

Filière Technologies du vivant

Orientation Biotechnologie

Diplôme 2009

Bastien Machi

Hes·SO VALAIS WALLIS

Rte du Rawyl 47 - 1950 Sion 2

*Aufbau von
eukaryotischen Zellkultur Systemen
zur Messung der Bioaktivität
von estrogenen Stoffen*

Professeurs

Bruno Schnyder
Wilfried Andlauer

Expert

Didier Picard

HES-HEVS (Sion)



EM000006112746

Sion, le 1^{er} juillet 2009

BT / 2009 / 77

Résumé :

Des tests de quantification d'oestrogènes ont été menés avec trois souches de levures recombinantes, les souches DP 450, DP 451 et DP 452. La souche DP450 exprime l'ER α , la souche DP 451 exprime l'ER β , et la souche DP 452 sert de contrôle négatif et n'exprime donc pas de récepteur oestrogénique. Les trois souches contiennent comme reporter protéine la luciférase qui, en présence d'oestrogènes, est transcrite grâce à l'induction positive des ER. La teneur en luciférase du milieu est ensuite mesurée par la luminescence dégagée en présence de luciférine.

Les essais pratiqués dans le cadre de ce projet ont montré que la croissance de la souche DP450 connaît une phase de latence de 4h, une phase exponentielle de 23h et l'apparition de la phase stationnaire après 27h de culture. Cette souche possède un μ_{\max} de 0.56 h⁻¹. La phase de latence de la souche DP 451 dure 3.17h, sa phase exponentielle 23h, et l'apparition du plateau au bout de 26h. Son μ_{\max} est de 0.39h⁻¹. Enfin la souche DP 452 possède une phase de latence de 3.17h, une phase exponentielle de 21h et une phase stationnaire i après 24h de culture.

Une influence prononcée sur la vitesse de croissance et sur la densité cellulaire maximale de la souche DP 450 est remarquée à une concentration de 1 μ M d'E2. Cet effet est moins marqué sur la souche DP 451. La croissance de la souche DP 452 est augmentée par la présence de E2, mais l'OD₆₀₀ maximale atteinte en présence de ce produit est plus faible.

Les tests de luminescence n'ont pas marché à Sion, c'est pourquoi d'autres tests ont été entrepris à Genève, dans le laboratoire qui a fourni les souches. Les tests de Genève ont révélé que l'induction de la luciférine dans les souches DP 450 et DP 451 augmente avec le temps et la concentration en oestrogènes. Il n'y a en revanche pas d'induction dans la souche DP 452.

D'autres essais ont démontré qu'aucun traitement des cellules après induction n'est nécessaire pour le bon déroulement du test car il semble que la luciférine soit majoritairement excrétée. Des tests de comparaison du potentiel d'induction de l'E2 et de la génistéine ont également été menés, révélant que la génistéine possède une affinité avec l'ER α entre 10^{-2.5} et 10⁻⁴ fois moins que l'E2. Des tests sur les 3 souches après lyophilisation ont montré que DP 450 avait une viabilité de 7%, DP 451 de 18% et DP452 de 50%.

Table des matières

Introduction :	4
Objectifs :	10
Matériel et méthode :	11
Préparation du milieu de culture	11
Minimal SD medium :	11
Solution d'acides aminés 10X :	11
Solution de Glucose 40 % (W/V) :	12
Solution de L-Histidine 100X:	12
Solution de L-Leucine 100X	12
Solution d'Adénine 200X :	13
Préparation du milieu SD avec acides aminés et Adénine (pour 100ml):	13
Culture de maintient :	13
Précultures :	14
Culture :	14
Corrélation OD600 avec le nombre de cellules :	14
Courbe de croissance	15
Induction et mesure de la bioluminescence :	15
Concentration des cellules :	16
Lyse des cellules :	16
Mesure de la viabilité des cellules.....	16
Lyophilisation des cellules :	17
Résultats :	18
Caractérisation des souches :	18
Corrélation entre l'OD600 et le nombre de cellules :	18
Courbes de croissance :	20
Évolution du μ des cultures en fonction du temps :	24
Influence du β -estradiol sur la croissance des souches DP 450, DP 451 et DP 452 :	25
Induction et luminescence des souches.....	28
Induction en fonction de la concentration en oestrogènes.....	29
Induction en fonction du temps.....	36
Influence du type de traitement des cellules sur le rapport d'induction final.....	39
Comparaison de l'effet inductif de l'E2 et de la génistéine	40

Lyophilisation des cellules :	41
Discussion	42
Caractérisation des souches :	42
Corrélation entre l'OD600 et le nombre de cellules :	42
Courbes de croissance :	42
Evolution du μ des cultures en fonction du temps :	43
Influence du β -estradiol sur la croissance des souches DP 450, DP 451 et DP 452 :	43
Induction et luminescence	44
Induction en fonction de la concentration en oestrogènes	45
Induction en fonction du temps	46
Influence du type de traitement des cellules sur le rapport d'induction final.....	47
Comparaison de l'effet inductif de l'E2 et de la génistéine	47
Lyophilisation des cellules :	47
Conclusion :	48
Perspectives :	49
Bibliographie :	50
Annexe:.....	54
Principes des techniques expérimentales de mesure de la bioactivité:	54
Méthodes avec des levures	54
Méthode avec des cellules de mammifères.....	60
Techniques expérimentales de mesure de la concentration :	63
Quelques molécules anti estrogène :	65
Le toremifén	65
Le droloxifén	66
L' idoxifén	67
Le fluvestrant.....	68

Abréviations :

FDA	:	Food and Drug Administration	YES	:	Yeast Estrogen Screening
ER	:	Estrogen Receptor	LYES	:	Lyticase Yeast Estrogen Screening
E2	:	17 β -estradiol	Trp	:	Tryptophan
ZON	:	Micotixin Zearaleon	Ura	:	Uracil
hRE	:	Hormon Responsive Element			
AhR	:	Aryl hydrocarbon receptor			

Introduction :

Les hormones sont des molécules permettant la « communication » au sein d'un organisme. Elles sont capitales pour l'activité du métabolisme. Le mot hormone provient du grec « ormon » qui signifie : l'assaut, l'élan, l'ardeur [1]. Ces molécules messagères sont généralement sécrétées en trace par des tissus spécifiques. Elles sont le plus souvent véhiculées par le sang chez les animaux, ou par la sève chez les plantes. Ces molécules sont délivrées dans des tissus cibles, afin de stimuler des voies métaboliques. En agissant sur l'activité hormonale, il est possible de soigner des maladies telles que certains types de cancer. Les hormones sont par exemple responsables de la croissance des cellules et des tissus, du rythme cardiaque, de la pression sanguine, des fonctions rénales, de la sécrétion des enzymes digestives, de la lactation ou encore du développement et du bon fonctionnement du système reproducteur. [2]

Les hormones sont divisées en plusieurs classes : les hormones peptidiques, les hormones aminées et les stéroïdes.

Les hormones peptidiques sont des hormones allant de 3 à 200 acides aminés, par exemple l'insuline et le glucagon.

Les hormones aminées contiennent un groupe amine, sont hydrosolubles et de petite taille. L'adrénaline et les hormones thyroïdiennes sont des exemples d'hormones aminées.

Les hormones stéroïdes, issues du cholestérol [3], sont des molécules liposolubles. Elles comprennent notamment la testostérone, les œstrogènes [2], et le cholestérol qui est le stérol le plus répandu dans le règne animal car c'est un des constituants lipidique de la membrane plasmique des cellules animales. [3]

Les stéroïdes se divisent en cinq familles : les androgènes, les œstrogènes, les progestatifs, les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes et les sels biliaires. La testostérone, un androgène, et l'estradiol, un œstrogène contribuent au développement du système reproducteur chez les animaux. La progestérone et d'autres progestatifs participent à la régulation du cycle menstruel ainsi qu'à la gestation. Le métabolisme glucidique, protéique et lipidique est notamment régulé par les glucocorticoïdes tels que le cortisol. Les minéralocorticoïdes régulent les équilibres salins dans les tissus. Les sels biliaires comme l'acide cholique et l'acide désoxycholique, molécules à pouvoir détergent, participent à la digestion et à l'absorption intestinale des lipides. [3]

Les œstrogènes sont des stéroïdes principalement synthétisés par les femelles sous forme de β -estradiol. Une multitude d'autres composants naturels ou chimiques ont un effet que l'on appelle œstrogène-like similaire au β -estradiol. Les composants de type naturel sont appelés phytoestrogènes s'ils proviennent de plantes et mycoestrogènes s'ils proviennent de champignons ou de moisissures. Les œstrogènes de type chimique sont appelés xœstrogènes.

Durant ces dernières années, on a remarqué une augmentation de la quantité des œstrogènes et œstrogènes-like relâchés dans l'air, les nappes phréatiques et la chaîne

alimentaire. L'activité oestrogénique de ces substances est susceptible de perturber l'activité endocrinienne normale du métabolisme allant jusqu'à le rendre stérile ou cancéreux [4]. Ces raisons motivent les différentes recherches portant sur la détection et la bioactivité de ces molécules. [4]

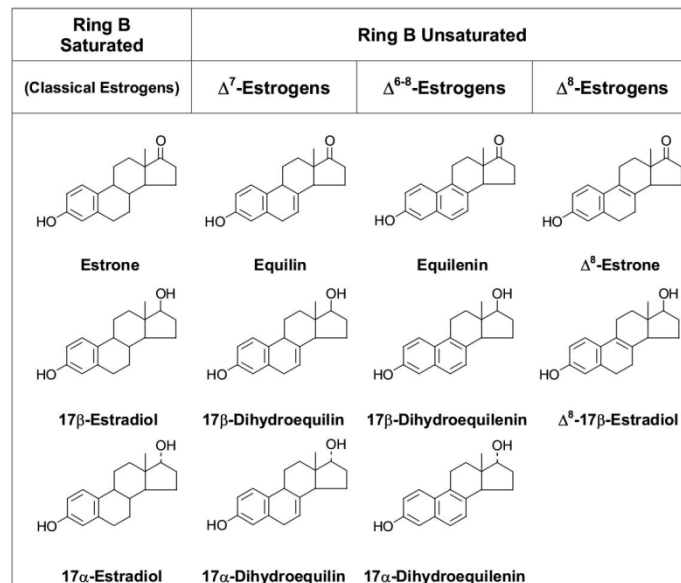


Figure 1: Forme chimique de différents composés à activité oestrogénique saturés et insaturés [5]

Les perturbateurs endocriniens sont soupçonnés d'être à l'origine de la hausse des cancers du sein et de la prostate [14]. On suppose également que le contact avec des œstrogènes lors de la gestation peut avoir un effet tératogénique sur le développement de l'embryon. Des médicaments contenant du diethylstilbestrol ont été prescrits à des femmes enceintes entre les années 1938 et 1971. Ces médicaments étaient censés prévenir les fausses couches, mais se sont révélés dévastateurs pour le développement fœtal. [15] [16]

En 2006 on a dénombré aux Etats-Unis 214'640 cancers du sein déclarés, 1'720 chez les hommes, et 212'920 chez les femmes. La même année, 41'430 personnes sont mortes de cette pathologie aux Etats-Unis, 460 hommes et 40'970 femmes. [17]

Les molécules capables de se lier aux ER sont multiples. Certaines d'entre elles ont un effet oestrogénique, et d'autres ont un effet anti-oestrogénique. Ces dernières sont utilisées dans la recherche sur le cancer du sein.

Les oestrogènes peuvent favoriser la croissance de ce type de cancer. Les molécules dites anti-œstrogènes peuvent permettre de lutter contre cette maladie. Le tamoxifen par exemple, molécule approuvée par la FDA, est utilisé comme molécule curative. Le mécanisme d'action du tamoxifen repose sur la liaison entre ce dernier et l'ER, aboutissant à un ralentissement de l'activité des oestrogènes dans le corps, par compétition entre le tamoxifen et l'œstrogène pour le même site de fixation sur l'ER. Avant qu'il puisse être lié à l'ER, il doit être métabolisé dans le foie dans sa forme active qui est le 4- hydroxytamoxifen. [18]

Tamoxifen

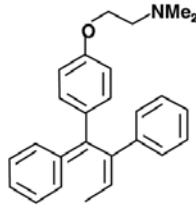


Figure 2: structure chimique du tamoxifen

Il semblerait toutefois qu'une utilisation prolongée (5 ans) de tamoxifen, peut accroître les risques de glaucome et de cataracte [19]. De plus, le tamoxifen représente un risque pour le fœtus des femmes sous traitement en cours de grossesse. Quelques cas d'avortements spontanés, ainsi que de malformations congénitales ont été décrits après la prise de tamoxifen. Il faut noter que l'augmentation de cancer du col de l'utérus due à la prise de tamoxifen peut aller jusqu'à 1 :1000.

D'autres effets secondaires indésirables peuvent apparaître après la prise de tamoxifen tels que : des néoplasèmes malins et bénins, l'apparition de myomes, une réduction du nombre de trombocytes, des leucopénies, des hémorragies vaginales, des thromboses veineuses profondes, des troubles gastro-intestinaux, de l'alopécie et des éruptions cutanées. [20]

Ces effets indésirables justifient la recherche sur les anti-œstrogènes de type tamoxifen-like, qui possèderaient une activité anti-oestrogénique, mais avec des effets secondaires réduits.

Les sources de xénoestrogènes sont très variées : on les trouve principalement dans les pesticides sous forme de Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), de méthoxychlor, de dieldrin, de kepone, dans les solvants sous forme d'hydrocarbures, et dans les plastiques sous forme de bisphénol-A [6].

En dresser une liste exhaustive serait impossible, tant leurs variétés et leurs sources sont importantes. Les plus inquiétants sont les phtalates contenus dans nombres de produits cosmétiques pouvant traverser la peau, et être détectés dans le sang.

Les styrènes et les dioxines sont connus pour leur activité oestrogénique. L'activité oestrogénique des styrènes à été étudiée sur la prolifération de cellules MCF-7. Il en ressort que tous les styrènes n'ont pas forcément une activité oestrogénique équivalente. Les styrènes avec deux cycles benzéniques ont une activité plus faible que les styrènes à trois cycles benzéniques [34].

Les xénoestrogènes se trouvent également là où on le soupçonne le moins. Une étude a par exemple démontré que l'on trouve une activité oestrogénique dans les bouteilles d'eau minérale. En effet, 60% des eaux mesurées présentaient des contaminations aux œstrogènes avec une activité maximum équivalente à 75.2 ng/l de E2. On suppose qu'au moins une partie des œstrogènes présents dans ces eaux provient des bouteilles en plastique [30]. Cette découverte est inquiétante dans le sens où l'humain est en permanence exposé à des matières susceptibles de perturber le système endocrinien. On peut raisonnablement

supposer qu'on retrouve l'activité oestrogénique dans certains récipients en plastique d'eau minérale, dans des biberons, dans certains jouets pour enfants, dans l'emballage de nos aliments, dans les plastiques de nos voitures ainsi que dans une multitude d'autres objets en plastique de notre quotidien.

D'autres molécules comme les dioxines, ne sont pas véritablement des œstrogènes-like, car ils ne se lient pas directement à l'ER. Mais ces molécules sont malgré tout des perturbateurs endocriniens qui touchent à la biosynthèse des œstrogènes. Les dioxines se fixent à des récepteurs appelés AhR. Une fois activés, ces récepteurs modulent la transcription de certains gènes comme *cyp19a* et *cyp19b*. Ces gènes codent pour la cytochrome p450 aromatasase, enzyme qui catalyse la dernière étape de la biosynthèse des œstrogènes. Cet effet peut donc augmenter le taux d'œstrogènes dans le métabolisme et perturber le fragile équilibre que représente le système hormonal [35]. De plus, d'autres études ont démontré que les dioxines favorisent le "wasting syndrome", la prolifération des cancers, la tératogénèse, l'hépatotoxicité et l'immunotoxicité. [36]

Malgré les vives inquiétudes à propos des œstrogènes, il semblerait que dans les pays ayant un régime semi-végétarien comme une grande partie de l'Asie, on dénombre moins de cancers du sein que dans les pays occidentaux [31].

Il semblerait même que certains diphénols à activité oestrogénique représentent un bon moyen de se protéger contre le cancer et l'ostéoporose. La prise de soja par exemple, prévient l'oxydation de certaines lipoprotéines, responsables du transport des stéroïdes dans le corps. Des essais sur les animaux ont suggéré que la prise de lignans et d'isoflavanoïdes peuvent prévenir l'apparition de cancers et d'athéroscléroses. Cependant, durant certains de ces essais il ne fut pas possible de séparer l'effet de ces phytoestrogènes de ceux d'autres composés présents dans la nourriture [31].

Une étude menée en Suède a démontré qu'un régime riche en phytoestrogènes était corrélé avec la décroissance des risques de cancer de la prostate [32]. On a remarqué qu'une grande consommation de phytoestrogènes augmentait la teneur de ces composés dans l'urine et les selles, engendrant une augmentation des phytoestrogènes dans les nappes phréatiques [33]. Concernant les phytoestrogènes, dont les membres les plus abondants sont les lignans et les isoflavanoïdes, la source qui touche le plus l'être humain est la source alimentaire. Il est envisagé d'enrichir l'alimentation en isoflavones, soit sous forme de pilules, soit directement dans les produits alimentaires [31].

Les phytoestrogènes ne possèdent pas que des qualités. Une étude portant sur l'implication des phytoestrogènes dans des inflammations du colon sur des rats a démontré que les phytoestrogènes augmentent la zone sur laquelle s'étend l'inflammation [37].

Tableau 1 : liste d'une sélection représentative d'aliments avec leur concentration en phytoestrogènes [7]

Source de phytoestrogène	Concentration en phytoestrogènes [µg/100g]	Source de phytoestrogènes	Concentration en phytoestrogènes [µg/100g]
Graines de lin	379380	Café	6.3
Graines de soja	103920	Pastèques	2.9
Tofu	27150.1	Lait de vache	1.2
Yogourt au soja	10275	Pousses de soja	789.6
Graines de sésame	8008.1	Brocolis	94.1
Pain au lin	7540	Choux	80
Pain complet	4798.7	Prunes sèches	183.5
Lait de soja	2957.2	Pêches	64.5
Humos	993	Fraises	51.6
Ail	603.64	Mûres	47.6
Pousses de fève chinoise	495.1	Pistaches	382.5
Abricots secs	444.5	Châtaignes	210
Dates sèches	329.5	Noix	139
Graines de tournesol	216	Noix de cajou	121.9
Pousses d'alfalfa	210.2	Noisettes	107.5
Huile d'olive	180.7	Lentilles	36.5
Amandes	131.1	Vin rouge	53.9
Haricots verts	105.8	Thé vert	13
Cacahuètes	34.5	Vin blanc	12.7
Oignons	32	Thé noir	8.9
Myrtilles	17.5	Café décaféiné	5.5
Maïs	9	Bière	2.7

Le Tableau 1 présente les aliments les plus importants contenant des phytoestrogènes. On y observe une grande différence de concentration de ce type de molécules d'un aliment à l'autre. Effectivement cela va de 1.2 µg/100g pour le lait de vache à 379380 µg/100g dans les graines de lin, c'est-à-dire un rapport supérieur à 300'000 fois.

Les récepteurs des œstrogènes sont des récepteurs nucléaires stéroïdiens. Il semblerait que leur localisation soit controversée : on suppose qu'en absence de leur ligand, ils se situent dans le noyau ou dans le cytoplasme, restent sous leur forme inactive, et sont liés à la protéine HSP 90 masquant le site de localisation nucléaire du récepteur. Lorsque les ER sont mis en présence de molécules à activité œstrogénique, l'œstrogène se lie avec son récepteur, induisant un changement conformationnel de ce dernier, et détachant la protéine HSP de l'ER. L'ER ainsi configuré peut migrer dans le noyau, et son holorécepteur se fixer à une séquence bien précise de l'ADN. Les séquences où se fixe l'ER sont appelées HRE. Une fois l'homodimère fixée, elle sert de co-régulatrice et modifie l'activité transcriptionnelle du gène régulé. En principe les ER aboutissent à une régulation positive du gène régulé et à une meilleure expression du gène régulé, donc à une plus grande quantité de protéines produites. [8]

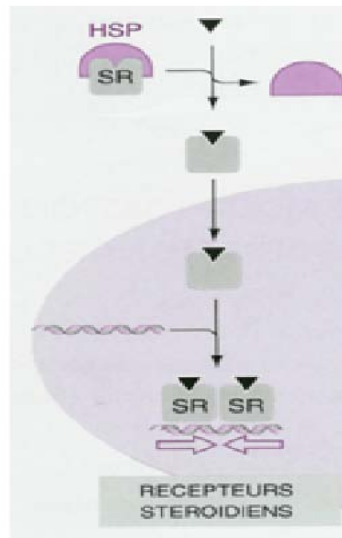


Figure 3 : schéma des mécanismes hormonaux stéroïdiens impliqués dans la régulation de l'ADN [8]

En général, l'interaction entre l'ER et HRE aboutit à une dimérisation du RE. Chaque élément du RE se fixe à une séquence hexanucléotidique particulière, respectivement : 5'-AGGTCA-3' et 3'-ACTGGA-5', dont la répartition est de une par brin de la double hélice d'ADN. [8]

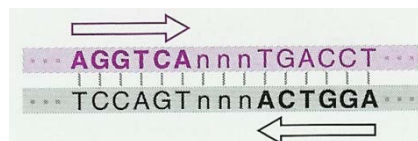


Figure 4: séquences d'ADN sur lesquelles chacune des monomères de l'ER vient se fixer [8]

La quantification de la bioactivité des oestrogènes peut se faire par l'intermédiaire de plusieurs types de cellules. En général il s'agit de cellules de mammifères ou de levures.

La détection de l'activité oestrogénique se fait en principe en modifiant les cellules avec 2 plasmides. Un des plasmides permet l'expression d'un des ER, α ou β , l'autre est le plasmide sur lequel le groupe récepteur + oestrogène va avoir un effet d'induction positive sur la reporter protéine codée par un gène porté par ce dernier.

Dans le cadre de ce travail, 3 souches de levures recombinantes ont été utilisées. Les 3 souches se nomment DP450, DP451 et DP452. La souche DP 450 exprime le récepteur oestrogénique α , la souche DP 451 exprime le récepteur oestrogénique β , et la souche DP452 n'exprime aucun récepteur. La souche DP 452 sert de contrôle négatif.

Les 3 souches portent un plasmide contenant un gène qui code pour la luciférase. L'induction de ce gène se fait par l'intermédiaire des ER, mais uniquement en présence d'oestrogène. L'induction de la luciférase est en principe proportionnelle à l'activité oestrogénique de l'échantillon qui a été ajouté au milieu de culture. Comme il s'agit d'une recombinaison hétérologue, il y a un risque de délétion des plasmides. Pour garantir que les levures utilisées portent les plasmides, leur milieu de culture doit être dépourvu de tryptophane et d'uracil. La détermination de la quantité de luciférase se fait par bioluminescence en ajoutant de la luciférase au milieu contenant les cellules induites.

La bioluminescence est un processus de cr\u00e9ation de lumi\u00e8re par un organisme qui est le r\u00e9sultat de la conversion d'\u00e9nergie en lumi\u00e8re [48]. Une luminescence particuli\u00e8rement connue est celle des lucioles qui utilisent des signaux lumineux pour attirer leurs cong\u00e9n\u00e8res [49]. Les compos\u00e9s impliqu\u00e9s dans de telles r\u00e9actions peuvent varier d'un organisme \u00e0 l'autre, mais elles ont toutes en commun le fait d'utiliser de l'ATP, de l'oxyg\u00e8ne, de la lucif\u00e9rine comme porteur de lumi\u00e8re et de la lucif\u00e9rase comme \u00e9metteur de lumi\u00e8re.

Il existe plusieurs types de lucif\u00e9rase : les plus connus sont la *renilla* lucif\u00e9rase et la fire fly lucif\u00e9rase. Les diff\u00e9rentes lucif\u00e9rases se rassemblent sous le seul terme g\u00e9n\u00e9rique de luminase : il d\u00e9signe toutes les enzymes responsables du ph\u00e9nom\u00e8ne de bioluminescence dans la nature [50].

Objectifs :

Comme on soup\u00e7onne les perturbateurs endocriniens de type oestrog\u00e9nique d'\u00eatre \u00e0 l'origine d'une multitude de pathologies, il serait tr\u00e8s utile de mettre au point un test simple et rapide pour la d\u00e9tection de tels produits.

Les objectifs de ce travail consistent \u00e0 choisir une technologie d\u00e9j\u00e0 existante, \u00e0 l'utiliser pour mettre en place un test pratique pour ce type de d\u00e9tection, \u00e0 le valider, et \u00e0 l'utiliser pour tester diff\u00e9rentes substances \u00e0 activit\u00e9 oestrog\u00e9nique.

Matériel et méthode :

Préparation du milieu de culture

Minimal SD medium :

Matériel :

- Yeast Nitrogen Base Without amino acids ; Y0626-256G ; Batch: 098K1260; Sigma-Aldrich Co. 3050 Spruce street, St Louis, MO 63103 USA
- Agar bacteriological (Agar Bios Special LL) ; 4110302 ; lot: 37X000; Biolife Italiana S.r.L Viale Monza 272 – 20128 Milano Italia
- Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- Pesé 6.7 g de yeast nitrogen base without amino acids
- Si le milieu doit être solide ajouter 30 g d'agar bactériologique
- Ajouter 900 ml d'H₂O
- Chauffer dans une casserole jusqu'à dissolution complète de la poudre
- Autoclaver à 121 °C durant 15 minutes

Solution d'acides aminés 10X :

Materiel :

- L-Isoleucine ; MP 8631 ; réserve du laboratoire de chimie analytique de la HES-SO Valais
- L-Valine ; MP 8565 ; batch : 991102 ; réserve du laboratoire de chimie analytique de la HES-SO Valais
- Adénine 99% ; A8624-5G ; lot : 034K0065 ; Sigma-Aldrich Co. 3050 Spruce street, St Louis, MO 63103 USA
- L-Arginine ; 11009 ; lot: 408807/1 52800 ; Flucka Chemie GmbH Buchs Zwitterland
- L-lysine ; L5501 ; réserve du laboratoire de chimie analytique de la HES-SO Valais
- L-Méthionine ; CN 10431 ; réserve du laboratoire de chimie analytique de la HES-SO Valais
- L-Phénylalanine ; 78020 ; lot : 370499/1 13098 ; Flucka Chemie GmbH Buchs Zwitterland
- L-Thréonine ; 89179-10G ; lot: 0001405306 ; Sigma-Aldrich Co. 3050 Spruce street, St Louis, MO 63103 USA
- L-Tyrosine ; 93829 ; lot: 276967/1 795 ; Flucka Chemie GmbH Buchs Zwitterland
- Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- Peser :30 mg de L-isoleucine
150 mg de L-Valine
50 mg d'Adénine
20 mg de L-Arginine
30 mg de Lysine
20 mg de L-Méthionine

50 mg de L-Phenylalanine
200 mg de L Threonine
30 mg de L-Tyrosine

- Ajouter 100 ml de H₂O
- Filtrer avec un filtre de 0.22 µm

Solution de Glucose 40 % (W/V) :

Matériel :

- D(+)- Glucose ; réserve du laboratoire de microbiologie ; HES-SO Valais
- Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- Peser 40 g de D-Glucose
- Ajouter 100 ml D'H₂O
- Autoclaver à 121 °C durant 15 minutes

Solution de L-Histidine 100X:

Matériel :

- L-Histidine ; 53320 ; réserve du laboratoire de chimie analytique de la HES-SO Valais
- Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- Peser 200mg de L-Histidine
- Ajouter 100 d'H₂O
- Filtrer avec un filtre de 0.22 µm

Solution de L-Leucine 100X

Matériel :

- L-Leucine ; MP 8501 ; réserve du laboratoire de chimie analytique de la HES-SO Valais
- Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- Peser 1000 mg de L-Leucine
- Ajouter 100 d'H₂O
- Filtrer avec un filtre de 0.22 µm

Solution d'Adénine 200X :

Matériel :

- Adénine 99% ; A8624-5G ; lot : 034K0065 ; Sigma-Aldrich Co. 3050 Spruce street, St Louis, MO 63103 USA
- Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- Peser 400 mg d'Adénine
- Ajouter 100 d'H₂O
- Filtrer avec un filtre de 0.22 µm

Préparation du milieu SD avec acides aminés et Adénine (pour 100ml):

Matériel :

- Solution d'acides aminés 10X
- Solution de L-Histidine 100X
- Solution de L-Leucine 100X
- Solution de Glucose 40 % (W/V)
- Solution d'Adénine 200X
- Minimal SD medium
- Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- Pipeter: 10 ml de solution d'acides aminés 10X
 - 1 ml de solution de L-Histidine 100X
 - 1 ml de solution de L-Leucine 100X
 - 5 ml de solution de Glucose 40 % (W/V)
 - 0.5 ml de solution d'Adénine 200X
 - 82.5 ml de minimal SD medium

Culture de maintient :

Matériel :

- Souche DP 450, Dp 451 et DP452
- Milieu SD avec acides aminés, adénine et agar bactériologique
- Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- Verser 20 ml de Milieu SD avec acides aminés, adénine et agar bactériologique chaud (env. 45°C)
- Attendre que le milieu se solidifie

- Ensemencer les plaques avec les cellules (une souche par plaque)
- Incuber les plaques à l'envers durant 5 jours à 30°C
- Mettre du parafilm autour des plaques et les placer à 4°C à l'envers

Précultures :

Matériel :

- Souche DP 450, DP 451 et DP452
- Milieu SD avec acides aminés et Adénine
- Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- Verser 10 ml de milieu SD avec acides aminés et Adénine dans des Erlenmeyers
- prélever un pellet de cellule des cultures de maintien, et les resuspendre dans les Erlenmeyers contenant le milieu (une souche par Erlenmeyer)
- Placer les Erlenmeyers inoculés de 6h à une nuit dans un incubateur à 30°C sous une agitation de 200 RPM

Culture :

Matériel :

- Spectrophotomètre Biochrome Libra S12
- Préculture des souches DP 450, DP 451 et DP 452
- Milieu SD avec acides aminés et Adénine
- Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- Effectuer une mesure de la densité optique des précultures
- les diluer dans des Erlenmeyers jusqu'à l'OD₆₀₀ voulu avec du milieu SD avec acides aminés et adénine.
- Placer les Erlenmeyers inoculés de dans un incubateur à 30°C sous une agitation de 200 RPM

Corrélation OD600 avec le nombre de cellules :

Matériel :

- Ensemenceur en spirale EDDY JET
- Spectrophotomètre Biochrome Libra S12
- Culture des souches DP 450, DP 451 et DP 452
- Milieu SD avec acides aminés et Adénine
- Milieu SD avec acides aminés, adénine et agar bactériologique
- Sodium chloride ; 368257 ; batch: 7L312227M ; Carlo Erba Reactifs SA Chaussée du Vexin – BP 616 Val de Reuil France
- Tryptic Digest of casein ; 4123402 ; lot: 6H2441; Biolife Italiana S.r.L Viale Monza 272 – 20128 Milano Italia

-Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- Verser 20 ml de Milieu SD avec acides aminés, adénine et agar bactériologique chaud (env. 45°C)
 - Attendre que le milieu se solidifie
 - Préparer du VL en dissolvant 1g de Tryptic Digest of casein + 8.5g de chlorure de sodium dans 1L d'H₂O
 - Prendre la densité optique des cultures
 - Prélever 10 µl de culture, et les placer dans un tube stérile contenant 9.990 ml de VL
 - Vortexer le tube
 - Utiliser l'EDDY JET pour ensemercer une plaque avec le contenu du tube
 - Diluer les cultures avec du milieu SD avec acides aminés et Adénine
 - Renouveler l'opération depuis la 4^{ème} étape jusqu'à avoir couvert la fourchette d'OD₆₀₀ désirée
 - Placer les plaques à 30°C durant 3 jours
 - Compter le nombre de colonies présente sur chaque plaque
 - Multiplier le nombre de colonies ainsi obtenues par 20325.2 (facteur comprenant le facteur de dilution et le volume ensemercer sur la plaque) pour obtenir un nombre de cellules *ml⁻¹
- Créer un Graphique comprenant l'OD600 en ordonnées et la concentration cellulaire en abscisse

Courbe de croissance

Matériel :

- Culture des souches DP 450, DP451 et DP 452 au T0
- Spectrophotomètre Biochrome Libra S12
- Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- Prendre un échantillon de la culture chaque h
- Mesurer l'OD₆₀₀ 3X
- Créer un Graphique comprenant l'OD600 en ordonnées et le temps en abscisse

Induction et mesure de la bioluminescence :

Matériel :

- Citric acid ; 27488 ; lot: 13804643708218 ; Flucka Chemie GmbH Buchs Zwitterland
- Trisodium citrate ; 131655.1211 ;lot: 95149DGR ; Panreac Quimica SA Barcelona Espagne
- Culture des souches DP 450, DP451 et DP 452
- D-Luciférine ; L9504-10MG ; Sigma-Aldrich Co. 3050 Spruce street, St Louis, MO 63103 USA
- Milieu SD avec acides aminés et Adénine
- β-Estradiol >= 98% ; E2758-250MG ; lot: 098K1372 ; Sigma-Aldrich Co. 3050 Spruce street, St Louis, MO 63103 USA
- Ethanol absolu ; réserve du laboratoire de chimie générale de la HES-SO Valais
- Luminomètre Varian Cary Eclipse , Chameleon ou Turner TD-20

-Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- Dissoudre 10 mg dans un mélange contenant 5 ml d'une solution 0.1M d'acide citrique et 65 ml d'une solution 0.1M de trisodium citrate
- Préparer une solution de 10 mM de β -Estradiol dans de l'éthanol absolu
- Effectuer les dilutions voulues de la solution de β -Estradiol
- Diluer les cultures avec du Milieu SD avec acides aminés et Adénine jusqu'à un OD_{600} de 0.75 pour une induction de 6h et jusqu'à 0.1 pour une induction overnight
- Ajouter 1 μ l de solution de β -Estradiol pour 1 ml de culture
- Attendre entre 6h et un nuit
- mesurer la Bioluminescence

Concentration des cellules :

Matériel :

- Culture des souche DP450, DP451 et DP 452
- Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- Centrifuger les cellules à 9000G
- Retirer le surnagent
- resuspendre le pellet de cellules dans un volume de H₂O 10X inférieur au volume de départ

Lyse des cellules :

Matériel :

- Culture des souche DP450, DP451 et DP 452
- Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- placer 1 ml de culture dans un eppendorf de 2 ml
- ajouter 0.8 ml de bille
- placer dans l'appareil à lyse mécanique 5X 30 sec

Mesure de la viabilité des cellules

Matériel :

- Solution d'Erythrosine- β ; réserve du laboratoire de microbiologie ; HES-SO Valais
- Culture des cellules DP 450, DP 451 et DP 452

Méthode :

- Prendre 0.5 ml de culture
- Ajouter 0.5 ml de solution d'Erythrosine- β
- Placer quelques goutte du mélange entre la lamelle couvre objet et une plaque de Neubauer
- Compter le nombre de cellules roses (mortes) et le nombre de cellules totale sur 5 grands carrés
- effectuer le calcul suivant (nombre de cellules totale-nombre de cellules rose)/Nombre de cellules totales

Lyophilisation des cellules :

Matériel :

- Culture des cellules DP 450, DP 451 et DP 452
- Lyophilisateur
- Matériel standard de laboratoire

Méthode :

- mesurer la viabilité des cellules
 - Placer 1 ml de culture dans un eppendorf (la culture peut être centrifugée et resuspendue dans du VL ou un solution de Glycérol)
 - Mettre l'eppendorf durant une nuit à -80°C
 - placer l'eppendorf dans le lyophilisateur durant 24h
 - sortir les échantillons du lyophilisateur
- (pour réactiver les cellules les replacer dans du Milieu SD avec acides aminés et Adénine pendant 10 min, il est possible de mesurer le taux de mortalité des cellules dû à la lyophilisation en faisant une mesure de la viabilité directement après la revitalisation)

Résultats :

Caractérisation des souches :

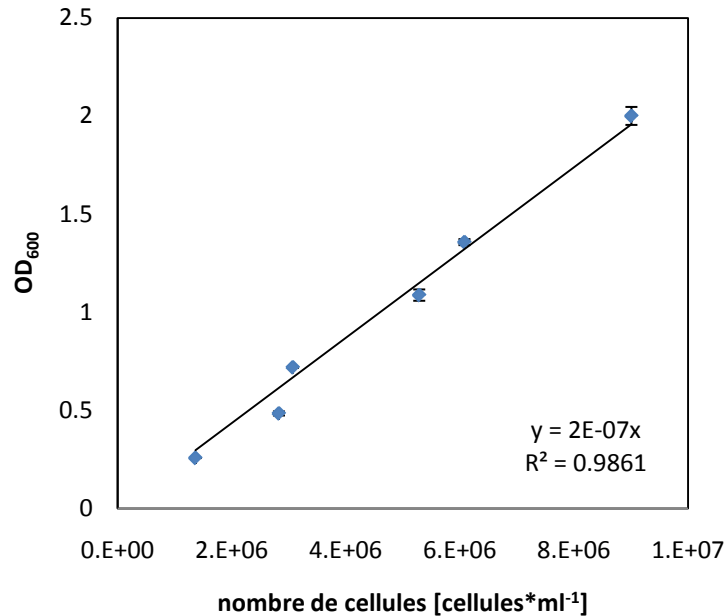
La caractérisation des trois souches utilisées pour la mise au point de ces essais de quantification de la bioactivité des oestrogènes représente la première étape de ce travail. En effet, il est nécessaire de connaître les caractéristiques des souches permettant l'essai. La caractérisation des souches telle que les courbes de croissance, les taux de croissance, l'influence des oestrogènes et la corrélation entre l'OD₆₀₀ et le nombre de cellules, sont autant d'informations qui permettent l'optimisation des essais.

Corrélation entre l'OD₆₀₀ et le nombre de cellules :

La corrélation entre l'OD₆₀₀ et le nombre de cellules est primordiale, car la densité optique intervient dans tous les autres essais. C'est pourquoi l'obtention d'une équation reliant les deux paramètres serait un outil utile si l'on veut rapporter les valeurs obtenues à un nombre de cellules.

Le Graphique 1 a été obtenu en diluant une culture de 24h avec du milieu de culture afin d'obtenir différents OD₆₀₀ reportés sur l'axe des ordonnées du Graphique 1. La mesure de chaque OD₆₀₀ a été faite à triplicat. Concernant la mesure des valeurs d'OD₆₀₀, celles qui étaient comprises en-dessous de 0.5 n'ont pas été diluées avant la mesure, celles comprises entre 0.5 et 1 ont été diluées 5 fois, et celles supérieures à 1, 10 fois.

Pour chaque valeur d'OD₆₀₀, 1 ml de culture a été prélevé et dilué 1000 fois dans du VL. 49.2 µl de la suspension de cellules ont été ensemencés sur une plaque de pétri avec milieu sélectif sans trp et ura avec la technique de l'ensemencement en spirale. Après 48h, les colonies présentes sur les plaques représentant les différentes dilutions ont été comptées, et les valeurs obtenues ont été reportées sur l'axe des abscisses. Le facteur de dilution de 1000 fois a été pris en compte avant le report des points. Chaque point du Graphique 1 représente la moyenne des mesures d'OD₆₀₀ à une dilution donnée, les barres d'erreurs de chaque point représentent ± l'écart-type entre les OD₆₀₀ en ce point.



Graphique 1 : OD₆₀₀ en fonction de la concentration en cellules (DP450)

Le Graphique 1 permet de déterminer la densité cellulaire en fonction de la densité optique à 600 nm. A des valeurs d'OD₆₀₀ de 0.256, 0.483, 0.718, 1.086, 1.357 et 2.000, on obtient respectivement en million de cellules, 1.361, 2.825, 3.069, 5.284, 6.077 et 9.004. La fourchette de densité optique étudiée (0.256 à 2.000) a été prise car elle comprend la densité optique utilisée lors du début de l'induction qui est de 0.8. L'évolution de la densité optique évolue de manière apparemment linéaire avec la concentration de cellules. On peut observer que la barre d'erreur du point à un OD₆₀₀ de 0.483 est le point le plus éloigné de la droite de tendance : malgré tout, les barres d'erreurs relatives à ce point sont confondues avec ce dernier. La plage représentée par les barres d'erreurs du point à l'OD₆₀₀ de 2.000 est la plage la plus étendue de tous les points.

La détermination du nombre de cellules s'est faite par ensemencement en spirale. Une série de tentatives pour l'obtention de la densité cellulaire avec des plaques de Neubauer ont été entreprises mais se sont révélées peu précises car le bourgeonnement des levures laisse une grande place à la subjectivité de l'interprétation de l'opérateur. Effectivement, il est difficile de décider d'une systématique de comptage, en particulier lorsqu'il s'agit de choisir la limite entre une cellule bourgeonnante qui compte pour une cellule et une cellule bourgeonnante qui compte pour deux cellules. La Figure 8 permet d'observer ce phénomène. La photographie de la Figure 8 provient de l'observation d'une culture de la souche DP450 sous un microscope optique muni d'une caméra avec un contraste de phase 2 à un grossissement de 400 fois.

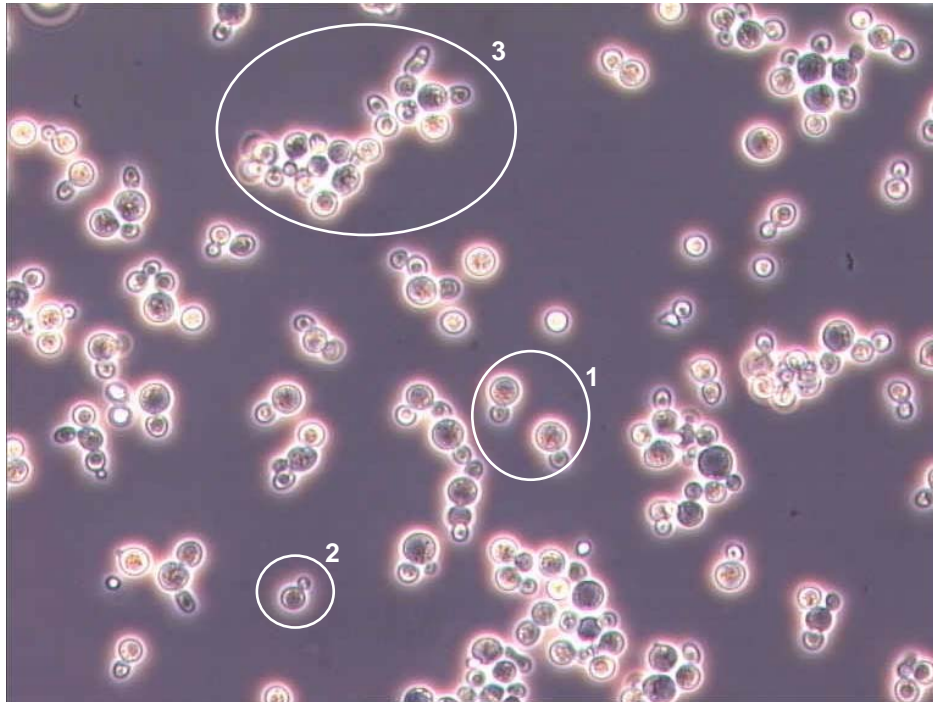


Figure 5 : Photographie de *Saccharomyces cerevisiae* (souche DP450) agrandie 400 fois avec un contraste de phase 2

La Figure 5 montre la difficulté de l'obtention d'une systématique de comptage. Pour une meilleure compréhension, les zones en question dans ce paragraphe, ont été mises en évidence dans une ellipse suivie par un chiffre en haut à droite. Le postulat lors du comptage de levures est qu'une cellule fille compte comme une cellule uniquement si sa taille est supérieure ou égale à la 50% de la taille de la cellule mère. La zone 1 représente deux cellules bourgeonnantes dont les cellules filles représentent environ 50% de la taille des cellules mères. Les cellules filles dans la zone 1 doivent compter comme des cellules à part entière. On devrait donc compter 4 cellules dans la zone 1. Dans la zone 2 la taille de la cellule fille est inférieure à 50% de la taille de la cellule mère. On doit donc compter une seule cellule dans la zone 2. La zone 3 représente un amas de cellules bourgeonnantes. Il est difficile de distinguer quelles cellules bourgeonnent, et quelle est la cellule mère de chaque cellule fille. C'est dans le genre de situation de la zone 3 qu'il est difficile d'appliquer la systématique de comptage décrite précédemment.

Courbes de croissance :

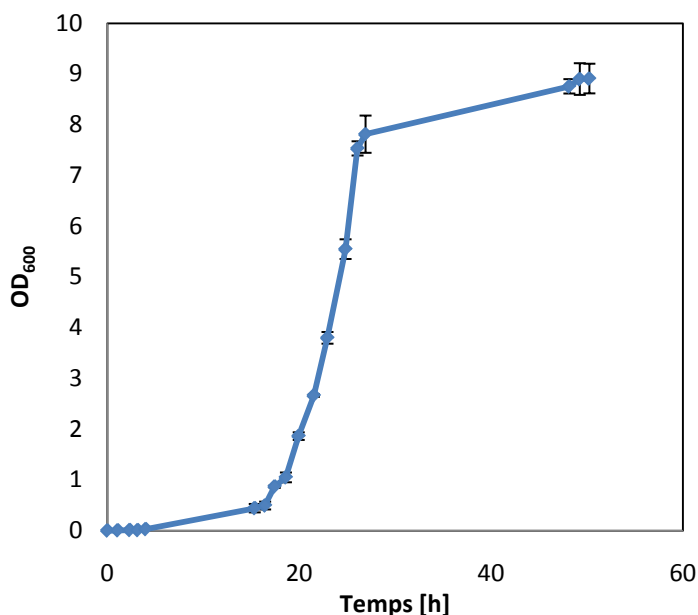
Les courbes de croissance permettent de caractériser le temps des différentes phases de la croissance de chacune des souches de ces essais. L'identification des durées de chacune des phases de croissance est particulièrement utile en vue d'une production de la souche à grande échelle ainsi que pour connaître les moments où les cellules sont le plus sensibles à l'induction.

La construction des Graphiques 2, 3 et 4 s'est faite en faisant une culture de chacune des souches et en prélevant des échantillons à des temps définis. Chaque échantillon a subi une

analyse de la densité optique à 600 nm. Cette mesure s'est faite à triplicat sauf pour les 5 premiers points de chacune des courbes où la mesure n'a été faite qu'une seule fois.

La moyenne des valeurs d'OD₆₀₀ a été rapportée sur l'axe des ordonnées et le temps écoulé depuis l'initiation de la culture lors de la prise de l'échantillon a été reporté sur l'axe des abscisses. Les échantillons dont les OD₆₀₀ étaient supérieurs à 1 ont été dilués 10 fois, les autres n'ont pas été dilués. Les barres d'erreurs représentent ± l'écart-type entre les valeurs d'OD₆₀₀ relatives à chacun des points. Par souci de clarté, les valeurs d'OD₆₀₀ et de temps sont présentées dans des Tableaux plutôt que dans les textes relatifs aux Graphiques 2, 3 et 4. Les valeurs présentées dans les Tableaux 2, 3 et 4 sont des valeurs arrondies à 2 chiffres après la virgule. Les valeurs présentées dans les commentaires peuvent légèrement différer des valeurs des Tableaux en raison de ces arrondis.

Tableau 2 : Valeurs associées au Graphique 2

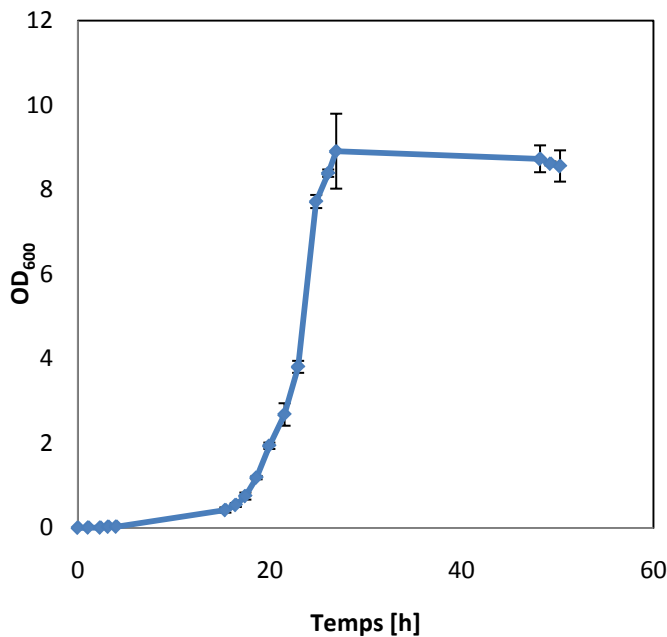


Graphique 2 : Croissance de la souche DP 450 en fonction du temps

Temps [h]	OD600 moyen	écart-type
0.00	0.00	-
1.08	0.01	-
2.33	0.01	-
3.17	0.01	-
4.00	0.03	-
15.37	0.44	0.08
16.45	0.50	0.08
17.45	0.87	0.03
18.62	1.05	0.10
19.95	1.86	0.08
21.53	2.66	0.03
22.95	3.80	0.12
24.83	5.55	0.19
26.08	7.53	0.14
26.92	7.81	0.37
48.17	8.76	0.14
49.25	8.90	0.31
50.25	8.91	0.29

Le Graphique 2 et le Tableau 2 montrent que la souche DP 450 connaît une phase de latence apparente qui dure environ 4 h, l'OD entre 3.17 et 4.00 h triple. La phase de latence est suivie par la phase exponentielle qui dure environ 23 h. Une phase "probablement" stationnaire intervient après environ 27 h de culture. On observe que les barres d'erreurs des 4 derniers points recouvrent une plage étendue comprise entre 0.28 et 0.74 d'OD₆₀₀ montrant que la croissance observable lors de la phase stationnaire n'en est pas forcément une car ces dernières se recouvrent. Les 5 premiers points du Graphique 2 ne possèdent pas de barres d'erreurs car la mesure de l'OD₆₀₀ ne s'est pas faite à triplicat, et ne permettent pas le calcul d'un écart-type. L'étude de la croissance de la souche DP 450 n'a pas été menée jusqu'à la phase de déclin. La densité optique maximale mesurée est de 8.91 et l'OD₆₀₀ de début de culture était de 0.002. On observe également de l'OD₆₀₀ entre les deux derniers points.

Tableau 3 : Valeurs associées au Graphique 3



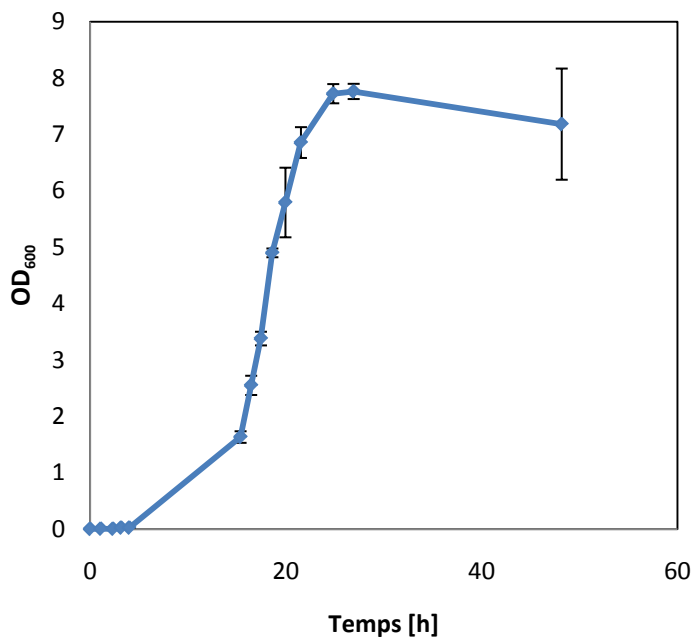
Temps [h]	OD600 moyen	écart-type
0.00	0.01	-
1.08	0.01	-
2.33	0.01	-
3.17	0.03	-
4.00	0.03	-
15.37	0.42	0.06
16.45	0.54	0.05
17.45	0.75	0.08
18.62	1.19	0.04
19.95	1.94	0.08
21.53	2.68	0.27
22.95	3.81	0.14
24.83	7.72	0.16
26.08	8.39	0.09
26.92	8.91	0.89
48.17	8.73	0.32
49.25	8.62	0.05
50.25	8.56	0.37

Graphique 3 : Croissance de la souche DP 451 en fonction du temps

On observe sur le Graphique 3 et le Tableau 3 que la phase de latence de la souche DP 451 dure environ 3 h. Effectivement la densité optique triple entre 2.33 et 3.17 h. La phase exponentielle de cette souche dure 23 h et sa phase stationnaire commence après 26 h de culture. Les 5 premiers points de la courbe de croissance présentée sur le Graphique 3 ne possèdent pas de barre d'erreurs, car les mesures d'OD₆₀₀ pour ces points n'ont été faites qu'une fois. Les barres d'erreurs des 4 derniers points s'étendent sur des plages allant de 0.1 à 1.78 de densité optique. De telles plages indiquent qu'il ne faut pas accorder trop de confiance à la forme de la fin de la courbe, en particulier sur le déclin apparent de la phase stationnaire. L'OD₆₀₀ moyen du point le plus haut de la courbe est de 8.91 après 26.92 h de culture, c'est également le point dont les barres d'erreurs sont les plus étendues. La densité optique à l'initiation de la culture était de 0.005. La phase de déclin n'est pas observable sur le Graphique 3.

En comparant les Graphiques 2 et 3 on observe que mis à part les temps de latence qui varient d'une heure, la croissance des souches DP 450 et DP 451 est relativement similaire tant au niveau de la durée de la phase exponentielle qu'au niveau de la densité optique de la phase stationnaire.

Tableau 4 : Valeurs associées au Graphique 4



Temps [h]	OD600 moyen	écart-type
0.00	0.00	-
1.08	0.01	-
2.33	0.01	-
3.17	0.03	-
4.00	0.03	-
15.37	1.63	0.10
16.45	2.55	0.17
17.45	3.38	0.12
18.62	4.90	0.08
19.95	5.79	0.62
21.53	6.86	0.27
24.83	7.72	0.17
26.92	7.76	0.14
48.17	7.18	0.99

Graphique 4 : Croissance de la souche DP 452 en fonction du temps

Le Graphique 4 et le Tableau 4 montrent que la phase de latence de la souche DP 452 est d'environ 3 h. On observe qu'entre 2.33 et 3.17 h l'OD₆₀₀ évolue de 0.01 à 0.03 indiquant le début de la phase exponentielle puisque cette valeur triple en moins d'une heure. La phase exponentielle dure 21 h, et la phase stationnaire commence 24 h après l'inoculation de la culture. Comme pour les souches DP 450 et DP 451 la densité optique des 5 premiers points de la courbe n'a été mesurée qu'une fois, expliquant l'absence de barres d'erreurs à ces endroits. On observe des barres d'erreurs sur les points à 19.95 et 48.17 h qui s'étendent respectivement sur des plages de densité optique de 1.24 et 1.98. La forme véritable de la courbe en ces points peut fortement varier par rapport à ce qui est observable sur le Graphique 3. L'OD₆₀₀ moyen du point le plus haut de la courbe est de 7.72 après 24.83 h de culture. L'OD₆₀₀ lors de l'inoculation était de 0.003.

On observe que la croissance de la souche DP 452 diffère des deux autres souches par rapport au temps de la phase de latence, au temps pour atteindre la phase stationnaire, ainsi que par la densité optique de la phase stationnaire : la souche DP 450 connaît un temps de phase d'exponentielle plus court de 2 h par rapport aux deux autres souches et une phase de latence plus courte d'une heure par rapport à la souche DP 450 et similaire à la souche DP 451. La phase stationnaire de la souche DP 452 intervient 3 h avant celle de la souche DP 450, et 2 h avant celle de la souche DP 451. En revanche la densité optique du plateau de la souche DP 452 à la phase stationnaire est plus faible de 1.2 par rapport aux 2 autres souches.

Évolution du μ des cultures en fonction du temps :

L'évolution du taux de croissance (μ) en fonction du temps est une donnée utile de comparaison des différentes souches. Elle permet d'avoir une indication sur l'état physiologique des cellules. Le μ permet également de connaître le moment où les cellules sont prêtes à la lyophilisation. Le calcul de cette valeur se fait en dérivant l'évolution de l'OD en fonction du temps ($d(\ln OD_{600})/dt$) des Graphiques 2, 3 et 4. Les valeurs de μ pour les souches DP 450, DP 451 et DP452 sont résumées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Evolution du μ des souches DP 450, DP 451 et DP 452 au cours du temps de culture

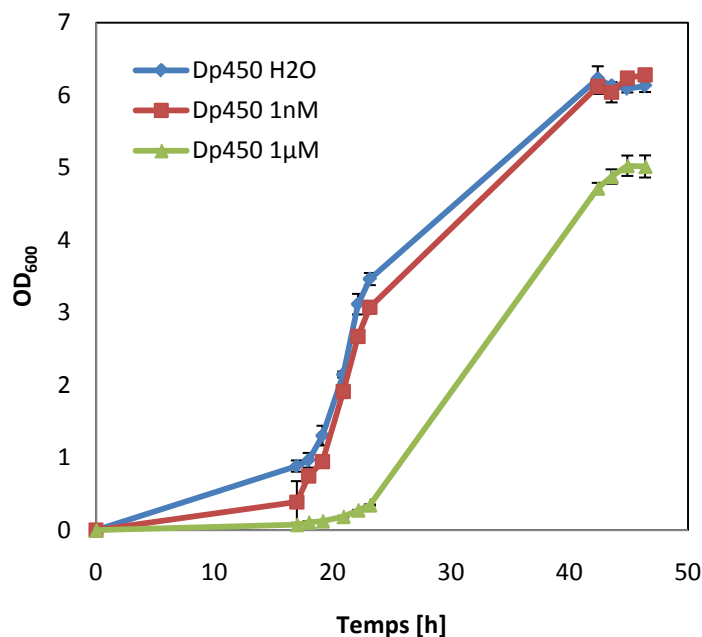
DP 450		DP 451		DP 452	
Temps [h]	μ [h^{-1}]	Temps [h]	μ [h^{-1}]	Temps [h]	μ [h^{-1}]
1.08	1.01	1.08	0.64	1.08	0.64
2.33	0.55	2.33	-0.08	2.33	-0.15
3.17	-0.22	3.17	1.40	3.17	1.93
4.00	1.32	4.00	0.08	4.00	0.00
15.37	0.24	15.37	0.23	15.37	0.37
16.45	0.10	16.45	0.23	16.45	0.41
17.45	0.56	17.45	0.33	17.45	0.28
18.62	0.16	18.62	0.39	18.62	0.19
19.95	0.43	19.95	0.37	19.95	0.11
21.53	0.23	21.53	0.20	21.53	0.11
22.95	0.25	22.95	0.25	24.83	0.09
24.83	0.20	24.83	0.37	26.92	0.00
26.08	0.24	26.08	0.07	48.17	0.00
26.92	0.04	26.92	0.07		
48.17	0.01	48.17	0.00		
49.25	0.01	49.25	-0.01		
50.25	0.00	50.25	-0.01		

Le Tableau 5 montre l'évolution du μ dans le temps pour les 3 souches utilisées pour les essais. On observe que le μ le plus grand pour la souche DP 450 est de $1.01 h^{-1}$ après 1.08 h de culture. Pour la souche DP 451 il est maximal avec une valeur de $1.40 h^{-1}$ après 3.17 h de culture et pour la souche la plus grande valeur de μ est à $1.93 h^{-1}$ après 2.33 h de culture. On peut également que des μ négatifs apparaissent après 3.17 h de culture pour la souche DP 450, après 2.33, 49.25 et 50.25 h de culture pour la souche DP 451 et après 2.33 h de cultures pour la souche DP 452.

Influence du β -estradiol sur la croissance des souches DP 450, DP 451 et DP 452 :

Il est important de connaître l'influence du β -estradiol sur la croissance des souches afin de pouvoir connaître l'augmentation de la biomasse durant la période d'induction. L'étude de l'influence de l'E2 s'est faite avec 2 concentration de β -estradiol, 1nM et 1 μ M, une culture, dont le volume de solution d'E2 a été remplacé par un volume égal d'H₂O, a été réalisée afin d'avoir une courbe de référence. Les cultures avec une teneur de 1 μ M de E2 ont été préparées en mélangeant 8.6 g d'une solution de β -estradiol de 2.4 μ M avec 20 g de milieu de culture sélectif. Les cultures dont la concentration de E2 était de 1 nM ont été préparées en mélangeant 8.6 μ l d'une solution de β -estradiol de 2.4 μ M avec 20 g de milieu de culture sélectif et 8.6 g d'H₂O.

Tous les Graphiques ont été construits pour les trois souches en reportant les valeurs d'OD₆₀₀ sur l'axe des ordonnées, et les valeurs de temps sur l'axe des abscisses. Les valeurs contenues dans chacun des Graphiques sont reportées sous forme numérique arrondie à 2 décimales dans des Tableaux suivants :



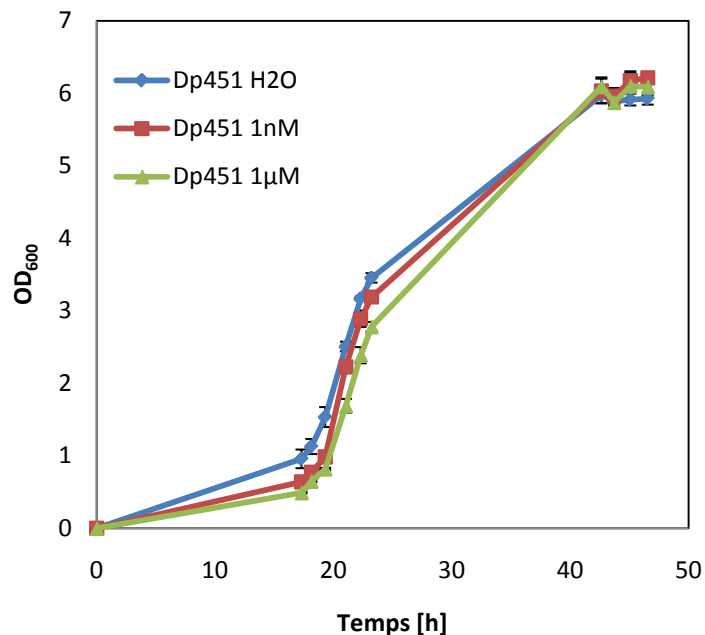
Graphique 5 : Evolution de l'OD₆₀₀ de la souche DP 450 en fonction du temps avec des concentrations en E2 de 0 M, 1 μ M et 1 nM

On observe sur le Graphique 5 et sur le Tableau 6 que l'E2 a une influence négative sur la croissance de la souche DP 450. Cette influence semble plus prononcée avec l'augmentation de la concentration en E2. Il semblerait qu'à une concentration de 1 nM de β -estradiol, cette tendance à ralentir la croissance n'intervient que sur le taux de croissance. Elle n'a pas d'effet sur la densité cellulaire maximale qui peut être obtenue dans ces conditions de culture. On peut notamment relever qu'après 16.97 h de culture à cette concentration en oestrogènes, l'OD₆₀₀ moyenne est à 0.39 alors que celle avec une culture sans E2 est de

0.88, alors qu'à partir 40 h de culture ces valeurs semblent se stabiliser à des densités optiques équivalentes oscillant entre 6.04 et 6.28 pour la culture avec 1 nM de E2 et entre 6.09 et 6.23 sans inducteur. Même en tenant compte des barres d'erreurs l'OD₆₀₀ maximale avec 1 nM de β-estradiol (0.68) ne dépasse pas l'OD₆₀₀ minimale en l'absence d'inducteur (0.80) à ce temps de culture. Concernant la culture dont la concentration en E2 s'élève à 1 μM, La tendance de la molécule inductrice à inhiber la croissance des cellules semble affecter le taux de croissance, ainsi que l'OD₆₀₀ atteinte lors de la phase stationnaire. On observe qu'après 16.97 h de culture à cette concentration en E2 l'OD₆₀₀ est de 0.08 ± 0.01 et cette valeur atteint son maximum (5.03 ± 0.14) après 44.88 h de culture

Tableau 6 : Valeurs associées au Graphique 5

Temps [h]	H ₂ O		1 nM		1 μM	
	OD ₆₀₀ moyen	Ecart-type	OD ₆₀₀ moyen	Ecart-type	OD ₆₀₀ moyen	Ecart-type
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16.97	0.88	0.08	0.39	0.29	0.08	0.01
17.97	0.96	0.10	0.75	0.01	0.11	0.02
19.13	1.30	0.14	0.95	0.02	0.13	0.00
20.88	2.15	0.04	1.91	0.06	0.19	0.01
22.13	3.12	0.14	2.67	0.04	0.28	0.00
23.13	3.46	0.08	3.07	0.09	0.35	0.01
42.38	6.23	0.17	6.12	0.11	4.72	0.07
43.55	6.13	0.02	6.04	0.14	4.88	0.10
44.88	6.09	0.05	6.24	0.08	5.03	0.14
46.38	6.13	0.08	6.28	0.08	5.02	0.15

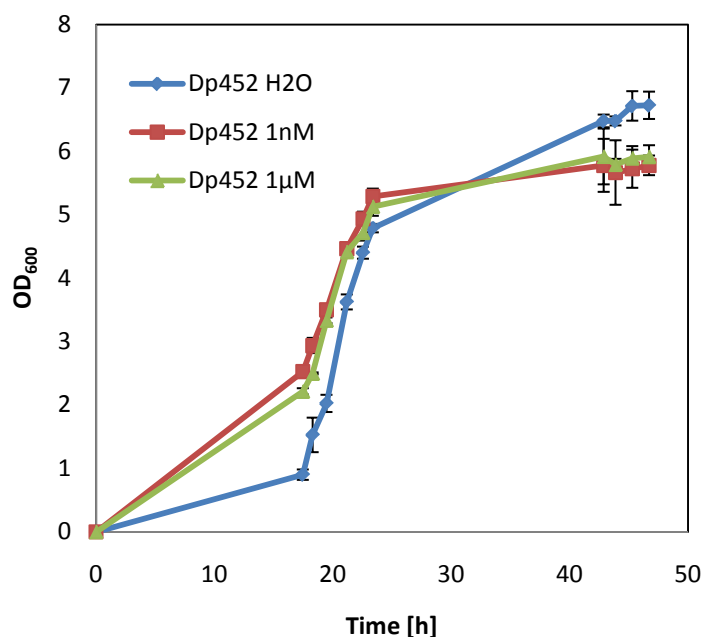


Graphique 6 : Evolution de l'OD₆₀₀ de la souche DP 451 en fonction du temps avec des concentrations en E2 de 0 M, 1 μM et 1 nM

Tableau 7 : Valeurs associées au Graphique 6

Temps [h]	H ₂ O		1 nM		1 μM	
	OD ₆₀₀ moyen	Ecart-type	OD ₆₀₀ moyen	Ecart-type	OD ₆₀₀ moyen	Ecart-type
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
17.30	0.96	0.13	0.64	0.02	0.49	0.01
18.13	1.13	0.10	0.77	0.01	0.65	0.01
19.30	1.53	0.14	0.98	0.01	0.82	0.01
21.05	2.51	0.07	2.23	0.06	1.69	0.10
22.30	3.17	0.03	2.89	0.11	2.39	0.11
23.22	3.45	0.07	3.19	0.02	2.78	0.07
42.63	5.98	0.12	6.03	0.17	6.09	0.13
43.72	5.89	0.11	5.96	0.11	5.87	0.05
45.08	5.91	0.08	6.17	0.11	6.10	0.20
46.55	5.93	0.08	6.21	0.02	6.09	0.12

Comme le montre le Graphique 6 et le Tableau 7 l'influence de l'E2 sur la souche DP 451 semble moins importante que sur la souche DP 450. On observe que le ralentissement de la croissance est plus marqué avec l'augmentation de la teneur en oestrogènes. La valeur maximale de l'OD₆₀₀ ne semble pas être affectée par des concentrations de β-estradiol inférieures ou égales à 1 μM. En effet, les valeurs de densité optique à partir de 42.63 h varient entre 5.89 ± 0.11 et 5.98 ± 0.12 sans inducteur, 5.96 ± 0.11 et 6.21 ± 0.02 dans un milieu contenant 1 nM de E2 et 5.87 ± 0.05 et 6.10 ± 0.2 à 1 μM de β-estradiol. On remarque qu'aux temps étudiés entre 17.30 h et 23.22 h de culture, les valeurs d'OD₆₀₀ de la courbe représentant la culture avec 1 nM d'E2 sont toujours inférieures aux à celles de la culture sans oestrogène, et la courbe représentant la culture avec 1 μM de β-estradiol présente des valeurs de densité optique toujours inférieures à celles avec une teneur en E2 de 1 nM.



Graphique 7 : Evolution de l'OD₆₀₀ de la souche DP 452 en fonction du temps avec des concentration en E2 de 0 M, 1 μM et 1 nM

Tableau 8 : Valeurs associées au Graphique 7

Temps [h]	H ₂ O		1 nM		1 μM	
	OD 600 moyen	Ecart-type	OD 600 moyen	Ecart-type	OD 600 moyen	Ecart-type
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
17.47	0.90	0.08	2.53	0.08	2.21	0.05
18.30	1.53	0.27	2.94	0.12	2.50	0.02
19.47	2.02	0.14	3.50	0.03	3.33	0.05
21.18	3.62	0.12	4.46	0.01	4.41	0.09
22.55	4.40	0.10	4.94	0.11	4.72	0.13
23.38	4.79	0.07	5.29	0.12	5.13	0.15
42.88	6.48	0.10	5.78	0.42	5.92	0.44
43.88	6.48	0.07	5.66	0.51	5.79	0.09
45.30	6.71	0.23	5.72	0.30	5.89	0.19
46.72	6.72	0.22	5.78	0.16	5.91	0.18

On observe sur le Graphique 7 et sur le Tableau 8 que, contrairement au souche DP 450 et DP 451, la croissance de la souche DP 452 ne semble pas être inhibée par le β -estradiol. On observe qu'entre 17.47 h et 23.38 h les valeurs d'OD₆₀₀ de l'essai sans oestrogène sont inférieures aux essais avec inducteurs. Durant la même tranche d'h, les valeurs d'OD₆₀₀ de l'essai avec 1 nM d'E2 sont supérieures à celles obtenues avec une concentration en β -estradiol de 1 μM. Même si la croissance durant la phase exponentielle ne semble pas être inhibée par les oestrogènes, il semblerait que les valeurs d'OD₆₀₀ atteintes lors de la phase stationnaire le soit. La densité optique à partir de 42.88 h de culture varient entre 6.48 ± 0.07 et 6.72 ± 0.22 sans inducteur, entre 5.66 ± 0.51 et 5.78 ± 0.42 pour la souche avec un concentration de 1 nM de E2 et entre 5.79 ± 0.09 et 5.92 ± 0.44 avec une teneur de 1 μM de β -estradiol.

Induction et luminescence des souches

Les tests de luminescence et d'induction sur les trois souches représentent véritablement le cœur du projet. Les tests de luminescence se sont faits en deux endroits : dans les laboratoires du département de biologie cellulaire de l'université de Genève, et dans les laboratoires du département de technologie du vivant à la HES-SO de Sion. Plusieurs types d'essais ont été effectués dans le but de développer ce test. Des paramètres tels que l'induction en fonction du temps d'induction, l'induction en fonction de la teneur en β -estradiol, la bioluminescence en fonction du type de traitement des cellules avant le test de bioluminescence ont été étudiés. Les analyses d'induction en fonction du temps ont été pratiquées sur les 3 souches à Genève et sur la souche DP 450 à Sion, sur un luminomètre de type chameleon à Genève et sur un Varian carry eclipse à Sion. Les tests d'induction en fonction de la concentration en E2 ont été faits sur les trois souches à Genève et uniquement sur la souche DP 450 à Sion. Ce type d'essais a été pratiqué sur deux types de luminomètres à Genève, un chameleon et un Turner TD-20, et sur un Varian carry eclipse à Sion. Concernant le type de traitement des cellules après induction, les résultats présentés

ici sont uniquement ceux obtenus à Genève, et ont été obtenus sur un luminomètre de type chameleon.

La méthode d'obtention de calculs des résultats se sont faits de manières différentes entre Sion et Genève. En effet, les RLU à Sion ont été pris comme étant l'intensité lumineuse maximale émise entre 2 et 6 min. après ajout de la luciférine, alors qu'à Genève les RLU ont été prises comme étant la somme des photons émis durant le temps de l'essai. C'est pourquoi il est important d'avoir un temps d'analyse constant entre les différents échantillons.

Le calcul du rapport d'induction se fait comme suit :

$$\text{Rapport d'induction} = \frac{RLU e}{OD600 e} / \frac{RLU blanc}{OD600 blanc}$$

RLU e = Unités de lumière relatives en présence de l'échantillon d'oestrogènes après induction

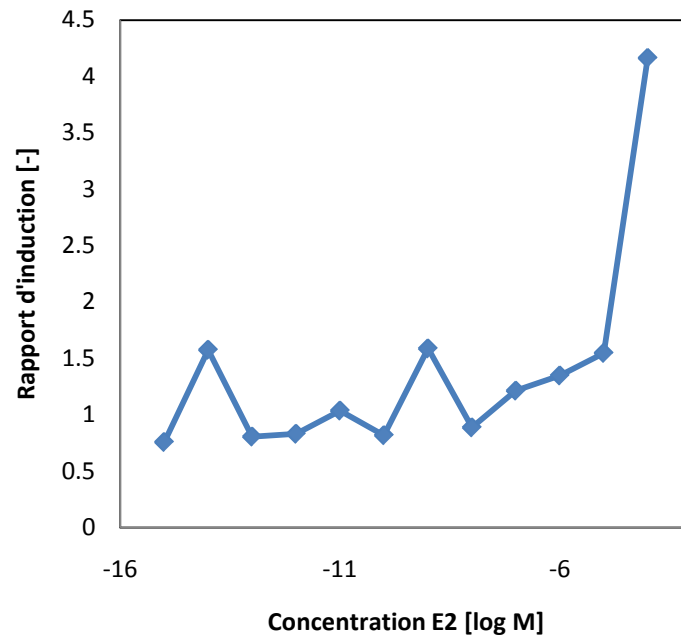
OD600 e = Densité optique de la culture en présence de l'échantillon d'oestrogènes après induction

RLU blanc = Unités de lumière relatives sans oestrogène

OD600 blanc = Densité optique de la culture sans oestrogène

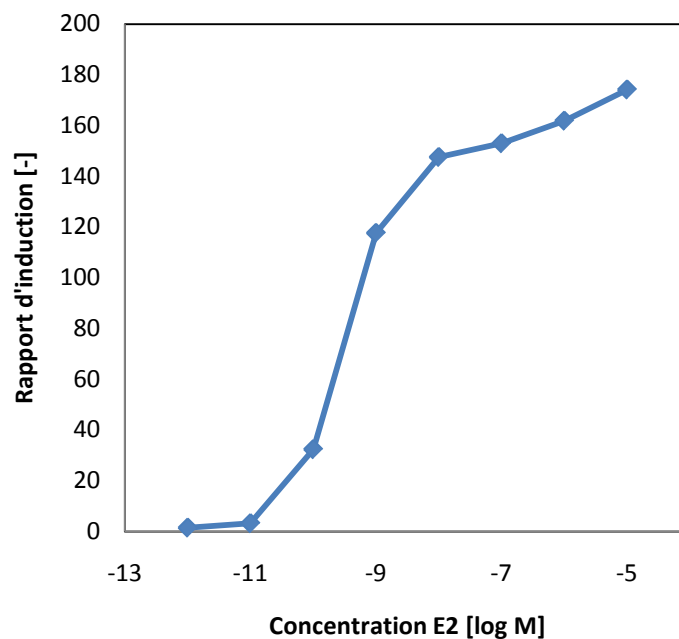
Induction en fonction de la concentration en oestrogènes

L'étude de l'induction en fonction de la concentration en oestrogènes permet de trouver la tranche de teneur où les rapports d'induction évoluent de manière linéaire, et donc ainsi de trouver la limite de détection et de quantification de ces méthodes de quantification des molécules à activité oestrogénique. Cette étude permet également de connaître la dose de E2 effective où les rapports d'induction sont à 50% de l'induction maximale (ED₅₀). Les valeurs de ED₅₀ permettent de comparer les différentes substances étudiées.



Graphique 8 : Rapport d'induction de la souche DP 450 en fonction du log de la molarité en E2 effectué à Sion sur un luminomètre Varian Cary Eclipse

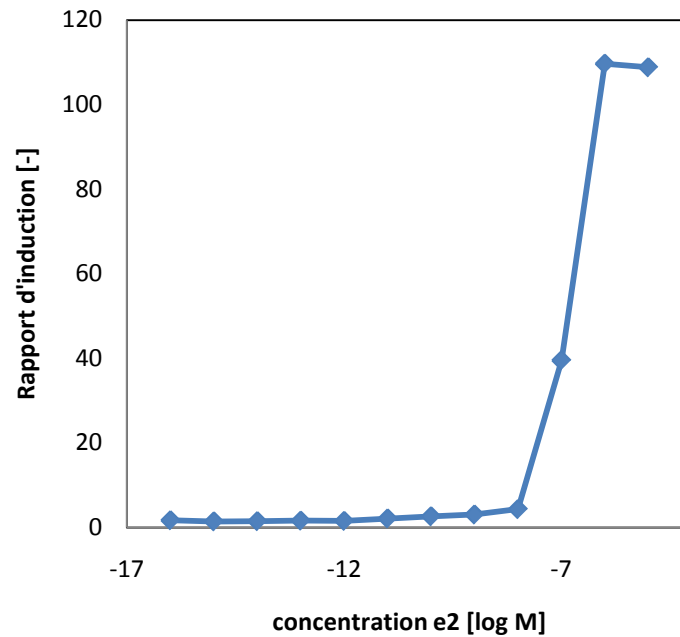
On observe sur le Graphique 8 que les concentrations étudiées sont comprises entre 10^{-15} M et 10^{-4} M de E2. Les rapports d'induction débutent à 0.76 à 10^{-15} M, montent ensuite 1.58 à 10^{-14} M, retombent à 0.81, 0.83, 1.04 et 0.82 à 10^{-13} , 10^{-12} , 10^{-11} et 10^{-10} M de E2. Ce rapport remonte à nouveau à 1.59 à 10^{-9} avant de rechuter à 0.89 à 10^{-8} M. de ce point, les rapports d'induction augmentent progressivement à 1.21, 1.35 et 1.54 pour les concentrations de 10^{-7} , 10^{-6} et 10^{-5} M avant d'arriver à un maximum de 4.16 à une concentration en β -estradiol de 10^{-4} M. La culture utilisée pour ces essais a été induite durant 16 h : on observe ni zone de linéarité ni plateau sur ce Graphique. Au vu de la fluctuation des valeurs de rapport d'induction on ne peut ni donner de limite de détection, ni limite de quantification, et donc on ne peut pas donner de valeur ED_{50} pour cette souche durant cet essai.



Graphique 9 : Rapport d'induction de la souche DP 450 en fonction du log de la molarité en E2 effectué à Genève sur un luminomètre de type chameleon.

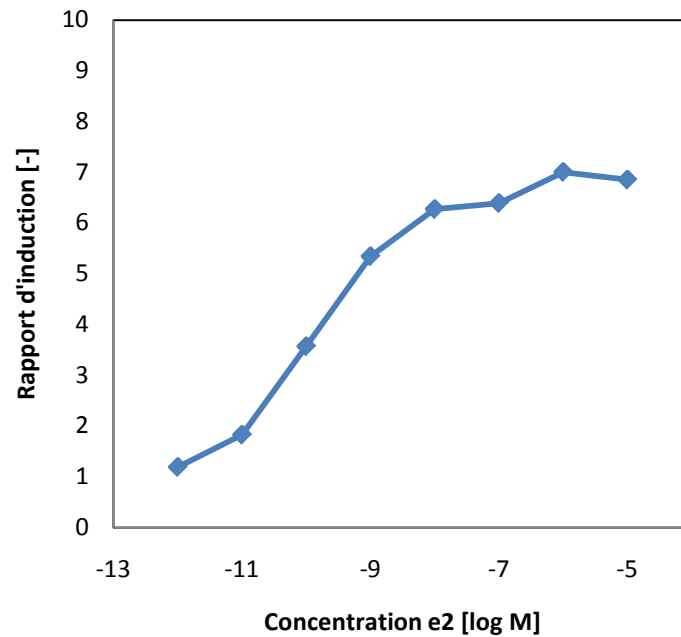
La courbe présentée sur le Graphique 9 a été dressée à partir d'une culture dont l'induction s'est faite sur 6 h et à partir d'une préculture vieille de 14 h. On y observe une croissance progressive du rapport d'induction en fonction du log de la molarité en E2.

Les valeurs des rapports sont de 1.53, 3.27, 32.42, 117.63, 147.54, 152.96, 161.84, 174.13 pour des concentrations en E2 respectives en Log de la molarité de -12, -11, -10, -9, -8, -7, -6 et -5. La limite de détection semble se situer à 10^{-11} M et la limite de quantification entre 10^{-11} et 10^{-10} M. Le Graphique 9 semble comporter 2 zone de linéarité, une entre 10^{-11} et 10^{-8} M et l'autre entre 10^{-8} et 10^{-5} M. On ne distingue pas l'atteinte d'un plateau à la fin de la courbe, empêchant l'optention d'une valeur d'ED₅₀ précise, mais une approximation permet de dire qu'elle se situe aux alentours de 10^{-9} M.



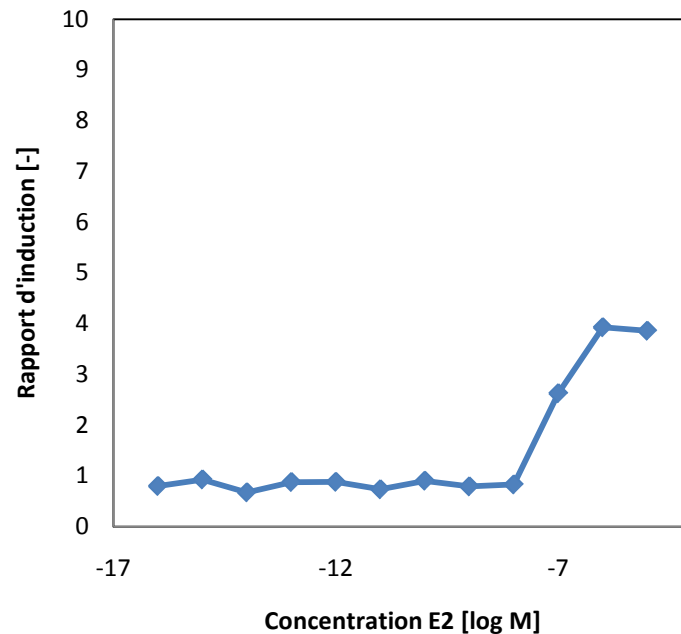
Graphique 10 : Rapport d'induction de la souche DP 450 en fonction du log de la molarité en E2 effectué à Genève sur un luminomètre de type Turner TD-20

Le Graphique 10 a été dressé à partir d'une culture induite durant 14 h, et dont la préculture était âgée de 6 h. Les valeurs de rapport d'induction sont de 1.70, 1.43, 1.49, 1.60, 1.54, 2.13, 2.64, 3.05, 4.33, 39.52, 109.68, 108.83 pour des concentrations en E2 respectives en Log de la molarité de -16, -15, -14, -13, -12, -11, -10, -9, -8, -7, -6 et -5. La limite de détection se situe à 10^{-9} M et la limite de quantification entre 10^{-8} et 10^{-7} M. La zone de linéarité se situe entre 10^{-8} et 10^{-6} M. On observe l'apparition d'un plateau à partir de 10^{-6} M. l'ED₅₀ de la souche DP 450 avec du β -estradiol lors de cet essai est d'environ $10^{-7.2}$ M.



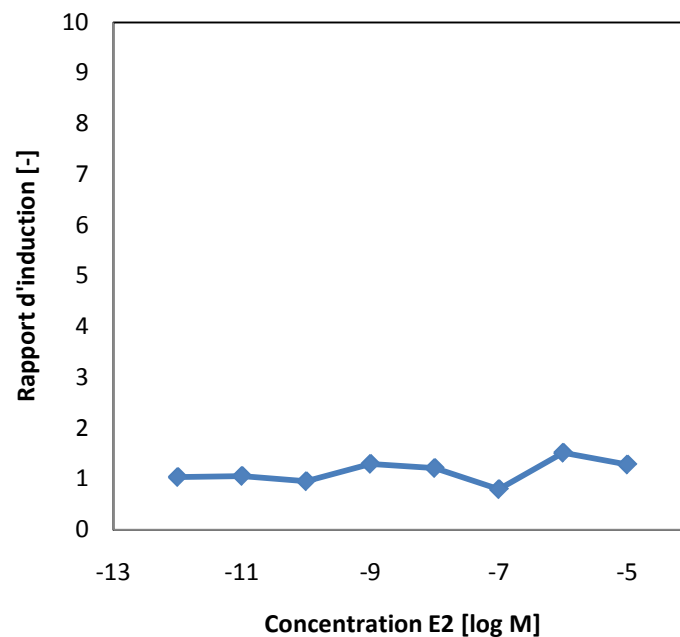
Graphique 11 : Rapport d'induction de la souche DP 451 en fonction du log de la molarité en E2 effectué à Genève sur un luminomètre de type chameleon.

Pour la construction de la courbe présente sur le Graphique 11, une préculture de 14 h a été utilisée avec un temps d'induction de 6 h. Les valeurs de rapports d'intensité sont de 1.19, 1.83, 3.57, 5.34, 6.28, 6.39, 7.00 et 6.85 pour des concentrations en E2 respectives en Log de la molarité de -12, -11, -10, -9, -8, -7, -6 et -5. La limite de détection de cette méthode se situe à 10^{-8} M, on ne peut pas donner de limite de quantification puisque la limite de quantification est atteinte lorsque le signal est supérieur ou égale à 10 fois le bruit de fond qui dans cet essai se situe à 1. Comme l'apparition du plateau intervient à un log de la molarité de -6 et que son rapport d'induction est inférieur à 10, on ne peut pas véritablement parler de limite de détection. La zone de linéarité de l'essai est entre 10^{-11} et 10^{-7} M de E2. l'ED₅₀ de la souche DP 450 avec du β -estradiol lors de cet essai est d'environ 10^{-10} M.



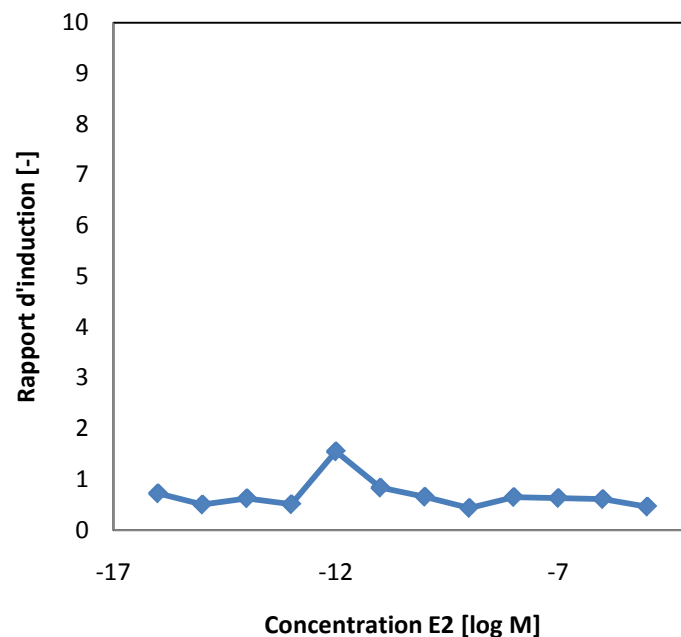
Graphique 12 : Rapport d'induction de la souche DP 450 en fonction du log de la molarité en E2 effectué à Genève sur un luminomètre de type Turner TD-20

Le Graphique 12 a été dressé à partir d'une culture induite durant 14 h, et dont la préculture était âgée de 6 h. Les valeurs de rapport d'induction sont de 0.80, 0.93, 0.67, 0.88, 0.88, 0.73, 0.90, 0.79, 0.83, 2.63, 3.93, 3.86 pour des concentrations en E2 respectives en Log de la molarité de -16, -15, -14, -13, -12, -11, -10, -9, -8, -7, -6 et -5. La limite de détection se situe entre 10^{-7} et 10^{-6} M la limite de quantification ne peut être donnée puisqu'il y a l'apparition d'un plateau à partir de 10^{-6} M dont la valeur de rapport d'induction est inférieure à 10 fois le bruit de fond. La zone de linéarité se situe entre 10^{-8} et 10^{-6} M. l' ED_{50} de la souche DP 450 avec du β -estradiol lors de cet essai est d'environ $10^{-8.5}$ M.



Graphique 13 : Rapport d'induction de la souche DP 452 en fonction du log de la molarité en E2 effectué à Genève sur un luminomètre de type chameleon.

Pour la construction de la courbe présente sur le Graphique 13 une préculture de 14 h a été utilisée avec un temps d'induction de 6 h. Les valeurs de rapports d'intensité sont de 1.04, 1.05, 0.95, 1.30, 1.22, 0.80, 1.52 et 1.28 pour des concentrations en E2 respectives en Log de la molarité de -12, -11, -10, -9, -8, -7, -6 et -5. Il n'y a pas de limite de détection avec cette souche, car la limite de détection correspond à 3 fois le bruit de fond et ici, toutes les valeurs sont inférieures à cette limite : comme il n'y a pas de limite de détection, il n'y a pas de limite de quantification. Comme la courbe est "quasiment" plate, la zone de linéarité ainsi que le plateau sont étendus sur la totalité de la courbe, c'est-à-dire de 10^{-12} à 10^{-5} M de E2. Il n'y a pas de valeur ED_{50} pour la souche DP452 lors de cet essai, car à aucun moment elle ne fut induite.

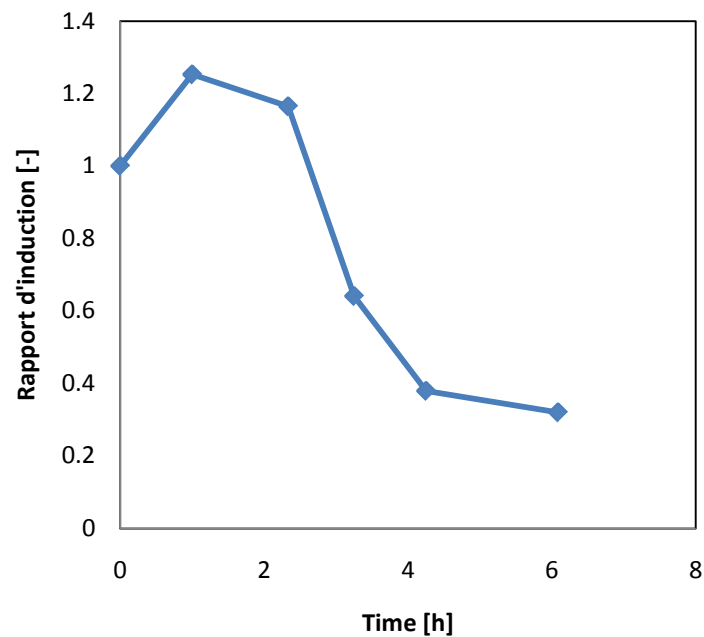


Graphique 14 : Rapport d'induction de la souche DP 452 en fonction du log de la molarité en E2 effectué à Genève sur un luminomètre de type Turner TD-20

Le Graphique 14 à été dressé à partir d'une culture induite durant 14 h, et dont la préculture était âgée de 6 h. Les valeurs de rapport d'induction sont de 0.72, 0.50, 0.62, 0.51, 1.55, 0.83, 0.65, 0.43, 0.65, 0.43, 0.65, 0.63, 0.61, 0.46 pour des concentrations en E2 respectives en Log de la molarité de -16, -15, -14, -13, -12, -11, -10, -9, -8, -7, -6 et -5. On observe un pic d'induction à 10^{-12} M de β -estradiol. Pour les mêmes raisons que sur le Graphique 13, il n'est pas possible de donner une limite de détection ou une limite de quantification. Comme la souche DP 452 ne connaît pas d'induction, il n'est pas possible non plus de trouver de valeur d'ED₅₀. La zone de linéarité ainsi que le plateau se confondent sur la totalité de la courbe.

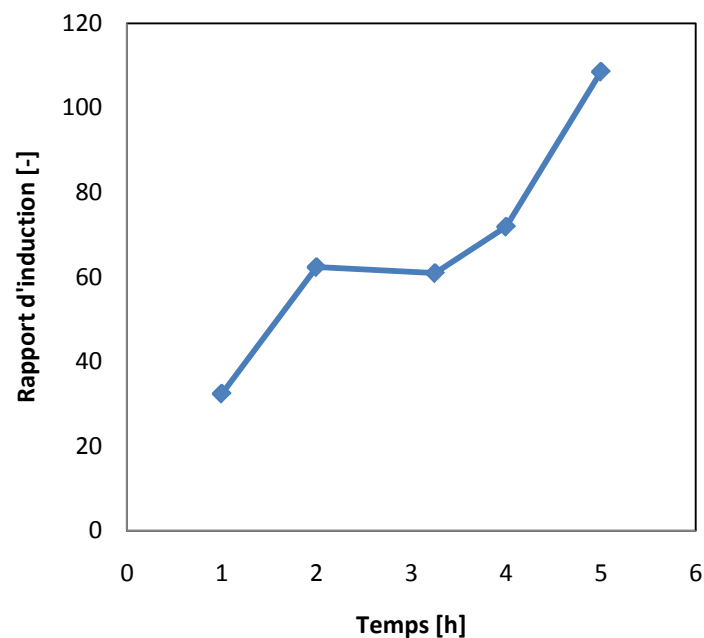
Induction en fonction du temps

L'étude des rapports d'induction en fonction du temps permet d'optimiser le temps d'induction pour arriver à une sensibilité suffisante tout en ayant un temps d'induction réduit. Pour cette étude les valeurs de rapport d'induction ont été reportées sur l'axe des ordonnées et le temps sur l'axe des abscisses. Tous les essais présentés dans cette section ont été induits avec une teneur en β -estradiol de 10^{-7} M



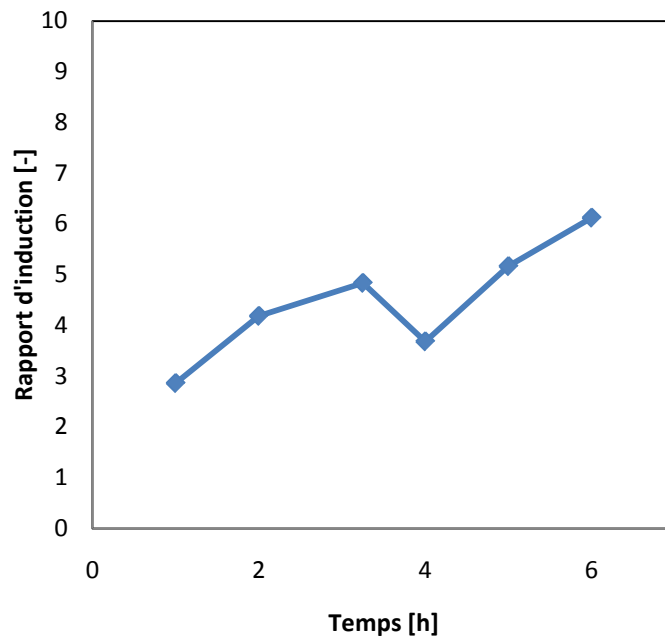
Graphique 15 : Rapport d'induction de la souche DP 450 en fonction du temps avec une molarité d'induction de 100 n M de E2 effectué à Sion sur un luminomètre Varian Cary Eclipse

Le Graphique 15 montre une induction globalement décroissante en fonction du temps. Les valeurs de rapport d'induction sont de 1.00, 1.25, 1.16, 0.64, 0.38 et 0.32 après des temps d'induction respectifs de 0.00, 1.00, 2.33, 3.25, 4.25 et 6.08 h.



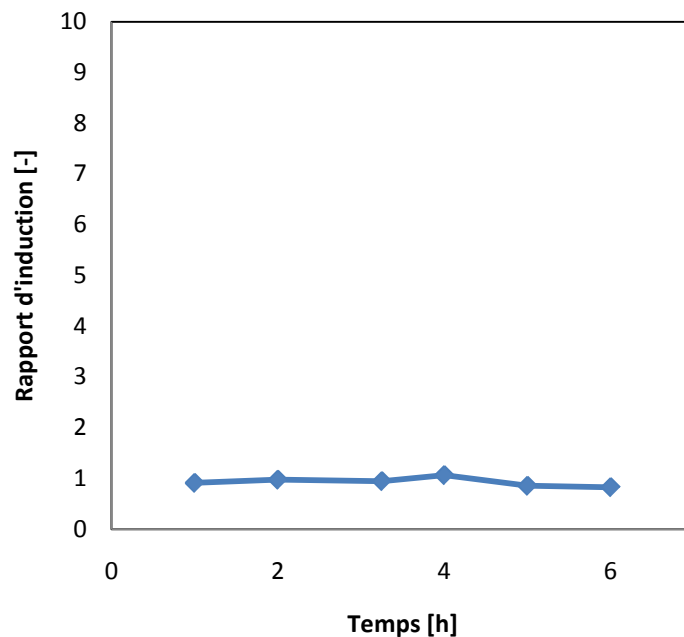
Graphique 16 : Rapport d'induction de la souche DP 450 en fonction du temps à une molarité en E2 de 100 nM effectué à Genève sur un luminomètre de type chameleon.

On observe sur le Graphique 16 que l'induction augmente globalement avec le temps. Malgré tout, on observe une légère décroissance de l'induction entre 2.62 et 3.25 h d'induction. Les valeurs de rapport d'induction sont de 32.37, 62.32, 60.89, 71.87 et 106.55 pour des temps d'induction respectifs de 1.00, 2.00, 3.25, 4.00 et 5.00 h d'induction.



Graphique 17 : Rapport d'induction de la souche DP 451 en fonction du temps à une molarité en E2 de 100 nM effectué à Genève sur un luminomètre de type chameleon.

Le Graphique 17 indique que l'induction de la souche DP 451 augmente globalement avec le temps dans ces conditions de culture. On remarque qu'une baisse de l'induction intervient entre 3.25 et 4.00 h. Les valeurs de rapport d'induction pour le Graphique 17 sont de 2.86, 4.19, 4.84, 3.68, 5.17 et 6.12 pour des temps d'induction respectifs de 1.00, 2.00, 3.25, 4.00, 5.00 et 6.00 h.

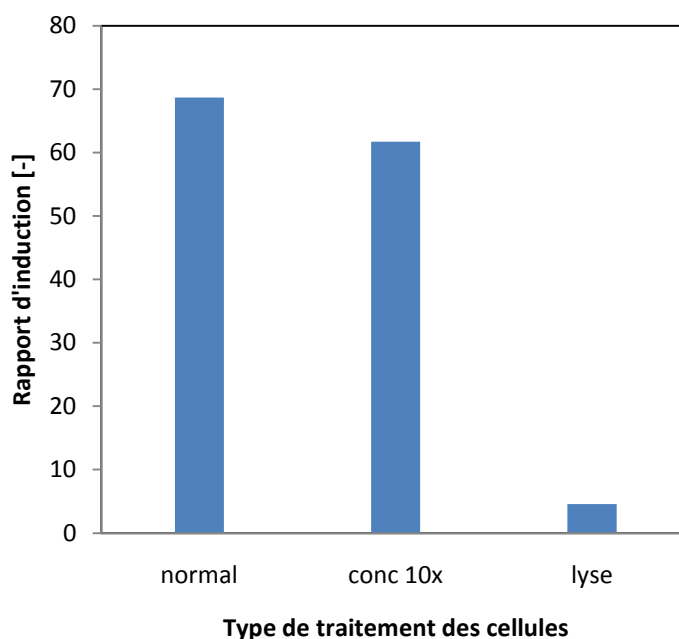


Graphique 18 : Rapport d'induction de la souche DP 452 en fonction du temps à une molarité en E2 de 100 nM effectué à Genève sur un luminomètre de type chameleon.

Le Graphique 18 montre que l'induction de la souche DP 452 n'évolue pas dans le temps. Les valeurs de rapport d'induction sont de 0.91, 0.97, 0.94, 1.06, 0.85 et 0.83 pour des temps d'induction respectifs de 1.00, 2.00, 3.25, 4.00, 5.00 et 6.00 h

Influence du type de traitement des cellules sur le rapport d'induction final

L'influence du type de traitement des cellules sur la mesure est intéressante car elle permet d'améliorer la réponse lumineuse due à l'induction. Elle permet également de savoir si la luciférase est sécrétée ou si c'est une protéine intracellulaire. Les types de traitement étudiés sont une concentration de 10X des cellules dans de l'H₂O et une lyse mécanique avec des billes de levures induites. Un essai où les cellules sont traitées normalement à également été réalisé. Toutes les cellules proviennent de la même culture induite, et ne furent séparées qu'avant le traitement. Les blancs utilisés pour l'obtention des rapports d'induction ont été traités de la même manière que les cellules induites. Toutes les inductions lors de cet essai ont été menées avec une teneur en β -estradiol de 100 nM. Les cellules utilisées pour cet essai ont été induites durant 6 h et proviennent d'une préculture âgée de 14 h.

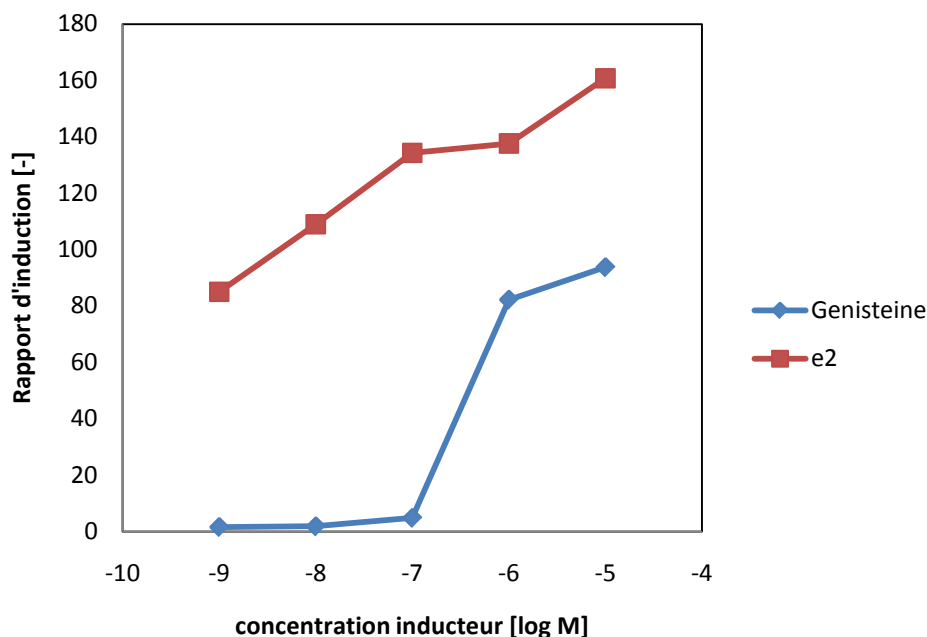


Graphique 19 : Rapport d'induction en fonction du type de traitement des cellules après une induction de 6 h avec 100 nM d'E2 effectué à Genève sur un luminomètre de type chameleon.

On observe sur le Graphique 19 que le meilleur moyen d'obtenir un rapport d'induction élevé est de ne faire subir aucun traitement aux cellules. On obtient des valeurs de rapport d'induction de 68.69 pour des cellules non traitées, de 61.72 pour des cellules concentrées 10X et de 4.55 pour des cellules lysées.

Comparaison de l'effet inductif de l'E2 et de la génistéine

Cet outil de quantification des oestrogènes doit permettre de mesurer l'activité oestrogénique de toutes les substances pouvant se lier aux récepteurs ER. C'est pourquoi il est important de tester le système avec une autre substance que du β -estradiol. La substance choisie ici est de la génistéine. La comparaison des deux substances s'est faite sur des cellules provenant de la même préculture âgée de 17 h. L'induction par les deux substances sur les cellules s'est faite durant 6 h. Cet essai permet d'obtenir la valeur ED50 pour la génistéine.



Graphique 20 : Rapport d'induction sur la souche DP 450 en fonction du log de la molarité en E2 ou en génistéine effectué à Genève sur un luminomètre de type chameleon.

Le Graphique 20 montre que les rapports d'induction à concentration égale sont toujours inférieurs avec la génistéine qu'avec l'E2. Les valeurs de rapport d'induction avec l'E2 sont de 84.98, 108.97, 134.26, 137.64 et 160.74 pour des concentrations respectives en log de la molarité de -9, -8, -7, -6 et -5. L'évolution du rapport d'induction en fonction du log de la M en β -estradiol évolue de manière "quasiment" linéaire. Les valeurs de rapport d'induction avec la génistéine sont de 1.59, 1.83, 4.83, 82.22 et 93.73 pour des concentrations respectives en log de la molarité de -9, -8, -7, -6 et -5. On observe que la limite de détection de la génistéine est comprise entre 10^{-8} et 10^{-7} M et que sa limite de quantification se trouve entre 10^{-7} et 10^{-6} M. Il semblerait qu'à partir de 10^{-6} M le rapport d'induction de la génistéine atteint un plateau. La valeur d'ED₅₀ pour la génistéine lors de cet essai est de $10^{6.5}$ M d'E2.

Lyophilisation des cellules :

Des test de lyophilisation de la souche DP 450 DP 451 et DP 452 ont été effectués. Le premier test de lyophilisation sans traitement des cellules à donné des viabilités post lyophilisation de 7% pour la souche DP 450, 18 % pour la souche DP451 et 50% pour la souche DP 452. Une seconde série de tests de lyophilisation en vue d'augmenter la viabilité de la souche DP 450 a été menée en faisant des traitements différents des cellules prélyophilisation.

3 tubes n'ont subi aucun traitement, 3 tubes ont été resuspendus dans du VL et 3 tubes dans une solution de glycerole 100%. Les tubes n'ayant subi aucun traitement ainsi que les tubes avec le VL ont révélé une viabilité de 0%, les tubes avec le glycérol n'ont pas été lyophilisés durant les 24h de lyophilisation.

Discussion

Caractérisation des souches :

Corrélation entre l'OD₆₀₀ et le nombre de cellules :

Le coefficient R^2 de 0.9861 de la droite de tendance du Graphique 1 confirme que l'équation qui définit cette droite représente bien l'évolution de la densité optique en fonction de la concentration en cellules. Lors de l'élaboration de la droite de tendance, une exigence fut introduite : l'ordonnée à l'origine de l'équation qui la décrit devait être égale à 0. S'il n'y a pas de cellules, la densité optique doit logiquement être nulle.

Le coefficient R^2 aurait pu être amélioré à 0.99 en ne forçant pas la droite de tendance à passer par 0 à l'origine de l'ordonnée. Il aurait également pu être amélioré en excluant le deuxième point de la courbe mais, au regard des barres d'erreurs l'entourant, cette valeur semble correcte. L'équation qui découle de la droite de tendance permet la transformation de l'OD₆₀₀ en nombre de cellules. Elle peut être utilisée sur tous les Graphiques comprenant une densité optique à 600 nm sur l'axe de l'ordonnée. L'ensemencement en spirale a été motivé par le fait qu'il est réalisé par une machine : l'erreur inhérente à l'intervention humaine peut être minimisée. Un ensemencement classique en surface avec une spatule aurait été possible mais aurait certainement abouti à des résultats moins fiables. Des séries de comptages avec des plaques de Neubauer ont été effectuées afin d'obtenir la viabilité des cultures, mais la fluctuation des résultats due au bourgeonnement des levures ont poussé à l'abandon de cette technique. Les Graphiques obtenus avec cette méthode sont présentés en annexe 1 de ce rapport.

Courbes de croissance :

À propos des courbes de croissance, il semblerait que la souche DP452 connaisse une croissance plus rapide que les 2 autres souches. La phase stationnaire de cette souche intervient après 24.83 h de culture, ce qui est au minimum 2 h plus tôt que l'apparition de cette phase dans les cultures des 2 autres souches. Cela s'explique par le fait que la souche DP 452 n'a pas à transcrire ni à traduire d'ER, ce qui laisse à disposition plus de capacité métabolique pour l'augmentation de la biomasse.

Le fait que la plage recouverte par les barres d'erreurs semble plus prononcée sur les derniers points de chaque courbe s'explique par le fait que l'obtention des valeurs d'OD₆₀₀ en ces points s'est faite en diluant les cultures qui augmente ainsi l'écart-type entre les valeurs ainsi obtenues par le facteur de dilution. Les barres d'erreurs permettent de remettre en cause certains phénomènes observables sur les Graphiques 2, 3 et 4. On remarque par exemple que la culture de la souche DP 452 connaît une légère décroissance à partir de 26.92 h, ce qui paraît impossible, puisque la densité optique ne peut que croître ou rester stable dans le temps : une cellule même morte, activité protéolytique mis à part, absorbe de la lumière à 600 nm.

Mais les barres d'erreurs du dernier point du Graphique 4 montrent que la culture n'est pas forcément décroissante, et qu'il est possible que la valeur d' OD_{600} de ce point (7.18 ± 0.99) soit égale voir supérieure à la valeur de l'avant- dernier point de cette courbe (7.76 ± 0.14) rendant donc la croissance de la souche DP 452 conforme à la théorie.

Les phases de latence d'environ 3 h pour les souches DP 451 et DP 452 et d'environ 4 h pour la souche DP 450 dans ces conditions de culture paraissent conformes à la littérature [42] qui donne un temps de phase de latence compris entre 2.00 et 3.30 h. Cette légère différence peut être due au fait que les souches utilisées pour ces essais sont des levures recombinantes, et que le milieu de culture n'est pas le même.

Evolution du μ des cultures en fonction du temps :

Sur le Tableau 5 les taux de croissance maximaux des cultures peuvent paraître particulièrement élevés (1.01 h^{-1} pour la souche DP 450 ; 1.40 h^{-1} pour la souche DP 451 ; 1.93 h^{-1} pour la souche DP) face au μ_{\max} donné par la littérature qui est de 0.28 h^{-1} [43]. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces taux de croissance ont été pris à partir de valeurs de densité optiques inférieures à 0.1. Les valeurs de densité optiques inférieures à 0.1 connaissent une grande erreur de mesure, car de petites fluctuations de l' OD_{600} entraînent une grande différence dans des $\Delta \ln$ de OD_{600} . C'est pourquoi, il ne faut pas accorder de crédit à ces valeurs de taux de croissance.

En revanche, si l'on prend les valeurs de μ_{\max} comprises entre 15.37 et 48.17 h de culture, on arrive à des valeurs plus proches de la théorie (0.56 h^{-1} pour la souche DP 450 après 17.46 h de culture ; 0.39 h^{-1} pour la souche DP 451 après 18.62 h de culture ; 0.41 h^{-1} pour la souche DP452 après 16.45 h de culture). Ces valeurs demeurent encore élevées par rapport à la valeur obtenue dans la littérature. Ceci peut s'expliquer par le fait que les souches utilisées ne sont pas exactement les mêmes : effectivement, la souche de la littérature n'est pas recombinante et les milieux utilisés ne sont pas les mêmes. Ces deux facteurs peuvent entraîner un changement de valeurs du μ_{\max} . On peut tout de même constater que la comparaison des μ reste du même ordre de grandeur.

Influence du β -estradiol sur la croissance des souches DP 450, DP 451 et DP 452 :

L'influence négative de l'E2 sur la croissance est plus marquée sur la souche DP 450 que sur la souche DP 451 et DP 452. Ceci peut s'expliquer par le fait que la souche DP 450 contient l'ER α alors que la souche DP 451 contient l'ER β . Effectivement l'ER α possède une capacité d'induction supérieure à l'ER β . La souche DP 450 à concentration en E2 équivalente, produit donc plus de luciférine que la souche DP 451. Etant donné que les capacités métaboliques sont partagées entre la production de biomasse et la production de luciférine, la souche produisant plus de produit, aura à disposition moins de ressources pour l'augmentation de la biomasse. Ceci est une explication qui permet de comprendre l'influence accrue de l'E2 sur la souche DP 450 par rapport à la souche DP 451. Ceci est conforté par l'observation que cette tendance s'accroît avec l'augmentation de la teneur en oestrogènes sur les souches

DP 450 et DP 451. L'OD₆₀₀ du plateau de la souche DP 450, qui est plus bas, possède une teneur en E2 de 1 μ M qu'à 0 et 1 nM, peut s'expliquer par la plus faible création de métabolites secondaires due à la fabrication en parallèle de luciférase. Ces métabolites peuvent favoriser la croissance des levures et donc ainsi augmenter l'OD₆₀₀ de la phase stationnaire. Cette hypothèse n'explique en revanche pas le fait que la souche DP452 connaisse également un abaissement de la densité optique atteinte lors de la phase stationnaire (6.72 \pm 0.22 à 0 M de E2, 5.78 \pm 0.16 à 1 nM de E2 et 5.91 \pm 0.18 à 1 μ M de E2) et que la souche DP 451 ne subisse pas cet effet (5.98 \pm 0.12 à 0 M de E2, 6.21 \pm 0.02 à 1 nM de E2 et 6.10 \pm 0.20 à 1 μ M). La souche DP 452 qui ne connaît pas d'induction de la luciférase par les oestrogènes devrait en toute logique se voir encore moins affectée par cette tendance que la souche DP 451 qui connaît une faible induction de la luciférase par les oestrogènes. L'accroissement de la vitesse de croissance de la souche DP 452 en culture dans du milieu contenant 1 nM et 1 μ M de E2 est explicable par le fait que les oestrogènes augmentent le niveau d'ARN de l'adénylate cyclase et donc le niveau intracellulaire de l'AMPc. L'augmentation de ces composés peut conduire à la stimulation de la reprise de croissance des cellules après la phase G0 [44].

Induction et luminescence

L'objectif de transfert de la technologie de Genève à Sion est l'un des objectifs de ce travail. Les séries d'essais de bioluminescence se sont réparties entre Genève et Sion. Dans un premier temps les tests de bioluminescence furent menés à Sion et se révélèrent infructueux.

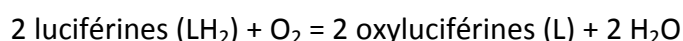
La compréhension de la raison de ces échecs fut la raison pour laquelle une série d'essais furent effectués à Genève dans le laboratoire où les tests de détection des oestrogènes avec les souches DP 450, DP 451 et DP452 sont déjà bien en place et où ils ont déjà fait la preuve de leur efficacité. Deux différences furent constatées lors des manipulations entre Genève et Sion : ce n'est pas la valeur des pics les plus hauts dont il faut tenir compte pour le calcul, mais de la somme des photons émis par unité de temps. Il faut mélanger les mix d'adénine et d'acides aminés au milieu juste avant l'utilisation de ce milieu pour la culture et pour l'induction.

Lorsque de nouveaux essais furent entrepris à Sion, les mêmes paramètres furent appliqués qu'à Genève autant que possible, mais les résultats de la bioluminescence sont restés aberrants.

Deux paramètres demeurent différents entre les deux laboratoires : les fournisseurs des réactifs utilisés pour les essais et l'appareil de détection de la luminescence.

Ces deux paramètres peuvent être à l'origine des dysfonctionnements de l'essai, mais l'hypothèse privilégiée est celle d'un problème lié à l'appareil de détection de la luminescence, car il donne des résultats inattendus pour des essais concernant d'autres projets au sein de la HES-SO Valais. De plus, les résultats des valeurs d'intégration des intensités lumineuses dans le temps donnent des valeurs négatives. Cela est peu probable dans un test où de la lumière devrait théoriquement être produite : une mauvaise

calibration du zéro de la machine peut être à l'origine de ces valeurs négatives. Une autre explication serait qu'effectivement aucune lumière ne soit produite, et, cas échéant, les réactifs seraient à remettre en cause. La seconde hypothèse est moins probable mais reste tout à fait crédible, dans le sens où la luciférine utilisée comme substrat à la luciférase est restée stockée après ouverture du flacon sous forme de poudre à -20 °C, sans atmosphère contrôlée, durant une semaine. Cela aurait pu conduire en présence d'oxygène à une oxydation de la luciférine [45], et aboutir à la formation d'oxyluciférine qui ne permet pas à la luciférase de créer de la lumière. La réaction d'oxydation de la luciférine est :



Induction en fonction de la concentration en oestrogènes

Le Graphique 8 est une des expériences de bioluminescence effectuée à Sion avant les essais de Genève. C'est l'un des essais avec la souche DP 450 visant à obtenir une réponse lumineuse proportionnelle à la concentration en E2 du milieu de culture.

On constate des aberrations au niveau de la lumière émise, comme par exemple aux concentrations de 10^{-14} et 10^{-9} M de E2 où les valeurs de rapport d'induction (respectivement 1.58 et 1.59) sont supérieures aux valeurs comprises entre 10^{-8} et 10^{-5} M de E2 (respectivement 0.89, 1.21, 1.35 et 1.54). De plus, le rapport d'induction maximal à 10^{-4} M de E2 (4.16) est bien inférieur à la valeur à obtenir avec la souche DP 450 qui devrait être d'au moins 60 selon la littérature [46].

Les Graphiques 9 et 10 représentent tous deux des courbes de rapport d'induction en fonction du log de la molarité en E2 pour la souche DP 450. Les essais représentés sur ces Graphique n'ont pas été menés sur les mêmes luminomètres, et ne proviennent pas de cultures ayant subi le même temps de préculture ni le même temps d'induction. Il semblerait que l'essai représenté sur le Graphique 9 montre une meilleure limite de détection (10^{-11} M de E2) et une meilleure limite de quantification (entre 10^{-11} et 10^{-10} M de E2) et n'aboutisse pas à un plateau clair à partir de 10^{-6} M de E2 contrairement à l'essai représenté sur le Graphique 10 (limite de détection : 10^{-9} M de E2; limite de quantification : entre 10^{-8} et 10^{-7} M de E2).

Les rapports d'induction maximaux sur le Graphique 9 (174.13) sont également meilleurs que ceux du Graphique 10 (109.68). En sachant que le temps d'induction était plus élevé durant l'essai du Graphique 10 (14 h) que celui du Graphique 9 (6 h) et qu'il semblerait que la quantité de luciférase augmente avec le temps, on peut donc exclure ce paramètre pour expliquer les meilleures performances de l'essai du Graphique 9. Il y a donc deux explications plausibles pour expliquer ce phénomène : soit l'appareil utilisé pour l'essai du Graphique 9 (chameleon) est plus performant que celui utilisé durant celui du Graphique 10 (Turner TD-20), soit l'âge de la préculture de l'essai du Graphique 9 (14 h) permettait une meilleure induction que celle du Graphique 10 (6 h). Il faut également souligner que la valeur d'ED50 obtenue avec l'essai du Graphique 9 (10^{-9} M de E2) est inférieure à la valeur d'ED50 obtenue avec l'expérience du Graphique 10 ($10^{-7.2}$ M).

Les essais d'induction en fonction de la concentration en E2 effectués sur la souche DP 451 sont représentés sur les Graphiques 11 et 12. Comme pour la souche DP 450, les essais entre les 2 Graphiques ont été faits sur des appareils différents (Graphique 11 : chameleon ; Graphique 12 : Turner TD-20), à des temps de préculture différents (Graphique 11 : 14 h ; Graphique 12 : 6 h) et à des temps d'induction différents (Graphique 11 : 6 h ; Graphique 12 : 14 h). On remarque que l'essai représenté sur le Graphique 11 possède une meilleure limite de détection que celle du Graphique 12 (Graphique 11 : 10^{-8} M de E2 ; Graphique 12 : entre 10^{-7} et 10^{-6} M de E2). Sur aucun de ces essais on ne voit apparaître de limite de quantification car les valeurs maximales de rapport d'induction (Graphique 11 : 7.00 ; Graphique 12 : 3.93) sont inférieures à 10 fois le bruit de fond. On peut penser que, pour les mêmes raisons que pour la souche DP 450, les résultats du Graphique 11 sont plus probants que ceux du Graphique 12. La différence de sensibilité entre les 2 essais conduit à une différence de ED_{50} entre les 2 expériences (Graphique 11 : 10^{-10} M de E2 ; Graphique 12 : $10^{-8.5}$ M).

Concernant les essais d'induction en fonction de la concentration portant sur la souche DP 452 représentés sur les Graphiques 13 et 14, ils ont aussi été effectués sur les 2 appareils, avec des temps de préculture et d'induction identiques à ceux des souches DP 450 et DP 451. L'allure des courbes des 2 Graphiques paraît dans son ensemble normal, vu que la souche DP 452 sert de contrôle négatif. On ne peut donc pas trouver de limite de détection ou de quantification : il n'est donc pas possible de déterminer de valeurs d' ED_{50} . L'information véritablement utile de ces Graphiques, est que l'induction est manifestement due à la présence des ER α et β et que c'est l'E2 qui est responsable de l'induction. Il faut remarquer qu'à 10^{-12} M de E2, la courbe présente sur le Graphique 14 connaît un pic d'induction (1.55) mais que cela ne se retrouve pas à des concentrations d'inducteur plus importantes, ce qui prouve que ce rapport d'induction particulièrement haut pour la souche DP 452 n'est pas le résultat d'une induction par l'E2. D'ailleurs, l'emplacement de ce pic ne remet pas en cause les inductions des souches DP 450 et DP451 puisque il se trouve à une concentration inférieure à la limite de détection des 2 autres souches.

Induction en fonction du temps

Le Graphique 15 est une des expériences menées à Sion sur la souche DP 450 avant les essais de Genève. Il montre une décroissance du rapport d'induction en fonction du temps. Activité protéolytique mise à part, cette tendance va à l'encontre des attentes. Le fait que le rapport d'induction soit inférieur à 1 à des temps d'induction de 3.25, 4.25 et 6.08 h (respectivement 0.64, 0.38 et 0.32) signifie que la quantité de luciférase produite est inférieure après induction qu'avant d'avoir ajouter l'E2. Cela montre que cet essai n'a pas marché.

Les essais menés à Genève qui étudient les rapports d'induction en fonction du temps sont présentés sur les Graphiques 16 pour la souche DP 450, 17 pour la souche DP451 et 18 pour la souche DP 452. Le Graphique 16 comporte un plateau au niveau de l'induction entre 2.00 h et 3.25 h, et le Graphique 17 connaît une diminution de l'induction durant ce laps de temps. Il est possible qu'entre ces deux temps, les cellules aient passé moins de temps en phase G0 et plus en phase G1. Ce phénomène a pour effet de mettre à profit plus de capacité métabolique pour l'augmentation de la biomasse et moins pour la production de

luciférase. D'ailleurs les valeurs d'OD₆₀₀ pour les 2 souches durant cette période ont augmenté de 1.5X, ce qui est la plus forte augmentation de IOD₆₀₀ durant cet essai. Mis à part ce phénomène, la tendance des 2 courbes vers une augmentation de l'induction paraît logique. La plus forte induction dans la souche contenant l'ER α que celle contenant l'ER β est conforme à la théorie. Concernant le Graphique 18, ce dernier montre qu'il n'y a pas d'induction dans le temps, ce qui est conforme aux attentes, puisqu'il représente l'induction dans le temps de la souche qui ne produit aucun ER.

Influence du type de traitement des cellules sur le rapport d'induction final

Le Graphique 19 montre qu'il est plus favorable de ne faire subir aucun traitement aux cellules. La différence de rapport d'induction entre les cellules non traitées (68.69) et les cellules concentrées 10X (61.72) démontre que la plus grande partie de la luciférase est sécrétée mais qu'une autre partie est intracellulaire. Une hypothèse qui peut expliquer le fait que les cellules lysées donnent une valeur de rapport d'induction de 4.55 est que des protéases sont libérées durant la lyse mécanique, protéases dénaturant la luciférase qui ne seraient donc plus capables de produire de la lumière en présence de luciférine.

Comparaison de l'effet inductif de l'E2 et de la génistéine

En comparant les ED50 de l'E2 (10^{-9} avec le chameleon ; préculture de 14h ; induction de 6h) et de la génistéine ($10^{-6.5}$ avec le chameleon ; préculture de 14h ; induction de 6h) on observe que l'affinité de la génistéine pour l'ER α est environ de $10^{-2.5}$ moins forte que celle de l'E2, ce qui est bien inférieur à la littérature qui nous donne un rapport d'affinité de $5 \cdot 10^{-5}$ [46]. On s'approche de la valeur de la littérature si on observe le début de l'induction qui intervient à 10^{-7} avec la génistéine et de 10^{-11} avec l'E2. Pour avoir une meilleure comparaison, il aurait fallu répéter l'expérience un plus grand nombre de fois, et sur une plage de concentration plus étendue.

Lyophilisation des cellules :

Les taux de viabilité des souches DP 451 (18%) et DP 452 (50%) est particulièrement élevé au regard de la littérature qui indique qu'il est difficile d'obtenir des viabilités supérieures à 10% [47].

Ceci peut être dû au faible nombre de cellules par grands carrés (<10), ce qui engendre une grande erreur au niveau du comptage.

De plus, la faible coloration de certaines cellules fait qu'une partie d'entre elles peuvent être comptées comme vivantes alors qu'elles sont mortes. La viabilité de la souche DP 450 (7%) semble plus proche de la viabilité attendue. La mesure de la viabilité de cette souche a été faite avec une densité de cellules plus grande sous le microscope (~50 cellules par grand carré).

Perspectives :

Avant de pouvoir mettre au point un kit permettant la détection de l'activité oestrogénique à partir de différentes matrices, il reste encore bon nombre de tests à effectuer.

Une des priorités est d'identifier la ou les raisons qui perturbent le bon déroulement des essais à Sion. Comme mentionné plus haut, deux axes de recherches pour résoudre ce problème doivent être entrepris.

Le premier est la confirmation que les réactifs de Sion fonctionnent correctement. Pour ce faire, une possibilité simple serait de tester les réactifs de Sion au laboratoire de l'université de Genève : cela permettrait en peu de temps d'éliminer les soupçons qui pèsent sur cette possible source de problème.

Le deuxième est de tester la sensibilité et la bonne calibration du Varian Cary Eclipse de Sion. Pour y remédier un standard de luciférase pourrait être acheté, ce qui rendrait ainsi possible les tests sur la bioluminescence avec cet appareil, sans autre substance que l'enzyme et son substrat.

Une alternative existe à l'utilisation du Varian Cary Eclipse : il doit être possible d'utiliser un microscope à fluorescence avec un filtre qui détecte la GFP. Comme la réaction entre la luciférase et la luciférine produit de la lumière à 560 nm qui se trouve dans les spectres du vert, il est sûrement possible d'utiliser le filtre du microscope sans aucune excitation, de prendre une photo de la culture induite en présence de luciférase, et de calculer par traitement numérique le nombre de pixels correspondant à la lumière émise par la réaction enzymatique.

D'autres paramètres seraient également intéressants à étudier dans le cadre de la mise au point de ce kit. Comme décrit dans la partie discussion de ce rapport, une influence du taux de croissance sur la sensibilité de la mesure est plausible. C'est pourquoi il serait intéressant d'effectuer des tests de rapports d'induction en fonction de la concentration à différents âges de préculture, en particulier au moment où la culture se trouve à son μ_{\max} . L'optimisation de la lyophilisation est aussi une des suites primordiales à la mise au point d'un tel test. Des paramètres tels que le traitement de la souche avant la lyophilisation, la sensibilité des souches lyophilisées au rayonnement UV et à la température ainsi que la capacité qu'ont les oestrogènes à induire les levures après lyophilisation, sont des critères à prendre en compte pour l'emballage, le stockage et l'utilisation d'un tel kit.

Bibliographie :

- [1] <http://www.chilton.com/paq/archive/PAQ-99-202.html> 02.03.2009
- [2] Albert L. Lehninger ; Principles of biochemistry ; The Johns Hopkins University
- [3] Reginald H. Garrret, Charles M. Grisham ; Biochimie 2ème édition; DeBoeck University
- [4] Toine F.H. Bovee at al.; Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein; Gene 325 (2004), 187-200
- [5] <http://www.lipidworld.com/content/2/1/4/Figure/F1?highres=y> 01.03.2009
- [6] Zava, D T : Blen, M : Duwe, G; **Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture**; Environ-Health-Perspect. 1997 Apr; 105 Suppl 3637-45
- [7] <http://www.dietaryfiberfood.com/phytoestrogen.php> 29.02.2009
- [8] Christiqn Moussard; Biologie moléculaire et biochimie des communication Cellulaires; de boeck
- [9] Rudolf Mitterbauer at al.; A sensitive and inexpensive yeast bioassay for the mycotoxin Zearaleone and other compounds with estrogenic activity; Applied and environmental microbiology, Feb 2003, 805-811
- [10] Alois Jungbauer, Verena Beck; yeast reporter system for rapid determination of estrogenic activity; Journal of Chromatography B, 777 (2002) 167-178
- [11] André Sievernich at al.; In vitro bioactivity of 17 α -estradiol; Journal of steroid biochemistry and molecular biology; 92 (2004) 455-463
- [12] Emily Pisha, John M. Pezzuto; Cell-based assay for the determination of estrogenic and anti-estrogenic activities; Methods in cell Science; 19 (1997) 37-43
- [13] Maria J. Lòpez de Alda, Damià Barcelò; Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters; Fresenius J Anal Chem; 371 (2001) 437-447
- [14] Terri Damstra et al ; Global assessment of the state of the science of the endocrine disruptors ; international programme on chemical safty (2002)
- [15] Ruthann M. Giusti; Kumiko Iwamoto; and Elizabeth E. Hatch ; Diethylstilbestrol Revisited: A Review of the Long-Term Health Effects ; Annals of internal Medicine ; 122 (1995) 778-788
- [16] SCHRAGER et al; Diethylstilbestrol exposure ; AAFP may 2004
-

- [17] Ahmedin Jemal et al ; Cancer Statistics 2006 ; CA Cancer J Clin (2006) 56:106–130
- [18] Kim Bich Nguyen tamoxifen undergoes optimisation cosmos 2008
- [19] Annlia Paganini-Hill and Linda J Clark ; Eye problems in breast cancer patients treated with tamoxifen ; Breast Cancer Research and Treatment 60 ;(2000) 167–172,
- [20] Compendium suisse des médicaments 2007 ; documed
- [21] Stephen RD Johnson ; selective oestrogen receptor modulators and downregulators for breast cancer-have they lost their way ? ; Breast Cancer Research ; 7 (2005) 119-130
- [22] K. Holli Tamoxifen versus toremifene in adjuvant treatment of breast cancer ;European journal of cancer ; 38 (2002) 37-38
- [23] M Gershanovich et al ; A phase III comparison of two toremifene doses to tamoxifen in postmenopausal women with advanced breast cancer ; Breast cancer reserch and Treatment ;45 (1997) 251-262
- [24] Stephen R.D. Johnston ; Endocrine manipulation in advanced breast cancer : recent advances with SERM therapies ; Clinical Cancer Research ; 7 (2001) 4376-4387
- [25] A. Buzdar et al ; phase III randomized trial of droloxifene and tamoxifen as first-line endocrine treatment of ER/PgR-positive advanced breast cancer ; Breast cancer reserch and Treatment ; 73 (2002) 161-175
- [26] DR Newell et al ; Professor Tom Connors and the development of novel cancer therapies by the Phase I/II Clinical Trials Committee of Cancer Research UK ; british journal of cancer ; 89 (2003) 437-454
- [27] G arpino et al ; idoxifene versus tamoxifen : a randomized comparaisn in post ménauposal patient with métastatic breast cancer ; Annals of oncology ; 14 (2003) 233-241
- [28] A howell et al ; Comparison of fulvestrant versus tamoxifen for the treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women previously untreated with endocrine therapy: a multinational, double-blind, randomized trial ; Journal of Clinical Oncology ; 22 (2004) 1605-1613
- [29] Paul K et al ; Estrogen induces death of tamoxifen-resistant MCF-7 cells :contrasting effect of estrogen receptor downregulator.Journal of Steroid biochemistry and molecular biology ; 98 (2006) 193-198

- [30] Martin Wagner et al ; Endocrine disruptors in bottled mineral water : total estrogenic burden and migration from plastic bottles ; Cancer Causes and control ; (2008)
- [31] Herman Adlercreutz et al ; Phyto-oestrogens and weastern diseases ; The Finnish Medical Society DUODECIM, Ann Med ; 29 (1997) 95-120
- [32] Maria Hedelin et al ; Dietary phytoestrogen, serum enterolactone and risk of prostate cancer : the cancer prostate sweden study (sweden) ;Cancer Causes and Control ; 17 (2006) 169-180
- [33] Andrea m Hutchins et al ; Vegetables, fruits, and legumes : Effect on urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion ; Journal of the american Dietetic Association ; 95 (1995) 769-774
- [34]K Ohyama et al ; Certain styrene oligomers have proliferative activity on MCF-7 human breast tumor cells and binding affinity for human estrogen receptor- α ; Environmental Health Perspective ;109 (2001) 699-703
- [35] K Cheshenko et al ; Expression of zebra fish aromatase cyp19a et cyp19b genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor Toxicological Sciences ; 96 (2007) 255-267
- [36]Darrell R Boverhof et al ; Dioxin induces an Estrogen-Like, Estrogen Receptor-Dependent gene Expression Response in the Murine Uterus Molecular Pharmacology ; 69 (2006) 1599-1606
- [37] S Heinonen et al ; Metabolism of isoflavones in human subjects ; Phytochemistry Reviews ; 1 (2002) 175-182
- [38]Jan Seibel et al ; in utero and postnatal exposure to a phytoestrogen-enriched diet increases parameters of acute inflammation in rat model of TNBS-induced colotis ; Arch Toxicol ; 82 (2008) 941-950
- [39] T Schultis et al ; Determination of estrogenic activity by LYES-assay (Yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase) ; Chemosphere ; 57 (2004) 1649-1655
- [40] W Chu et al ; Validation of a New Yeast-Based Reporter Assay Consisting of Human Estrogen Receptors α/β and Coactivator SRC-1 : Application for Detection of Estrogenic Activity in Environmental Samples environmental Toxicology ; (2008)
- [41] Marleen Maras et al ; Estrogen-like Properties of fluorotelomer alcohols as Revealed by MCF-7 Breast Cancer Cell Proliferation ; Environmental Health Perspectives ; 114 (2006) 100-105
- [42] Ould El Hadj M. D. et al ; Product engineering of yeast baker (Saccharomyces Cerevisae) cultivated on must of dates rejects; Courier du Savoir ; 7 (2006) 13-18
-

- [43] Pim Van Hoek et al ; effect of specific Growth rate on fermentative capacity of baker's yeast ; Applied and Environmental Microbiology ; Nov. 1998 4226-4233
- [44] Tanaka S. et al ; Estrogen can regulate the cell cycle in the early G1 phase of yeast by increasing the amount of adenylate cyclase mRNA ; Cell ; vol. 57 n°4 (1998) 675-681
- [45] E. Newton Harvey ; Studies on the oxidation of luciferine without luciferase and the mechanism of bioluminescence; reçu pour publication le 19 avril 1928
- [46] P. Leskinen et al ; Bioluminescent yeast assays for detecting estrogenic and androgenic activity in different matrices ; Chemosphère ; 61 (2005) 259-266
- [47] Y. Miyamoto-Shinohara et al ; Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage ; Cryobiology ; 41 (2000) 251-255
- [48] Hasting J.W. ; Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems ; J. Mol Evol ; 19 (1983)
- [49] J.F. Case et al ; Neurally controlled luminescent systems ; Academic press ; (1978) 332-366
- [50] Thomas O Baldwin ; Firefly luciferase: the structure is know, but the mystery remains ; Structure ; 4 (1996) 223-228
-

Annexe:

Principes des techniques expérimentales de mesure de la bioactivité:

La majorité des méthodes de l'étude de bioactivité des œstrogènes fonctionne sur la base de l'interaction des molécules à activité oestrogénique avec les récepteurs nucléaires à œstrogènes (ER).

Comme il est décrit plus haut, les molécules à une activité œstrogénique sont de plus en plus abondantes dans la nature. C'est pourquoi bon nombre de recherches ont été entreprises dans le but de développer des méthodes permettant de quantifier la bioactivité de ces molécules, car il est important de pouvoir juger de l'impact environnemental sur les perturbations du système endocrinien. Quelques-unes de ces méthodes sont répertoriées dans ce document afin d'avoir une vision plus globale de l'état de la recherche concernant ces mesures. On distingue 2 grandes catégories de méthodes : celles qui utilisent des lignées de levures recombinantes, et celles qui utilisent des lignées de cellules animales transgéniques.

En principe les méthodes de mesure de la bioactivité utilisent le système de régulation des gènes par l'ER. On recombine les souches pour que l'induction positive de l'ER sur l'ADN exprime une protéine facilement mesurable. C'est souvent des systèmes où la transformation des cellules permet d'exprimer l'ER humain dans la cellule hôte qui peut être de plusieurs types, cellule animale ou levure. Un autre brin d'ADN est également transféré dans la cellule transformée. Ce brin d'ADN comporte généralement un HRE suivi par le gène codant pour la protéine révélatrice de la bioactivité des composés ("reporter protein"). D'autres modifications du génome de la souche utilisée pour la mesure peuvent être effectuées, soit pour augmenter la sensibilité de la méthode, soit pour éviter l'apparition de faux positifs.

Méthodes avec des levures

4 méthodes à base de levures sont décrites ici. Les 4 méthodes permettent de quantifier la bioactivité des molécules à activité oestrogénique. La première méthode, est une méthode développée pour quantifier l'activité oestrogénique du ZON dans des milieux complexes. Il semblerait que cette méthode soit également applicable à d'autres types d'œstrogènes que le ZON. Elle est décrite dans la publication « A sensitive and inexpensive yeast bioassay for micotoxin zearaleone and other compounds with estrogenic activity » [9]. La seconde méthode (LYES) se base sur un système à deux plasmides qui permet la quantification de la bioactivité des œstrogènes, xéno- et phytoestrogènes suivi d'une lyse. Elle est décrite dans la publication « yeast reporter system for rapid determination of estrogenic activity » [10] et est aussi décrite dans « Determination of estrogenic activity by LYES-assay (Yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase) ». La troisième méthode est décrite dans « In vitro bioactivity of 17 α -estradiol » [11] est a été développée pour mesurer la bioactivité de deux isomères de l'estradiol, mais peut également être appliquée à d'autres

oestrogènes-like : cette méthode est décrite dans « Validation of a New Yeast-Based Reporter Assay Consisting of Human Estrogen Receptors α/β and Coactivator SRC-1 : Application for Detection of Estrogenic Activity in Environmental Samples » et représente la méthode qui possède la limite de détection la plus basse.

Principe de la méthode décrite dans « A sensitive and inexpensive yeast bioassay for micotoxin zearaleone and other compounds with estrogenic activity » [9]

Ce document décrit la construction de souches recombinantes de levures servant d'indicateur de la quantification de l'activité oestrogénique. La souche utilisée est YZRM7. C'est une souche incapable de croître sans un gène pyrimidine biosynthétique. Ce gène est exprimé uniquement en présence de molécule à activité oestrogénique à cause de la séquence HER en amont de ce dernier. Les gènes *FUR1* et *URK1*, permettant le bon fonctionnement des voies métaboliques responsables de l'assimilation des pyrimidines exogènes, ont été désactivés dans cette souche afin d'éviter que des pyrimidines présentes dans des échantillons biologiques puissent interférer avec la mesure. C'est la croissance des levures qui servira d'indicateur pour mesurer la bioactivité oestrogénique des molécules et c'est par les pyrimidines que l'on va induire cette croissance. Il faut donc que la cellule ne puisse utiliser les pyrimidines présentes dans le milieu. Les oestrogènes présents dans le milieu de culture induisent la fabrication des pyrimidines, sans lesquelles la levure ne peut croître puisqu'elle en a besoin pour reconstituer l'ADN de la cellule fille : on peut donc corréliser la croissance des cellules avec le potentiel oestrogénique d'un échantillon, à condition que l'on connaisse la concentration en oestrogènes ou en oestrogènes-like d'une gamme de standard. [9]

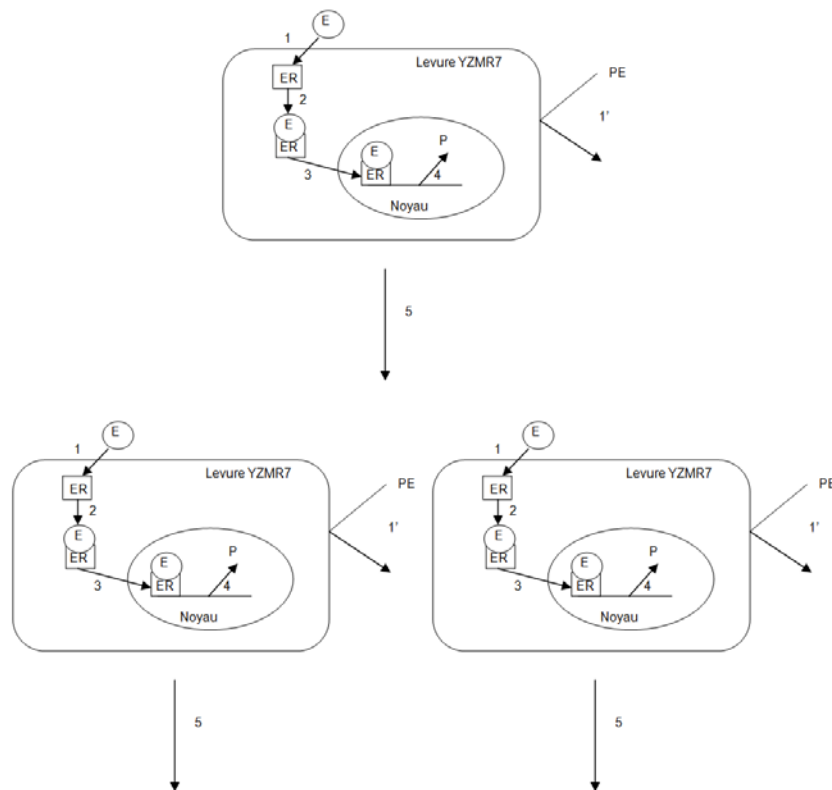


Figure 4 : Représentation schématique du fonctionnement de la méthode. E= œstrogène ; ER= récepteur œstrogène ; P= pyrimidine ; PE= pyrimidine exogène. 1 : l'œstrogène et le récepteur œstrogène sont tous deux libres. 2 : l'œstrogène et le récepteur œstrogène se fixent l'un à l'autre pour former un complexe actif. 3 : le complexe pénètre le noyau de la cellule, et se fixe à l'ADN pour induire l'expression positive des pyrimidines. 4 : les pyrimidines sont synthétisées. 5 : la cellule se divise. 1' : les pyrimidines exogènes ne pénètrent pas la cellule.

La méthode développée est sensible et peu coûteuse. La réponse de la croissance, basée sur la dépendance de la croissance aux récepteurs œstrogéniques des levures, aux stimulateurs œstrogéniques, est très robuste et reproductible. L'analyse ne demande pas de matériel très onéreux, en comparaison avec d'autres mesures de bioactivité avec des levures, ou avec des cellules de mammifères. [9]

Deux éléments sont importants pour cet essai :

1. La désactivation des gènes PDR5 et SNQ2, qui codent pour l'expression des transporteurs ABC, ce qui augmente la rétention intracellulaire du ZON et d'autres composés œstrogéniques. [9]
2. L'inactivation des gènes URK1 et FUR1 de la souche sauvage inhibant la voie métabolique de la métabolisation des pyrimidines, excluant ainsi la possibilité d'obtenir de faux positif due à la présence de pyrimidine dans des échantillons biologiques. [9]

Cette méthode permet la détection de l'activité oestrogénique de substances, mais ne permet pas leur identification. En inactivant les transporteurs ABC, on améliore la limite de détection jusqu'à 1µg de ZON par litre de milieu, mais on rend également la souche mutante plus sensible aux substances toxiques qui sont le substrat de ces transporteurs. Un autre désavantage de cette méthode est que la souche doit être maintenue, entre deux analyses, dans du milieu contenant des composés oestrogéniques. Si la souche est maintenue dans du milieu contenant des œstrogènes, elle peut se diviser encore quelques fois lors de l'analyse sous l'effet des traces d'œstrogènes dans le cytoplasme provenant du milieu de maintien. [9]

Principe de la méthode décrite dans « yeast reporter system for rapid determination of estrogenic activity » (LYES) [10]

Il s'agit là d'un test in-vitro pour la détermination de la bioactivité des œstrogènes, des xœstrogènes et des phytoœstrogènes, basé sur l'activation des récepteurs oestrogéniques α . Ce test est conçu pour permettre l'analyse des œstrogènes environnementaux. Ce système consiste en deux plasmides. Le premier contient le gène des récepteurs oestrogéniques inducible par du Cu^{2+} . Le second contient le gène lacZ, codant pour la β -galactosidase, et l'élément de réponse aux œstrogènes. La culture de la souche de levure contenant ces deux plasmides en présence d'œstrogènes permet l'activation des ER. Ces ER ainsi activés vont induire positivement l'expression du gène lacZ et donc permettre la production de β -galactosidase. La mesure de l'activité de la β -galactosidase peut être corrélée avec la bioactivité des composés oestrogéniques. La quantité de β -galactosidase exprimée, utilisée comme mesure de l'activité hormonale, est mesurée spectrophotométriquement en utilisant un substrat chromogénique générant une coloration quantifiable à 405 nm et les protéines totales sont quantifiées par la méthode de Bradford. La production de β -galactosidase doit être mesurée en fonction du temps d'incubation des levures. Après la culture, les cellules sont lysées enzymatiquement et centrifugées afin de récupérer la β -galactosidase intracellulaire. La β -galactosidase se trouve dans le surnageant. [10]

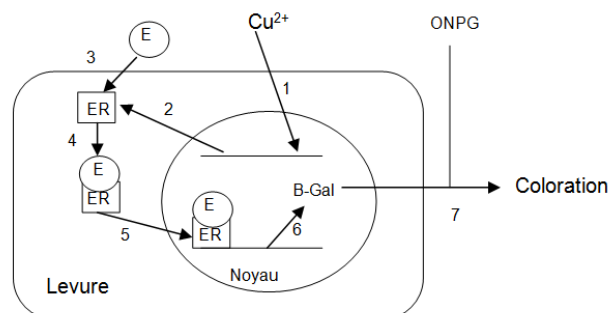


Figure 5 : Représentation schématique du fonctionnement de la méthode. E= œstrogène ; ER= récepteur œstrogène ; B-Gal= β -galactosidase ; ONPG= orthonitrophényl- β -D-galactopyrannoside. 1 : le Cu^{2+} inuit la production de l'ER. 2 : l'ER est produit. 3 : l'œstrogène et le récepteur œstrogène sont tous deux libres. 4 : l'œstrogène et le récepteur œstrogène se fixent l'un à l'autre pour former un complexe actif. 5 : le complexe pénètre le noyau de la cellule, et se fixe à l'ADN pour induire l'expression positive de la β -galactosidase. 6 : la β -galactosidase est synthétisée. 7 : la β -galactosidase se lie à l'ONPG pour produire une coloration détectable à 405nm.

La limite de détection de cette méthode est de 27.2 ng/β de 17 -estradiol. Des tests d'augmentation du temps d'incubation ont été effectués pour essayer d'augmenter la limite de détection, mais il semblerait que ce paramètre n'influence pas cette limite. L'un des avantages de cette méthode est la rapidité de cette dernière, effectivement le temps d'incubation peut-être réduit à 2h et peut aller jusqu'à une nuit. Cette méthode connaît aussi des désavantages, la lyse enzymatique des cellules rend la mesure moins sensible par rapport à une lyse mécanique, et la lyse est extrêmement dure à standardiser. [10]

Une autre publication parle de l'essai LYES : « Determination of estrogenic activity by LYES-assay (Yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase) » [39] :

Le teste LYES permet comme les autres tests de mesurer la bioactivité des composés à activité oestrogénique. Comme le test décrit dans « yeast reporter system for rapid determination of estrogenic activity » il repose sur une souche de levure qui contient le gène permettant d'exprimer l'ER, et un plasmide contenant le gène lacZ, inducible par le complexe œstrogènes-récepteurs. Dans un YES-assay classique l'étape demandant le plus de temps est l'excrétion de lβ -galactosidase. C'est pourquoi le LYES-assay comprend après culture de la levure dans le milieu contenant l'analyte supposée oestrogénique une étape de lyse avec de la lyticase provenant de *Arthrobacter luteus*. Cette méthode connaît une limite de quantification de 38 ng/l de milieu ; elle est extrêmement rapide à mettre en œuvre car elle ne demande que 7 h d'incubation. Cette méthode est aussi avantageuse, car elle ne demande que peu de matériel et est donc peu coûteuse.

Principe de la méthode décrite dans « In vitro bioactivity of 17 α-estradiol » [11]

Cet essai repose sur l'activation des récepteurs ER- α comme les tests décrits précédemment. Cette fois la molécule indicatrice de la bioactivité oestrogénique est la GFP. Des *Saccharomyces cerevisiae* ont été transformés avec un plasmide contenant la séquence codante pour les ER et avec un plasmide contenant une version optimisée pour les levures de la GFP (yEGFP). Le plasmide contenant la séquence yEGFP a été lié à trois HER permettant l'induction positive de la transcription de l'EGFP en présence d'œstrogènes. De plus, une suppression des gènes Pdr5, Snq2 et Yor1a été faite, afin d'augmenter la sensibilité de la méthode, car ces trois gènes sont connus pour faciliter l'évacuation des composés organiques tels que les stéroïdes. La quantité de EGFP produite peut être corrélée avec la bioactivité des composés étudiés, à condition que l'on connaisse la concentration en composés oestrogéniques de l'échantillon. La quantité d'EGFP peut-être mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et à une longueur d'onde d'émission de 535 nm. La mesure de la quantité de cellules au départ de la culture est mesurée avec une mesure de densité optique de 0.4 à 600nm. Ceci permet une standardisation de l'essai, et évite de devoir recourir à une lyse cellulaire. Pour la mesure les deux paramètres entrent donc en compte. [11]

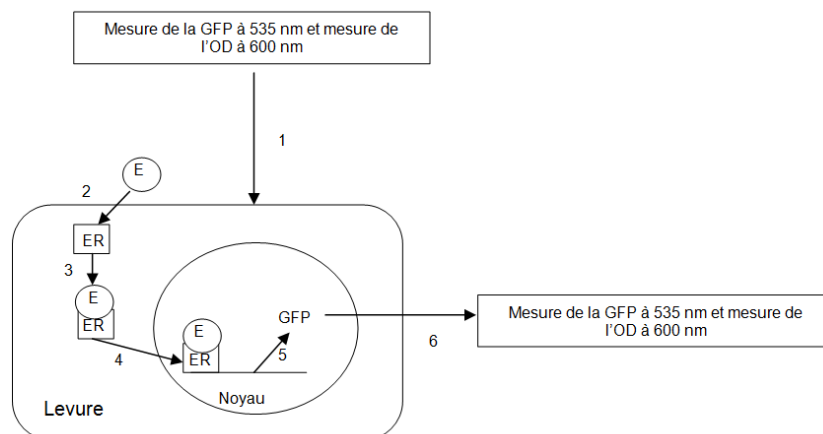


Figure : Représentation schématique du fonctionnement de la méthode. E= œstrogène ; ER= récepteur œstrogène ; GFP= Green fluorescence protein. 1 : une mesure de la densité optique et de la fluorescence est effectuée. 2 : l'œstrogène et le récepteur œstrogène sont tous deux libres. 3 : l'œstrogène et le récepteur œstrogène se fixent l'un à l'autre pour former un complexe actif. 4 : le complexe pénètre le noyau de la cellule, et se fixe à l'ADN pour induire l'expression positive de la GFP. 6 : la GFP et la quantité de cellules sont à nouveau mesurées par fluorescence et par OD.

La limite de détection de cette méthode est de 5 ng/l pour le 17 β -œstradiol et de 100 ng/l pour le 17 α -œstradiol. Elle possède l'avantage de ne pas impliquer de lyse cellulaire, et ne demande pas le maintien de la lignée dans du milieu contenant des œstrogènes. En revanche, elle demande un temps d'analyse relativement long de 16.5h et est relativement sensible aux toxines présentes dans le milieu à cause de la désactivation des gènes Pdr5, Snq2 et Yor1 augmentant non seulement la rétention intracellulaire des composés stéroïdiens mais aussi celle de certains éléments nocifs à la cellule.[11]

Principe de la méthode décrite dans : « Validation of a New Yeast-Based Reporter Assay Consisting of Human Estrogen Receptors α/β and Coactivator SRC-1 : Application for Detection of Estrogenic Activity in Environmental Samples »[40]

Cette méthode est la méthode la plus récente de mesure de la bioactivité des œstrogènes et œstrogènes-like. Elle consiste en un système à deux plasmides. Cette fois la séquence codant pour l'ER se trouve intégré à l'ADN chromosomal. La séquence de l'ER est exprimée en présence de galactose grâce au promoteur gal10. Un plasmide contient la séquence lacZ induite par le complexe ER-œstrogène, et l'autre plasmide contient la séquence d'un coactivateur SRC-1. Ce coactivateur permet d'augmenter la sensibilité de la méthode. Avant et après l'essai on mesure l'activité de la β -galactosidase en présence d'ONPG à 405 nm et la densité cellulaire à 595 nm. La pente de l'évolution de l'absorbance à 405 nm normalisé avec le nombre de cellules en fonction du temps peut être corrélée à la bioactivité œstrogénique de l'analyte étudiée.

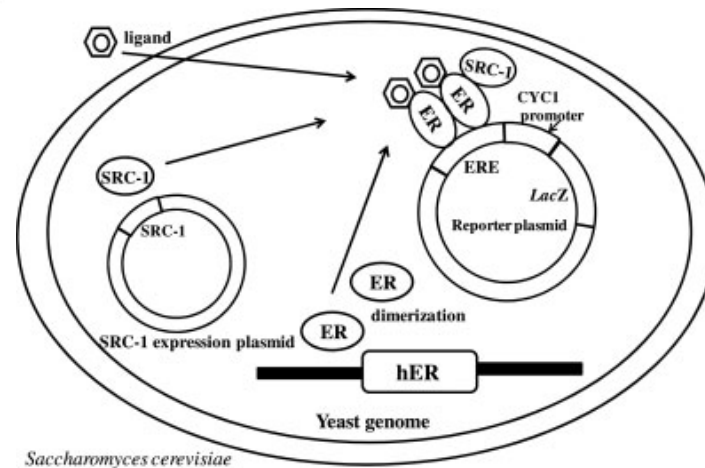


Figure 5 : Représentation schématique du fonctionnement de la méthode

Cette méthode présente l'avantage d'être la méthode la plus sensible trouvée actuellement car elle permet de détecter une concentration de 2.7 ng/l de milieu. Un avantage de cet essai est qu'il n'est pas particulièrement sensible aux polluants en comparaison avec les essais de cellules de mammifères. De plus il semblerait que la reproductibilité du test est bonne. L'essai est malgré tout demandeur en temps, car il prend minimum 3 jours.

Méthode avec des cellules de mammifères

Deux méthodes avec des cellules animales sont décrites ici. Les deux méthodes permettent la mesure de la bioactivité des composés à activité oestrogénique. La méthode est décrite dans la publication « Cell-based assay for the détermination of estrogenic and anti. estrogenic activities » et utilise des cellules Ishikawa [12]. La deuxième est décrite dans « Estrogen-like Properties of fluorotelomer alcohols as Revealed by MCF-7 Breast Cancer Cell Proliferation » et utilise des cellules MCF-7.

Principe de la méthode décrite dans « Cell-based assay for the détermination of estrogenic and anti. estrogenic activities » [12]

Cette méthode a été mise au point dans le but de déterminer le potentiel oestrogénique ou antioestrogénique de composés en utilisant des cellules Ishikawa. Les cellules Ishikawa sont des carcinomes d'endomètre humain qui montrent une alcaline phosphatase inducible par les œstrogènes qui peut être employée pour une détermination rapide de la bioactivité des œstrogènes ou des antioestrogènes. L'activité oestrogénique est mesurée par l'augmentation de la proportion d'alkaline phosphatase, alors que l'activité antioestrogénique est indiquée par une décroissance de l'activité de cette enzyme. Le procédé consiste en une culture de cellules Ishikawa en présence du composé à étudier. Une fois que la densité cellulaire voulue est atteinte, on lyse les cellules et on met en contact le résultat de la lyse avec le substrat de l'alkaline phosphatase qui est le p-nitrophénylphosphate. Immédiatement après la mise en contact de l'enzyme avec son substrat, on mesure toutes les 15 secondes la formation de p-nitrophenol (résultat de la réaction enzymatique entre l'alkaline phosphatase et le p-nitrophénylphosphate) avec un lecteur de plaques ELISA à 515 nm. On obtient ainsi des droites représentant la formation du produit en fonction du temps.

La pente de ces droites nous indique la bioactivité du composé oestrogénique. Plus la pente est élevée, plus le composé est physiologiquement actif. [12]

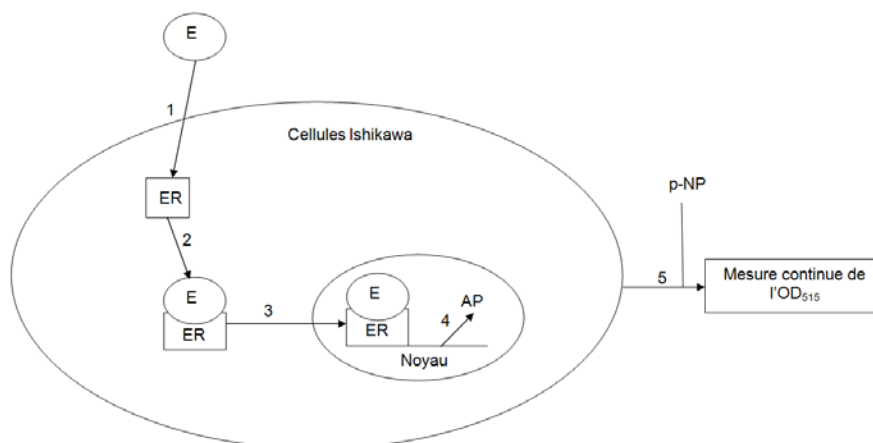


Figure 6 : Représentation schématique du fonctionnement de la méthode. E= œstrogène ; ER= récepteur œstrogénique ; AP= Alkaline phosphatase ; p-NP= p-nitrophénylphosphate. 1 : l'œstrogène et le récepteur œstrogénique sont tous deux libres. 2 : l'œstrogène et le récepteur œstrogénique se fixent l'un à l'autre pour former un complexe actif. 3 : le complexe pénètre le noyau de la cellule, et se fixe à l'ADN pour induire l'expression positive de l'alkaline phosphatase. 4 : l'alkaline phosphatase est synthétisée. 5 : on lyse les cellules et on ajoute de l'p-nitrophénylphosphate afin d'effectuer une mesure continue de la formation du produit issu de la réaction enzymatique.

La technique avec les cellules Ishikawa possède des avantages non négligeables par rapport aux mesures de la bioactivité avec des levures.

Premièrement elle possède un génome humain. Les levures transformées ne permettent pas de mesurer les interactions d'autres promoteurs ou répresseurs de changer la réponse de la mesure de la bioactivité chez les êtres humains. En effet, il est possible qu'une partie des complexes œstrogènes-ER ne soient pas aussi actifs lorsqu'ils sont répartis entre plusieurs HER que lorsqu'ils le sont sur un seul. Deuxièmement, les systèmes avec des levures n'imitent pas le métabolisme humain, et donc, ne permet pas de tester la toxicité des composés de manière aussi fiable que des cellules provenant de mammifères. Il semblerait également que le système avec les cellules Ishikawa soit reproductible et robuste. Ce système est simple, mais possède cependant quelques désavantages. Les cellules perdent la majorité de leur capacité d'induction après environ 30 passages. Cette perte est progressive de 1 à 30 passages. Ce qui implique que pour que les résultats soit comparables, il faut utiliser des cellules provenant d'un même passage. Il faut donc avoir un large stock de cellules, provenant d'un des premiers passages, conservées dans de l'azote liquide. [12]

Principe de la méthode décrite dans « Estrogen-like Properties of fluorotelomer alcohols as Revealed by MCF-7 Breast Cancer Cell Proliferation »[41]

Ce test utilise des cellules MCF-7, cellules isolées à partir d'adénocarcinomes malins du sein. Ces cellules sont connues pour croître en présence d'œstrogènes. C'est donc la différence de densité cellulaire entre le début et la fin de l'essai qui va permettre de quantifier la bioactivité de l'analyte. Le mécanisme de la dépendance de la croissance des MCF-7 est décrite dans la publication de M Lippman et al (the effects of estrogens and antiestrogens on hormone responsive human breast cancer in long term tissue culture). Il semblerait que ce soit la thymidine kinase qui soit responsable de la prolifération des MCF-7 en présence d'œstrogènes. La plus petite concentration mesurée est de 272 ng d'E2 par litre. Un désavantage de cette méthode est l'obtention de faux positifs, car la prolifération peut être induite par d'autres molécules que des agents à activité oestrogénique, mais l'obtention de faux négatifs est également possible, dans le sens où cette prolifération de ces cellules peut être inhibée par certains produits. Des mélanges complexes de molécules contenant à la fois des molécules inhibitrices et des œstrogènes peuvent apparaître comme neutres lors de l'analyse. De plus la méthode est relativement longue à mettre en œuvre car elle prend plus de 6 jours.

Techniques expérimentales de mesure de la concentration :

Outre la mesure de la bioactivité des molécules à activité oestrogénique, il est important de pouvoir en étudier la concentration, car elle permet de doser l'échantillon de départ. En effet, la mesure de la bioactivité sous-entend forcément une mesure antérieure de la concentration, afin de pouvoir comparer l'activité biologique des différents composés.

Tableau 2 : méthodes analytique pour la détermination des composés oestrogénique et la progestérone [13]

Analyte	Volume d'échantillon [l]	Préparation d'échantillon	Phase stationnaire	Détection	Limite de détection [ng/l]	Année de publication
stéroïdes	20-80	LLE, hydrolyse, CCM		GLC	10	1981
EE, NOR	0.01	Lyophilisation		IA	1(EE), 2(NOR)	1989
E2	0.05-0.1	SPE (colonne C ₁₈)		RIA	2	1993
E1, E2, EE	20	SPE (colonne C ₁₈), fraction HPLC		GC-MS	0.2	1998
E2, EE, E1, 17 α -E2	1	SPE, Hydrolyse, fraction HPLC	DB5-MS	GC-MS-MS	0.1-2.4	1999
E2, EE, E1	15	SPE, LLE, GPC, hydrolyse		GC-MS		1999
E2, EE	5	SPE, fraction HPLC	Phénomènes Prodigy	HPLC-FL RIA	0.107 (E2), 0.053 (EE)	1999
E2, E1, MES, 17 α -E2, E2-17-valer., 16 α -OH-E1, E2-17-acet	1	SPE, dérivatization silica gel	XTI-5	GC-MS-MS	1	1999
E2, EE, E1, 17 α -E2	1	LLE	HP Ultra II	GC-MS	58 (E2)	2000
E1, E2, E3, EE	0.15-0.4	SPE	Alltima	HPLC-MS-MS		2000
E1, E2, EE	1	SPE, fraction HPLC		GC-MS-MS	0.1-1.8	2000
E1, E2, E3, EE	0.5-1	SPE		HPLC-MS-MS	0.4-0.5	2000
E1, E2, EE	2.5	SPE	5% phenyl methylsiloxane	GC-MS-MS	1	2000
E1, E2, E3, EE, MES, LEV, NOR-acetate	20	SPE, silica gel dérivatization	DB5-MS	GC-MS	1 (limite de quantification)	2000

Tableau 2: suite

Analyte	Volume d'échantillon [l]	Préparation d'échantillon	Phase stationnaire	Détection	Limite de détection [ng/l]	Année de publication
E3, E2, E1, EE	1	SPE	Alltima	HPLC-MS-MS	0.5 (E2,EE) 1 (E1,E3)	2000
E3, E2, EE, DES, E1, NOR, LEV, PROG	0.5	SPE	LiChrospher 100 RP-18	HPLC-DAD-MS	2-500	2000
E1, E2, EE	2	SPE		GC-MS	1 (E1, E2) 0.5 (EE)	2000
E2		SPE		ELISA		2000
EE	7.08	SPE	DB5-MS	GC-MS	74	2000
E2, EE, E2gluc, E2sulf	0.3-2	SPE, hydrolyse, fraction HPLC	Rtx-5	ELISA GC-MS-MS (seulement pour l'E2)	0.1 0.2-0.4 (E2)	2001
E3, E2, EE, DES, E1, NOR, LEV, PROG	0.2	On-line SPE	LiChrospher 100 RP-18	HPLC/DAD-MS	10-200	2001

Abréviations: CCM= chromatographie sur couche mince ; GLC= gaz liquide chromatographie ; HPLC= chromatographie liquide à haute performance ; MS= spectrométrie de masse ; ELISA= Enzyme-linked immunosorbent assay ; GPC= Gel permeation chromatography ; FL=fluorescence ; GC=chromatographie en phase gazeuse ; SPE= solid-phase extraction ; LLE liquid-liquid partition ; RIA= radioimmunosorbent assay ; IA= immunoassay ; DAD= diode array detector ; EE= ethynyl estradiol ; NOR= norethindrone ; E2= estradiol ; E1=estrone ; 17 α -E2= 17 α -estradiol ; MES= mestranol ; E2-17-valer= estradiol-17-valerate ; 16 α -OH-E1= 16 α -hydroxy-estrone ; E2-17-acet= estradiol-17-acetate ; E3=estriol ; LEV= levonorgestrel ; NOR-acetate= norethindrone acetate ; E2gluc= estradiol gluconide ; E2sulf= estradiol sulfate.[13]

Le Tableau 2 montre les méthodes référencées de 1981 à 2001 pour la quantification des oestrogènes et de la progestérone. Il comporte des données relatives à chaque méthode, telles que les analytes, la préparation de l'échantillon, la phase stationnaire, le type de détection et la limite de détection.

La sensibilité nécessaire pour l'analyse de la concentration physiologiquement active est d'environ 1 ng/l pour les hormones de type stéroïdes. La détermination de ces composés nécessite souvent des étapes d'extraction et de purifications qui peuvent s'avérer laborieuses. Durant de nombreuses années les essais immunologiques étaient plus sensibles que les autres méthodes analytiques pour l'analyse des composés stéroïdiens. C'est l'introduction du couplage de la spectrométrie de masse avec la chromatographie en phase gazeuse ou à haute performance qui a nettement augmenté la sensibilité des méthodes analytiques autres que immunologiques. [13]

Quelques molécules anti estrogène :

Le profil idéal d'une molécule de remplacement du tamoxifen doit posséder [21] :

Dans les essais précliniques :

- Une grande affinité avec l'ER
- Un ralentissement de la croissance des cancers du sein hormono-dépendants
- Une meilleure inhibition des xénografts hormono-dépendants en culture in vivo
- Une activité contre les tumeurs résistantes au tamoxifen
- Une capacité à retarder l'apparition de cancers résistants aux anti-œstrogènes
- Une réduction des effets agonistes dans les essais utéro-trophiques
- Un effet antagoniste à la stimulation des cellules du cancer endométrial in vitro et in vivo
- La capacité à prévenir la perte osseuse dans les animaux ayant subi une ovariectomie

Dans les essais cliniques

- Une activité sur les cancers du sein hormono-dépendants au moins équivalente au tamoxifen
- Une activité contre les tumeurs résistantes au tamoxifen
- Moins d'effets secondaires que le tamoxifen
- Aucun effet d'épaississement de l'endomètre/ hyperplasie/ carcinogène
- Un effet de préservation de la densité osseuse
- Un effet de réduction du cholestérol dans le sérum

Quelques exemples de molécules anti-œstrogènes :

Le toremifén

La structure du toremifén est très semblable à celle du tamoxifen comme il est démontré dans la Figure 3. La seule différence structurale entre les deux molécules est l'atome de chlore présent en position 4 [21]. Le toremifén se lie également aux ER dans les cellules cibles. Son effet varie en fonction du tissu auquel il est appliqué. Typiquement, dans les seins

et dans l'endomètre, il inhibe la prolifération des cellules, alors que dans le foie, il stimule la synthèse des protéines comme la SHBG. Dans le système nerveux central, le toremifène inhibe la sécrétion de prolactine.

Toremifène

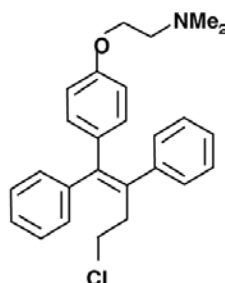


Figure 6 : structure chimique du toremifène [21]

À petite dose (1-3 mg/kg), on suppose que l'activité antitumorale du toremifène est due à son activité anti-oestrogénique lorsqu'il se lie à l'ER. En revanche, à haute dose (100-200 mg/kg) le toremifène exerce une action oncolytique directe. Les phases cliniques de traitement du cancer du sein chez des patientes postménopausées ont démontré une réponse de 68%. [23]

Les études statistiques ont prouvé une équivalence au niveau de l'efficacité entre le tamoxifène et le toremifène. Aucune différence au niveau de leur toxicité respective n'a été démontrée. Au niveau de la qualité de vie, le toremifène présente un profil similaire au tamoxifène [22]. Il provoque néanmoins moins de douleurs abdominales, de bouffées de chaleur, de douleurs crâniennes, de somnolence, de dysfonctionnement cardiaque ou de pertes vaginales. En revanche, plus de patients ont souffert de saignements vaginaux, de thromboses, de douleurs générales, de fragilisation osseuse et de transpiration excessive [23]. Le nombre de réapparitions de cancers après traitement sont équivalents avec les deux molécules. [24]

Le droloxifène

La structure du droloxifène est une base de tamoxifène, avec l'ajout d'une fonction alcoolique en méta sur le phényle en 1 sur la chaîne de carbone en transe par rapport au phényle en position 2 sur la chaîne de carbone. [24]

Droloxifène

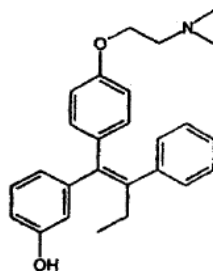


Figure 7: structure chimique du droloxifen [24]

Le droloxifen possède une affinité 10 fois supérieure avec l'ER que le tamoxifen. Son temps de demi-vie est également plus court. [21]. Des études menées sur 154 femmes provenant de 35 pays ont démontré que le droloxifen possède une activité anticancer inférieure à celle du tamoxifen, particulièrement sur les femmes âgées de moins de 65 ans. Ces raisons ont conduit à l'arrêt des tests cliniques concernant le droloxifen. [25] [24]

L' idoxifen

Comme le montre la Figure 4, la structure de l'idoxifen est relativement similaire à celle du tamoxifen. Les uniques différences résident en un atome d'iode positionné en para du phényle en position 1 de la chaîne carbone, ainsi qu'en une cyclisation de 4 carbones à la place du méthyle positionné sur l'atome d'azote qui est en aval de l'oxygène en position para de l'autre phényle sur le carbone 1 de la chaîne.[26]

Idoxifen

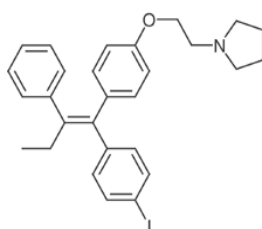


Figure 8 : structure chimique de l'idoxifen [26]

L'idoxifen est plus stable que le tamoxifen dans le métabolisme. Son affinité avec l'ER est accrue par l'atome d'iode. [21]. On estime que son affinité avec l'ER est 100 fois supérieure à celle du tamoxifen [26]. Concernant les effets secondaires de l'idoxifen, des études ont révélé que cette molécule, en comparaison avec le tamoxifen, provoque moins d'embolies pulmonaires, de gangrènes périphériques, d'infarctus du myocarde, de désordres gastro-intestinaux, d'insuffisances respiratoires, d'hypothyroïdisme et de pertes partielles d'audition. En revanche, on reporte plus de cas de douleurs squelettiques, de désordres utérins, d'insuffisances hépatiques, d'effusions pleurales, d'œdèmes faciaux, de réactions allergiques, d'ulcères de l'estomac et de vomissements avec l'idoxifen qu'avec le tamoxifen [27]. Deux études internationales de phase III ont démontré que l'idoxifen ne présente

aucune amélioration d'efficacité ou de sécurité par rapport au tamoxifen. Son développement a donc été stoppé en 2001. [21] [24]

Le fluvestrant

Une multitude d'autres molécules à activité anticancérogène existent, telles que le raloxifen, le TAT-59, le GW5638, l'aroxifen, acolbifen, ou encore le ERA-923.

Malheureusement aucune d'entre elles n'a surpassé le tamoxifen. La seule molécule en cours de développement qui possède selon les premiers essais la possibilité de surpasser le tamoxifène est le fluvestrant [21]. D'autres essais de comparaison entre le tamoxifen et le fluvestrant ont démontré qu'au final les deux produits ont une efficacité et une tolérance équivalentes au niveau des cancers hormono-dépendants [28].

Un léger avantage est accordé au fluvestrant : il semblerait qu'il permette de traiter les cancers résistant au tamoxifen [29]. La structure du fluvestrant, n'est pas similaire au tamoxifen. Il possède une structure de stéroïdes avec un ajout d'une chaîne de carbone contenant du soufre, du fluor, et de l'oxygène, sur le deuxième cycle benzénique de la structure, comme illustré dans la Figure 6. [21]

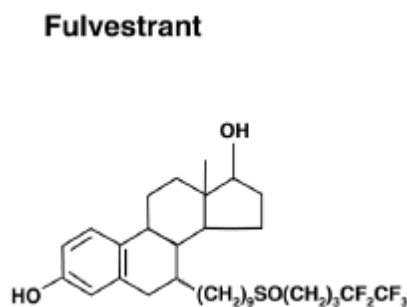


Figure 9: structure chimique du fluvestrant [21]