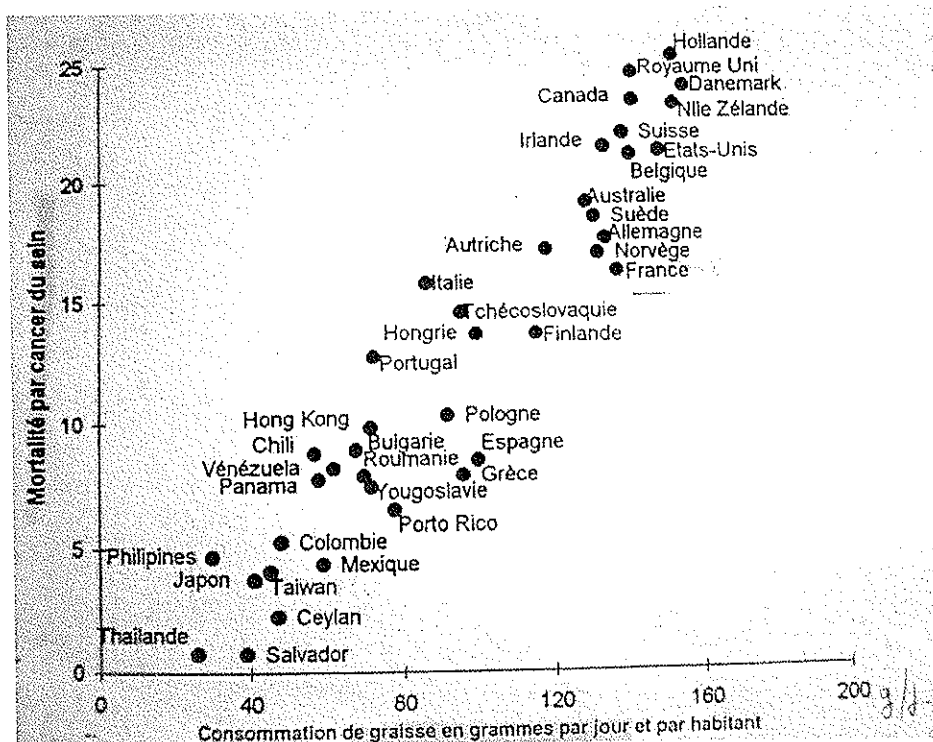


Figure 2 : Mortalité par cancer du sein en fonction de la consommation de graisse

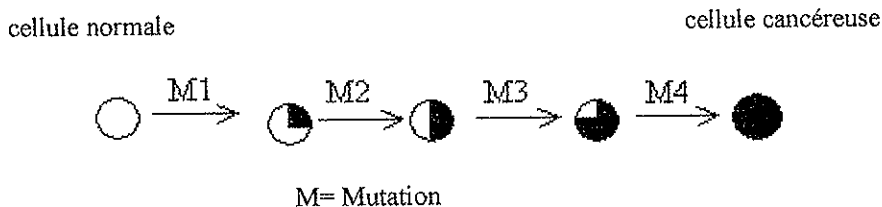
Il a également été observé que les populations asiatiques migrantes dans les pays occidentaux (Etats-Unis) et dont l'alimentation s'appauvrit en constituants végétaux présentent une incidence du cancer du sein proche des populations occidentales. Il est enfin à noter que les symptômes de la ménopause sont aussi plus faibles chez la femme japonaise que chez la femme américaine.

Les facteurs hormonaux prédisposant au cancer du sein sont :

- a) la nulliparité ou l'âge de la première grossesse tardive ;
- b) une ménopause tardive ;
- c) l'hyperoestrogénie relative, les irrégularités menstruelles ;
- d) pas d'allaitement ;
- e) les facteurs de risque liés aux mastopathies bénignes ;
- f) la contraception hormonale créant une imprégnation hormonale à composante œstrogénique ou progestative dominantes.

II.1.2. Origine du cancer

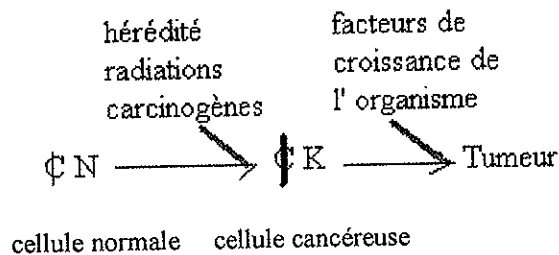
Le cancer est une anomalie génétique somatique due à une altération du génome en un point dans 90 à 95 % des cas et 4 à 10 % des cancers sont héréditaires génétiques. La majorité des cancers proviennent d'une seule cellule anormale et plusieurs mutations acquises sur une cellule et sa descendance sont nécessaires pour aboutir à une cellule cancéreuse : c'est la progression tumorale.



Il faut par conséquent du temps pour modifier un génome ; dans le cas d'Hiroshima et Nagasaki, le pic des cancers dans ces populations a eu lieu au bout de 8 ans.

Au cours d'une vie, il y a 10^{16} divisions cellulaires et chaque gène a 10^{10} chances distinctes de mutation. Dans un environnement favorable, le taux de mutation est de 10^{-6} mutations par gène et par division. Ces mutations en cascade présentent plusieurs étapes : (i) étape d'initiation ; (ii) étape de promotion ; (iii) étape de progression.

Ces mutations touchent tous les tissus, notamment les cellules épithéliales qui sont les cellules les plus exposées aux facteurs physicochimiques et celles dont la multiplication cellulaire est la plus forte. Ainsi 90% des cancers sont des carcinomes et les mutations de ces cellules conduisent à des adénocarcinomes épithélioma.



Les mutations qui font passer une cellule normale à une cellule cancéreuse sont dues à l'hérédité, aux radiations et aux carcinogènes. Les facteurs de croissance de l'organisme sont synthétisés par les cellules cancéreuses ou les cellules avoisinantes et provoquent la formation d'une tumeur ; lors de sa détection la tumeur contient tout au plus un milliard de cellules.

II.1.3. Bases génétiques

Un gène oncogène incitera la cellule à se multiplier de façon non contrôlé (par exemple l'oncogène erbB rencontré dans le cancer du sein). Par opposition l'anti-oncogène ou gène suppresseur de tumeur inhibe l'action de l'oncogène par action simultanée sur la mitose (figure 3).

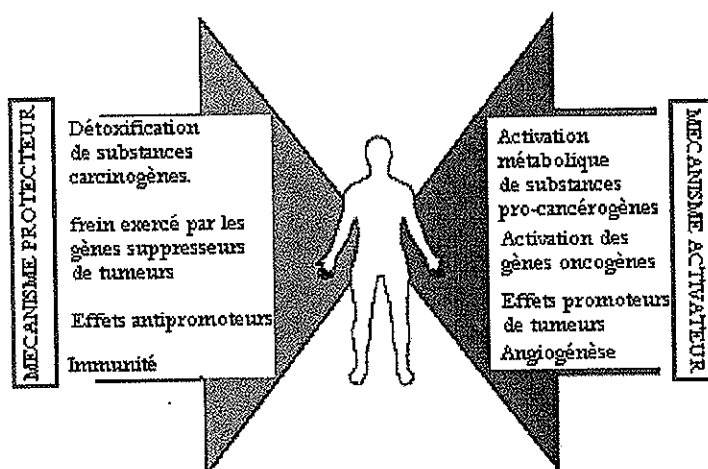


Figure 3 : Mécanismes protecteurs et activateurs

L'anti-oncogène agira sur la mitose, la différenciation cellulaire, et sur l'apoptose (exemple : gène p53). La prolifération cellulaire ainsi régulée sera normale (figure 4).

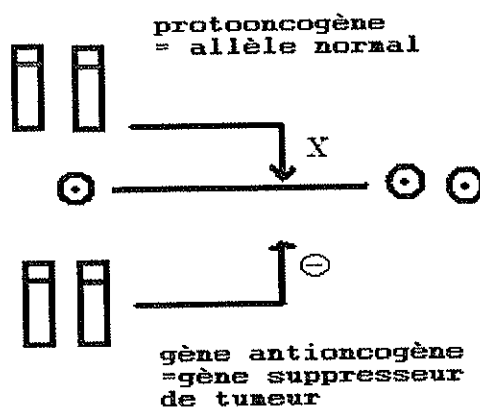


Figure 4 : Prolifération cellulaire régulée

Une mutation peut survenir sur un des allèles pro-oncogènes. On a alors un gène oncogène qui est un gène stimulateur hyperactif dominant. Une mutation récessive peut survenir sur les 2 allèles d'un gène inhibiteur et dans ce cas les deux allèles du gène sont inactivés. Il survient

alors une mutation dite récessive. Une amplification ou une translocation sur l'un ou les deux allèles du gène suppresseur entraînera une prolifération tumorale (figure 5).

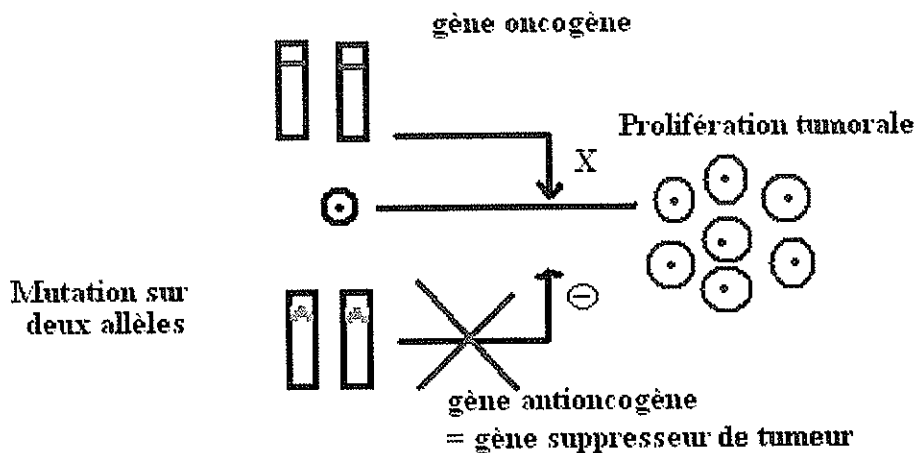


Figure 5 : Prolifération tumorale

II.1.4. Fonctions des facteurs oncogènes au niveau cellulaire

La fonction des oncogènes est de coder pour des protéines : (a) les facteurs de croissances (PDGF.....); (b) les récepteurs membranaires; (c) les éléments de signalisation intracytoplasmiques et intranucléaires; (d) les activateurs de la tyrosine kinase.

Il y a subversion des voies métaboliques impliquées dans la prolifération cellulaire et dans la différenciation cellulaire. Tout ce mécanisme s'auto-entretient et s'accélère en boucle induisant la prolifération cellulaire (figure 6 et 7).

Il y a progression tumorale et invasion des tissus aboutissant aux métastases (figure 8). La tumeur fabrique donc des facteurs de croissance (PDGF, EGF) qui induisent une angiogénèse tumorale par fabrication de cellules endothéliales. L'angiogénèse permet l'apport d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance cellulaire.

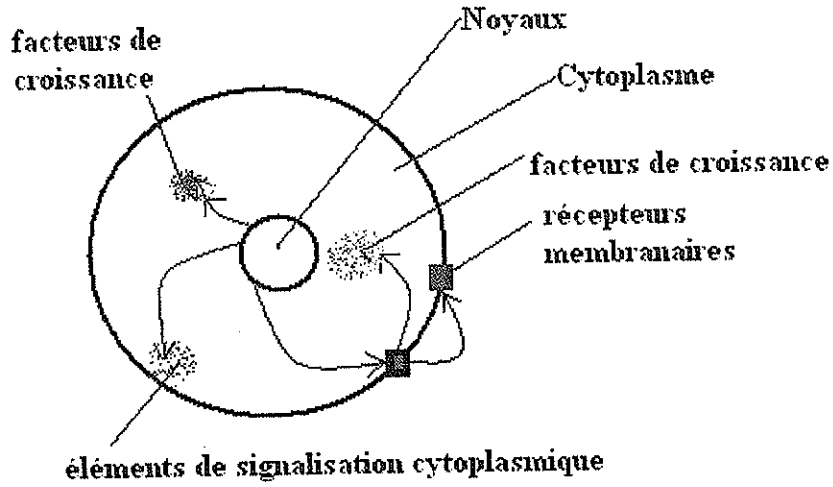


Figure 6 : Action des facteurs oncogènes au niveau cellulaire

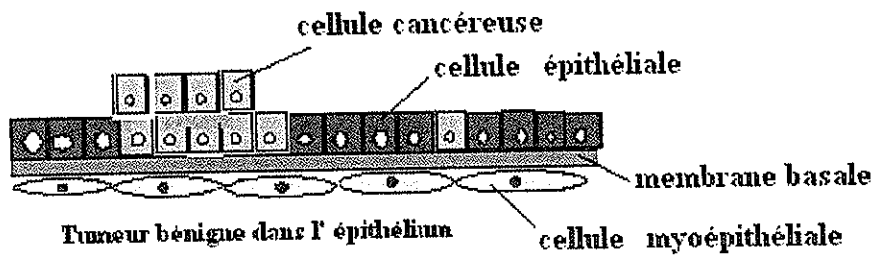
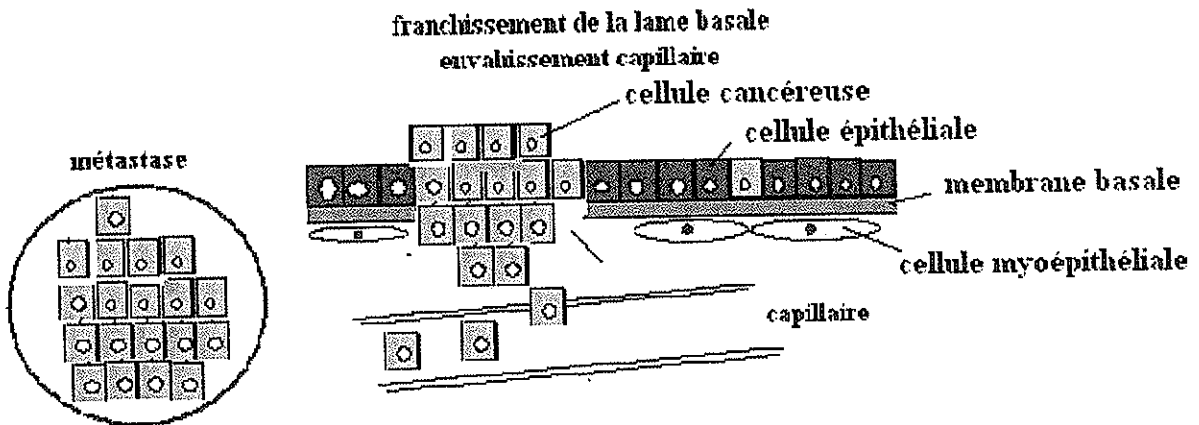


Figure 7 : Tumeur bénigne dans l'épithélium



cellules cancéreuses se fixant au niveau d'un organe périphérique

Figure 8 : Franchissement de la lame basale et envahissement capillaire.

La structure des vaisseaux néoformés est fragile. Ces vaisseaux envahissent les tissus périphériques de la tumeur. C'est un élément dans le processus de progression tumorale.

Les cellules cancéreuses épithéliales évoquées ci-dessus perdent leurs liaisons intercellulaires ; les enzymes protéolytiques coupent les liaisons liant les cellules à la membrane basale. La rupture de la membrane basale entraîne un processus invasif et provoque une atteinte minimale du tissu conjonctif. La rupture de la paroi vasculaire engendrée par les protéases entraîne un embolie vasculaire et provoque une augmentation du potentiel métastatique. Les cellules cancéreuses vont alors se fixer sur un organe hôte.

II.2. La lignée cellulaire carcino-mammaire MCF-7

II.2.1. Origine des cellules

II.2.1.1. Historique

Ces cellules ont été prélevées chez une patiente d'origine caucasienne âgée de 69 ans et originaire de la région de Détroit (Levenson *et al*, 1997). Ces cellules ont été cultivées pour la première fois en 1972 par le Dr. Herbert Soule à la Fondation de Lutte contre le Cancer de l'état du Michigan (figure 9). Les cellules proviennent d'une lignée cellulaire dérivant d'une effusion pleurale d'un cancer du sein métastasé. Cette patiente avait subi une mastectomie de son sein droit pour une tumeur bénigne et une ablation totale du sein gauche pour un adénocarcinome canalaire infiltrant.

Cette patiente avait été traitée par de fortes doses d'un œstrogène de synthèse, le diéthylstilbestrol. Il est à noter que les cellules étaient RE⁺ (récepteurs œstrogéniques positifs).

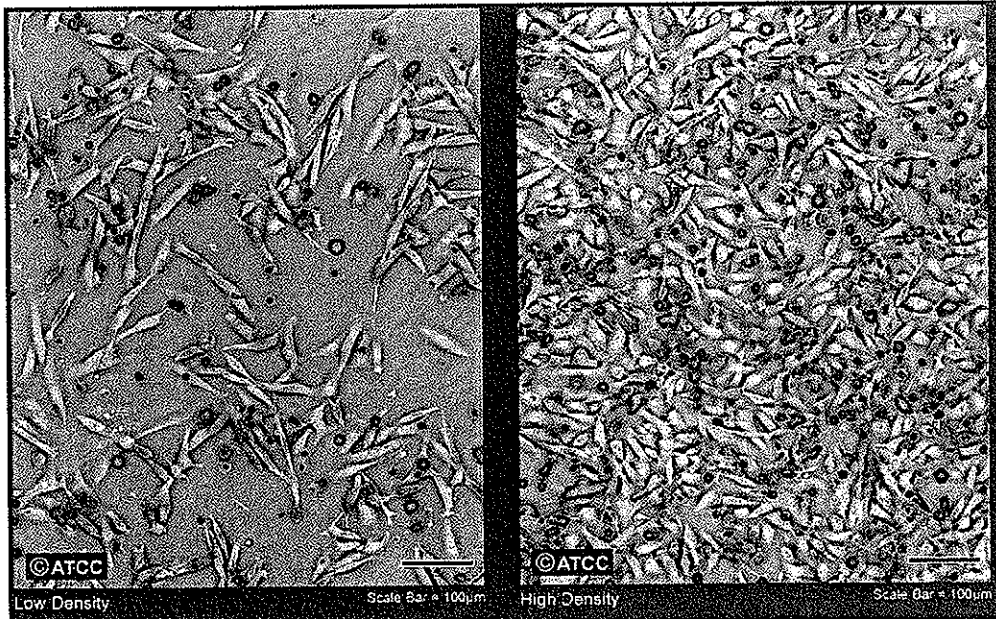


Figure 9 : Cellules MCF-7

II.2.1.2. Anatomie-histologie

II.2.1.2.1. Le sein

Le sein est un cône à base thoracique dont le sommet est le mamelon (figure 10). Le mamelon est entouré de l'aréole où débouchent les glandes sébacées.

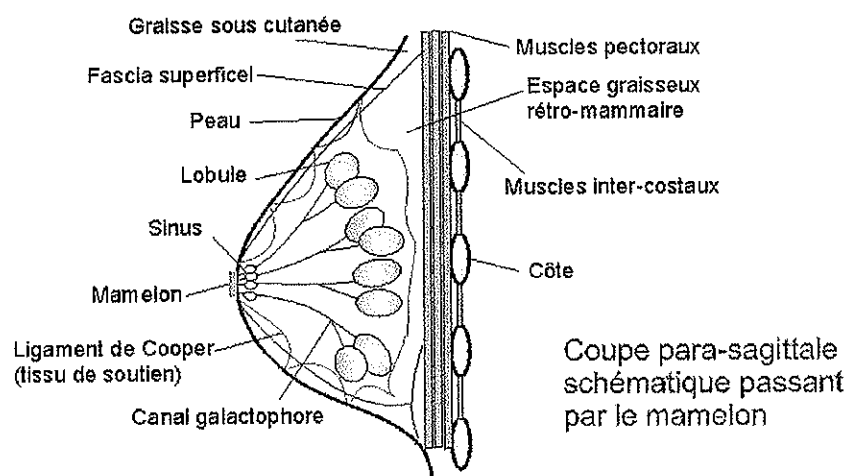


Figure 10 : Coupe para-sagittale du sein

A la surface du mamelon débouchent 12 à 20 orifices correspondant à l'abouchement d'un canal galactophore interlobaire bordé d'un épithélium bistratifié, la couche interne étant constitué de cellules myoépithéliales. Le canal interlobulaire se dilate en un sinus galactophore. Le parenchyme mammaire est constitué de 15 à 20 lobes distincts drainés par un canal galactophore interlobaires. Les canaux interlobulaires se termineront par des groupes de canaux intralobulaires, chaque groupe constituant un lobule mammaire de forme ovoïde.

II.2.1.2.2. Le canal galactophore

Les constituants épithéliaux des canaux galactophores intralobaires et extralobulaires et des canaux mammaires intralobulaires peuvent subir une transformation cancéreuse (figure 11 et 12).

Les cancers provenant des canaux intralobulaires sont appelées carcinomes lobulaires (10%) et ceux provenant des canaux galactophores sont appelées carcinomes canaux (90%). La glande mammaire est riche en petits vaisseaux sanguins facilitant la dissémination cancéreuse. Il est à noter que la dissémination par voie sanguine des cellules cancéreuses se fait vers les poumons et les os. Les MCF-7 sont des cellules adhérentes dérivant des canaux galactophores et ont la morphologie des cellules épithéliales.

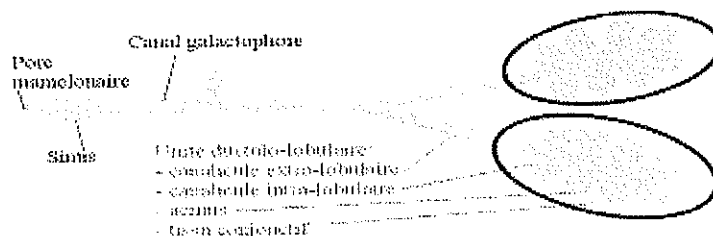


Figure 11 : Coupe du canal galactophore

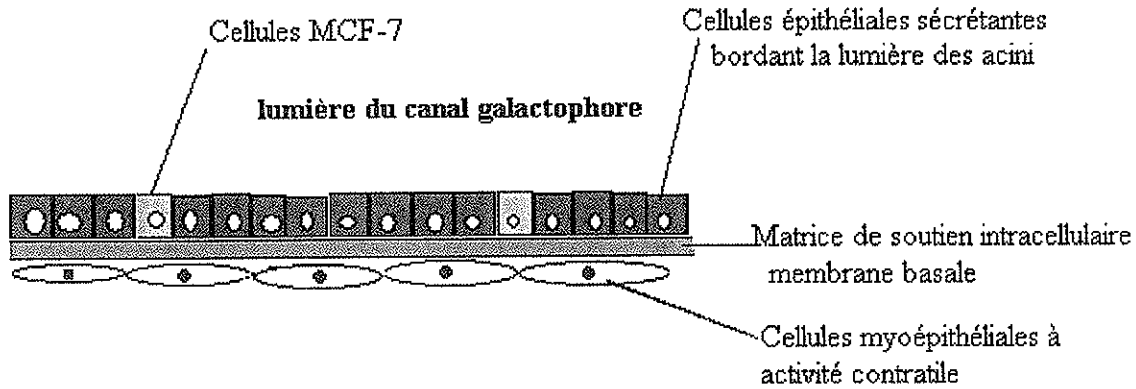


Figure 12 : Histologie du canal galactophore

II.2.2. Les différentes découvertes

II.2.2.1. Les récepteurs

II.2.2.1.1. Les récepteurs œstrogéniques

Le Dr. Sam Brooks (Brooks *et al*, 1973), collaborateur du Dr Soule, a été le premier à décrire les récepteurs œstrogéniques par la technique de Scatchard. En 1975, le Dr Marc Lippman (Lippman *et al*, 1975) a démontré que l'anticœstrogène Tamoxifène inhibe la croissance des cellules MCF-7 mais que cette inhibition pouvait être inversée par les œstrogènes. En 1977, Zava et McGuire (Zava *et al*, 1977), utilisant les méthodes d'analyse par fractionnement, trouve des récepteurs œstrogéniques inoccupés dans le nucléoplasme des cellules MCF-7. King et Greene (King *et al*, 1984), à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs aux œstrogènes, démontrent que les récepteurs œstrogéniques sont situés dans le noyau des cellules MCF-7.

Les hormones stéroïdiennes diffusent directement à travers la membrane plasmique des cellules MCF-7 et se fixent sur les récepteurs protéiques intracellulaires (figure 13). Dans sa forme inactive, le récepteur est lié à un complexe protéique contenant une protéine inhibitrice, la protéine de choc thermique Hsp90.

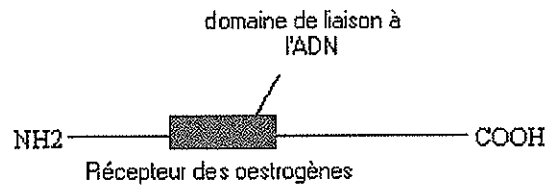


Figure 13 : Modèle d'un récepteur œstrogénique intracellulaire. Domaine de liaison (récepteurs aux œstrogènes) des cellules MCF-7

La fixation de l'œstrogène sur son récepteur entraîne la dissociation du complexe inhibiteur, activant le récepteur en exposant son site de fixation sur l'ADN (figure 14).

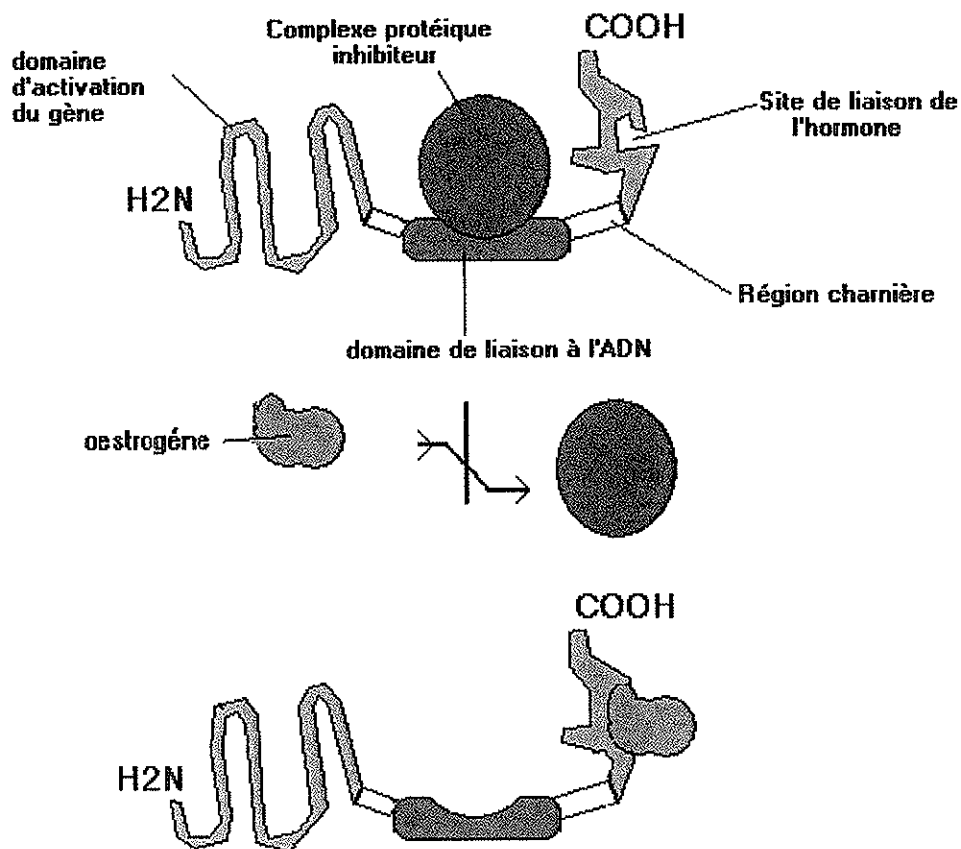


Figure 14 : Récepteur œstrogénique : déplacement du complexe protéique par

l'œstrogène. (Alberts *et al*, 2001)

La fixation de l'œstrogène active les récepteurs qui contrôlent ensuite directement la transcription de gènes spécifiques.

La réponse à une hormone stéroïdienne s'effectue en 2 étapes :

1) l'induction directe de la transcription d'un petit nombre de gènes spécifiques survient en 30 min et constitue la réponse primaire (figure 15) ;

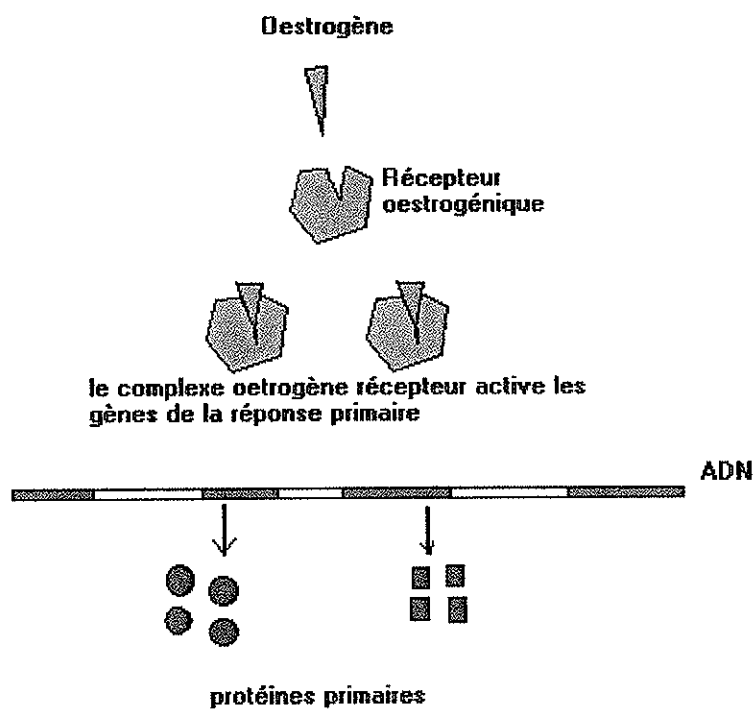


Figure 15 :ETAPE 1 : induction réponse à une hormone stéroïdienne et formation de protéines primaires (Alberts *et al*, 2001)

2) les produits de ces gènes activent à leur tour d'autres gènes constituant la réponse secondaire retardée (figure 16).

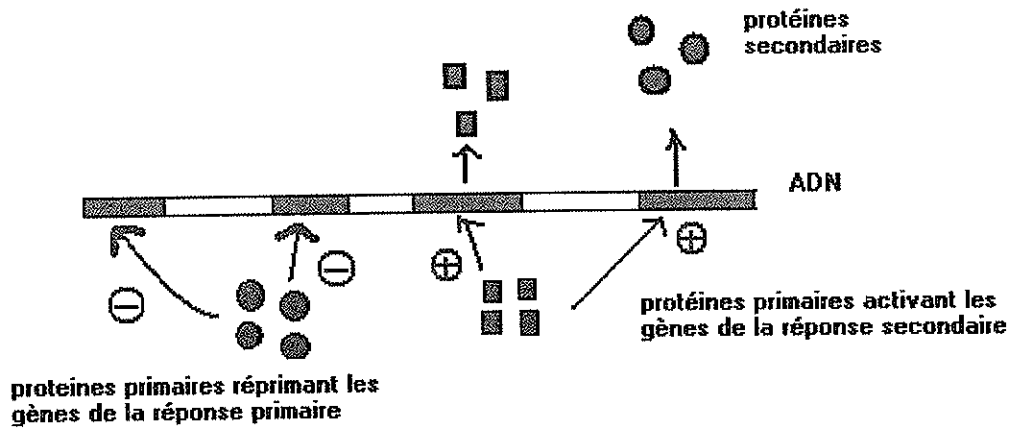


Figure 16 : ETAPE 2 : induction de protéines secondaires (Alberts *et al*, 2001)

Deux récepteurs oestrogéniques ont été décrits : ER α (figure 17) et ER β (figure 18) (McDonnell, 1999)

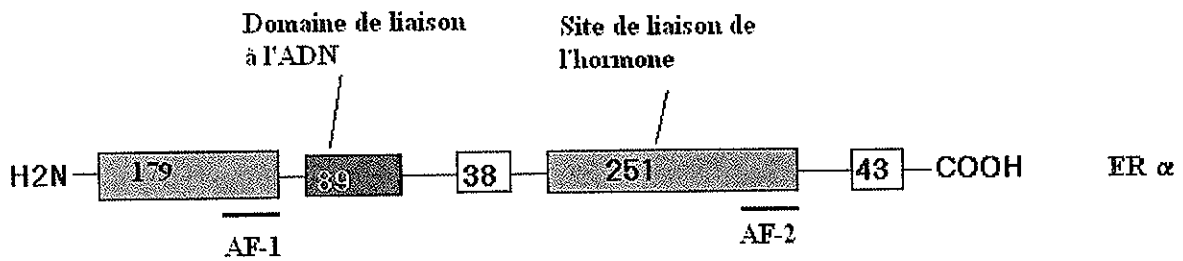


Figure 17 : Récepteur oestrogénique alpha

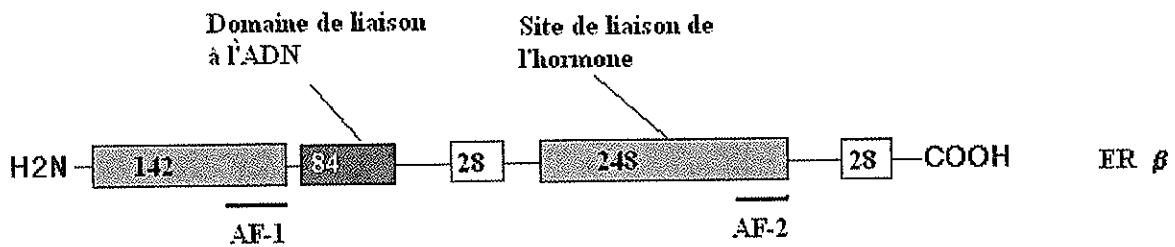


Figure 18 : Récepteur oestrogénique bêta

Les chiffres représentent le nombre d'acide aminés.

Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, les 2 types de récepteurs α et β sont exprimés (Power *et al*, 2003)

II.2.2.1.2. Les autres récepteurs

Les autres récepteurs présents dans les cellules MCF-7 sont : (I) les récepteurs aux glucocorticoïdes ; (II) les récepteurs à la progestérone ; (III) les récepteurs aux androgènes ; (IV) les récepteurs aux rétinoïdes (Horwitz *et al*, 1975).

II.2.2.2. Les enzymes de cette lignée cellulaire

II.2.2.2.1. Les enzymes de la biosynthèse des stéroïdes

La chaîne de production des œstrogènes est initiée à partir du cholestérol dans les surrénales. Elle aboutit aux stéroïdes en C18 caractérisés par un noyau phénolique tel que le 4-androstènedione.

La synthèse d'œstradiol se poursuit dans les cellules cancéreuses MCF-7 grâce à l'aromatase et la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (figure 19, 20). L'aromatase (P450 , CYP 19) est l'enzyme qui assure la conversion des androgènes en œstrogènes (biosynthèse de l'œstrone à partir de la Δ 4-androstènedione et de l' œstradiol à partir de la testostérone). Les cellules MCF-7 révèlent un fort taux d'aromatase (Chetrite *et al*, 1999). L' aromatase est stimulée par les facteurs de croissances TNF α , IL6 et PGE2. La 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase permet la réduction de l'œstrone en œstradiol.

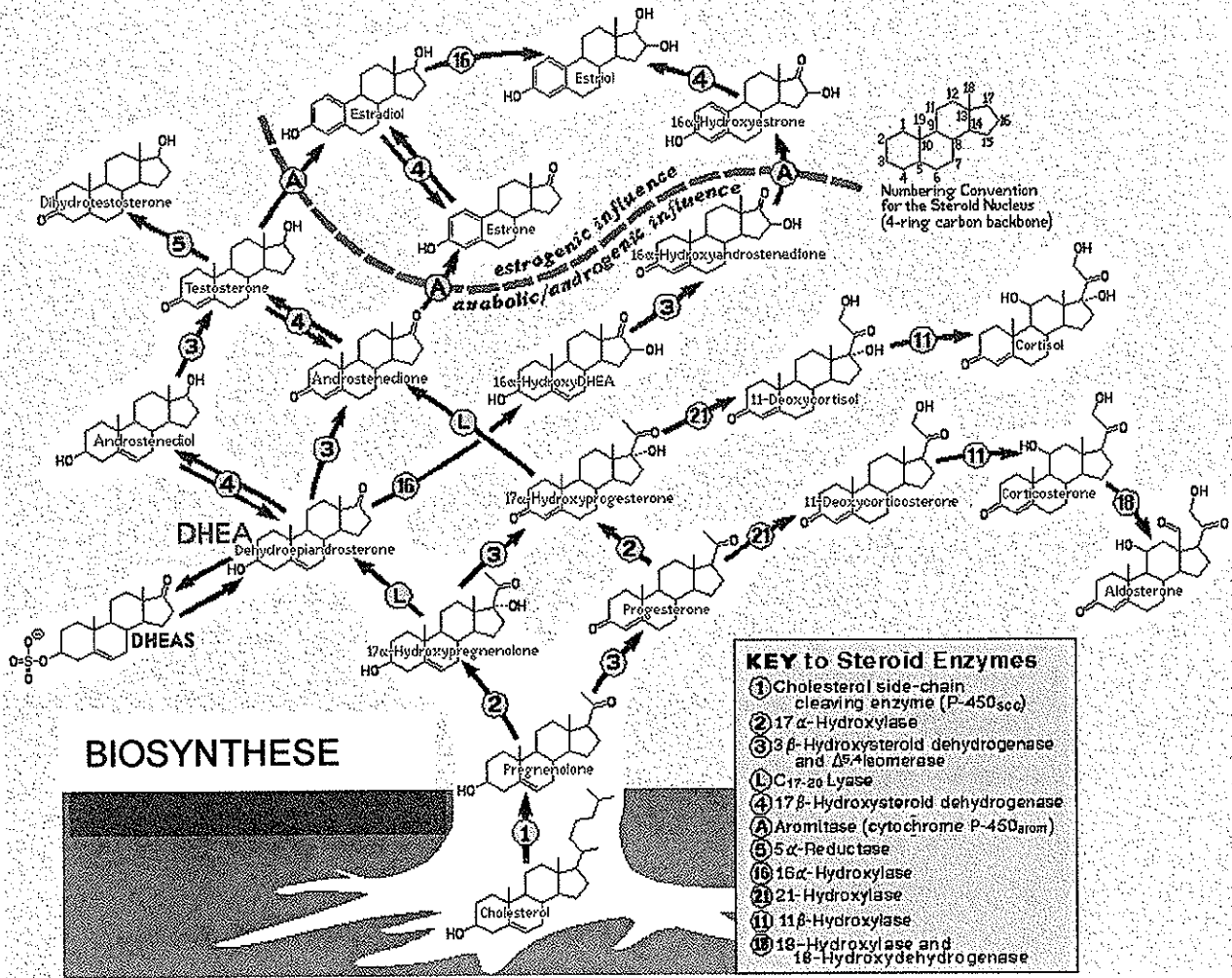


Figure 19 : Biosynthèse des stéroïdes

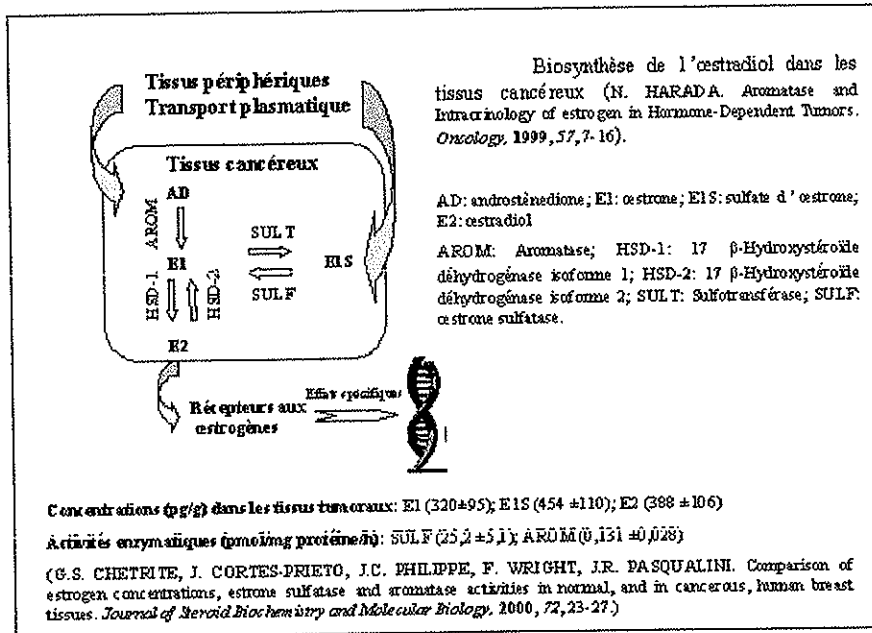


Figure 20 : Biosynthèse de l'œstradiol dans la cellule cancéreuse.

II.2.2.2. Les enzymes de détoxication

II.2.2.2.1. Les cytochromes (CYP 450) (phase I)

Les cytochromes P450 forment une superfamille multigénique d'enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif de molécules très diverses comprenant aussi bien des xénobiotiques (médicaments, pesticides polluants toxiques, cancérigènes) que des substances endogènes (acides gras, vitamines, stéroïdes). Les réactions de biotransformation des xénobiotiques catalysées par les CYP s'inscrivent dans un processus de détoxication évitant l'accumulation de substances potentiellement toxiques dans l'organisme. Une des caractéristiques de ces enzymes est leur inductibilité en particulier par certaines hormones, médicaments et polluants. Deux isoformes induisant le métabolisme des œstrogènes sont présents dans les cellules MCF-7 (Coumoul *et al*, 2001) :

- (a) le cytochrome P450 1A1 ; cette isoforme provoque l'hydroxylation en position 2 des œstrogènes ;
- (b) le cytochrome P450 1B1 ; cette isoforme provoque l'hydroxylation en position 4 des œstrogènes ;

II.2.2.2.2. Les sulfotransférases (SULT) (phase II)

Les sulfotransférases (EST) permettent la synthèse des sulfoconjugués des stéroïdes et plus particulièrement des œstrogènes. Les dérivés sulfatés sont biologiquement inactifs. Les isoformes SULT1A1*1 et SULT1A1*2 sont exprimées dans les cellules MCF-7 et catalysent la sulfatation du 2-méthoxyestradiol (Spink *et al*, 2000) et des dérivés hydroxylés des œstrogènes (Faucher *et al*, 2001).

II.2.2.2.3 Les sulfatases

Les sulfatases provoquent l'hydrolyse des sulfates. Ainsi l'œstrone sulfatase est connue pour jouer un rôle important dans la production local d'œstrogènes dans les lignées MCF-7. Son activité peut être stimulée par l'IL6 et le TNF- α (Imoto *et al*, 1997).

II.2.2.2.4. La catéchol-O-méthyltransférase

La Catéchol-O-méthyltransférase (COMT) catalyse la réaction de O-méthylation des œstrogènes en méthoxyœstrogènes. Les métabolites des œstrogènes catalysés par la COMT contribuent aux risques carcinogènes par effets directs et indirects sur les principaux mécanismes de détoxification (Lavigne *et al*, 2001). L'enzyme existe sous forme soluble (S COMT) et sous forme membranaire (MB COMT).

II.2.2.2.5 Les UDP-glucuronosyltransférases (phase II)

Les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) constituent une famille d'enzymes qui catalysent la glucuronoconjugaison. Cette réaction permet l'élimination sous forme de glucuronides hydrosolubles de composés exogènes et endogènes. Les UGT de la famille 1A (UGT1A) sont majoritairement impliquées dans l'élimination des œstrogènes et des catécholestrogènes. Les UGT sont exprimés dans le foie et au niveau du tractus gastrointestinal, mais également dans les tissus cibles des stéroïdes tels la glande mammaire et la prostate. Dans les cellules MCF-7, l'enzyme existe sous 6 isoformes : UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17 (Hum *et al*, 1999).

II.2.2.3 Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont résumés dans le tableau 1.

facteur	dénomination	source	cible	Activité biologique	récepteur
TNF α	Tumor Necrosis Factor	Monocytes Macrophage Cellules dendritiques Cellules B,T, fibroblastes	Presque toutes les cellules de l'organisme	Cytokine proinflammatoire Facteur de croissance et de différenciation Cytotoxique pour un grand nombre de cellules transformées	Récepteur de type I (CD120A) Récepteur de type II (CD120B)
IL6	Interféron B2 B-cell stimulatory Interleukine 6	Macrophage Cellules dendritiques Cellules B,T, fibroblastes Cellules stromale de la moelle épinière	Cellules B, plasmocytes, cellules T, hépatocytes, Cellules de la MO	Prolifération et différenciation des cellules B	2 chaînes α : CD126 fixe l'IL6 avec une faible affinité β : Gp130 associé au complexe de chaîne alpha avec l'IL6

Tableau 1 : Facteurs de croissance

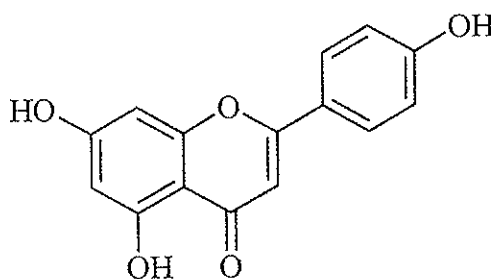
III. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'APIGENINE

L'apigénine appartient à la famille des 4-oxoflavonoïdes et est présente dans les plantes de consommation courante dans une alimentation occidentale (méditerranéenne) (Tableau 2).

Plante	Teneur en apigénine (mg/100 g)	Référence
Céleri	1,6-10,8	Trichopoulou <i>et al</i> , 2000
Menthe	11-42	Justesen <i>et al</i> , 2001
Origan	2-4	Justesen <i>et al</i> , 2001
Persil	510-630	Justesen <i>et al</i> , 2001

Tableau 2 : Teneur en apigénine de plantes de consommation courante dans une alimentation méditerranéenne.

structure



Classification internationale de la molécule : CAS : 000520-36-5

Formule brute : $C_{15}H_{10}O_5$

Nom chimique : 5,7,4' trihydroxyflavan-2-one

Poids moléculaire : PM = 270,2

Potentiel de lipophilie : 3,02

Solubilité : L'apigénine est soluble dans le DMSO et dans l'éthanol

Absorption dans l'UV : cette molécule absorbe dans l'UV aux longueurs d'onde suivantes:

$\lambda = 268 \text{ nm}, 335 \text{ nm}$

IV. COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE
LIQUIDE/SPECTROMETRIE DE MASSE

Parmi les méthodes analytiques, la spectrométrie de masse occupe une place privilégiée grâce à ses caractéristiques : sensibilité et limite de détection inégalées, variété des applications (physique atomique, cinétique des réactions, géochronologie, toutes formes d'analyse chimique qualitative et quantitative, en particulier en biomédecine), réactions ions-molécules et détermination de paramètres thermodynamiques. Les progrès de spectrométrie de masse ont été extrêmement rapides durant les deux dernières décennies : production, séparation et détection d'ions, acquisition et réduction des données résultantes ont conduit au développement d'instruments entièrement nouveaux. Le couplage de la chromatographie liquide est délicat car il est nécessaire de produire des ions en phase gazeuse pour l'analyse en spectrométrie de masse. Différentes méthodes sont actuellement utilisées pour faire face à ces problèmes et tout particulièrement l'interface à pression ambiante (APCI, Electrospray). C'est cette dernière source (Electrospray) qui a servi aux analyses des métabolites de ce travail.

IV.1. Appareillage (figure 21)

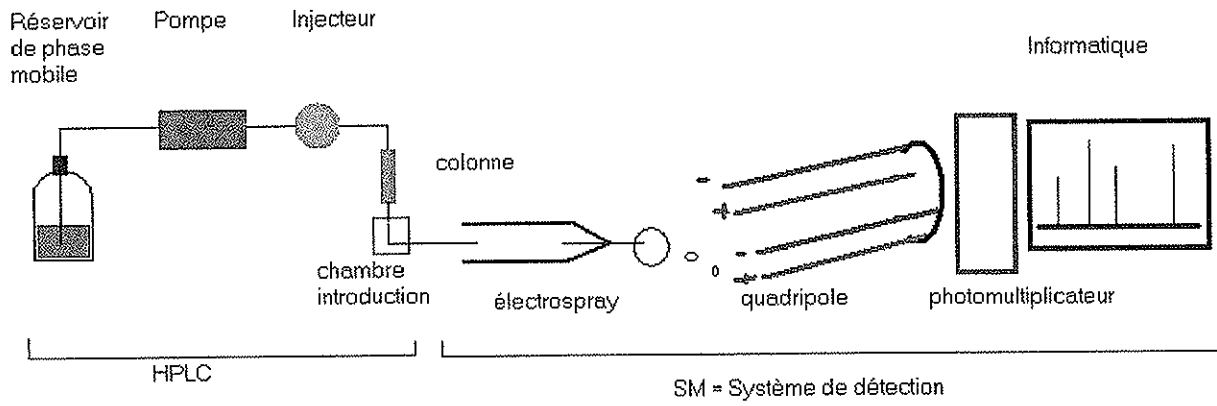


Figure 21 : Appareillage

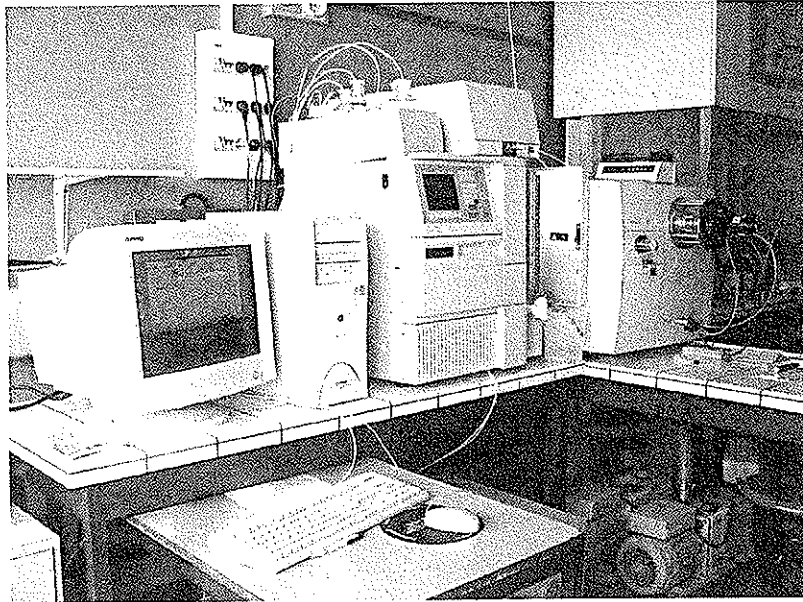


Figure 22 : Couplage CLHP/SM

IV.1.1. Chromatographie liquide haute performance

L'appareillage utilisé (figure 23) doit être capable de supporter les pressions élevées imposées par la très fine granulométrie des phases stationnaires. Il comprend :

- (1) un ou plusieurs réservoirs de phase mobile. Les solvants utilisés comme phase mobile doivent posséder les propriétés suivantes : un pouvoir solvant et une inertie chimique vis à vis des solutés, une compatibilité vis à vis du système de détection, une insolubilité et une inertie chimique vis à vis de la phase stationnaire, une viscosité faible, une stabilité et une faible toxicité et une miscibilité parfaite lorsqu'on utilise des mélanges de solvants.
- (2) un système de pompage qui provoque dans la colonne un écoulement de phase mobile compatible avec la séparation chromatographique ; la pompe permet d'obtenir des pressions de 150 à 250 bars.
- (3) un système d'introduction des échantillons (un injecteur automatique dans ce travail) ;
- (4) une colonne (phase octadécyle) ;
- (5) un système de détection (ici le spectromètre de masse).

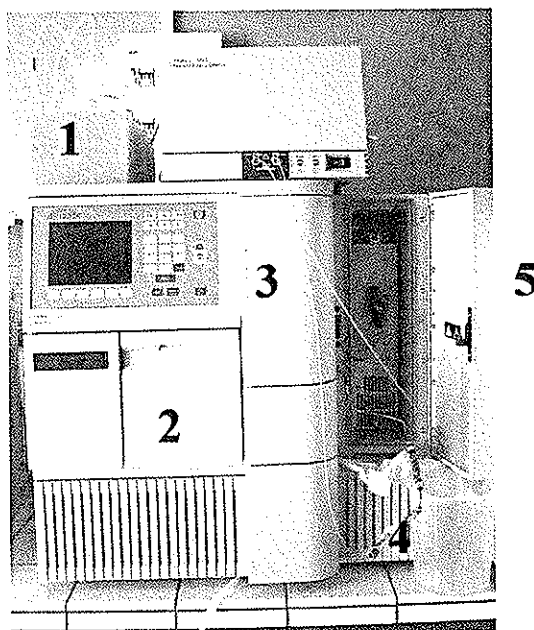


Figure 23 : Système Alliance WATERS

IV.1.2. Le Spectromètre de masse

La spectrométrie de masse repose sur l'ionisation et la fragmentation des molécules. Leur ionisation implique une accumulation d'énergie qui, en se dissipant, peut provoquer une rupture des liaisons inter-atomiques en donnant naissance à des fragments caractérisés par leurs m/z . Les fragments chargés positivement ou négativement sont accélérés dans un champ électrostatique puis parviennent jusqu'à l'analyseur quadripolaire où ils sont séparés en fonction de leur m/z . Le spectromètre de masse est constitué de 4 parties : (figure 24) (1) le système d'introduction (éluant chromatographique) ; (2) la source d'ionisation ; (3) l'analyseur ; (4) l'ensemble collecteur enregistreur.



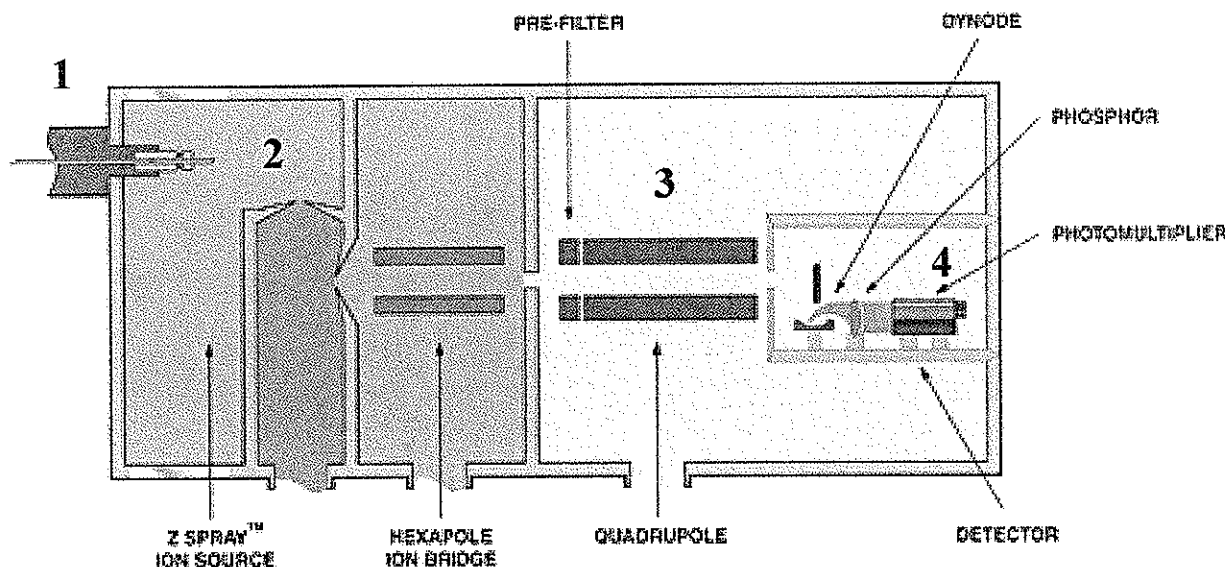
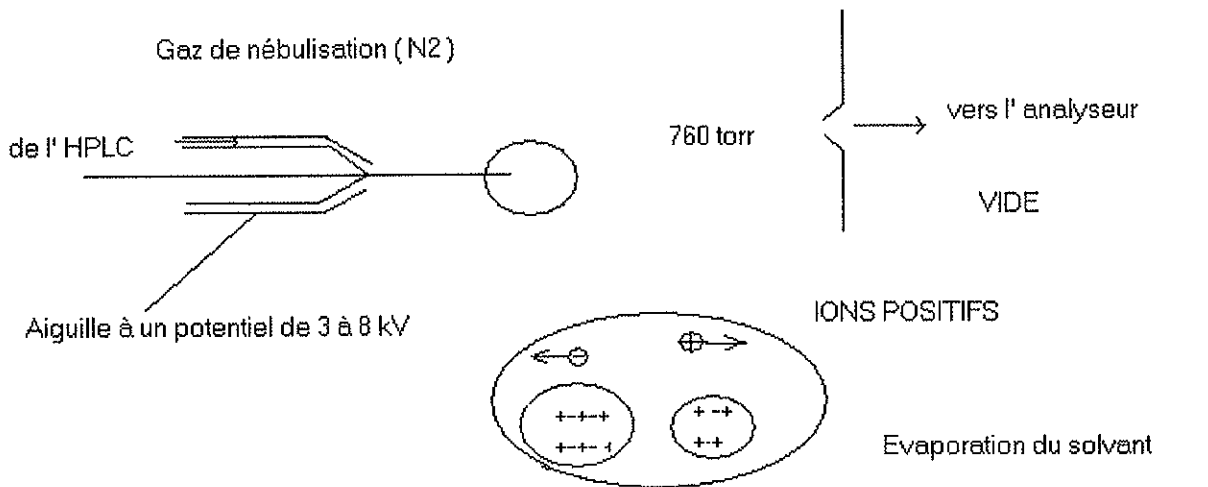


Figure 24 : Schéma du ZMD

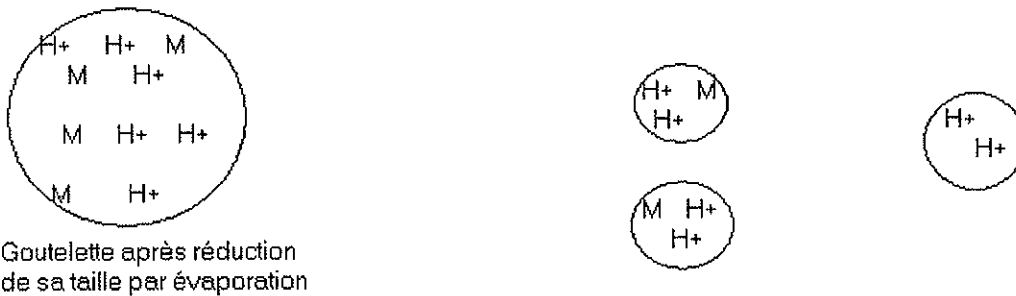
IV.1.2.1. La source d'ionisation : l'électrospray

L'électrospray est produit par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit. Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide, situé à l'extrémité du capillaire, qui va se rompre pour former des gouttelettes hautement chargées. L'évaporation du solvant contenu dans les gouttelettes va provoquer leur rétrécissement jusqu'au moment où les forces coulombiennes répulsives vont approcher le niveau des forces de cohésions de celles-ci et provoquer leur explosion (figure 25). Ces gouttelettes subissent alors une cascade de fissions donnant des gouttelettes de plus en plus petites, jusqu'au moment où le champ électrique en leur surface devienne suffisant pour provoquer la désorption des ions. Ces ions produits sont porteurs d'un grand nombre de charges s'il existe plusieurs sites ionisables sur la molécule.



A certain moment, les charges sont transférées de la gouttelette vers le composé qui devient ionisé et s' évapore de celle-ci.

Explosion coulombienne



La structure des molécules à analyser doit présenter quelques sites potentiellement ionisables, et la phase mobile doit permettre une bonne ionisation

Figure 25 : Explosion coulombienne

IV.1.2.2. L'analyseur quadripolaire

L'analyseur quadripolaire est constitué de 4 barres métalliques cylindriques parallèles disposées aux quatre angles d'un carré. Les ions cheminant sont soumis à l'influence d'un champ électrique total constitué d'un champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant.

Les électrodes adjacentes sont portées à des potentiels opposés alors que les électrodes opposées sont portées au même potentiel. A l'intérieur du quadripôle règne un champ électrostatique (figure 26). Pour une fréquence donnée, un ion oscillera entre les électrodes

adjacentes de polarités opposées et suivra un parcours bien déterminé ; les autres ions sortiront du champ. Il ne s'exerce aucune force longitudinale de telle sorte qu'un ion poursuit son trajet avec une vitesse constante. Les tensions continues et alternatives varient de façon linéaire en maintenant leur rapport constant. Cette variation permet de séparer les ions en fonction de leur masse et de leur charge : $m/z = f(U, V)$.

Ce système est caractérisé par : (a) une vitesse de balayage important (0,1 s par décade de 40 à 400 uma voire 2000 uma); (b) une capacité à supporter des pressions plus élevées que les analyseurs magnétiques. Chaque région du spectre peut être étudiée sans modification du calibrage et du balayage; ceci rend cet analyseur particulièrement adapté aux couplages chromatographiques.

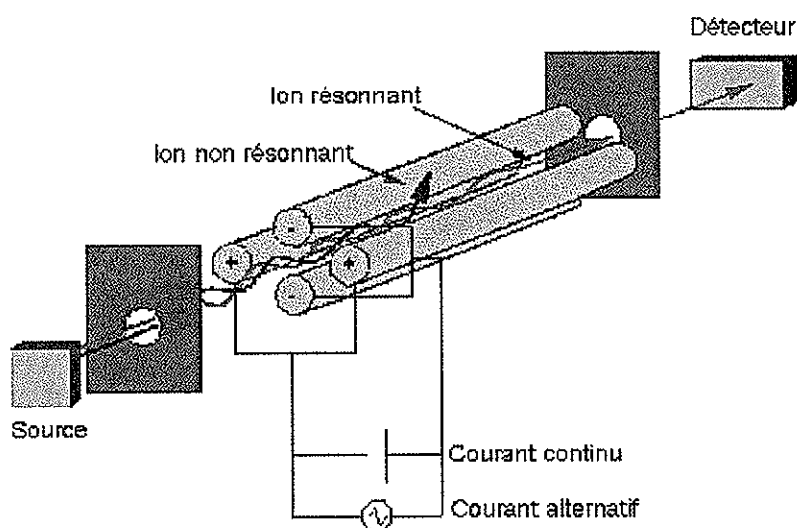


Figure 26 : Analyseur quadripolaire

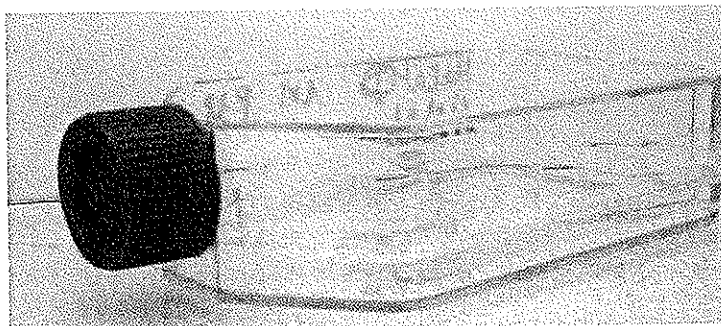
V. PROLIFERATION CELLULAIRE

V.1. Matériels et méthodes

V.1.1. Matériels et produits chimiques pour la culture cellulaire

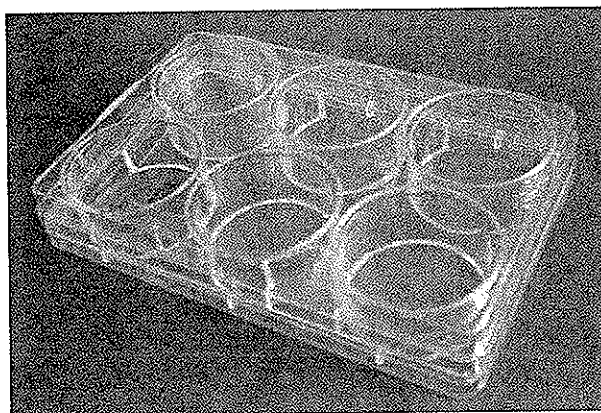
V.1.1.1 Récipients de culture cellulaire à usage unique

V.1.1.1.1. Boîte de 25 cm²



Cette boîte, fabriquée par NUNC™ Brand products, est spécialement sélectionné pour les lignées cellulaires à haute sensibilité vis à vis des composés toxiques. Elle est en polystyrène traité pour assurer une clarté optimale, un attachement cellulaire et une croissance cellulaire optimale. La stérilité est assuré par gamma ionisation (SAL = 1×10^{-6}) et l'apyrogénicité testée par le LAL-test préconisé par le guide FDA (Food and Drug Administration) avec un taux d'endotoxine < 20 endotoxines/ ml. Un filtre au niveau du bouchon permet les échanges gazeux O_2 / CO_2 avec l'extérieur.

V.1.1.1.2. Plaques 6 puits



Les plaques 6 puits proviennent du même fabricant que les boîtes 25 cm² à savoir NUNC™ Brand products. La nature chimique, l'utilisation, la stérilité, les tests d'apyrogénicité sont strictement identiques aux boîtes 25 cm². Ces plaques permettent une utilisation moindre de cellules. Les échanges gazeux se font par les bords des plaques et lors de l'ensemencement et du prélèvement un risque de contamination bactérienne existe.

V.1.1.2. Le milieu de culture

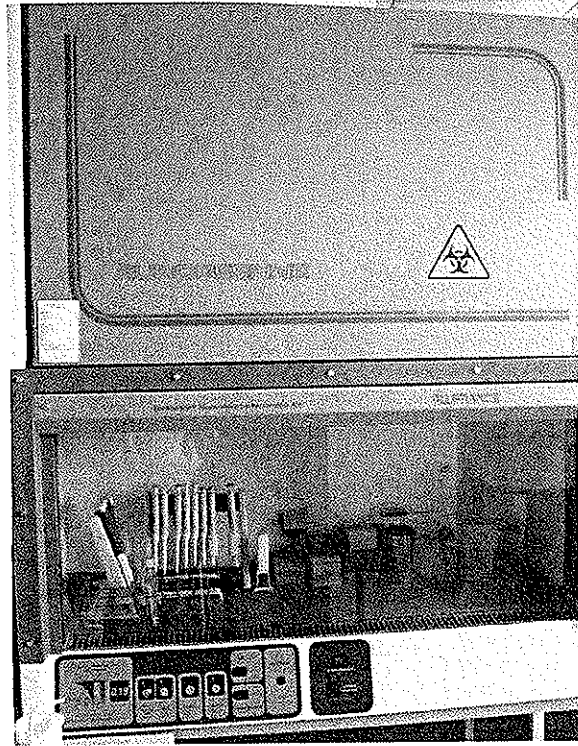
Le milieu de culture provient du laboratoire GIBCO. Il est constitué de : (a) sérum de veau fœtal décomplémenté par la chaleur soit 10 % du milieu de base (50 ml) ; (b) de pénicilline / streptomycine [10 000 UI / 10 000 µg /ml] soit 1% du milieu de base (5 ml) ; (c) de L-glutamine soit 1% du milieu de base (5 ml) ; (d) de milieu sans pyruvate de sodium ; (e) de glucose ; (f) de pyridoxine.

V.1.1.3. Produits chimiques

Les lignées cellulaires humaines en culture sont stockées congelées. La congélation protège les lignées cellulaires, minimise le risque de contamination. L'azote liquide est utilisé en conjonction avec les agents cryoprotecteurs comme le DMSO. Sans la présence d'agent cytoprotecteurs, la congélation est létale pour la plupart des cellules mammaires. Les dommages sont causés par détérioration mécanique due aux cristaux de glace, par concentration des électrolytes, par déshydratation, par changement de pH et par dénaturation des protéines. Ces effets létaux sont minimisés par addition de ces agents cryoprotecteurs qui autorisent un bas niveau de congélation. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) provient de Sigma Aldrich. La stérilité est obtenue après filtration et les endotoxines sont testées. L'apigénine provient de Sigma Aldrich (pureté 99%). La solution de de Trypsine-EDTA est obtenue par mélange de 0,5 g de trypsine porcine, 0,2 g d' EDTA, 4Na par litre de solution. Cette solution est stérilisée et filtrée. La trypsine aura pour rôle de couper les liaisons protéiques intercellulaires et l'EDTA aura pour rôle de complexer les ions Ca²⁺ et Mg²⁺. La solution de

bleu trypan est préparée avec 0,81 % NaCl et 0,06 % potassium phosphate dibasique. La solution est filtrée et stérilisée. Tous ces produits proviennent de Sigma Aldrich.

V.1.1.4. La hotte



Toutes les manipulations sont faites sous hotte à flux d'air laminaire vertical SA-FLUFRANCE-modèle *Européenne* qui diminue fortement le risque de la contamination bactérienne des boites ou des plaques de cultures cellulaires au moment de la mise en place des cellules et de l'incubation de l'apigénine aux différentes concentrations.

V.1.1.5. L'incubateur

Les cellules MCF-7, mises en culture dans les boites 25 cm³ ou dans les plaques 6 puits, sont placées dans un incubateur à CO₂ SAVYO à la température constante de 37°C pendant 6 jours afin de recréer les conditions de température *in vivo*. Les paramètres affichés sont :
température : 37 °C ; 5% CO₂



V.1.2. Cellules MCF-7

Les MCF-7 proviennent de la collection du Dr DEGREMoux (IGM hôpital Saint Louis, Paris). Les cellules sont conservées dans 95 % du milieu de culture + 5 % DMSO et sont bloquées en phase G0.

V.1.3. Protocole

Les cellules MCF-7 détenues congelées dans les cryotubes au laboratoire sont décongelées en quelques minutes à 37°C, reprises dans du milieu de culture puis placées à l'incubateur à 37°C pendant 6 jours jusqu'à confluence. Les cellules se fixent au support de la boîte ou du puit par des liaisons ioniques entre les ions bivalents Ca^{2+} , Mg^{2+} cellulaire avec le support de la boîte ou des liaisons protéiques intercellulaires qui collent les cellules selon un tapis cellulaire uniforme .

Les cellules à J7 constituent alors notre pool cellulaire. Les cellules sont désormais prêtes à êtreensemencées. Les cellules ($6,75 \cdot 10^6$ cellules) sont diluées dans 75 ml de milieu et répartis dans les 14 boîtes de 25 cm^3 à ensemer. Ces boîtes sont placées 24 heures à l'incubateur.

Après 24 heures, les témoins (contenant 500000 cellules par boîte ou 150000 cellules par puit) et les échantillons (contenant l'apigénine à la concentration *ad hoc* obtenue à partir d'une solution mère 10^{-2} M dans le DMSO) sont incubés 6 jours.

A J6, nous procédons au comptage cellulaire sur cellule de Malassez selon le protocole suivant :

- 1- ajouter le surnageant ;
- 2- ajouter l' EDTA stérile pendant 20-30 s => l'enlever ;
- 3- faire agir la solution de Trysine-EDTA ;
- 4- placer les cellules à l'incubateur pendant 3 à 4 min, temps nécessaire au décollage des cellules ;
- 5- ajouter 3 ml de milieu de culture dans la boîte 25 cm³ ;
- 6- séparer les cellules à l'aide de la pipette pasteur pour dissocier les agrégats cellulaires ;
- 7- opérer à une dilution au 1/10 des cellules soit
400 µl de complet + 50 µl de cellules + 50 µl de bleu Trypan ;
- 8- compter 2 fois 15 µl de cellules que l'on répartit de part et d'autre de la lamelle.

Une seconde techniques d'étude de la prolifération cellulaire sur plaque 6 puits utilisant une technique au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) a été envisagé. Le MTT est un colorant qui peut être réduit à différents niveaux de la chaîne respiratoire. La réduction du MTT semble dépendre majoritairement de l'activité des déshydrogénases mitochondriales. Ses caractéristiques ont été appliquées à la prolifération cellulaire. La technique du MTT est basée sur le clivage du sel de tétrazolium jaune en cristaux de formazan violet par les déshydrogénases mitochondriales actives. Notons que cette conversion se produit uniquement dans les cellules vivantes. La quantité de formazan formé, déterminée par absorbance à 550 nm, est quantifiée au lecteur de plaque ELISA et est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

V.2 Résultats

V.2.1. Résultats des boîtes de 25 cm³.

Le comptage des cellules MCF-7 est réalisé sur cellules de Malassez. Les 3 séries d'expériences sont résumées dans les tableaux suivants. Le comptage a été répété 2 fois, l'exploitation des résultats se fera sur les moyennes obtenues aux différentes concentrations.

Expérience du 16/10/2002

Concentration en apigénine (µM)	T1	T2	1	1	5	10	15	20	25	30	40	50
Comptage 1	121	134	113	130	124	117	155	109	92	67	55	12
Comptage 2	150	140	117	151	138	129	152	133	113	61	41	16
Moyenne		136		127,5	128	123	153	121	102,5	64	48	14

Expérience du 22/10/02

Concentration en apigénine (µM)	T1	T2	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
Comptage 1	225	133	194	131	149	48	65	37	24	17	9	5
Comptage 2	176	168	170	117	113	75	65	41	36	18	8	8
Moyenne		172	182	124	131	75	65	39	30	17,5	8,5	6,5

Expérience du 29/10/02

Concentration en apigénine (µM)	T1	T2	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
Comptage 1	103	115	105	103	77	55	40	26	28	14	6	8
Comptage 2	128	120	117	86	88	41	43	21	26	17	16	6
Moyenne		116,5	111	94,5	82,5	50	41,5	23,5	27	10,5	11	7

Le tableau suivant moyenne l'ensemble des 3 expériences :

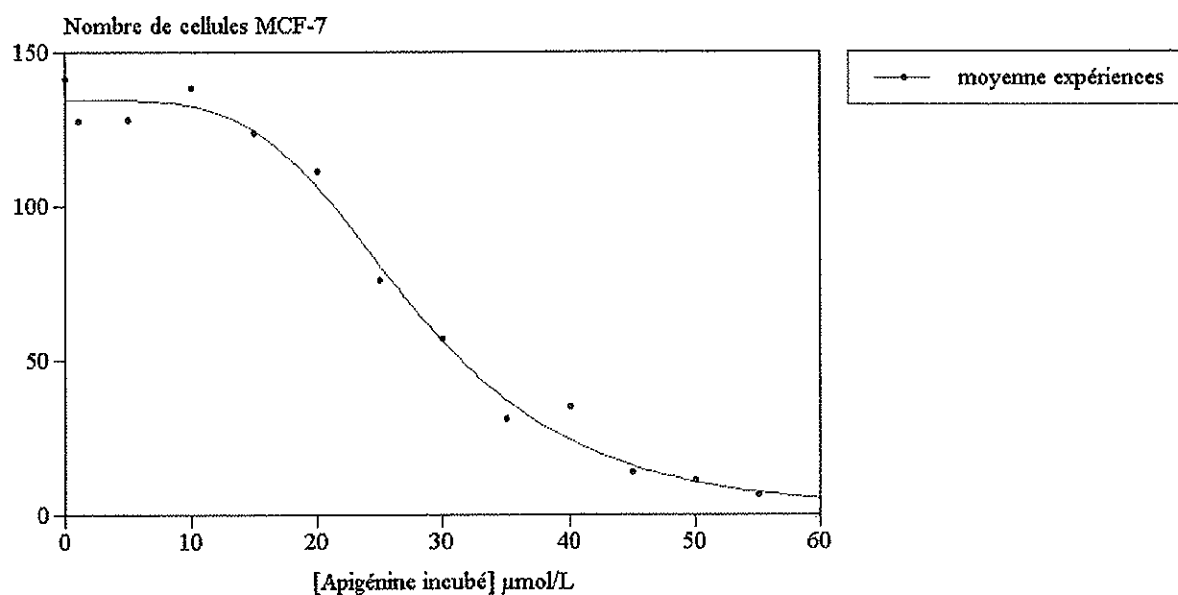
Concentration en apigénine (μM)	T	1	5	10	15	20
Moyenne des comptages	141,5 \pm 22,9	127,5	128	138,7 \pm 31	123,8 \pm 23,9	111,5 \pm 20,9

Concentration en apigénine (μM)	25	30	35	40	45	50	55
Moyenne des comptages	75,8 \pm 21,4	56,8 \pm 10,8	31,2 \pm 7,7	35 \pm 9,3	14 \pm 3,5	11,17 \pm 2,2	6,75 \pm 0,3

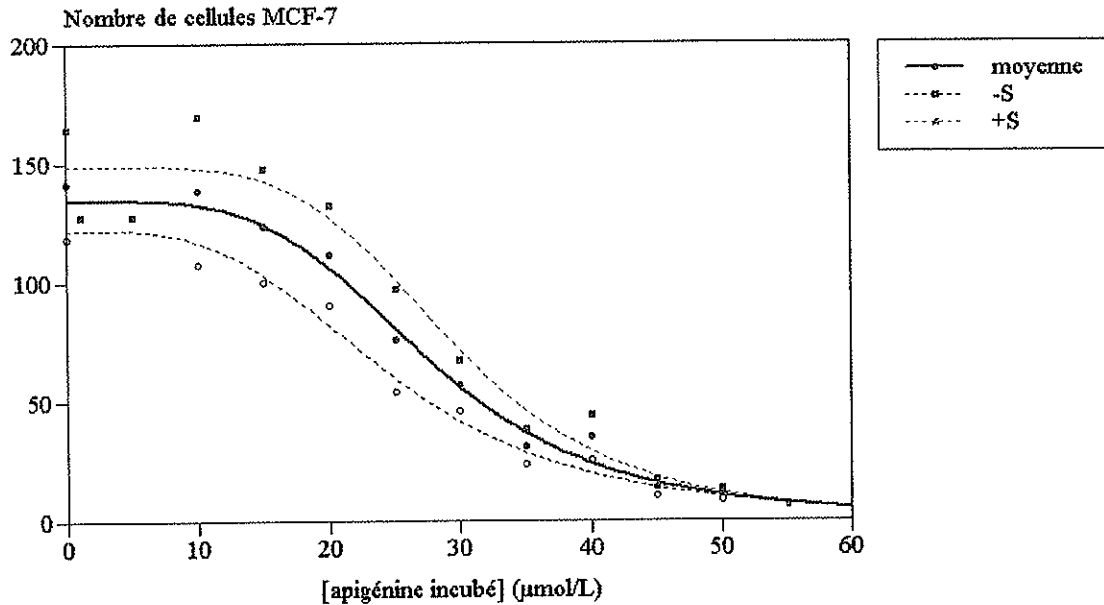
Ces résultats ont été modélisés (logiciel WINREG, Dr. Debord) par la fonction de Hill : $y = Y_{\text{max}} / [1 + (K/x)^n]$ en supposant une distribution gaussienne des valeurs des 3 expériences (figure 27).

Param.	IC50 (μM)	r	r ²
	27,5	0,9943	0,9887

Regression moyenne



Regression de Courbe moyenne

Figure 27 : Modélisation des résultats de prolifération cellulaire : boîte de 25 cm³

V.2.2. Résultats sur plaques 6 puits

[apigénine] µmol/L	0	1	5	10	15	20
Absorbance à 550 nm	0,599±0,037	0,510±0,037	0,566±0,028	0,25±0,049	0,572±0,055	0,642±0,072
% activité	100	85	94,5	41,73	95,5	107

[apigénine] µmol/L	25	30	35	40	45	50	55
Absorbance à 550 nm	0,613±0,035	0,533±0,016	0,456±0,034	0,351±0,011	0,362±0,027	0,289±0,016	0,259±0,023
% activité	102,3	88,98	76,6	58,6	60,43	48,24	42,24

L'IC50 obtenue par la technique du MTT est évaluée à 49,5 µmol/L (figure 28) la valeur est assez éloignée de celles obtenues par la technique du bleu trypan.

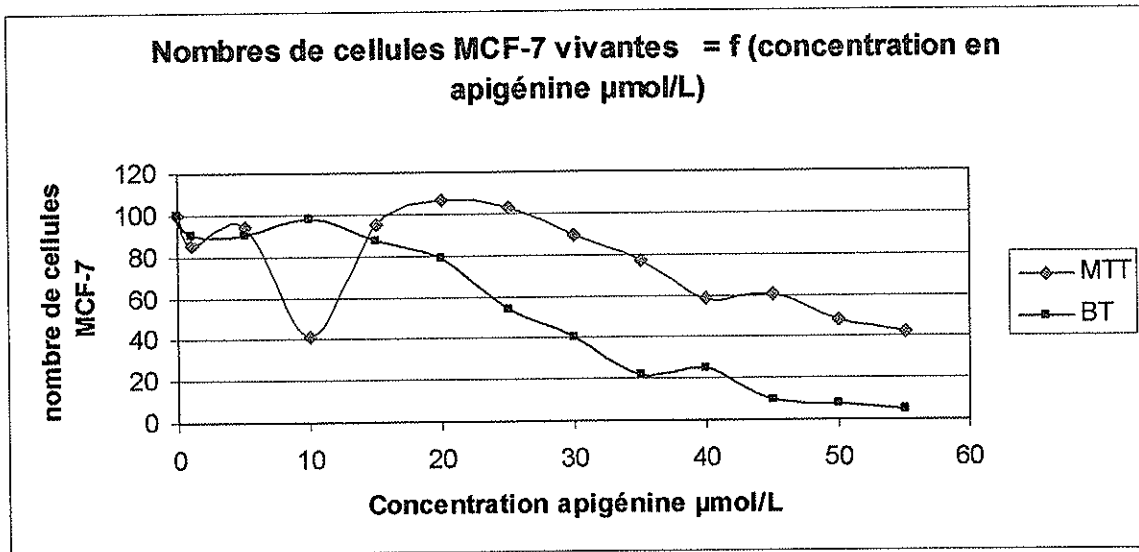


Figure 28 : Comparaison entre les deux techniques d'analyse de prolifération cellulaire

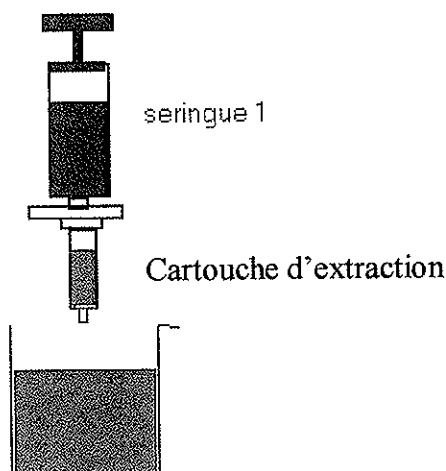
Nous observons que la technique au MTT montre un nombre de cellules vivantes plus élevé par comparaison avec à la technique du Bleu Trypan. Certains auteurs évoquent que les cellules bloquées en G2/M ont une activité mitochondriale plus élevée (Es Saady *et al*, 1996 ; Harmand *et al*, 2003). L'étude du comptage des cellules MCF-7 par la technique du Bleu Trypan semble mieux adaptée à notre étude et nous exploiterons les résultats de cette technique dans la suite.

VI. METABOLISME CELLULAIRE

VI.1. Matériels et méthodes

VI.1.1. Extraction solide/liquide

Nous procédons à une extraction solide/liquide des différents surnageants selon le protocole suivant :



- 1) 1 ml d'échantillon ou de témoin est acidifié par 100 μ l d'HCl 1M ;
- 2) la cartouche d'extraction C18 est amorcé par le passage successif de 2 ml de méthanol et 2 ml de solution (90% eau + 10% méthanol) ;
- 3) l'apigénine et ses métabolites sont extraits par passage sur la cartouche d'extraction ;
- 4) la cartouche est lavée par 2x2 ml de solution (90% eau + 10% méthanol) ;
- 5) la cartouche est éluée par 1ml de méthanol et l'éluat analysé par CLHP/SM.

Cette méthode permet de concentrer les molécules de polarité différentes.

VI.1.2. Sonication des culots cellulaires

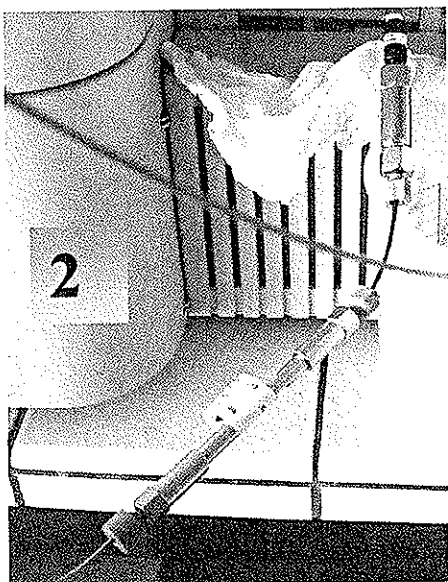
Les culots cellulaires, conservés congelés, sont ramenés à la température ambiante et dilués par 1 ml d'eau distillée glacée. Cette opération a pour but de détacher mécaniquement les cellules du support plastique. Les cellules sont transférées dans des tubes à hémolyse en présence d'eau distillée glacée. La lyse cellulaire est provoquée par les 2 techniques suivantes : (i) les

tubes sont sonicés dans une cuve à ultrasons BRANSON® 2510 à 2 reprises pendant 15 secondes, (ii) les tubes sont alors centrifugés à 13 000 g pendant 10 minutes.

VI.1.3. Analyse par CLHP/SM

VI.1.3.1. Colonnes

Deux colonnes ont été successivement utilisées dans ce travail : (1) une colonne Nucléosil C18 3 μ M (2 x 125 mm) ; (2) une colonne Discovery HS 18 3 μ M (2,1 x 75 mm) couplée à une précolonne Supelguard Discovery HS 18 3 μ M (2,1 x 20 mm).



VI.1.3.2. Gradients

La composition de la phase mobile varie durant l'analyse selon un gradient de composition. Suivant la colonne utilisée, le gradient suit le profil décrit dans la figure 29. Les solvants utilisés sont de qualité NORMAPUR (acide formique) ou CHROMANORM (acétonitrile, méthanol).

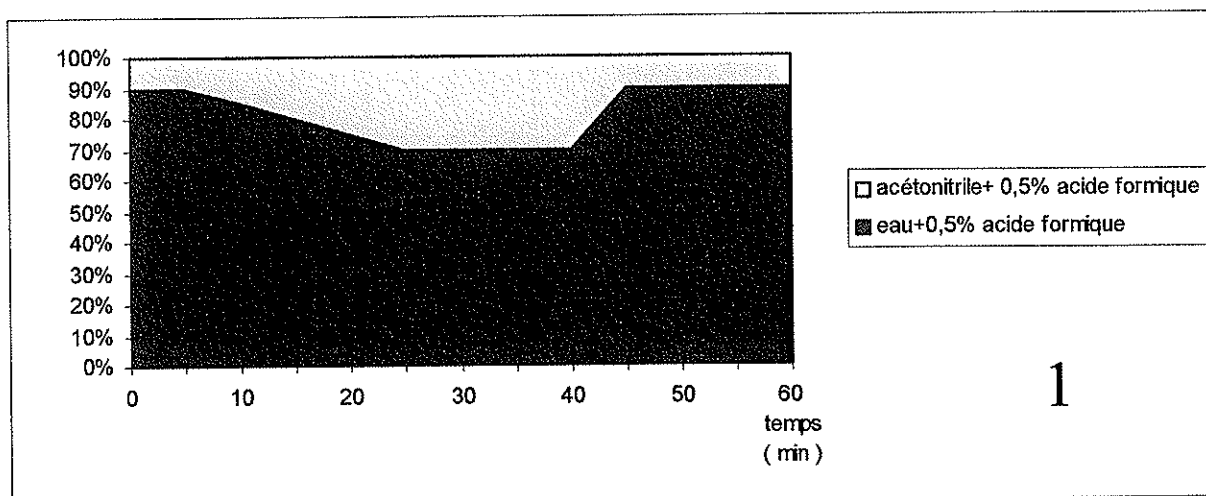


Figure 29 : Gradient

VI.1.3.3. Paramètres d'acquisition en électrospray négatif

L'analyse s'effectue en Single Ion Recording aux m/z suivants : 269 (apigénine), 285 (dérivé monohydroxylé), 349 (monosulfoconjugué), 445 (monoglucuroconjugué), 525 (monosulfomonoglucuroconjugué), 529 (disulfoconjugué), 621 (diglucuroconjugué).

Les paramètres du spectromètre de masse sont :

Tension du capillaire	3,5 kV	RF Lens	0,05 V
Tension de cône	40 V	Température du bloc source	100°C
Tension de l'extracteur	4 V	Température de désolvatation	150°C

VI.2. Résultats

Ce travail a fait l'objet de trois séries de mesure : 16/10/2002, 22/10/2002, 29/10/2002.

VI.2.1 Analyse des culots cellulaires

Après sonisation des culots cellulaires, les résultats ne montrent aucune détection de l'apigénine ou de ces métabolites quelque soit la concentration incubée. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus par Chetrite (Chetrite *et al*, 1999) lors de l'incubation d'œstrogènes dans des cellules MCF-7.

VI.2.2 Analyse des surnageants

Aucun métabolite de phase I n'a été mis en évidence. Deux métabolites de phase II ont été identifiés et quantifiés lors des trois séries d'expérience (16/10, 22/10 et 29/10) (figure 30) : un monoglucuroconjugué ($m/z = 445$) et un monosulfoconjugué ($m/z = 349$). Les positions de substitution n'ont pu être étudiées.

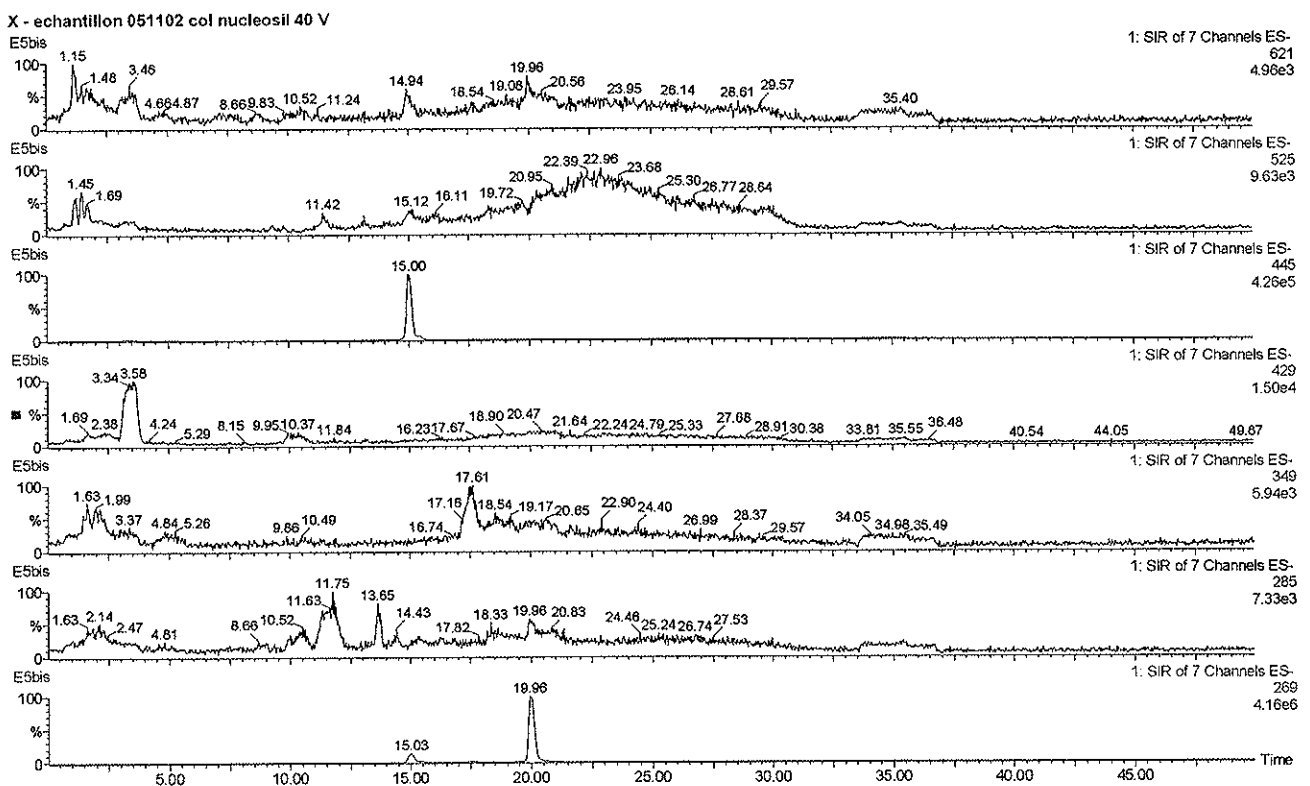


Figure 30 : Analyse des différents métabolites ($C_{\text{incubée}} = 40 \mu\text{M}$)

L'identification de ces métabolites est confirmée à partir du métabolisme « *in vitro* » (Gradolatto *et al*, sous presse) et « *ex vivo* » (Basly *et al*, 2003) de l'apigénine.

VI.2.2.1 Quantification des métabolites

Les métabolites sont quantifiés par intégration des surfaces sous les pics. Deux modèles sont choisis pour représenter l'évolution de ces métabolites : la contribution moyenne du métabolite glucuroconjugué au métabolisme total par la courbe $AUC^1(\text{glucuroconjugué})/AUC(\text{total})$ (figure 31) et la contribution moyenne du métabolite sulfoconjugué au métabolisme total par la courbe $AUC(\text{sulfoconjugué})/AUC(\text{total})$ (figure 32).

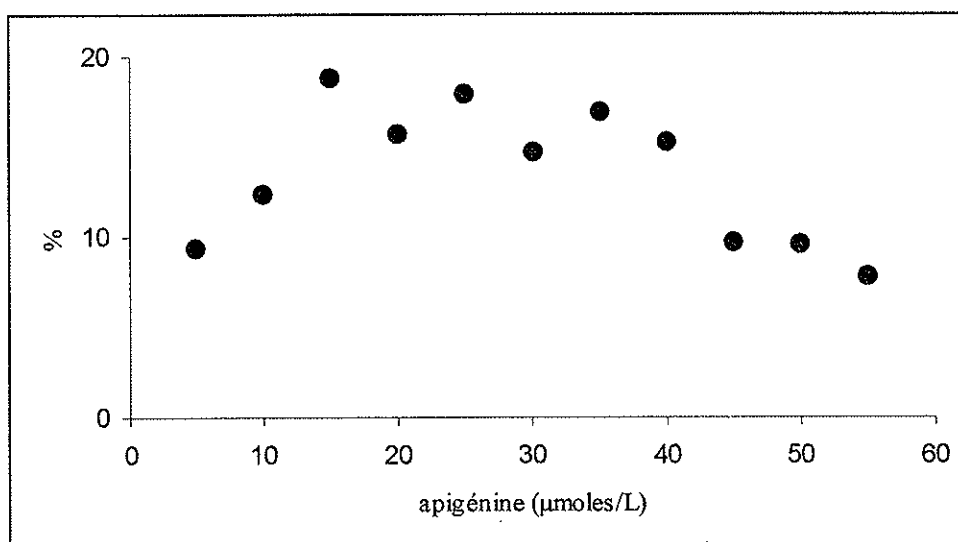


Figure 31 : Contribution moyenne du métabolite glucuroconjugué au métabolisme total de l'apigénine

¹ AUC : aire du pic ; AUC(total) représente la somme des aires respectives des pics de l'apigénine et des deux métabolites pour chaque concentration incubée.

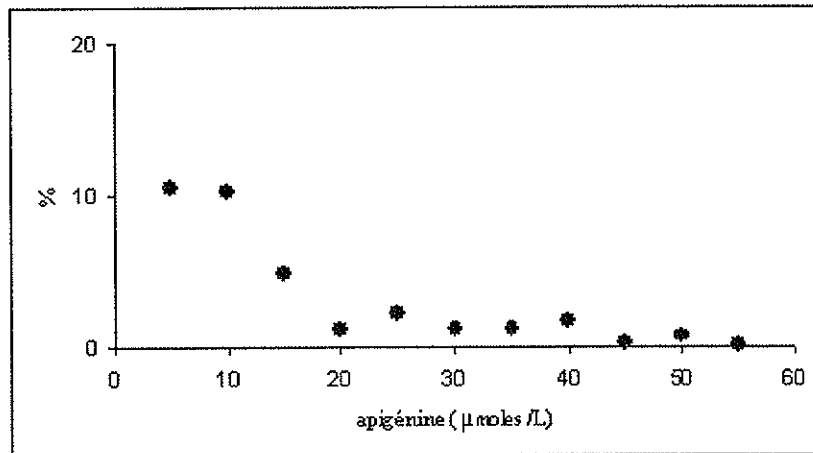


Figure 32 : Contribution moyenne du métabolite sulfoconjugué au métabolisme total de l'apigénine

De ces deux courbes, il apparaît que la quantité total de métabolites de phase II reste faible (valeurs comprises entre 8% (55 μM) et 23 % (15 μM). L'excrétion d'apigénine non métabolisé reste majoritaire. La figure 33 représente la concentration moyenne d'apigénine excrétée (obtenue à partir de la contribution en pourcentage de l'apigénine au métabolisme total) en fonction de la concentration incubée.

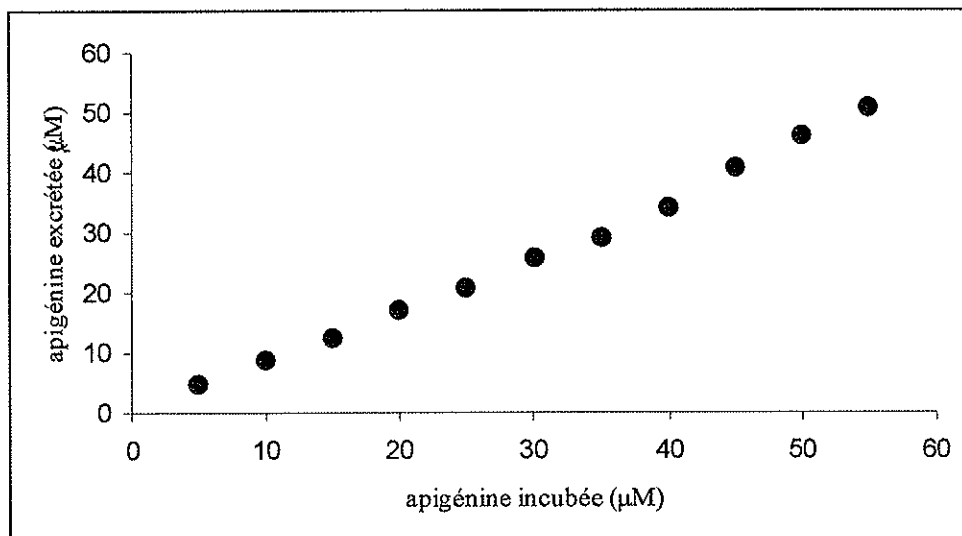


Figure 33 : Concentration de l'apigénine non métabolisée

La détoxification faible de l'apigénine en métabolites de phase II plus polaires pourrait contribuer à expliquer la mort cellulaire observée dans le chapitre précédent.

VI.2.2.2. Relation entre mort cellulaire et excrétion

La figure 34 représente la relation entre mort cellulaire et excrétion de l'apigénine (exprimé comme AUC)

= AUC apigénine	0	960	43 180	87 001	171 475	310 428	388 136	484 996	314 002	1 179 445	1 033 567	850 515
y= nb cellules	141,5	127,5	128	138,67	123,83	111,5	75,83	56,83	31,25	35	14	11,17
[apigénine] μ M	0	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50

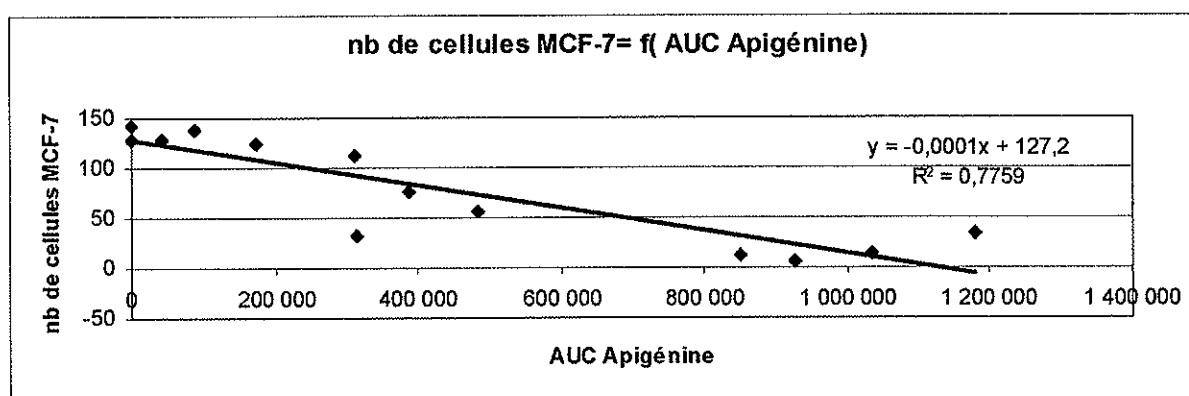


Figure 34 : Mort cellulaire en fonction de l'aire de l'apigénine

L'étude statistique de ces résultats montre que pour l'ensemble des expériences le coefficient de corrélation $R < 0$: par conséquent le nombre de cellules et l'AUC apigénine varient en sens inverse. Pour les expériences 1 et 2, ainsi que pour la moyenne des 3 expériences, le test de Student montre que $t_c > T_{seuil}$ à 5%. En conclusion : la mort des cellules MCF-7 est liée à la concentration en apigénine dans le surnageant au risque 5%.

Seul l'expérience 3 semble ne pas avoir fonctionné car le test statistique est négatif.

APIGENINE	
	moyenne
X moy	445 450
S x	5 790 856
S x 2	4,67 E12
Y moy	77
S y	1001,8
S y2	111 205,72
S xy	205 462 112
N	13
R	-0,9
R ²	0,81
b	-1,15E-4
a	
N-2	11
Equation droite de régression	$y = -1E-4x + 127,2$
tc	6,19
Tseuil à 5%	2,201

La figure 35 représente la relation entre mort cellulaire et excrétion du métabolite monoglucuroconjugué (exprimé comme AUC)

x= AUC monogluc	0	1 611	4 413	15 290	35 923	46 428	75 842	72 801	60 168	179 260	94 731	79 614	73 403
y= nb cellules	141,5	127,5	128	138,67	123,83	111,5	75,83	56,83	31,25	35	14	11,17	6,75
[apigénine] µM	0	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55

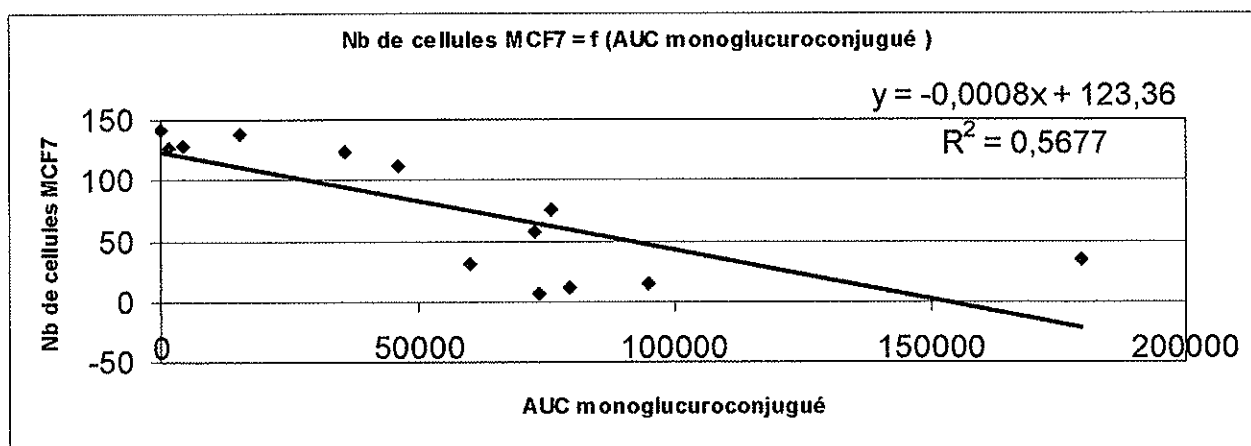


Figure 35 : Relation entre mort cellulaire et métabolite monoglucuroconjugué

L'étude statistique de ces résultats montre que pour l'ensemble des expériences : le coefficient de corrélation $R < 0$; nombre de cellules et l'AUC apigénine monoglucuroconjugué varient en sens inverse. Pour les expériences 1 et 2 , ainsi que pour la moyenne des 3 expériences , le test de Student montre que $t_c > T_{\text{seuil}}$ à 5%. Donc le nombre de cellule MCF-7 semble être lié à l'AUC apigénine monoglucuroconjugué. En conclusion, la mort des cellules MCF-7 est liée à la concentration en apigénine monoglucuroconjugué dans le surnageant. Seul l'expérience 3 semble ne pas avoir fonctionné car le test statistique est négatif. Il peut s'agir d'un problème de détection. A l'inverse le nombre de cellule MCF-7 n'est pas lié à l'AUC apigénine monosulfoconjugué.

Afin de voir si apigénine ou le monoglucuroconjugué ont une prédominance vis à-vis de l'inhibition de la prolifération cellulaire nous avons effectué un test de comparaison de deux coefficients de corrélation expérimentaux .

Soit l'hypothèse $H_0 : z_1 = z_2$

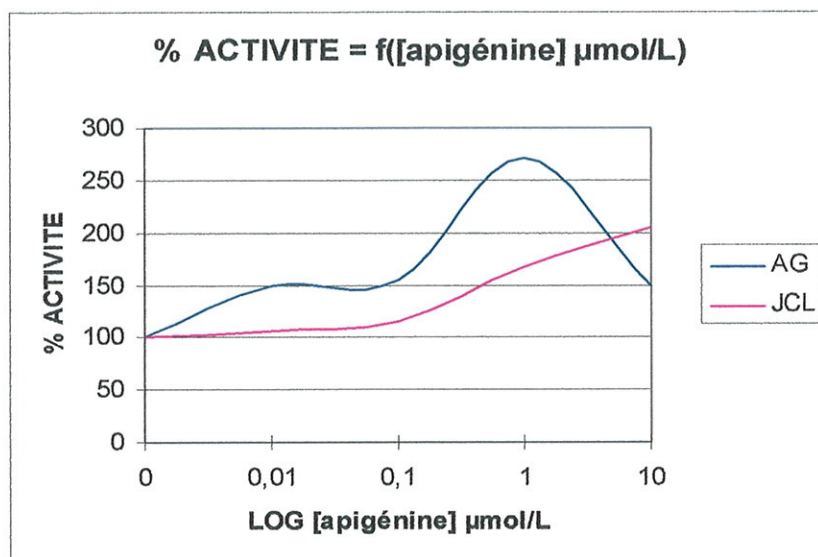
	Série 1	Série 2	Moyenne
r_1 Apigénine	-0,85	-0,85	-0,9
r_2 Monoglucuroconjugué	-0,79	-0,93	-0,75
U_c	-0,34	+0,8	-1,118

Pour l'ensemble des 3 tests, si l'on compare le U_c (U calculé) aux différents U théoriques ($U_{th}=1,96$ pour un risque $\alpha=0,05$ et $U_{th} = 2,576$ pour $\alpha=0,01$) ; U_c appartient à l'intervalle $] -U_{th,\alpha} ; U_{th,\alpha} [$. En conclusion on accepte l'hypothèse $H_0 : z_1=z_2$. Il n'existe pas de différence significative entre apigénine et monoglucuroconjugué vis-à-vis de la mort cellulaire.

VII. DISCUSSION

ERRATUM (p 66)

En revanche pour des concentrations en apigénine compris entre 0,1 et 10 $\mu\text{mol/L}$, la prolifération cellulaire semble constante. Si nous comparons les résultats obtenus pour les mêmes concentrations à ceux mentionnés par Le Bail (Le Bail *et al*, 1998) et Gradolatto (Gradolatto, 2003) en présence de sérum de veau foetal destéroïdé, ces derniers observent une prolifération cellulaire induite par l'effet oestrogénique de l'apigénine (figure).



Notre étude de prolifération cellulaire (figure 27) pour des concentrations supérieures à 10 $\mu\text{mol/L}$ montre que l'apigénine induit une mort cellulaire qui est dose-dépendante ($\text{IC}_{50}=27,6 \mu\text{mol/L}$). Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Yin ($\text{IC}_{50}=28,8 \mu\text{mol/L}$) (Yin *et al*, 2001) et Manthey ($\text{IC}_{50}=22,0 \mu\text{mol/L}$) (Manthey *et al*, 2002) dans des conditions opératoires similaires (sérum de veau fœtal 10%) (figure 36).

Régression

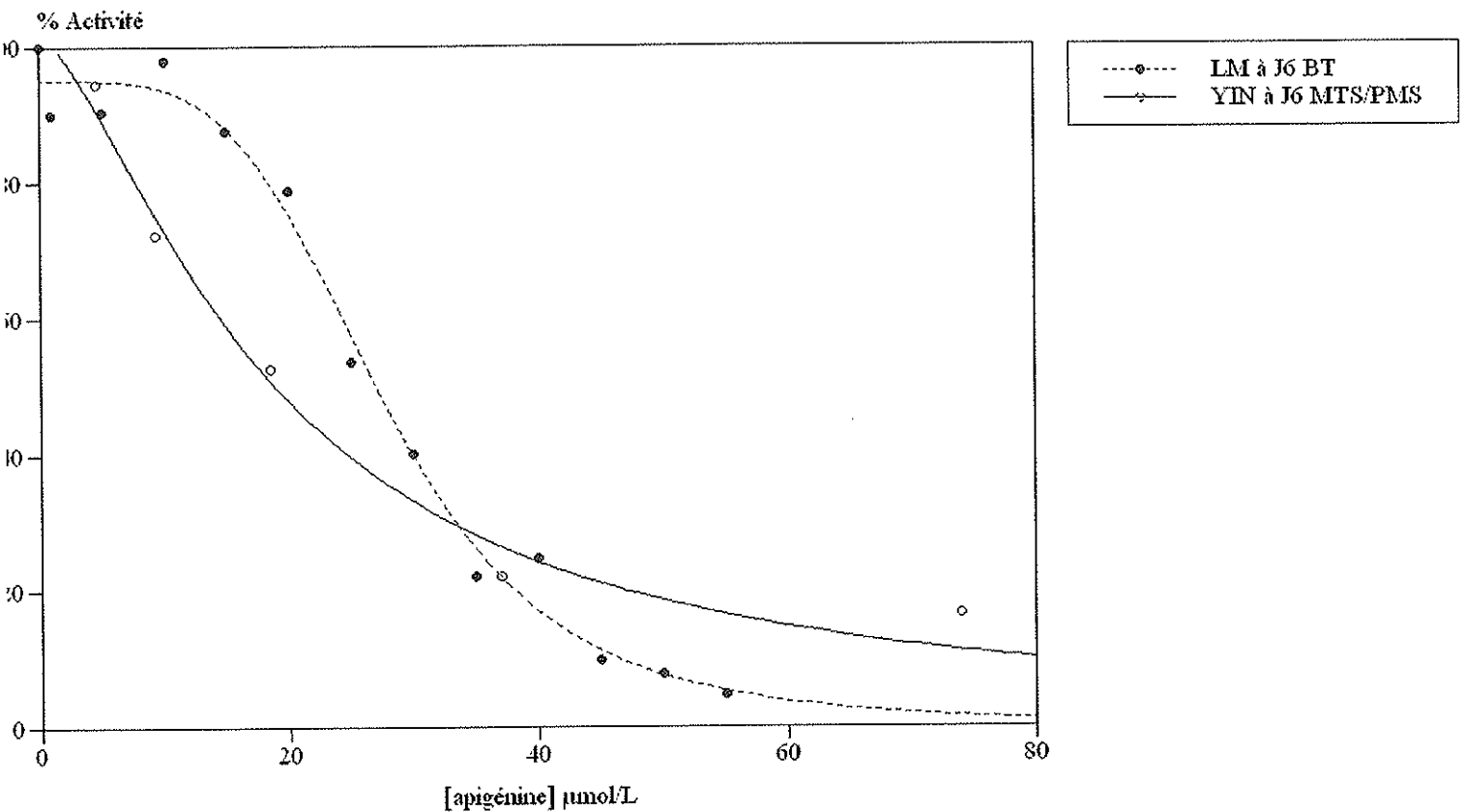


Figure 36 : Courbe de régression : % activité en fonction de la concentration en Apigénine ($\mu\text{mol/L}$) selon LM à J6 (technique du Bleu Trypan) et selon YIN à J6 (Technique MTS/PMS)

* *Conclusion*

L'apigénine, connue pour ses propriétés inhibitrices de l'aromatase et de la 17- β -hydroxystéroïde déshydrogénase (Lebail *et al*, 1998) a un potentiel œstrogénique estimé de 0,0027 % par comparaison avec l'œstradiol (Whitten *et al*, 2001) (Tableau 3) et ce phytoestrogène à une affinité particulière pour le récepteur ER β (Morito *et al*, 2001).

Son activité œstrogène like est due à la présence de l'hydroxy en position 7 (Le Bail *et al*, 1998). En revanche la présence d'un hydroxy en position 4' aurait tendance à diminuer l'activité œstrogénique (comparaison de chryisine et de l'apigénine).

	E2	APG
hER transfected yeast	2 nmol/L	44 µmol/L
Relative potency (%)	100 %	0,0027 %

Tableau 3 . Potentiel œstrogénique (d'après Whitten *et al*, 2001)

L'apigénine seule induit une augmentation de la prolifération cellulaire. Nous n'avons pas pu observer ce résultat dans notre expérience car les stéroïdes présents dans le sérum de veau fœtal (œstrogènes, androgènes) suffisent à saturer tous les récepteurs présents provoquant une prolifération constante de la lignée MCF-7. Cette hypothèse est confirmée par les résultats de Le Bail (Le Bail *et al*, 1998) qui a mis en évidence une prolifération constante des cellules MCF-7 en présence conjointe de sérum de veau fœtal, destéroïdé sur charbon actif, et d'œstradiol 10 nmol/L .

Comme mentionné précédemment, pour des concentrations supérieures à 10 µmol/L, nos expériences montrent une mort cellulaire dose-dépendante qui serait en G2/M du cycle cellulaire (Yin *et al*, 2001) (figure 37).

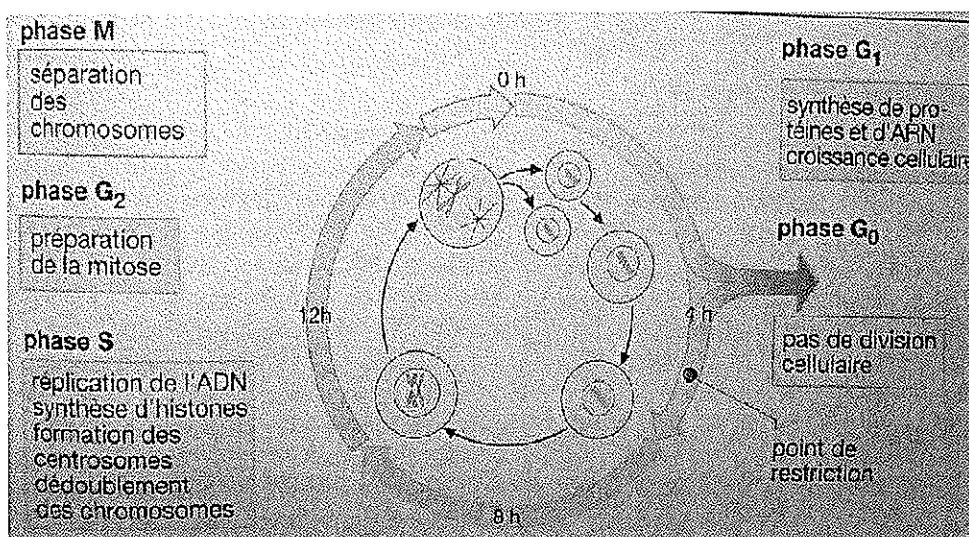


Figure 37 : Cycle cellulaire

Deux métabolites de l'apigénine sont retrouvés au niveau du surnageant : un monosulfoconjugué et un monoglucuroconjugué. Les autres enzymes : Cytochromes P450 et Catéchols O-MéthylTransférases ne se sont pas exprimées dans cette expérience. L'étude de corrélation montre qu'il existe une liaison entre la mort cellulaire par apoptose des cellules MCF-7 et la concentration en apigénine et en monoglucuroconjugué .

Cependant nous n'avons pas trouvé de prédominance de l'apigénine vis-à-vis du monoglucuroconjugué sur la prolifération cellulaire .

En revanche la concentration du sulfoconjugué ne présente aucune corrélation au niveau de l'apoptose. Ceci confirme les travaux de Peterson (Peterson *et al*, 1998) sur le métabolisme de la génistéine (analogue structural de l'apigénine ne différant que par la position du cycle aromatique B en position 3) dans la lignée MCF-7. Cet auteur démontre que le monosulfoconjugué de la génistéine ne corrèle pas avec l'apoptose.

Le blocage des MCF-7 en G2/M du cycle cellulaire trouve son explication dans deux principaux mécanismes observés par Yin (Yin *et al*, 2001) à l'origine de l'apoptose.

L'apigénine inhibe la phosphorylation du gène Rb (gène du Rétinoblastome) .La protéine Rb a un rôle régulateur en G1 du cycle cellulaire (Weinberg, 1995) et en G2/M (Yen, 1998). La baisse du taux de protéine Rb phosphorylée s'avère temps-dépendant et dose-dépendante. (Yin *et al*, 2001)

La protéine rétinoblaste non phosphorylée est active ; elle fixe alors une protéine régulatrice qui ne peut pas jouer le rôle d'activateur de la prolifération cellulaire (figure 38,39)

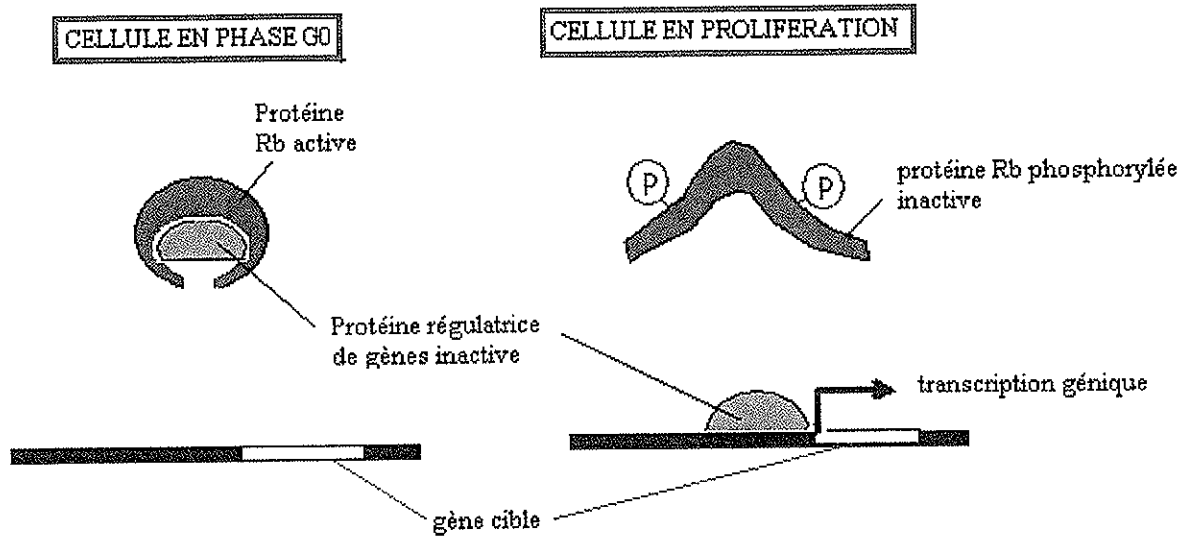


Figure 38 : Action de la protéine du rétinoblastome (Rb)

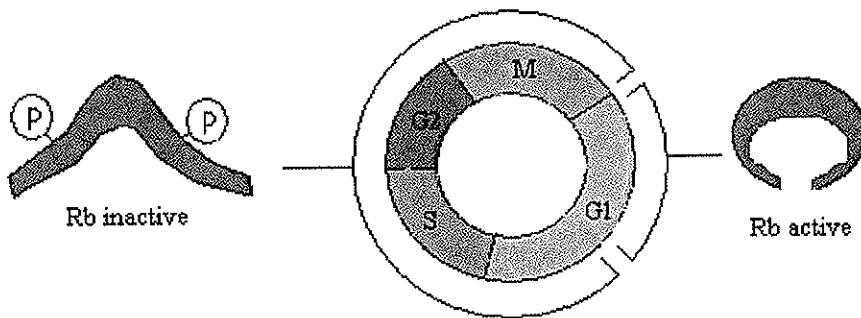


Figure 39 : Changement de phosphorylation dans une cellule en division.

D'autre part le système de contrôle du cycle cellulaire est basé sur deux familles de protéines. La première est une famille de protéines kinases cycline dépendante (CDK) qui sont responsables de la phosphorylation de protéines spécifiques sur les résidus Thréonine et Sérine. La seconde est une famille de protéines spécialisées appelés cyclines, qui se lient aux molécules Cdk et contrôlent leur capacité à phosphoryler des protéines cibles appropriées (Scherr *et al* , 1994) et (Hunter *et al* ,1994) (figure 40).

L'assemblage, l'activation et le désassemblage des complexes sont les principaux évènements sur lequel repose le cycle cellulaire. L'apigénine inhibe le taux de protéines CDK1, CDK4, Cycline B1 et Cycline D1 selon Yin (Yin *et al* , 2001) (figure 41).

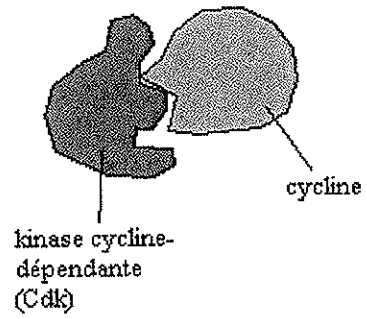


Figure 40 : Les deux composantes clés du système de contrôle cellulaire.

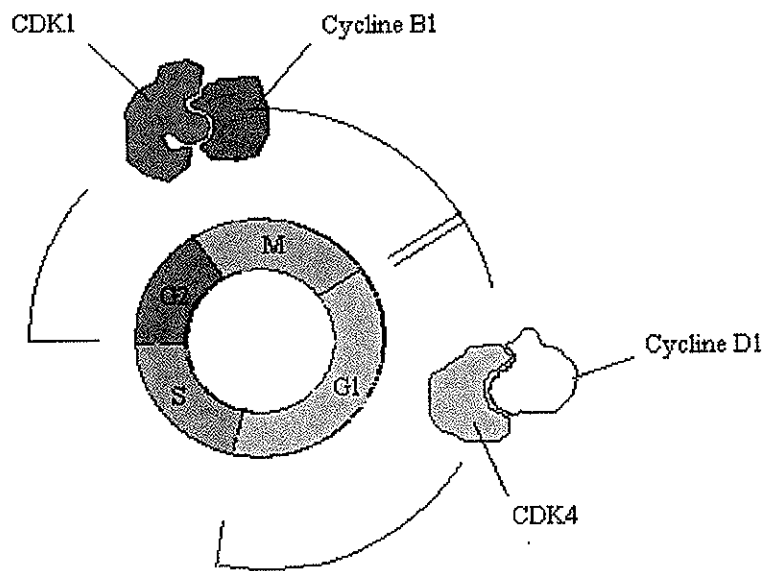


Figure 41 : Localisation des cyclines et CDK au niveau du contrôle du cycle cellulaire

VIII CONCLUSION

L'apigénine et son monoglucuroconjugué sont responsables de la mort cellulaire dans des conditions de culture proche des conditions in vivo (taux d'oestrogènes circulants).

L'hypothèse du blocage du cycle cellulaire par le mécanisme d'inhibition de la phosphorylation de la protéine rétinoblastome et l'inhibition des cyclines B1 et D1 et les Cdk1, Cdk4 sur le cycle cellulaire pourrait être une orientation pour l'explication de nos résultats expérimentaux. Il reste à explorer le rôle du monoglucuroconjugué sur la protéine rétinoblastome, sur les cyclines et Cdk.

D'autre part seule une technique par ajout dosés nous aurait permis de montrer un aspect quantitatif à nos expériences et d'établir ainsi une loi de conservation entre l'apigénine incubé et apigénine plus métabolites excrétés.

Au vue de l'étude l'apigénine pourrait être une molécule prometteuse vis-à-vis de la chimioprévention des cancers du sein hormonodépendants.

ANNEXES

TESTS STATISTIQUES

COEFFICIENT DE CORRELATION

$$r = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \times \sum y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}\right) \left(\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}\right)}}$$

TEST D'INDEPENDANCE LINEAIRE ENTRE DEUX VARIABLES ALEATOIRES X et Y

On réalise un test de Student .

Hypothèse H0 : Les variables X et Y sont indépendantes .

On calcule tc :

$$t_c = \left| \frac{r}{\sqrt{1-r^2}} \sqrt{n-2} \right|$$

Si $t_c > t$ seuil $(\alpha, n-2)$, on rejette l'hypothèse H0 au risque α . Les 2 variables sont donc liées au risque α

TEST DE COMPARAISON DE DEUX COEFFICIENTS DE CORRELATION EXPERIMENTAUX .

On dispose de deux échantillons de tailles n_1 et n_2 , et de coefficients de corrélation respectifs r_1 et r_2 .

On teste (H0) : $r_1 = r_2$

Soit

$$z_1 = \frac{1}{2} \ln \left(\frac{1+r_1}{1-r_1} \right), \quad z_2 = \frac{1}{2} \ln \left(\frac{1+r_2}{1-r_2} \right)$$

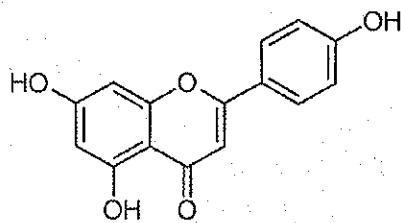
Si (H0) est vraie et si n_1 et n_2 sont assez grands , alors

$$U = \frac{Z_1 - Z_2}{\sqrt{\frac{1}{n_1 - 3} + \frac{1}{n_2 - 3}}}$$

On accepte H0 si pour un risque α le U calculé $\in]-U_{\alpha}, +U_{\alpha}[$

MOLECULES

Apigénine



CAS RN: 520-36-5

Formula: C₁₅H₁₀O₅

Weight: 270.24

SMILES: c13c(O)cc(O)cc1OC(c2ccc(O)cc2)=CC3=O

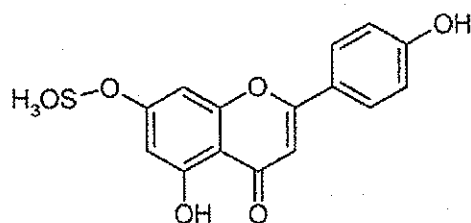
logP:

3.06 <+0.04> : KOWWIN

IALOGP : 2,95

3.68 (0.75) : ACD

SULT



Formula: C₁₅H₁₀O₈S

Weight: 350.31

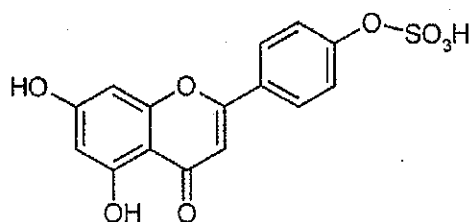
SMILES: c13c(O)cc(OS(=O)(=O)O)cc1OC(c2ccc(O)cc2)=CC3=O

logP:

0.87 : KOWWIN

0.58 : IALOGP

3.36 (0.77) : ACD



Formula: C₁₅H₁₀O₈S

Weight: 350.31

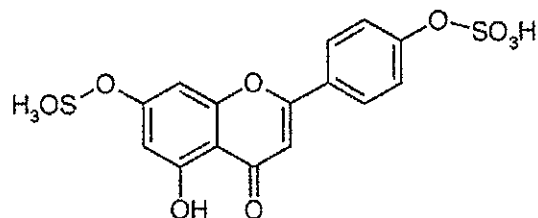
SMILES: c13c(O)cc(O)cc1OC(c2ccc(OS(=O)(=O)O)cc2)=CC3=O

logP:

0.85 : KOWWIN

0.91 : IALOGP

2.75 (0.76) : ACD



Formula: C₁₅H₁₀O₁₁S₂

Weight: 430.37

SMILES: c13c(O)cc(OS(=O)(=O)O)cc1OC(c2ccc(OS(=O)(=O)O)cc2)=CC3=O

logP:

SMILES:

c25c(O)cc(OC1C(O)C(O)C(O)C(C(=O)O)O1)cc2OC(c4ccc(OC3OC(C(O)=O)C(O)C(O)C3O)cc4)=CC5=O

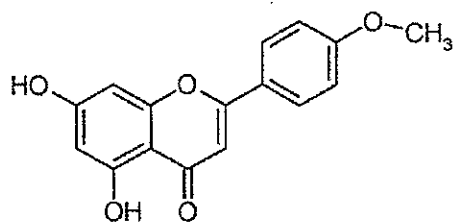
logP:

0.37 : KOWWIN

-2.43 : IALOGP

0.99 (0.86) : ACD

COMT



Formula: C₁₆H₁₂O₅

Weight: 284.27

SMILES: c13c(O)cc(O)cc1OC(c2ccc(OC)cc2)=CC3=O

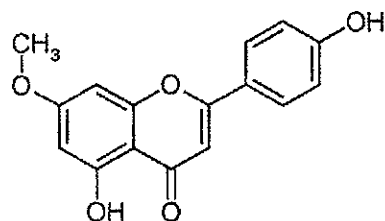
logP:

3.48 : KOWWIN

IALOGP : 3.15

3.61 (0.75) : ACD

CLOGP : 3.49



Formula: C₁₆H₁₂O₅

Weight: 284.27

SMILES: c13c(O)cc(OC)cc1OC(c2ccc(O)cc2)=CC3=O

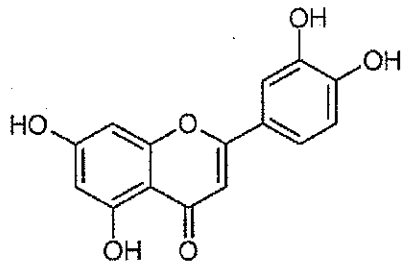
logP:

3.44 : KOWWIN

2.90 : IALOGP

4.13 (0.75) : ACD

CLOGP : 3.49

CYP

CAS RN: 491-70-3

Formula: **C₁₅H₁₀O₆**

Weight: 286.24

SMILES: c13c(O)cc(O)cc1OC(c2ccc(O)c(O)c2)=CC3=O

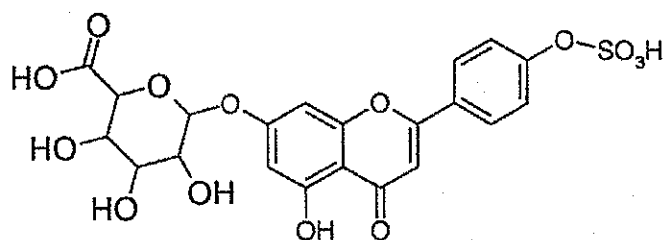
logP:

2.27 <-0.26> : KOWWIN

IALOGP : 2.61

3.72 (0.75) : ACD

SULT + UGT



Formula: C₂₁H₁₈O₁₄S

Weight: 526.43

SMILES:

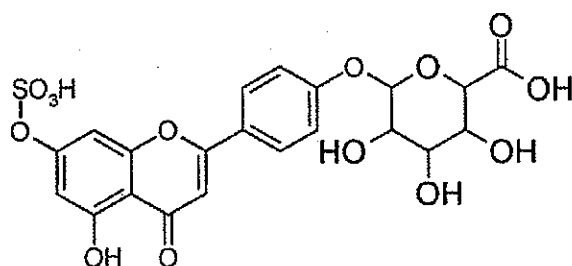
c24c(O)cc(OC1C(O)C(O)C(O)C(C(=O)O)O1)cc2OC(c3ccc(OS(=O)(=O)O)cc3)=CC4=O

logP:

0.60 : KOWWIN

-1.88 : IALOGP

1.88 (0.89) : ACD



Formula: C₂₂H₂₀O₁₃S

Weight: 524.46

SMILES:

c14c(O)cc(OS(=O)(=O)O)cc1OC(c3ccc(OC2CC(C(O)=O)C(O)C(O)C2O)cc3)=CC4=O

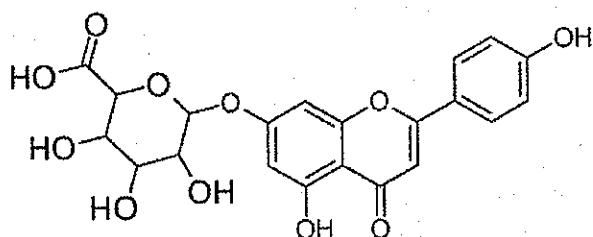
logP:

0.32 : KOWWIN

-2.06 : IALOGP

1.97 (0.89) : ACD

UGT



Formula: C₂₁H₁₈O₁₁

Weight: 446.37

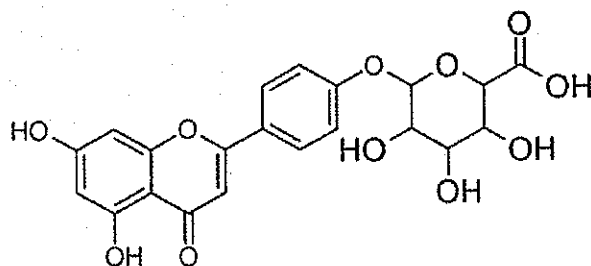
SMILES: c24c(O)cc(OC1C(O)C(O)C(O)C(C(=O)O)O1)cc2OC(c3ccc(O)cc3)=CC4=O

logP:

1.20 : KOWWIN

-0.09 : IALOGP

2.81 (0.76) : ACD



Formula: C₂₁H₁₈O₁₁

Weight: 446.37

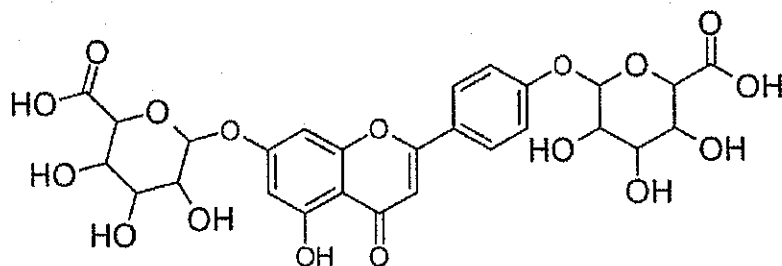
SMILES: c14c(O)cc(O)cc1OC(c3ccc(OC2OC(C(O)=O)C(O)C(O)C2O)cc3)=CC4=O

logP:

1.43 : KOWWIN

-1.68 : IALOGP

2.28 (0.76) : ACD



Formula: C₂₇H₂₆O₁₇

Weight: 622.49

0.52 : KOWWIN
0.20 : IALOGP
2.43 (0.89) : ACD

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Taux d'incidence des cancers.

Figure 2 : Mortalité par cancer du sein en fonction de la consommation de graisse

Figure 3 : Mécanismes protecteurs et activateurs

Figure 4 : Prolifération cellulaire régulée

Figure 5 : Prolifération tumorale

Figure 6 : Action des facteurs oncogènes au niveau cellulaire

Figure 7 : Tumeur bénigne dans l'épithélium

Figure 8 : Franchissement de la lame basale et envahissement capillaire

Figure 9 : Cellules MCF-7

Figure 10 : Coupe para-sagittale du sein

Figure 11 : Coupe du canal galactophore

Figure 12 : Histologie du canal galactophore

Figure 13 : Modèle d'un récepteur oestrogénique intracellulaire. Domaine de liaison (récepteurs aux œstrogènes) des cellules MCF-7

Figure 14 : Récepteur œstrogénique : déplacement du complexe protéique par l'œstrogène.

Figure 15 : ETAPE 1 : induction réponse à une hormone stéroïdienne et formation de protéines primaires.

Figure 16 : ETAPE 2 : induction de protéines secondaires.

Figure 17 : Récepteur œstrogénique alpha

Figure 18 : Récepteur œstrogénique bêta

Figure 19 : Biosynthèse des stéroïdes

Figure 20 : Biosynthèse de l'œstradiol dans la cellule cancéreuse

Figure 21 : Appareillage

Figure 22 : Couplage CLHP/SM

Figure 23 : Système Alliance WATERS

Figure 24 : Schéma du ZMD

Figure 25 : Explosion coulombienne

Figure 26 : Analyseur quadripolaire

Figure 27 : Modélisation des résultats de prolifération cellulaire : boîte de 25 cm³

Figure 28 : Comparaison entre les deux techniques d'analyse de prolifération cellulaire

Figure 29 : Gradients

Figure 30 : Analyse des différents métabolites ($C_{\text{incubée}} = 40 \mu\text{M}$)

Figure 31 : Contribution moyenne du métabolite glucuroconjugué au métabolisme total de l'apigénine

Figure 32 : Contribution moyenne du métabolite sulfoconjugué au métabolisme total de l'apigénine ;

Figure 33 : Concentration de l'apigénine non métabolisée

Figure 34 : mort cellulaire en fonction de l'aire de l'apigénine

Figure 35 : relation entre mort cellulaire et métabolite monoglucuroconjugué

Figure 36 : Courbe de regression : % activité en fonction de la concentration en Apigénine ($\mu\text{mol/L}$) selon LM à J6 (technique du Bleu Trypan) et selon YIN à J6(Technique MTS/PMS)

Figure 37 : Cycle cellulaire

Figure 38 : Action de la protéine du rétinoblastome (Rb)

Figure 39 : Changement de phosphorylation dans une cellule en division.

Figure 40 : Les deux composantes clés du système de contrôle cellulaire.

Figure 41 : Localisation des cyclines et CDK au niveau du contrôle du cycle cellulaire

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Facteurs de croissance

Tableau 2 : Teneur en apigénine de plantes de consommation courante dans une alimentation méditerranéenne.

Tableau 3 . Potentiel oestrogénique (d'après Whitten et al, 2001)

BIBLIOGRAPHIE

- B.ALBERTS, D.BRAY, J. LEWIS, M.RAFF, K.ROBERTS, J. D.WATSON. **Biologie moléculaire de la cellule**. Flammarion. 2001.
- J-P. BASLY, A. GRADOLATTO, C. TEYSSIER, C. CANIVENC-LAVIER. **Identification of apigenin metabolites in Rat Liver Perfusate by Column Switching Hight Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry**. *Monat. Chem.* 2003, 134, 355-359.
- S. BROOKS, E. LOCKE, E.H. SOULE. **Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma**. *J. Biol Chem.* 1973, 248, 6251-6253.
- G. S. CHETRITTE, H.J. KLOOSTERBOER. **Effect of OD14(LIVIAL) and its Metabolites on Human Estrogen Sulphotransferase Activity in the Hormone-Dependent MCF-7 and T-47D, and the Hormone-Independent MDA-MB-231 Breast Cancer cell lines**. *Anticancer Res.* 1999, 192, 269-276.
- X. COUMOUL, M. DIRY , C. ROBILLOT , R. BAROUKI . **Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7**. *Cancer Res.* 2001, 61, 3942-3948.
- D.ES-SAADY, A.SIMON, C. JAYAT-VIGNOLES, A.J.CHULIA, C.DELAGE. **MCF-7 Cell Cycle Arrested at G1 Through Ursolic Acid and Increased Reduction of Tetrazolium Salts**. *Anticancer Res.* 1996, 16,481-486.
- F.FAUCHER, L.LACOSTE , I. DUFORT , V. LUU-THE. **High metabolism of catecholestrogens by type 1 estrogen sulfotransferase (hEST1)**. *J Steroid Biochem Mol. Biol.* 2001, 77, 83-86.
- M.GENTRY, P.MARTEL. **Alimentation, nutrition des cancers, une perspective mondiale : application au contexte français.** , World Cancer Research Fund .2002.
- A.GRADOLATTO. **Evaluation et identification du potentiel endocrinien de flavonoïdes hydroxylés (in vitro et in vivo) et comparaison à un perturbateur**

endocrinien reconnu ,le bisphénol A . 3^{ème} réunion du comité de thèse. 25 novembre 2003 .

P.O. HARMAND, R. DUVAL, B. LIAGRE, C. JAYAT-VIGNOLES, J-L.BEYNETOUT, C. DELAGE, A. SIMON. **Ursolic acid induces apoptosis Through caspase-3 activation and cell cycle arrest in HaCat cells.** Int. J. Oncol. 2003, 23, 105-112.

K.B. HORWITZ, M.E COSTLOW, W.L. MCGUIRE . **MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors.** Steroids 1975, 26, 785-95.

D.W. HUM , A. BELANGER ,E. LEVESQUE , O.BARBIER , M. BEAULIEU , C.ALBERT , M.VALLEE ,C. GUILLEMETTE , A.TCHERNOF , D.TURGEON ,S. DUBOIS. **Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones.** J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 1999, 69, 413-23.

T. HUNTER , J. PINES. **Cyclin and cancer. II. Cyclin D and CDK inhibitors come of age.** Cell. 1994, 79, 573-582.

S.IMOTO, F.MITANI , K.ENOMOTO , K.FUJIWARA ,T. IKEDA ,M. KITAJIMA ,Y. ISHIMURA . **Related influence of estrogen metabolism on proliferation of human breast cancer.** Breast Cancer Res Treat. 1997, 42, 57-64.

U. JUSTESEN,P. KNUTHSEN. **Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoids intake by use of herbs in traditional Danish.**Food Chem. 2001, 73, 245-250.

W.J. KING ,G.L. GREENE. **Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells.** Nature. 1984, 307, 745-7.

J.A. LAVIGNE , J.E.GOODMAN , T. FONONG , S.ODWIN , P. HE , D.W.ROBERTS , JD.YAGER . **The effects of catechol-O-methyltransferase inhibition on estrogen metabolite and oxidative DNA damage levels in estradiol-treated MCF-7 cells.** Cancer Res. 2001, 61, 7488-94.

- A.S. LEVENSON, V.C.JORDAN. **MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line.** *Cancer Res.* **1997**, *57*, 3071-8.
- JC. LE BAIL, T.LAROCHE, F.MARRE-FOURNIER, G.HABRIOUX. **Aromatase and 17 β -hydroxysteroid deshydrogenase inhibition by flavonoids.** *Cancer Lett.* **1998**, *133*, 101-106.
- M.E. LIPPMAN , G. BOLAN. **Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture.** *Nature* **1975**, *256*, 592-3.
- A. MANTHEY, N. GUTHRIE. **Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines.** *J.Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5837-5843.
- D.P MCDONNELL. **Molecular Pharmacology of SERMs.** *Trends Endocrinol Metab.* **1999** *10*, 301-311.
- K.MORITO, T. HIROSE, J. KINJO, T. I HIRAKAWA,M. OKAWA, T. NOHARA, S.OGAWA, S. INOUE, M.MURUMATSU, Y. MASAMUNE. **Interaction of phytoestrogens with Estrogen Receptors α , β .** *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24*, 351-356.
- T .G. PETERSON, G.P. JI, M. KIRK, L. COWARD, C. N FALANY, S. BARNES. **Metabolism of the isoflavones genistein and bioachin A in human breast cancer cells lines.** *Am J Clin Nutr* **1998**, *68*, 1505S-1511S.
- KA .POWER, L. THOMSON. **Ligand-induced regulation of ER alpha and ER beta is indicative human breast cancer cell proliferation.** *Breast Cancer Res. Treat.* **2003**, *81*, 209-221.
- CJ.SCHERR. **Mammalian G1 cyclins.** *Cell* **1993**, *73*, 1059-1065.
- BC. SPINK , B.H. KATZ,M.M. HUSSAIN, S. PANG, S.P. CONNOR, K.M.ALDOUS, J.F. GIERTHY, D.C. SPINK. **SULT1A1 catalyzes 2-methoxyestradiol sulfonation in MCF-7 breast cancer cells.***Carcinogenesis* **2000**, *21*, 1947-57.

A.TRICHOPOULOU, E.VASILOPOULOU, P.HOLLMAN, CH.CHAMALIDES, E.FOUFA, T.R.KALOUDIS, D. KROMHOUT, P.H.MISKAKI, I. PETROCHILOU, E.POULIMA, K. STAFILAKIS, D.THEOPHILOU. **Nutritional composition and flavonoid content of edible wild and green pies : a potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet**, Food Chem.2000, 70, 319-323.

RA.WEINBERG. **The retinoblastoma protein and cell control**.Cell cycle control .Cell. 1995, 81, 323-330.

A.YEN, R.STURGILL. **Hypophosphorylation of the RB protein in S and G2 as well as G1 during growth arrest**. Exp Cell Rest 1998, 241, 324-331.

F. YIN, A.E. GIULIANO, R.E. LAW, A.J. VAN HERLE. **Apigenin inhibits growth and induces G2/M arrest by moduling cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells**. Anticancer Res. 2001, 21, 413-420.

D.T. ZAVA, W.L. MCGUIRE. **Estrogen receptor unoccupied sites in nuclei of a breast tumor cell line**. J. Biol. Chem. 1977, 252, 3703-3708.

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION.....	12
II. GENERALITES SUR LE CANCER DU SEIN. LA LIGNEE	
CELLULAIRE MCF-7.....	15
II.1. Généralités sur le cancer.....	16
II.1.1. Epidémiologie du cancer du sein.....	16
II.1.2. Origine du cancer.....	18
II.1.3. Bases génétiques.....	19
II.1.4. Fonctions des facteurs oncogènes au niveau cellulaire.....	21
II.2. La lignée cellulaire carcino-mammaire MCF-7.....	23
II.2.1. Origine des cellules.....	23
II.2.1.1. Historique.....	23
II.2.1.2. Anatomie-histologie.....	24
II.2.1.2.1. Le sein.....	24
II.2.1.2.2. Le canal galactophore.....	25
II.2.2. Les différentes découvertes.....	26
II.2.2.1. Les récepteurs.....	26
II.2.2.1.1. Les récepteurs œstrogéniques.....	26
II.2.2.1.2. Les autres récepteurs.....	30
II.2.2.2. Les enzymes de cette lignée cellulaire.....	30
II.2.2.2.1. Les enzymes de la biosynthèse des stéroïdes.....	30
II.2.2.2.2. Les enzymes de détoxification.....	32
II.2.2.2.2.1. Les cytochromes (CYP 450) (phase I).....	32
II.2.2.2.2.2. Les sulfotransférases (SULT)	33
II.2.2.2.2.3 Les sulfatases.....	33
II.2.2.2.2.4. La catéchol-O-méthyltransférase.....	33
II.2.2.2.2.5 Les UDP-glucuronosyltransférases.....	33

II.2.2.3 Les facteurs de croissance.....	34
III. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'APIGENINE.....	35
IV. COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE	
LIQUIDE/SPECTROMETRIE DE MASSE	37
IV.1. Appareillage.....	39
IV.1.1. Chromatographie liquide haute performance.....	40
IV.1.2. Le Spectromètre de masse.....	41
IV.1.2.1. La source d'ionisation : l'électrospray.....	42
IV.1.2.2. L'analyseur quadripolaire.....	43
V. PROLIFERATION CELLULAIRE.....	45
V.1. Matériels et méthodes.....	46
V.1.1. Matériels et produits chimiques pour la culture cellulaire.....	46
V.1.1.1 Réipients de culture cellulaire à usage unique.....	46
V.1.1.1.1. Boite de 25 cm ²	46
V.1.1.1.2. Plaques 6 puits.....	46
V.1.1.2. Le milieu de culture.....	47
V.1.1.3. Produits chimiques.....	47
V.1.1.4. La hotte.....	48
V.1.1.5. L'incubateur.....	48
V.1.2. Cellules MCF-7.....	49
V.1.3. Protocole.....	49
V.2. Résultats.....	50
V.2.1. Résultats des boites de 25 cm ³	50
V.2.2. Résultats sur plaques 6 puits.....	53
VI. METABOLISME CELLULAIRE.....	55

VI.1. Matériels et méthodes.....	56
VI.1.1. Extraction solide/liquide.....	56
VI.1.2. Sonication des culots cellulaires.....	56
VI.1.3. Analyse par CLHP/SM.....	57
VI.1.3.1. Colonnes.....	57
VI.1.3.2. Gradients.....	57
VI.1.3.3. Paramètres d'acquisition en électrospray négatif.....	58
VI.2. Résultats.....	59
VI.2.1 Analyse des culots cellulaires.....	59
VI.2.2 Analyse des surnageants.....	59
VI.2.2.1 Quantification des métabolites.....	60
VI.2.2.2. Relation entre mort cellulaire et excrétion.....	62
VII. DISCUSSION.....	65
VIII. CONCLUSION.....	71
ANNEXES.....	73
TESTS STATISTIQUES.....	74
MOLECULES.....	77
TABLE DES FIGURES.....	86
TABLE DES TABLEAUX.....	89
BIBLIOGRAPHIE.....	91
TABLE DES MATIERES.....	96

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 345

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

MONGER Laurent .INFLUENCE DE L'APIGENINE ET DE SES METABOLITES SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE .

Résumé : L'apigénine s'inscrit parmi les nombreux phytomicronutriments que nous ingérons dans une alimentation occidentale (*méditerranéenne*). Ce phytoestrogène a fait l'objet d'un nombre important d'études et présente des analogies structurales avec les stéroïdes endocriniens endogènes tels que les œstrogènes (œstradiol et œstrone). Cette analogie de structure lui confère une affinité de liaison pour les récepteurs œstrogéniques et ce flavonoïde présente par conséquent des propriétés agonistes/antagonistes envers ces récepteurs.

Notre étude de prolifération cellulaire pour des concentrations supérieures à 10 µmol/L montre que l'apigénine induit une mort cellulaire qui est dose-dépendante (IC₅₀=27,6 µmol/L) Nos expériences montrent une mort cellulaire dose-dépendante qui serait en G2/M du cycle cellulaire.

Deux métabolites de l'apigénine sont retrouvés au niveau du surnageant : un monosulfoconjugué et un monoglucuroconjugué.

L'apigénine et son monoglucuroconjugué sont responsable de la mort cellulaire dans des conditions de culture proche des conditions in vivo (taux d'oestrogènes circulants).

L'hypothèse du blocage du cycle cellulaire par le mécanisme d'inhibition de la phosphorylation de la protéine rétinoblastome et l'inhibition des cyclines B1 et D1 et les Cdk1,Cdk4 sur le cycle cellulaire pourrait être une orientation pour l'explication de nos résultats expérimentaux. Il reste à explorer le rôle du monoglucuroconjugué sur la protéine rétinoblastome , sur les cyclines et Cdk .

INFLUENCE OF APIGENIN AND ITS METABOLITES ON CELLULAR PROLIFERATION.

Apigenin is one of the phytomicronutriment found in European diet (mediterranean).This phytoestrogen shows structural analogy with estrogens. Apigenin was found to inhibit MCF-7 cell proliferation with IC₅₀=27,6 µmol/L and the cellular death was dose-dependent. These results are in agreement with those found previously. After incubation, two metabolites was found in the supernatant : one monoglucuroconjugate and one monosulfoconjugate. It appeared from these results that apigenin and monoglucuroconjugate are responsible of the cellular death.

MOTS-CLES : - Apigénine
- MCF-7
- IC50
- Cycle cellulaire
- Mort cellulaire
- Métabolisme
- Monoglucuroconjuguée
- Monosulfoconjuguée

KEYWORDS : - Apigenin
- MCF7
- IC50
- Cellular cycle
- Cellular death
- Metabolism
- Monoglucuroconjugate
- Monosulfoconjugate

JURY :

Président : Madame C. DELAGE, Professeur des Universités.

Juges : Madame D. ALLAIS, Maître de Conférences.

Monsieur J.P. BASLY, Maître de Conférences, Directeur de Thèse.

Monsieur S.BERNARDAUD, Docteur en Pharmacie.

Monsieur A.SIMON, Maître de Conférences.