

ANNÉE 2017

N° 51.....

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Mr Hugo ROLLAND

Présentée et soutenue publiquement le 16 Octobre 2017

**Le microbiote intestinal : son implication dans le métabolisme des
œstrogènes et ses conséquences sur le cancer du sein chez la
femme**

Président : **Mr Jean-Marie BARD**, Professeur de Biochimie Générale et Clinique

Membres du jury : **Mme Christine BOBIN-DUBIGEON**, Maître de Conférences de pharmacologie
Mme Françoise LE VACON, Docteur en Biologie

« On a souvent besoin d'un plus petit que soi »

Jean de la fontaine

REMERCIEMENTS

A Monsieur Jean-Marie BARD, professeur à la faculté de pharmacie de Nantes, pour avoir accepté de présider cette thèse.

A Madame Christine BOBIN-DUBIGEON, docteur en pharmacie et directrice de thèse, de m'avoir suivi et conseillé dans la réalisation de ce travail.

A Madame Françoise LE VACON, docteur en Biologie, pour m'avoir fait le plaisir de se libérer pour la soutenance de cette thèse.

A toute ma famille, pour leurs encouragements et leurs soutiens ; vous êtes ma source de motivation.

A mes amis Pharma de Nantes, pour m'avoir permis sans aucun doute de passer les meilleures années de ma vie d'étudiant.

A mes « Kikis » de Montpellier, pour cette parenthèse de vie humoristique.

INTRODUCTION

Le tube digestif forme un écosystème extrêmement complexe où les trois principaux acteurs : le microbiote, les nutriments et les cellules de l'hôte sont en contact permanent et interagissent.

Depuis la naissance de la microbiologie à la fin du XIX^{ème} siècle, les modes de pensées de cette discipline ont constamment évolué. En effet, pendant de nombreuses années la relation microbiote-hôte a été principalement étudiée sous l'angle de la pathogénicité à tort. Le microbiote intestinal représente une biomasse considérable possédant de nombreuses fonctions physiologiques indispensables pour l'hôte; jusqu'à être aujourd'hui considéré comme un « organe caché ». Cependant, malgré l'évolution des concepts microbiologiques, la composition du microbiote intestinal restait encore très imprécise. C'est à partir des années 2000 que l'on note des progrès majeurs dans l'investigation de la constitution du microbiote intestinal grâce aux avancées technologiques en biologie moléculaire et bio-informatique, notamment mis en avant lors de grands projets scientifiques (Projet MetaHIT).

Ces nombreux progrès ont conduit à faire évoluer certains concepts et notamment à considérer une nouvelle approche dans l'étude de certaines maladies intestinales et extra-intestinales en s'intéressant de plus près à l'influence positive ou négative du microbiote intestinal. Les domaines de la gastroentérologie en premier lieu (maladies inflammatoires de l'intestin) ainsi que d'autres domaines (allergies, obésité...) n'échappent donc pas à cette nouvelle approche. C'est donc tout naturellement que certains scientifiques ont axé leurs recherches sur la relation entre le microbiote intestinal et le cancer du sein, premier cas de mortalité de cancer chez la femme dans le monde.

L'objectif principal de cette thèse est d'exposer les connaissances scientifiques fondamentales concernant le microbiote intestinal et du cancer du sein, permettant notamment de mettre en avant le rôle essentiel du microbiote pour son hôte, et les enjeux de santé publique concernant ce cancer. Les résultats d'études scientifiques présentant une potentielle relation de cause à effet entre le microbiote intestinal et le cancer du sein par la métabolisation des œstrogènes seront discutés, ainsi que les perspectives de prévention du cancer du sein en lien avec le microbiote intestinal.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
INTRODUCTION	4
I. Le microbiote intestinal : un organe à part entière	7
1.1 Définition	7
1.2 Développement du microbiote intestinal	9
1.3 Composition du microbiote intestinal.....	11
1.3.1 Généralités	11
1.3.2 Arbre phylogénétique du microbiote intestinal	11
1.3.3 Le projet MetaHIT	13
1.3.4 Composition du microbiote intestinal	14
1.3.5 Répartition du microbiote intestinal de l'adulte sain.....	15
1.3.5.1 Estomac	17
1.3.5.2 Intestin grêle	17
1.3.5.3 Côlon.....	17
1.4 Modulation du microbiote intestinal chez le sujet sain	18
1.4.1 L'âge	18
1.4.2 L'alimentation.....	21
1.4.3 Les antibiotiques	22
1.5 Rôle du microbiote intestinal sur son hôte	24
1.5.1 Fonctions structurelles	24
1.5.2 Fonctions métaboliques	24
1.5.2.1 Fermentation.....	25
1.5.2.2 Transformation.....	27
1.5.2.3 Synthèse	27
1.5.3 Fonctions immunitaires.....	28
1.6 Techniques d'analyse du microbiote intestinal.....	29
1.6.1 Généralités	29
1.6.2 Technique par recherche de composés caractéristiques du microbiote intestinal	32
1.6.3 Technique basée sur la culture de bactéries.....	32
1.6.4 Techniques moléculaires.....	33
1.6.4.1 Séquençage du gène codant pour l'ARNr16S.....	33
1.6.4.2 Séquençage à haut débit.....	35
II. Le cancer du sein	37
2.1 Notions générales sur le cancer du sein.....	37

2.1.1	Epidémiologie du cancer du sein.....	37
2.1.2	Anatomie du sein	42
2.1.3	Classifications et stades cliniques des cancers du sein	45
2.1.3.1	Classifications du cancer du sein.....	45
2.1.3.2	Stades cliniques du cancer du sein	49
2.2	Dépistage et diagnostic du cancer du sein.....	50
2.2.1	Examen clinique	51
2.2.2	Mammographie.....	51
2.3	Le cancer du sein : une maladie multifactorielle	52
2.3.1	Age.....	53
2.3.2	Antécédents personnels et familiaux.....	53
2.3.2.1	Antécédents personnels.....	53
2.3.2.2	Antécédents familiaux.....	54
2.3.3	Style de vie	54
2.4	Exposition aux œstrogènes et conséquences sur le cancer du sein chez la femme.....	56
2.4.1	Généralités	56
2.4.2	Impact des œstrogènes sur le cancer du sein	57
2.4.2.1	Mécanisme d'action	57
2.4.2.2	Association des œstrogènes et du cancer du sein en période de pré et post-ménopause.....	59
2.4.3	Mécanisme de conjugaison des œstrogènes	62
III.	Microbiote intestinal, œstrogènes et cancer du sein	66
3.1	Généralités	66
3.2	Métabolisme des œstrogènes par le microbiote intestinal	66
3.3	Les habitudes alimentaires responsables de la modulation de l'activité de β -glucuronidase	76
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	79
	BIBLIOGRAPHIE.....	82
	ABREVIATIONS.....	91

I. Le microbiote intestinal : un organe à part entière

1.1 Définition

Le microbiote appelé auparavant flore microbienne, désigne l'ensemble des communautés de micro-organismes (bactéries, archées, champignons, virus) commensaux (non pathogènes) résidant dans un environnement spécifique (Figure 1). Il existe chez l'être humain de nombreux microbiotes situés à différents niveaux (cutané, vaginal, intestinal...).

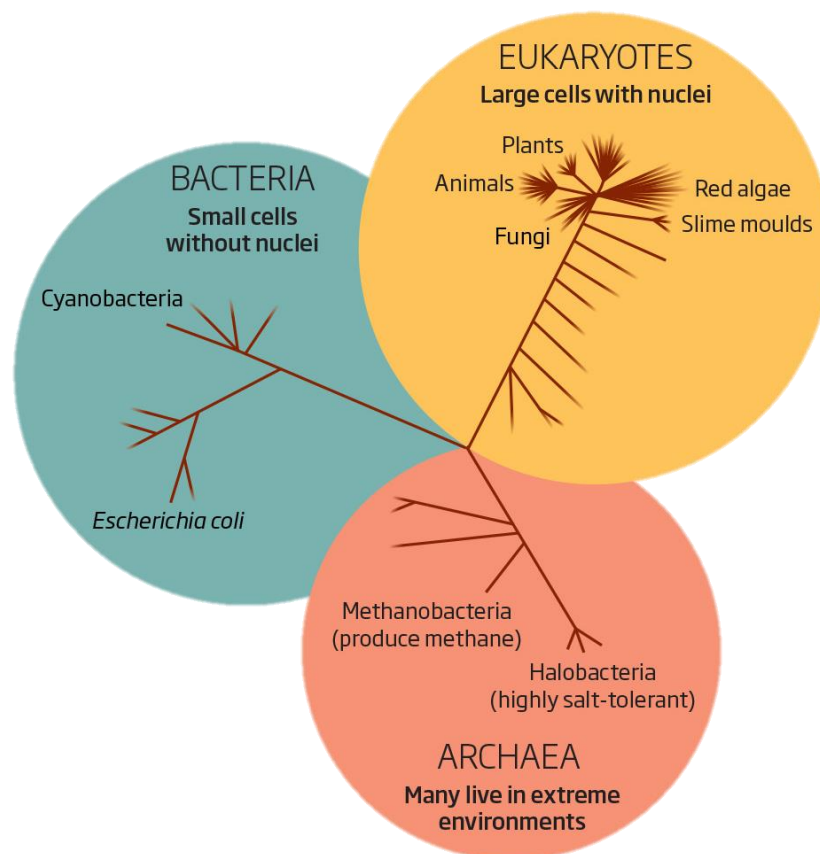


Figure 1. Les trois domaines du monde vivant : bactéries, eucaryotes et procaryotes (1)

Le microbiote intestinal quant à lui, réside dans le tractus digestif humain, c'est-à-dire de la bouche à l'anus, dont une forte proportion se situe dans l'intestin et le côlon (2) (Figure 2).

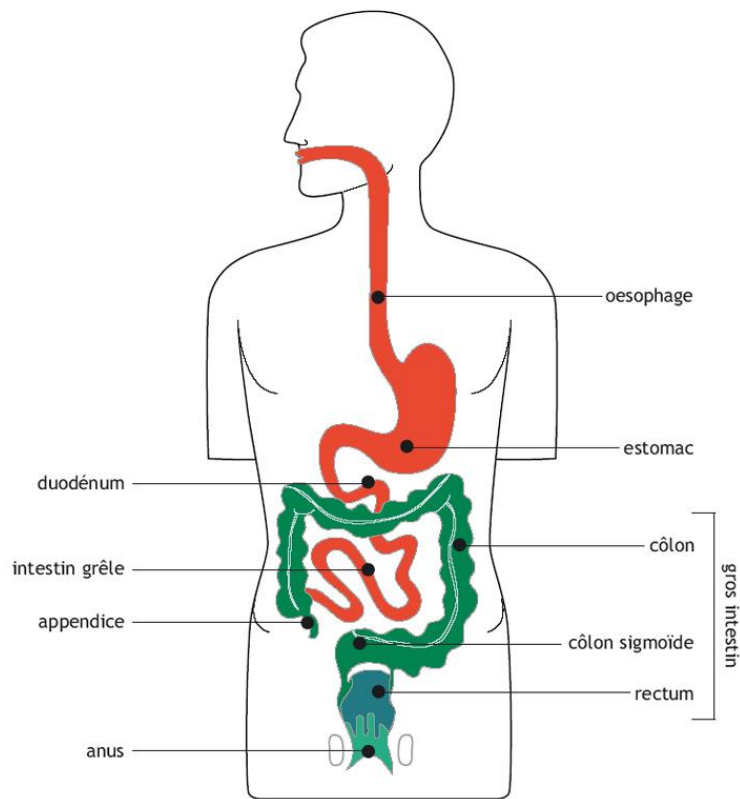


Figure 2. Schéma du tube digestif humain (3)

Les micro-organismes qui le composent sont extrêmement nombreux. En effet un individu héberge environ 10^{14} bactéries (100 000 milliards) soit plus de dix fois le nombre de cellules humaines présentes dans notre organisme. Son génome est 100 fois supérieur à celui de l'Homme et ses capacités métaboliques égalent celles d'un organe à part entière.

Auparavant, la biodiversité des micro-organismes intestinaux a été longuement explorée et décrite pour son rôle délétère sur l'organisme humain car le tube digestif est aussi responsable de l'hébergement de nombreux pathogènes. Son impact sur la santé et le bien-être de l'Homme est maintenant bien reconnu : contribution à la maturation du système immunitaire, barrière directe contre certains agents pathogènes, implication possible dans de nombreuses maladies (allergies, maladies inflammatoires de l'intestin, troubles dégénératifs...) (2).

Cet écosystème fait depuis plusieurs dizaines d'années l'objet de nombreuses recherches scientifiques, dont les découvertes sur ses potentiels bénéfices thérapeutiques sont très encourageantes.

1.2 Développement du microbiote intestinal

Le fœtus des mammifères et par extension celui de l'Homme, se développe *in utero*. L'environnement stérile dans lequel le fœtus évolue est aujourd'hui remis en cause par la découverte de bactéries dans le liquide amniotique, le méconium et le cordon ombilical (4). Cependant, on considère que le processus de colonisation des muqueuses (digestive, urogénitale, bucco-nasale, cutanée, respiratoire...) se met en place à partir de la naissance (5).

Le tube digestif est tout d'abord colonisé au contact de la flore vaginale ou fécale de la mère, respectivement lors d'un accouchement par voie basse ou au contact des micro-organismes présents dans l'environnement lors d'un accouchement par césarienne. La constitution du microbiote intestinal se poursuit ensuite progressivement, laissant d'abord la place aux bactéries intestinales aérobie-anaérobie facultatives (entérobactéries et principalement l'espèce *Escherichia coli*, les entérocoques, les staphylocoques...) nécessitant de l'oxygène pour se multiplier. Par la suite, en consommant l'oxygène présent dans l'intestin, les premières bactéries du microbiote intestinal vont favoriser l'implantation de bactéries dîtes anaérobies strictes proliférant en absence de gaz (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*...) ainsi que des lactobacilles et des microaérophiles (6) (Figure 3).

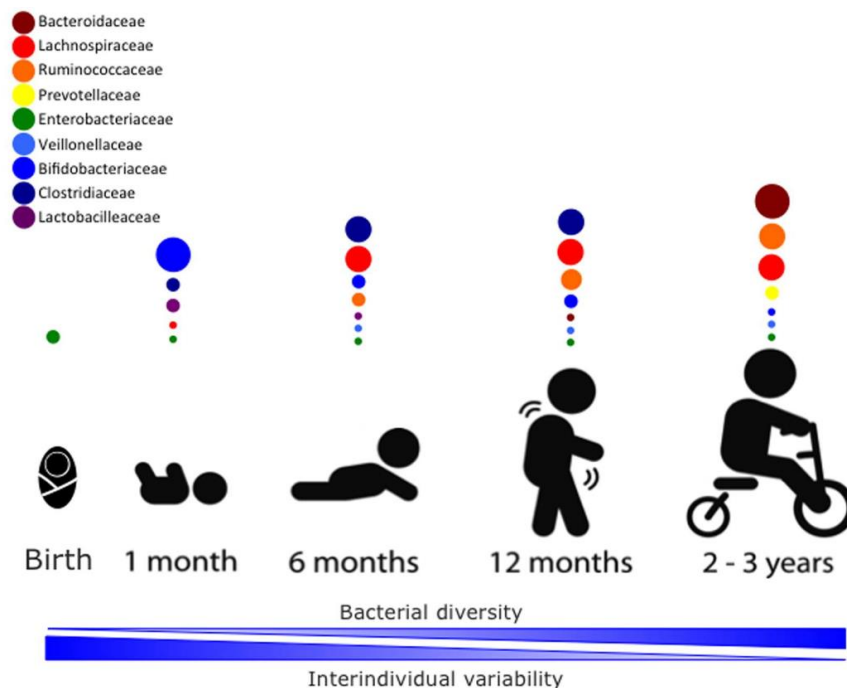


Figure 3. Les différentes étapes de la colonisation microbienne intestinale du nourrisson et de l'enfant

(7)

En l'absence de mécanisme immunologique sophistiqué comme chez l'adulte, le tractus digestif du nouveau-né est un environnement particulièrement permissif où les concentrations de bactéries dans les selles vont atteindre rapidement 10^{11} bactéries par gramme. Par la suite, le microbiote est continuellement exposé à de nouvelles bactéries provenant de l'environnement extérieur notamment par l'allaitement au sein de la mère, l'alimentation, les contacts divers avec les humains permettant au système immunitaire du nourrisson de se développer. La composition du microbiote intestinal évolue pendant les premières années de la vie pour devenir stable entre 2 et 4 ans.

Les proportions des bactéries constituant le microbiote intestinal de l'enfant diffèrent de celles de l'adulte jusqu'aux 2 ans et se stabilisent qualitativement et quantitativement par la suite jusqu'aux 4 ans (5). Le genre bactérien *Bifidobacterium* est ainsi le plus représenté suivi du genre *Bacteroides*, les groupes *C. coccoides* et *C. leptum* sont quant à eux proportionnellement moins représentés que chez l'adulte (Figure 4).

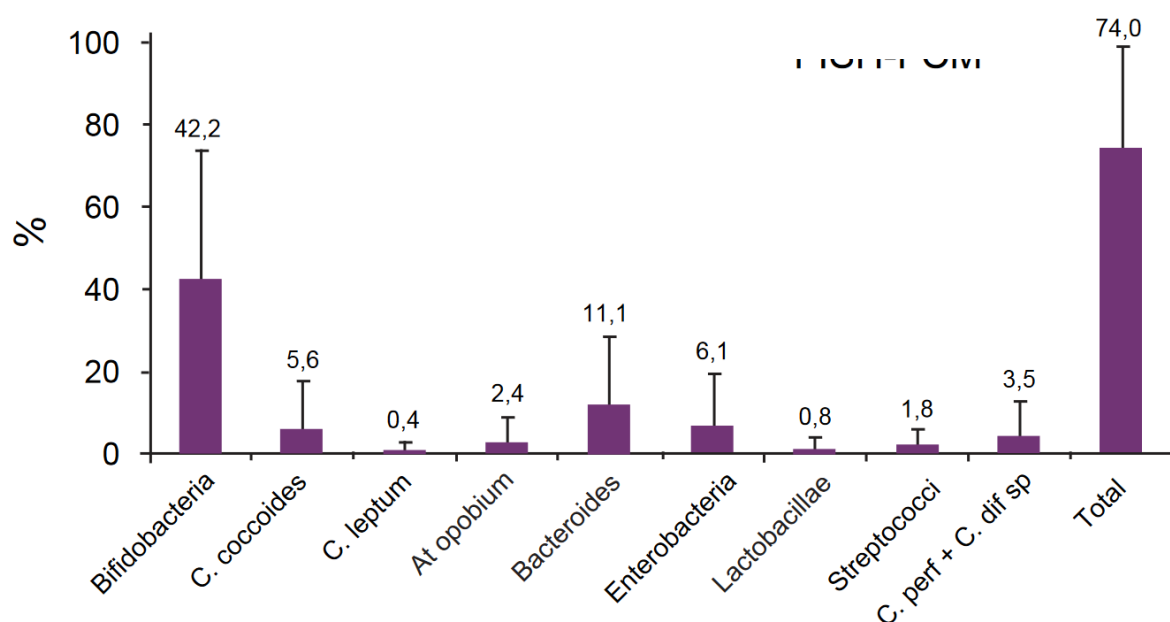


Figure 4. Composition du microbiote intestinal fécal d'enfants européens âgés de 6 semaines (8)

1.3 Composition du microbiote intestinal

1.3.1 Généralités

Le microbiote intestinal est un écosystème extrêmement complexe recouvrant près de 200 espèces bactériennes et pouvant atteindre un poids de deux kilogrammes chez un individu. Plus de 99% des micro-organismes sont d'origine bactérienne, le reste étant principalement des archées ce qui témoigne de la forte représentation des bactéries dans le tractus digestif (9).

Chaque individu possède son propre microbiote intestinal qui est donc unique sur le plan qualitatif et quantitatif. Cette spécificité d'hôte se confirme lorsque pour un échantillon de 10 individus différents, on ne retrouve en moyenne qu'une seule espèce bactérienne commune à tous les individus (10).

Cependant, malgré la grande spécificité du microbiote à l'échelle de l'individu, des similitudes sont observées si l'on considère la diversité au niveau des groupes bactériens ou *phyla*. Pour cela, une classification scientifique des espèces bactériennes présentes dans notre tractus digestif est nécessaire.

1.3.2 Arbre phylogénétique du microbiote intestinal

Il existe une classification scientifique des espèces comportant plusieurs niveaux. Le domaine est le premier niveau de la classification. Vient ensuite le règne, le *phylum* ou l'embranchement, la classe, l'ordre, la famille, le genre et l'espèce (Figure 5).

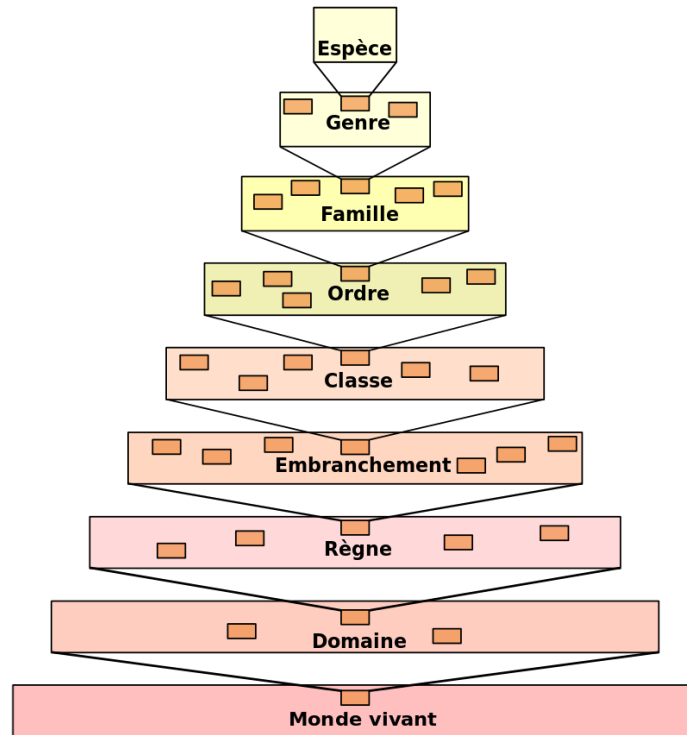


Figure 5. Classification traditionnelle ou classique du monde vivant (11)

A partir du XXI^{ème} siècle, de nouvelles techniques d'analyse ont permis d'approfondir nos connaissances sur la composition du microbiote intestinal en améliorant l'identification des espèces bactériennes.

En effet, une grande majorité des micro-organismes qui composent le microbiote intestinal n'avait pas encore été caractérisée. Après le premier séquençage complet de génome bactérien en 1995, un effort considérable de séquençage à large échelle du microbiote intestinal a été réalisé à travers plusieurs projets internationaux pour combler ces lacunes :

- **Human Microbiome Project** du National Institute of Health (NIH) lancé en 2008 aux Etats-Unis
- **MetaHIT** (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) de la communauté européenne avec un coût estimé à 20 millions d'euros
- **Microobese/MetaGut**, projet franco-chinois
- **Human Microbiome Initiative** au Canada

1.3.3 Le projet MetaHIT (9)

Le projet MetaHIT lancé en 2008 et coordonné par l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), a eu pour objectif d'identifier l'ensemble des génomes microbiens intestinaux (métagénome) par séquençage haut débit Illumina®. Il a permis de décrire les interactions reliant le métagénome et la santé, notamment avec l'obésité et certaines maladies inflammatoires. Ce projet est fondé sur l'analyse d'échantillons de selles recueillies auprès de 124 personnes et a permis d'identifier un total de 3,3 millions de gènes différents. Cet ensemble de gènes provient d'environ 1000 espèces bactériennes représentant la grande majorité des espèces de l'intestin humain.

Le principal défi de ce projet était de créer un catalogue rassemblant de petites séquences d'ADN pour obtenir une séquence continue d'une longueur au moins égale à celle d'un gène bactérien classique, soit approximativement 1000 bases.

Il a été établi que chacun des 124 sujets de la cohorte abritait en moyenne 540 000 gènes microbiens non redondants. Les 3,3 millions de gènes identifiés sont donc largement partagés. En effet lors de la comparaison des gènes présents chez les différents individus de l'étude, il a été montré que 40% des gènes portés par un individu donné, sont partagés avec au moins la moitié des individus de la cohorte. Ces gènes sont couramment appelés des « gènes communs ».

Les différents gènes du catalogue ont été classés en 19 000 clusters fonctionnels, environ 6000 d'entre eux ont été retrouvés chez tous les individus et représenteraient d'après les auteurs le « métagénome minimal » et qui selon eux seraient nécessaires au bon fonctionnement de l'écosystème intestinal.

Le projet a ouvert de nombreuses perspectives grâce à la découverte de nombreux gènes encore inconnus et par conséquent de potentielles fonctions bactériennes d'intérêt biologique.

1.3.4 Composition du microbiote intestinal (12)

Grâce aux nombreux projets cités précédemment, l'analyse de la composition du microbiote intestinal a permis de révéler la prédominance de 3 grands types de *phyla* bactériens formant le microbiote dominant : *Firmicutes*, *Bacteroidetes* et *Actinobacteria*.

➤ **Le phylum des *Firmicutes*** est toujours fortement représenté, il comprend :

- Le groupe *Eubacterium rectale*-*Clostridium coccoïdes* le plus souvent représenté (14% à 31% des bactéries totales en moyenne suivant les études).

Ce groupe est composé d'espèces bactériennes appartenant aux genres *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*.

- Le groupe du *Clostridium leptum* comprenant des espèces comme *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* qui sont les plus représentés (16% à 22% des bactéries totales).

➤ **Le phylum des *Bacteroidetes*** :

- Les genres les plus représentés sont *Bacteroides*, *Prevotella* et *Porphyromonas*.
Ils sont toujours présents et représentent 9% à 42% des bactéries totales selon les études.

➤ **Le phylum *Actinobacteria*** est moins systématiquement représenté et comprend :

- Le genre *Bifidobacterium* (0,7% à 10%) et les bactéries du groupe *Collinsella*-*Atopobium* (0,3% à 3,7% en moyenne).

Un microbiote sous dominant est observé avec les entérobactéries (0,4% à 1%), les lactobacilles et streptocoques (2%) qui sont plus rarement observés.

On observe donc des similitudes importantes entre chaque individu au niveau des *phyla* et des grands groupes phylogénétiques, mais pour ce qu'il s'agit des espèces, nombreuses d'entre elles sont sujet-spécifique. Cela laisse penser que le microbiote d'un individu lui est propre, mais qu'il existe d'un point de vue fonctionnel une interchangeabilité entre les espèces. Les données récentes de métagénomique vont dans ce sens en montrant que les fonctions portées par les gènes du microbiote sont similaires d'un sujet à l'autre.

1.3.5 Répartition du microbiote intestinal de l'adulte sain

Le microbiote intestinal subit des variations quantitatives et qualitatives importantes tout au long du tube digestif (13,14):

- De manière longitudinale : la densité de population en micro-organismes entre la bouche et le côlon augmente de manière croissante.
- De manière transversale entre la lumière et la muqueuse intestinale. La couche de mucus qui recouvre l'intestin constitue une niche écologique ou un écosystème spécifique. Des études scientifiques ont montré que les communautés bactériennes peuplant cette niche étaient remarquablement stables dans le temps et similaires entre l'iléum et le rectum pour un individu donné. En revanche les communautés bactériennes dominantes au niveau du mucus sont différentes de celles qui sont retrouvées au niveau de la lumière de l'intestin.

A chaque niveau du tractus digestif, une flore différente est donc retrouvée, correspondant à des habitats différents ou des niches écologiques spécifiques. Il convient de noter que non seulement une variation importante de la répartition des espèces bactériennes est observée tout au long du tractus digestif (Figure 6) mais aussi au sein même d'un organe comme la bouche (Figure 7) avec des prédominances bactériennes distinctes selon les différentes localisations (salive, palais, gencive, gorge...).

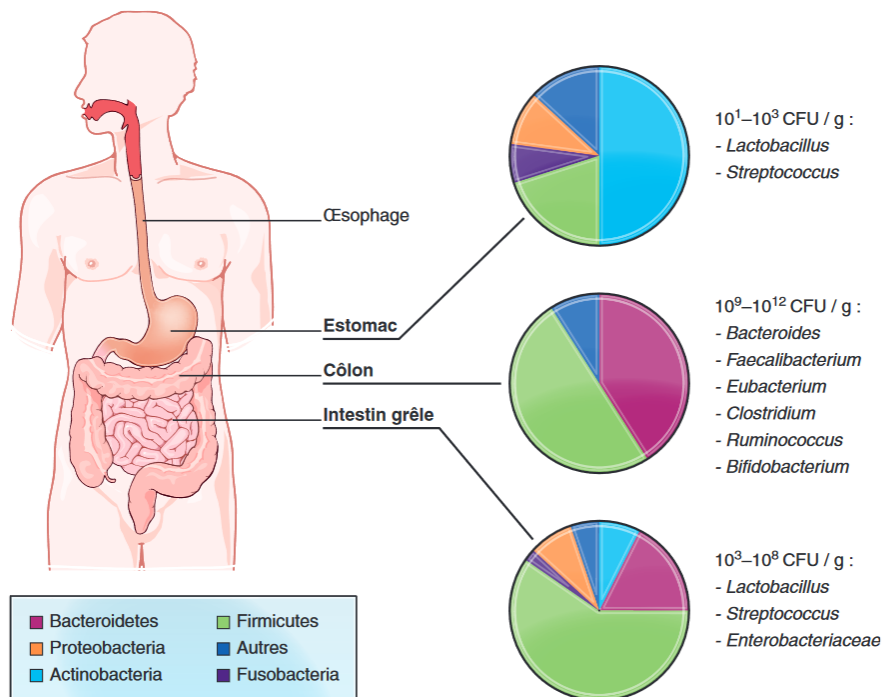


Figure 6. Présentation des différences de proportion des phyla du microbiote intestinal humain en fonction du type de niche (15)

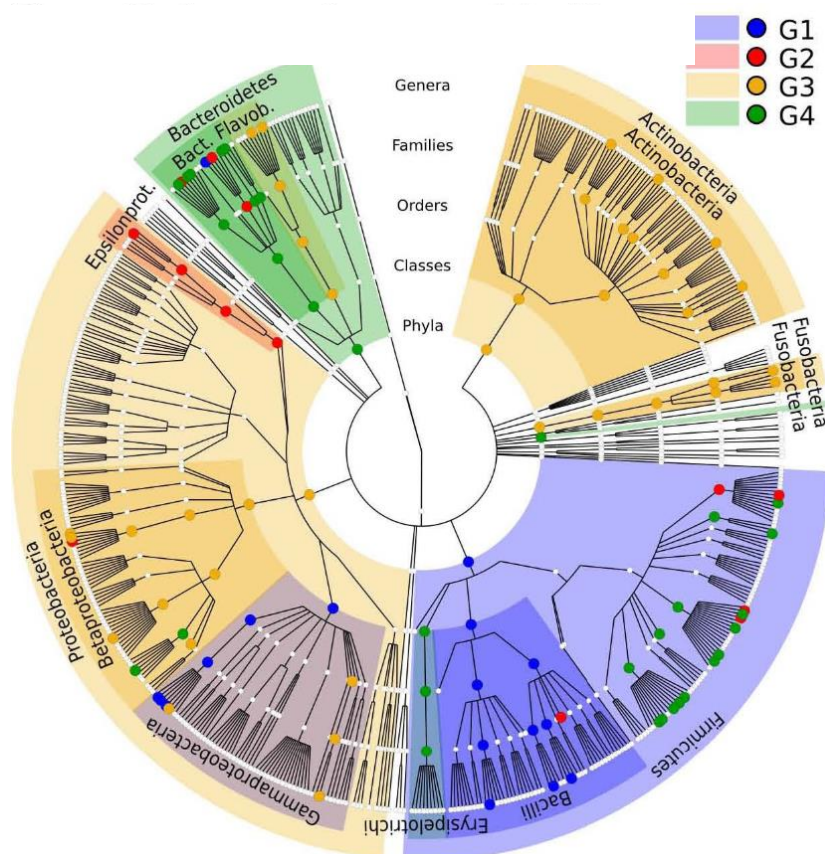


Figure 7. Cladogramme circulaire reportant les prédominances des phyla selon les muqueuses analysées. Groupe 1 : muqueuse buccale et du palais, Groupe 2 : muqueuse de la langue, de la gorge et de la salive, Groupe 3 : muqueuse des gencives, Groupe 4 : muqueuse fécale (16)

1.3.5.1 Estomac (13)

Au niveau de l'estomac, on retrouve peu de bactéries en raison de l'acidité (jusqu'à pH 2), du liquide gastrique et de l'activité motrice importante. Les principales bactéries sont les Lactobacilles et les Streptocoques à raison de 10^1 - 10^3 UFC (Unité Formant Colonie)/g.

1.3.5.2 Intestin grêle (13)

Après le passage de l'estomac à pH acide, le pH redevient neutre, l'oxygène se raréfie et le nombre de bactéries va augmenter progressivement du duodénum à l'iléon. La flore reste cependant encore relativement pauvre en raison du péristaltisme et de l'abondance des sécrétions.

La flore du duodénum-jéjunum n'excède pas 10^3 - 10^6 UFC/g et est composée d'espèces aérobie-anaérobie facultatives (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*) appartenant à la flore de passage.

La flore iléale est plus importante atteignant 10^5 - 10^8 UFC/g composée d'une flore anaérobie stricte prédominante appartenant aux genres *Bacteroides* et *Clostridies* associée à une flore anaérobie facultative (*Streptococcus*, *Lactobacillus*).

1.3.5.3 Côlon

C'est au niveau du côlon que la population bactérienne est la plus dense car la stabilité des populations bactériennes y est plus importante avec 10^8 - 10^{12} UFC/g ; ainsi autour de 40% du poids sec des selles correspondent à des micro-organismes. Le transit est très fortement ralenti et est associé à un très bas potentiel d'oxydoréduction qui est à l'origine de la proportion dominante de bactéries de genres anaérobies stricts (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*) (13).

Au sein même du côlon, des travaux ont mis en évidence des différences entre la flore caecale et fécale. En effet, la population bactérienne augmente de plus de 100 fois entre ces deux portions du côlon avec une proportion dominante de bactéries de genres anaérobies stricts (17).

1.4 Modulation du microbiote intestinal chez le sujet sain

L'hôte et son microbiote intestinal entretiennent des relations étroites et interagissent de manière synergique. L'équilibre de l'écosystème bactérien intestinal peut cependant être perturbé, entraînant une modification plus ou moins durable du microbiote appelée dysbiose.

Ce déséquilibre est influencé par des facteurs génétiques et environnementaux et jouerait un rôle dans le déclenchement et la sévérité de certaines maladies. Un des enjeux majeurs des travaux de recherches sur le microbiote intestinal est d'essayer de comprendre au mieux l'influence de certains facteurs sur la prolifération et la stabilité du microbiote intestinal chez les sujets sains.

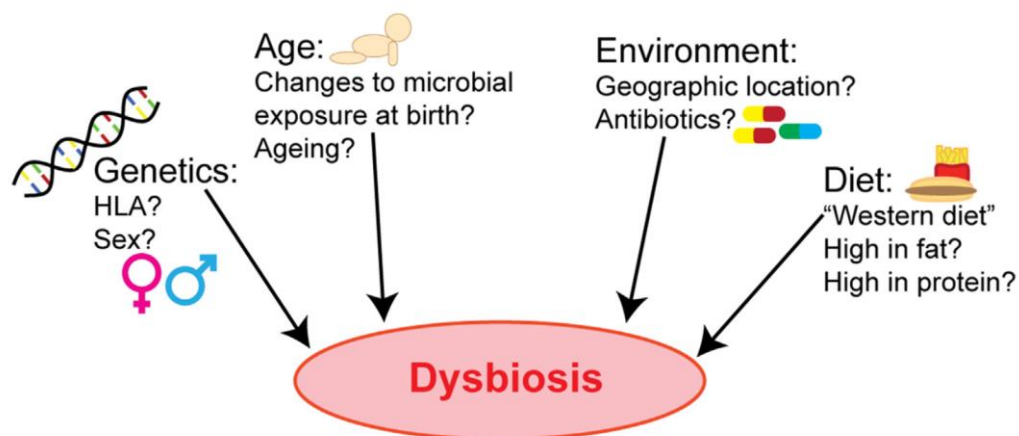


Figure 8. Causes probables de dysfonctionnement du microbiote intestinal appelé dysbiose

1.4.1 L'âge

➤ Naissance - jeune âge

Le microbiote intestinal du nouveau-né implanté rapidement après la naissance, constitue un élément de défense indispensable chez le jeune enfant. Différents facteurs, tels que le mode d'accouchement (voie basse, césarienne), l'environnement, le mode d'alimentation (lait maternel, biberon), le terme de naissance ou l'antibiothérapie *per partum* chez l'enfant influencent largement la qualité d'implantation de la flore intestinale (18).

Des études récentes ont démontrés que dans les pays industrialisés, en raison des conditions d'hygiène de plus en plus strictes lors de l'accouchement, l'implantation de certains genres bactériens anaérobies stricts principalement *Bifidobacterium* et *Bacteroides* est retardée. Cette période d'acquisition du microbiote semble très importante pour l'effet barrière protecteur vis-à-vis de certaines infections d'origine digestive ainsi que pour la maturation du système immunitaire et influence donc le risque de survenue de maladies ultérieures comme certaines allergies (6,19).

Une récente étude menée sur les selles de 10 enfants a été réalisée par séquençage haut débit (Roche/454©) (20). Les chercheurs ont analysé 34 échantillons fécaux provenant des mères et 46 échantillons de leurs enfants. L'étude a mis en évidence qu'il y existe une forte transmission de bactéries d'origine vaginale de la mère vers l'enfant lors d'un accouchement par voie basse comme le démontre la figure 9. Ainsi, un nombre important de lactobacilles est observé les premières heures après la naissance chez les enfants accouchés par voie basse, au contraire, chez les enfants accouchés par césarienne est observé une forte présence de bactéries d'origine cutanée comme des staphylocoques.

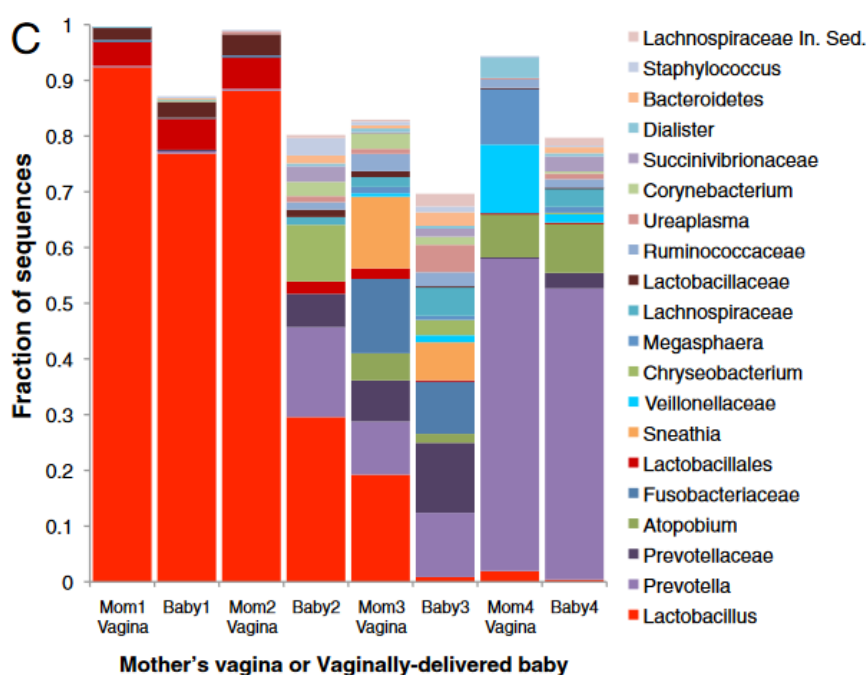


Figure 9. Comparaison de l'abondance relative des taxa des premières bactéries intestinales de nouveau-nés à celle des bactéries vaginales des mères (20).

➤ Personnes âgées

Au même titre que chez les enfants, il existe une forte variation des espèces bactériennes intestinales chez les personnes âgées comparé aux personnes adultes. Ces changements sont caractérisés majoritairement par une augmentation de *Bacteroidetes*, une diminution de *Firmicutes* (21) et de *Bifidobacterium* (22). De plus, il a même été démontré que les centenaires portaient en commun les mêmes modifications de proportion de certaines bactéries en comparaison aux microbiotes intestinaux de personnes adultes (23).

Le microbiote intestinal est un acteur clé participant aux fonctions physiologiques de l'hôte et évolue tout au long du cycle de la vie (Figure 10). Pendant les premières années de vie, le microbiote se diversifie et se complexifie. Cette transformation s'opère en parallèle avec le développement métabolique, immunologique et cognitif contribuant à l'équilibre des paramètres physiologiques ou homéostasie. Après cette phase de développement et de stabilité, on observe l'appauvrissement de la diversité du microbiote intestinal, très certainement lié à la progression de maladies et à la fragilité des personnes âgées (24).

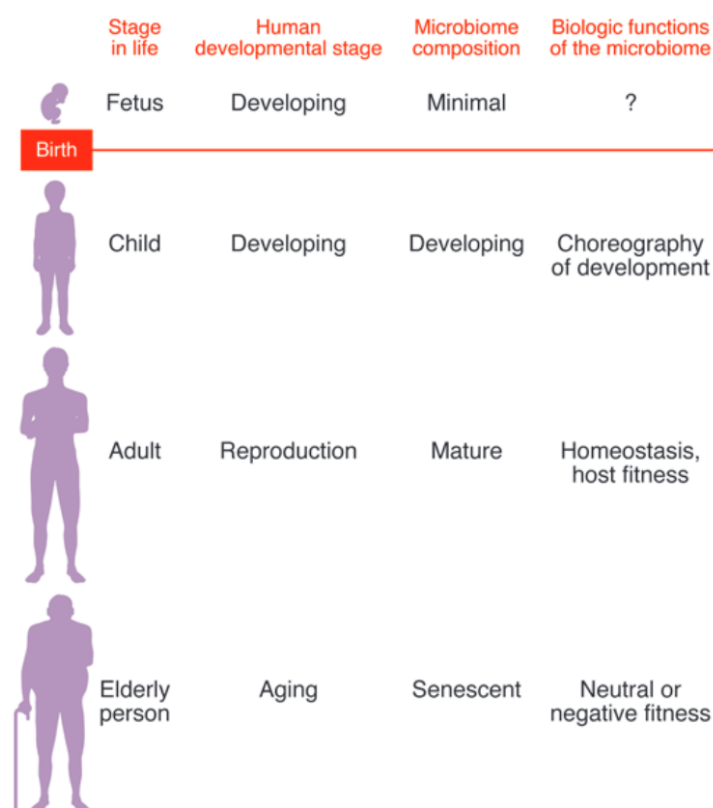


Figure 10. Synthèse des rôles biologiques majeurs du microbiote intestinal à travers les différentes étapes générationnelles (25)

1.4.2 L'alimentation

Le deuxième facteur influençant le microbiote intestinal chez l'enfant après le mode d'accouchement est l'alimentation, c'est-à-dire soit par le lait maternel ou industriel. Certaines études ont montré des différences de composition bactérienne chez des enfants alimentés par ces deux méthodes. En effet, le lait maternel n'apporte pas seulement que des nutriments essentiels mais aussi certains composés bioactifs (Human Milk Oligosaccharides ou HMO) non présents dans les laits industriels. Ces composés ont un rôle significatif dans la digestion et l'absorption des nutriments, la protection immunitaire et la défense antimicrobienne (26). Les HMOs favorisent de manière significative la croissance des bifidobactéries chez les enfants nourris au lait maternel comparé au lait industriel (27).

Par la suite, lorsque le microbiote intestinal devient mature et stable, le mode d'alimentation influence encore et toujours la composition, la diversité et la richesse de celui-ci. De manière générale, la prise d'aliments riches en fruits, végétaux et fibres est associée à une plus forte richesse et diversité du microbiote intestinal. Des études ont démontré que les microbiotes intestinaux diffèrent selon les variations géographiques des hôtes. Cela est expliqué par la différence d'habitudes alimentaires entre chaque communauté et pays comme le montre la figure 11. Ainsi, on observe chez des enfants consommant une alimentation occidentale riche en protéines animales, sucre, amidon et pauvre en fibres, des différences importantes dans la composition du microbiote en comparaison à des microbiotes intestinaux d'enfants d'Afrique, notamment par une abondance de *Bacteroides*.

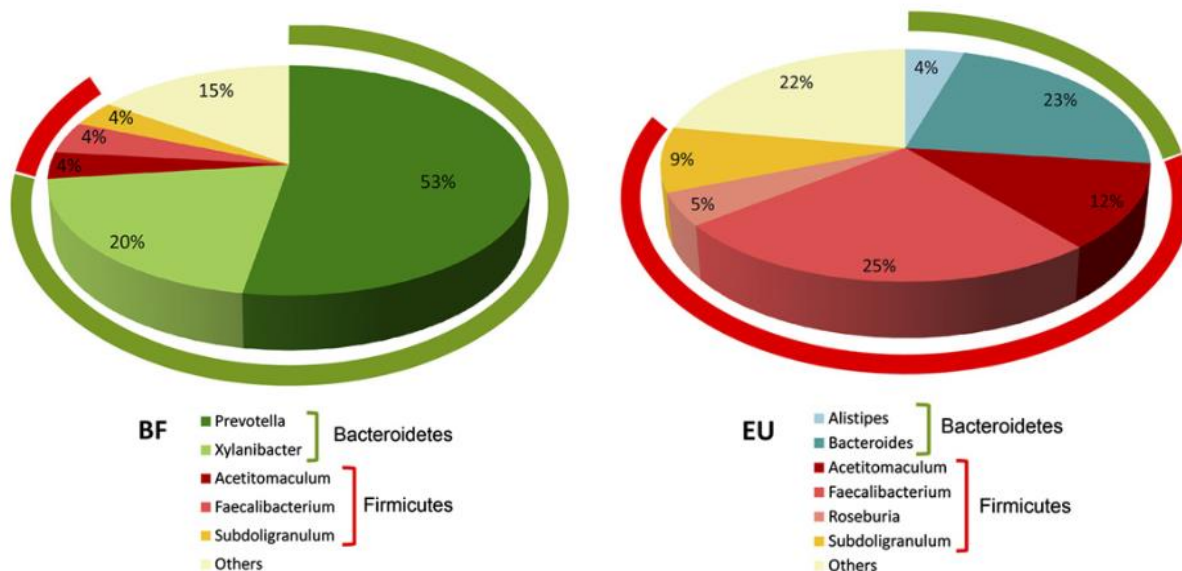


Figure 11. Différences de composition de microbiote intestinal entre des enfants d'Europe (EU) et d'Afrique (BF : Burkina Faso) (28)

Nous sommes déjà tous sensibilisés au fait que certaines mauvaises habitudes alimentaires prises sur une longue période peuvent avoir de réelles conséquences sur notre santé (obésité, risque cardiovasculaire, diabète de type 2...). Mais à travers les exemples cités précédemment, on saisit aussi l'influence considérable des habitudes alimentaires sur la composition du microbiote intestinal et par conséquent ses potentiels effets délétères sur notre santé.

1.4.3 Les antibiotiques

Les antibiotiques ont un effet indiscutablement positif à travers des traitements curatifs ou préventifs en protégeant les patients de maladies potentiellement mortelles. Cependant l'antibiothérapie déséquilibre l'écosystème bactérien intestinal.

Le déséquilibre peut se manifester par la rupture de l'effet barrière-protecteur du microbiote intestinal engendrant dans 5 à 20 % des cas selon les antibiotiques, des diarrhées post-antibiotiques au cours ou en fin de traitement (10).

Suite à ces perturbations, certaines bactéries comme *Clostridium difficile* vont coloniser la flore intestinale de barrière et engendrer la production de toxines se manifestant majoritairement par une colite pseudo-membraneuse.

Suite au diagnostic d'infection à *Clostridium difficile*, l'antibiothérapie responsable doit être évaluée, si possible arrêtée et un nouveau traitement antibiotique doit être mis en place. La principale complication du nouveau traitement est la rechute dans 20 à 25% des cas pouvant être prévenue par la prise de probiotiques notamment. Le plus souvent, l'équilibre rompu est rétabli peu de temps après l'arrêt de l'antibiothérapie, ce qui suggère que les bactéries de la flore de barrière ne sont que transitoirement éradiquées ou diminuées pendant le traitement (29).

De plus, les traitements antibiotiques favorisent l'implantation d'espèces et de souches résistantes aux antibiotiques (29,30). En effet, ces traitements altèrent la structure de la population microbienne intestinale en diminuant sa diversité de manière plus ou moins transitoire.

Comme le montre la figure 12, les changements de composition au sein de la communauté bactérienne intestinale entraînent :

- des modifications d'interactions entre espèces bactériennes. Les antibiotiques promeuvent les mécanismes d'acquisition de gènes de résistances par transfert d'information génétique parmi les bactéries en augmentant des phénomènes de conjugaison, de transduction et de transformation suite à l'activation d'une réponse des cellules au stress.
- une augmentation de l'espace de vie au sein de la communauté bactérienne intestinale laissant la place à la colonisation de bactéries portant des gènes de résistance aux antibiotiques qui, par conséquent, enrichissent la part de gènes résistants aux antibiotiques au sein du microbiome.

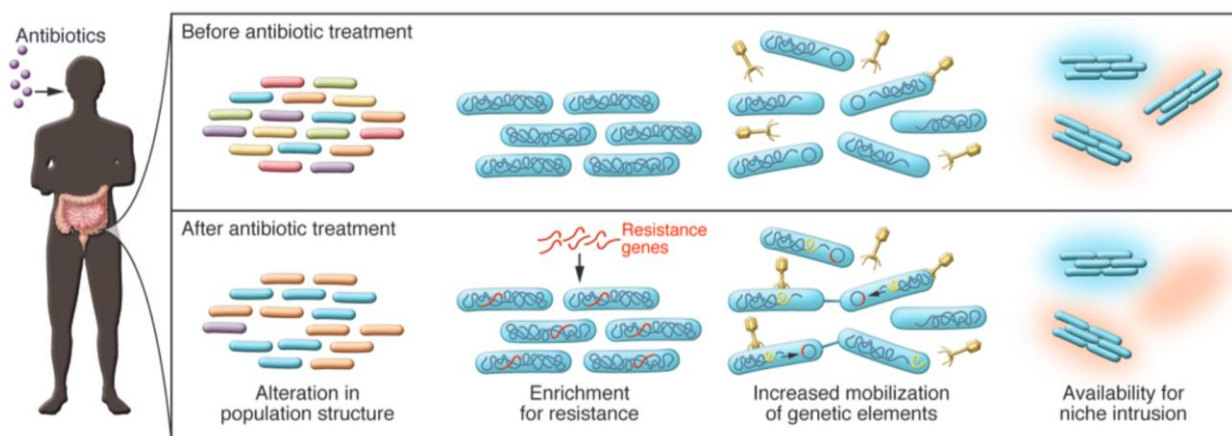


Figure 12. Effets des antibiotiques sur la communauté microbienne au sein du microbiote intestinal

Aujourd'hui, la résistance aux antibiotiques constitue l'une des plus graves menaces pesant sur la santé, la sécurité alimentaire et le développement mondial. La résistance aux antibiotiques menace l'efficacité de traitement antibiotique et peut nous diriger vers une ère où des infections courantes pourraient être à nouveau meurtrières.

L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a d'ailleurs adopté en mai 2015 un plan d'action mondiale pour combattre la résistance aux antimicrobiens (31).

1.5 Rôle du microbiote intestinal sur son hôte

1.5.1 Fonctions structurelles

Le microbiote intestinal joue un rôle de barrière protectrice contre les pathogènes ingérés, c'est-à-dire de résistance à la colonisation des bactéries exogènes qu'elles soient pathogènes ou non (32).

➤ **Effet barrière**

- Renforcement des jonctions serrées entre les cellules épithéliales intestinales.
- Induction de la sécrétion du mucus par les cellules épithéliales (caliciformes).

➤ **Effet protecteur**

- Sécrétion de métabolites antimicrobiens comme des acides ou des bactériocines.
- Compétition pour les nutriments entre les bactéries exogènes et commensales plus adaptées à l'écosystème intestinal.

1.5.2 Fonctions métaboliques

Parmi les fonctions majeures du microbiote intestinal, son influence sur le métabolisme de l'hôte est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. Ainsi, le microbiote est responsable de la fermentation des glucides et des protéines, de la transformation du cholestérol en acides biliaires ou bien de la synthèse de vitamines.

1.5.2.1 Fermentation

La fermentation est une fonction majeure du microbiote intestinal et a lieu physiologiquement dans le côlon. Les principales sources de carbone et d'énergie permettant la croissance et le maintien des fonctions cellulaires des bactéries du microbiote proviennent de :

- substrats d'origine exogène comme les glucides, les protéines et les lipides non digérés dans la partie supérieure du tractus digestif.
- substrats endogènes provenant de l'intestin grêle (enzymes pancréatiques, stérols biliaires, cellules épithéliales...) et de la paroi colique elle-même (mucopolysaccharides, mucines...).

Cette activité est aussi fondamentale car les métabolites formés sont, pour la plupart, absorbés et utilisés dans l'organisme.

➤ **Métabolisme des glucides (15,32,33)**

Les fibres et substrats glucidiques complexes sont transformés par des bactéries hydrolytiques à l'aide d'enzymes (polysaccharidases, glycosidases) en petits fragments (oses ou sucres simples, oligoses) assimilables par les bactéries.

La fermentation de ces derniers conduit à la production d'acides gras à chaîne courte (principalement acétate, propionate et butyrate) et de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone, méthane produit à partir d' H_2) (Figure 13).

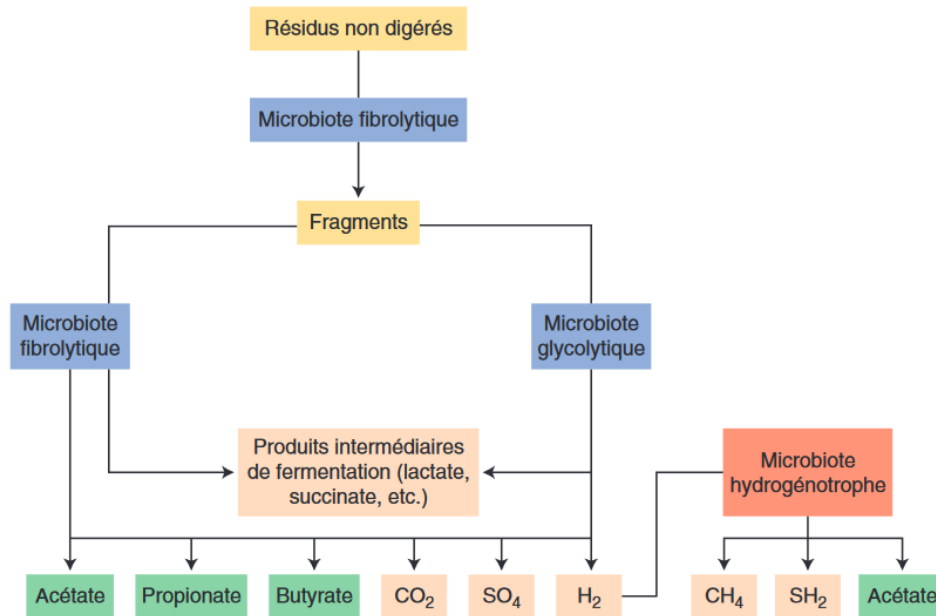


Figure 13. Fermentation des sucres par le microbiote colique (32)

Les acides gras à chaîne courte (AGCCs) ont des propriétés spécifiques ; par exemple, le butyrate a un effet trophique, antiprolifératif et immunomodulateur local. Le propionate est quant à lui absorbé par la muqueuse colique et module la production hépatique de cholestérol. Enfin, l'acétate est utilisé comme source d'énergie par de nombreux tissus (rein, cœur, muscles).

L'hydrogène, gaz produit majoritairement par la fermentation est utilisé *in situ* par des bactéries du microbiote colique appelées hydrogénotrophes pour former du méthane, de l'acétate ou des sulfures (Figure 13).

➤ Métabolisme des protéines (15)

La principale source d'énergie et d'azote chez les bactéries du microbiote intestinal est obtenue par hydrolyse des protéines grâce à des peptidases ou protéases en peptides et acides aminés.

Parmi les réactions chimiques nécessaires à la fermentation des acides aminés, la désamination est la plus utilisée par les bactéries du microbiote colique. Cette chaîne de réaction aboutit à la formation d'AGCCs (acétate, propionate, butyrate) dont certains effets ont été précédemment présentés, et à la formation d'ammoniac. L'ammoniac est la

principale source d'azote pour un très grand nombre d'espèces bactériennes dans le côlon qui l'utilisent pour la synthèse d'acides aminés et la production de protéines.

1.5.2.2 Transformation

➤ Acides biliaires (15)

Les acides biliaires sont des produits dérivés du cholestérol et conjugués dans le foie à diverses molécules hydrophiles ce qui a pour but d'augmenter leurs amphiphilies. Quarante-vingt-quinze pour cent des acides biliaires sécrétés dans la bile sont réabsorbés dans l'iléon terminal par des transporteurs actifs puis sont transportés dans le foie *via* le système porte pour y être à nouveau sécrétés dans la bile. Les cinq pour cent restant atteignent le côlon et sont déconjugués par les bactéries du microbiote colique en acides biliaires secondaires. Cette déconjugaison rend les acides biliaires plus hydrophobes et favorise donc leur réabsorption pour rejoindre à nouveau la circulation entéro-hépatique.

Les hormones stéroïdes et les xénobiotiques suivent les mêmes voies métaboliques : conjugaison hépatique, déconjugaison bactérienne et remise en circulation entéro-hépatique.

1.5.2.3 Synthèse (34)

La synthèse de vitamine K et de certaines vitamines B est aussi une fonction métabolique majeure du microbiote intestinal.

Certaines bactéries anaérobies facultatives dont *Escherichia coli* et *Enterobacter aerogenes* sont capables de synthétiser *in vitro* un large éventail de vitamines :

- Vitamine B8 ou biotine : importante pour la croissance cellulaire et pour le métabolisme des lipides, protéines et carbohydrates.
- Vitamine B2 ou riboflavine
- Vitamine B5 ou acide pantothénique
- Vitamine B6 ou pyridoxine
- Vitamine K : jouant un rôle essentiel dans la coagulation sanguine.

- Vitamine B12 : grande utilité pour la croissance locale bactérienne, certaines bactéries anaérobies strictes dont *Clostridium butyricum* et *Veillonella sp.* sont capables de la synthétiser.

1.5.3 Fonctions immunitaires

Le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans le développement et la maturation du système immunitaire et donc dans la mise en place de réponses protectrices cellulaires et humorales vis-à-vis des virus, des bactéries ou des parasites pathogènes.

La réponse humorale est assurée par la production d'immunoglobulines A (IgA) sécrétoires qui bloquent l'adhésion des bactéries pathogènes à la muqueuse, neutralisent les entérotoxines et empêchent la réplication virale dans l'entérocyte.

La réponse cellulaire repose sur les lymphocytes intra-épithéliaux qui permettent de maintenir l'intégrité de l'épithélium intestinal (35) (Figure 14).

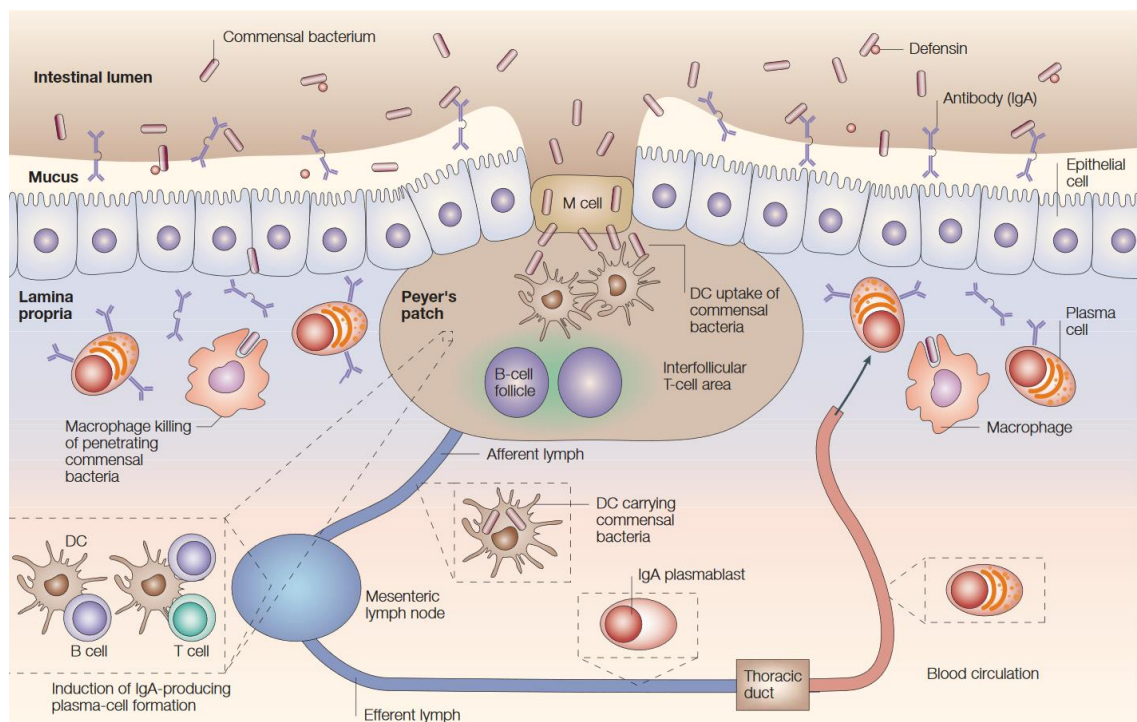


Figure 14. Défenses immunes mises en place contre les bactéries commensales intestinales (36)

Cette défense naturelle a d'ailleurs été mise en évidence grâce à l'observation de souris axéniques c'est-à-dire stériles et donc sans microbiote intestinal. Ces modèles ont permis de

mettre en évidence l'influence exercée par le microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte et en particulier sur le développement du système immunitaire (37).

Ainsi, des anomalies telles que l'hypoplasie des plaques de Peyer, la diminution du nombre de lymphocytes intra-épithéliaux, la faible production d'immunoglobulines sériques et cytokines présentes chez les souris axéniques ont disparu en quelques semaines après l'inoculation du microbiote intestinal de souris conventionnelles aux souris axéniques (15).

1.6 Techniques d'analyse du microbiote intestinal

1.6.1 Généralités

Depuis le début des recherches sur la composition du microbiote intestinal, les techniques visant à l'analyser ont été profondément améliorées pour atteindre aujourd'hui un niveau de précision très élevé jusqu'à l'espèce bactérienne sur l'ensemble du microbiote intestinal quel que soit sa provenance.

Grâce à ces nouvelles techniques mises au point, il est désormais possible de dépasser certaines limites d'investigation permettant de mieux comprendre l'interaction hôte-microbiote intestinal et mettre au service ces nouvelles connaissances scientifiques pour l'élaboration de comportements préventifs, voire curatifs.

Hormis ces avancées technologiques, l'attrait croissant des scientifiques ces dernières années pour le microbiote intestinal a quant à lui amené à considérer différemment cet écosystème. En effet, les premiers travaux de recherche sur le microbiote intestinal et jusqu'à ces dernières décennies étaient principalement basés sur l'analyse du microbiote intestinal à partir des échantillons fécaux des patients. Cependant, les résultats obtenus ne reflétaient pas ce qu'est réellement le microbiote intestinal : les bactéries les plus présentes dans le côlon sont le moins représentées dans l'estomac ou dans le duodénum. Malgré cela, les échantillons fécaux sont très utiles pour identifier la majorité des bactéries présentes dans le côlon, elles-mêmes prépondérantes dans le tube digestif (38).

De plus, par le passé, l'analyse quasi exclusive du microbiote intestinal basée sur la culture des bactéries ne permettait d'étudier qu'une faible proportion de la population bactérienne totale : environ 70% des bactéries qui composent le microbiote intestinal ne sont pas

cultivables par les méthodes classiques de culture bactérienne (12), ce qui se traduisait pas un profond manque de connaissances.

Par conséquent, pour répondre à l'accroissement des exigences scientifiques et grâce aux avancées technologiques, de nouvelles techniques ont vu le jour.

Nous verrons dans ce chapitre les techniques d'analyses les plus étudiées par le passé et celles qui sont une référence de nos jours (Tableau I).

Tableau I. Différentes techniques d'analyse du microbiote intestinal

	Recherche de composés caractéristiques du microbiote intestinal	Techniques culture-dépendante	Techniques culture-indépendante	Séquençage à haut débit
Description	Recherche de composés associés à la présence de microbes spécifiques permettant d'identifier les différences de composition dans la population microbienne chez différents groupes de sujets	Utilisation de milieu de culture spécifique au développement de certaines bactéries	Identification des bactéries à travers l'isolation et l'amplification de l'ADN bactérien comme celui de l'ARNr 16S	Approche basée sur le séquençage rapide utilisant l'ADN bactérien pour identifier la bactérie
Historique d'utilisation	Est utilisé aujourd'hui en majorité pour le screen de populations ou pour des études épidémiologiques	Historiquement la technique la plus utilisée pour identifier une bactérie présente dans différents environnements	Rendu populaire ces 2 dernières décennies par les avancées informatiques	Devient disponible commercialement au début des années 2000 et de plus en plus populaire jusqu'à nos jours
Avantages	Simple Economique Convenable pour un screen initial afin de tester une nouvelle hypothèse Utile pour une large population (études épidémiologiques)	Rapide Economique Peu d'équipements et de compétences requis Utile pour un screen initial avant des recherches plus détaillées	Relativement simple Relativement économique Résultats plus importants	Résultats très détaillées Profil bactérien provenant d'environnements complexes Informations phylogénétiques très poussées Relativement rapide
Inconvénients	Informations limitées Identification de l'espèce bactérienne impossible	Environ 70% de bactéries non cultivables Informations limitées	Biais de PCR Nécessite des équipements sophistiqués et une connaissance de leur maîtrise Peut nécessiter plusieurs méthodes en combinaison pour obtenir le résultat souhaité	Extrêmement cher Requiert des connaissances sur la préparation des échantillons, la gestion des machines et l'interprétation des résultats

1.6.2 Technique par recherche de composés caractéristiques du microbiote intestinal

Cette approche concerne l'étude des différences de composition ou la présence/absence de composés associés au microbiote ou MACs comme la dégradation de la mucine, la conversion du cholestérol en coprostanol, etc... (5). Les MACs les plus étudiées sont les AGCCs.

La comparaison des MACs a été un élément essentiel pour certaines études analysant la contribution du microbiome dans la prise d'antibiotiques ou de probiotiques chez les enfants versus groupe contrôle (39) ou pour identifier les différences au sein du microbiote intestinal chez les enfants atteints d'allergies versus groupe contrôle (40).

1.6.3 Technique basée sur la culture de bactéries

L'analyse de la flore bactérienne du microbiote intestinal est historiquement basée sur l'utilisation de techniques de culture avec l'isolement sur différents milieux sélectifs et non sélectifs, ainsi que l'identification des micro-organismes s'appuyant sur des caractères phénotypiques (morphologiques et biochimiques).



Figure 15. Colonies de *Salmonella sp.* isolées sur une boîte de pétri par milieu de culture sélectif (41)

Les approches reposant sur la culture de bactéries sont toujours employées dans certaines études, bien qu'elles soient le plus souvent combinées avec des techniques culture-indépendante comme l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) ou la cytométrie en flux (CMF) pour atteindre des résultats plus complets (5).

Malgré l'amélioration des méthodes de culture bactérienne, ces approches sont toujours inadaptées et insuffisantes pour caractériser le microbiote dans sa globalité surtout lorsque celui-ci est présent dans des environnements complexes comme le tube digestif humain.

1.6.4 Techniques moléculaires

Grâce à l'avènement de la biologie moléculaire, l'analyse du microbiote intestinal a considérablement évolué, permettant de l'étudier dans son intégralité.

La méthode génomique apparaît aujourd'hui comme l'approche la plus puissante pour caractériser un répertoire de gènes provenant de n'importe quel environnement microbien, indépendamment du fait que ces microbes puissent être cultivés ou non.

Afin de déterminer la composition du microbiote intestinal, plusieurs méthodes existent. Leurs principes consistent à déterminer, de manière directe ou indirecte, les séquences spécifiques de groupes ou d'espèces bactériennes (caractères phylogénétiques).

1.6.4.1 Séquençage du gène codant pour l'ARNr16S

Comme souligné précédemment avec l'étude MetaHIT, ces dernières années, les recherches sur la composition du microbiote intestinal ont évolué dans « l'aire métagénomique » avec un accroissement du nombre d'études employant des techniques basées sur le séquençage d'ADN, dû aux limites associées aux approches basées sur la culture des bactéries (9).

Le séquençage du gène de l'ARNr ribosomique 16S (ARNr16s) a l'avantage de fournir la séquence du gène lui-même et par conséquent des informations de valeur concernant l'identité des microbes. La molécule d'ARNr 16S est ubiquitaire, c'est-à-dire présente dans toutes les bactéries. Elle est présente en nombreux exemplaires dans chaque bactérie et est donc naturellement amplifiée.

Elle possède une structure primaire avec des régions conservées (communes à l'ensemble du domaine *Bacteria*), des régions variables (communes à un groupe bactérien) et des régions hypervariables (spécifiques d'une espèce) ce qui facilite la génération d'amplicons et la différenciation (Figure 16). L'ARNr16S a conservé une relation structure/fonction stable au cours de l'évolution et une taille suffisante permettant d'isoler facilement les bactéries grâce à leurs diversités.

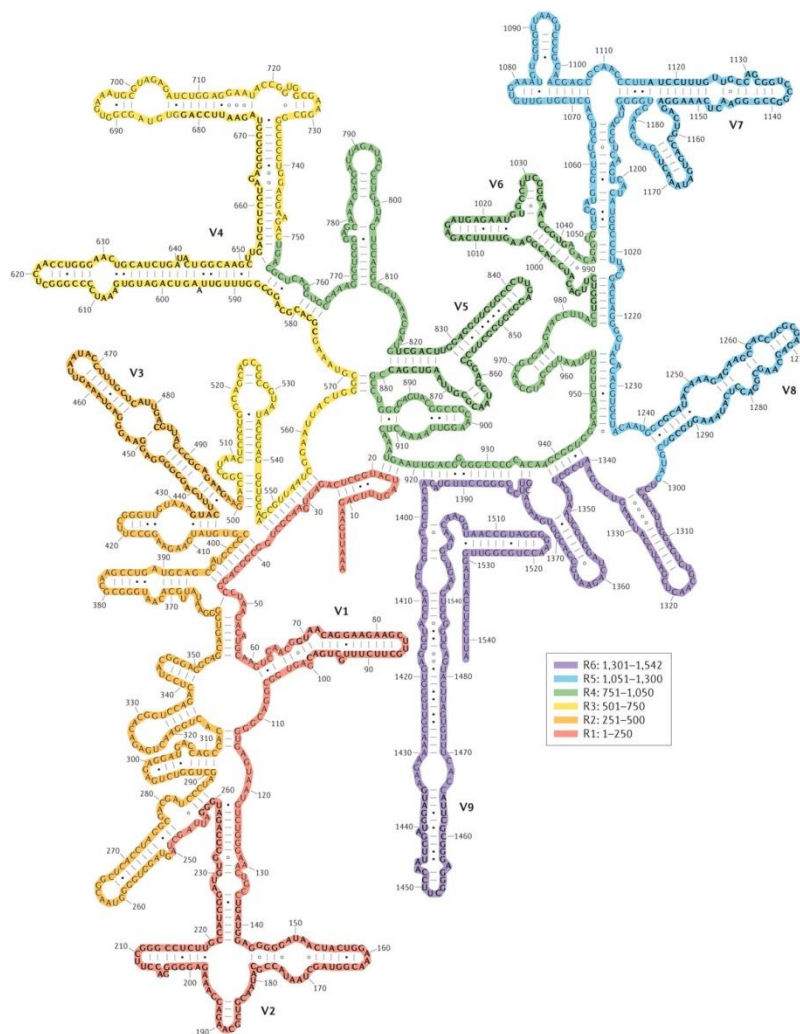


Figure 16. Structure secondaire de l'ARNr16s avec ses différentes régions (42)

Les premières analyses du microbiote à travers le séquençage du gène de l'ARNr16s était lentes et coûteuses et réalisées par clonage du gène entier à travers des plasmides transférés dans des hôtes tels que *Escherichia coli* (43). Au vue du coût de cette technique de séquençage, d'autres méthodes basées sur séquençage à plus large échelle à travers la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) ont été mises en œuvre, permettant de

révéler des informations détaillées concernant l'ensemble de la population microbienne dans un environnement particulier.

La PCR quantitative (qPCR) est maintenant fréquemment utilisée, elle mesure l'accumulation du gène recherché grâce à des amorces et des sondes marquées par fluorescence. La qPCR peut être aussi couplée avec la méthode FISH ou dot-blot hybridization.

L'utilisation de la technique PCR avec des amorces spécifiques permet d'étudier isolément un genre bactérien voire une espèce bactérienne, et de descendre ainsi le seuil de détection, permettant de suivre la colonisation du tractus digestif d'une espèce voire d'une souche. D'autre part, les résultats sont en général exprimés en valeur relative (pourcentage par rapport aux bactéries totales) pour les études utilisant des méthodes moléculaires, alors qu'ils sont exprimés en mesure absolue (nombre de micro-organismes) avec les techniques de culture.

De nouvelles évolutions ont vu ensuite le jour grâce aux biopuces phylogénétiques. Les biopuces sont similaires aux approches précédemment décrites, mais sont plus efficaces car elles permettent l'hybridation d'un plus grand nombre de séquences sur une lame, et par conséquent permettent de générer plus de données à partir d'une seule lecture.

Les séquences sont fixées à une lame en verre grâce à un robot. Ces séquences sont marquées par fluorescence et leurs expressions peuvent être ainsi mesurées. Malgré la facilité de mise en place, cette technique requiert du temps et des compétences notamment informatiques pour analyser le grand volume de données brutes générées. En effet, l'analyse d'images est un aspect central des expériences menées à l'aide de puces dont le but est de quantifier de manière relative le niveau d'expression des gènes.

1.6.4.2 Séquençage à haut débit

Aujourd'hui, les méthodes génomiques sont tournées vers les séquençages à haut débit, qui permettent une meilleure vision dans la composition du microbiote étudié (44). Les techniques de séquençage à haut débit comme celles fournies par Roche/454® et Illumina® ont été largement utilisées pour des études concernant le microbiote intestinal.

➤ **Roche/454©**

L'approche Roche/454© est basée sur le séquençage par synthèse. L'ADN (acide désoxyribonucléique) purifié est utilisé pour générer une librairie d'amplicons qui subit ensuite une émulsion (polymérisation) basée sur une PCR.

Cette PCR utilise des perles recouvertes d'oligonucléotides, qui sont spécifiques aux séquences d'adaptation attachées aux amplicons. Après le recouvrement des perles, des réactions enzymatiques vont permettre de générer des photons de lumière pour les séquences choisies. Cette activité lumineuse est ensuite détectée et analysée grâce à des techniques de bio-informatique qui vont permettre l'identification de la séquence initiale d'ADN (44).

➤ **Illumina©**

Concernant l'approche de séquençage Illumina©, des fragments d'ADN simple brin contenant des adaptateurs spécifiques situés aux extrémités sont générés. Ces fragments d'ADN simple brin sont attachés sur une cellule de débit en verre sur laquelle des oligonucléotides sont complémentaires avec la région adaptatrice des amplicons d'ADN.

Des cycles de séquençage vont se répéter en incubant préalablement des nucléotides marqués, des amorces et une ADN polymérase pour hybrider les fragments d'ADN. La cellule de débit est ensuite placée dans une cassette où l'incorporation des nucléotides marqués est mesurée en utilisant des technologies d'imagerie (44).

Bien que ces méthodes fournissent des résultats très détaillés (99,9% de précision), un rendement élevé de séquence avec des temps d'expérience courts (1 journée pour la méthode Roche 454©), elles ont cependant leurs propres limites.

En effet, elles requièrent des capacités informatiques poussées pour traiter l'ensemble des données générées, les plateformes de travail sont chères à l'achat (plusieurs centaines de milliers d'euros) et au fonctionnement (coût pour un million de bases respectivement d'environ 10 dollars et 10 centimes de dollars pour la méthode Roche 454© et Illumina©).

II. Le cancer du sein

Au vue des données épidémiologiques, des connaissances actuelles concernant la diversité des types de cancers et des facteurs de risque, le cancer du sein est considéré comme l'une des principales priorités mondiales en termes de santé publique. Ces différentes caractéristiques seront développées dans ce deuxième chapitre et permettront notamment de souligner l'intérêt croissant de potentielles approches préventives en lien avec le microbiote intestinal.

2.1 Notions générales sur le cancer du sein

➤ Généralités sur le cancer

En 2012, 14,1 millions de nouveaux cas de cancers et 8,2 millions de décès par cancer ont été observés dans le monde. La même année, la part de la population mondiale vivant avec un cancer diagnostiqué dans les 5 dernières années est chiffrée à 32,6 millions de personnes (45). Le cancer est donc un enjeu de santé publique, humain et social majeur affectant tous les pays. Ces chiffres confirment la nécessité d'élaborer et de mettre en place des plans de lutte contre le cancer efficaces pour offrir à chacun un accès à la prévention, au diagnostic et aux soins thérapeutiques.

2.1.1 Epidémiologie du cancer du sein

➤ Monde

- Cancer du sein chez l'Homme

Le cancer du sein est le deuxième cancer le plus fréquent chez l'Homme dans le monde avec 1,7 millions de nouveaux cas (Figure 17), mais arrive cependant à la cinquième place mondiale en termes de mortalité par cancer avec 522 000 décès (Figure 18). L'adoption de nombreuses mesures préventives et curatives ces dernières décennies expliquent cet écart entre l'incidence et la mortalité. Cette différence est parfois totalement absente pour certains cancers notamment le cancer du poumon qui est le premier cancer mondial en termes d'incidence et de mortalité.

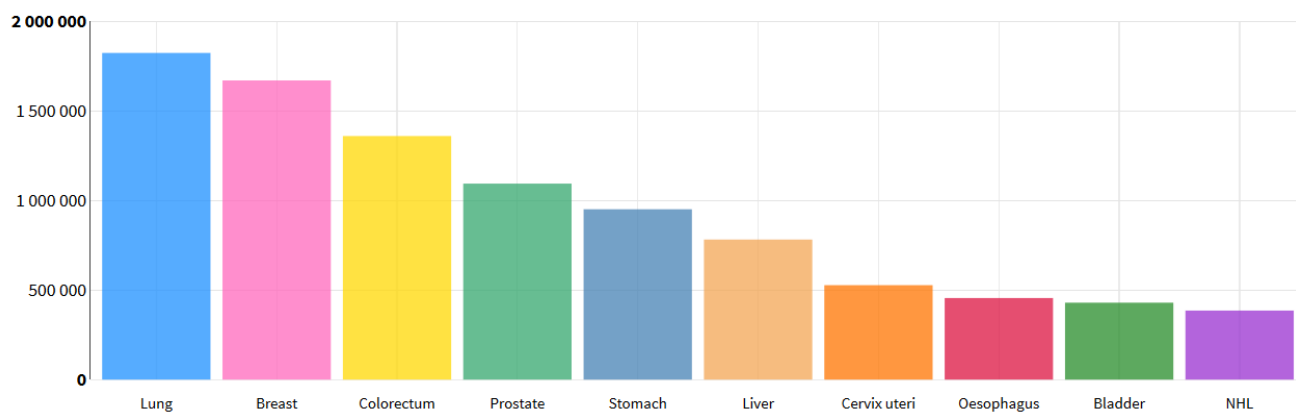


Figure 17. Incidence par type de cancer estimé dans le monde en 2012 (extrait d'IARC– OMS) (45)

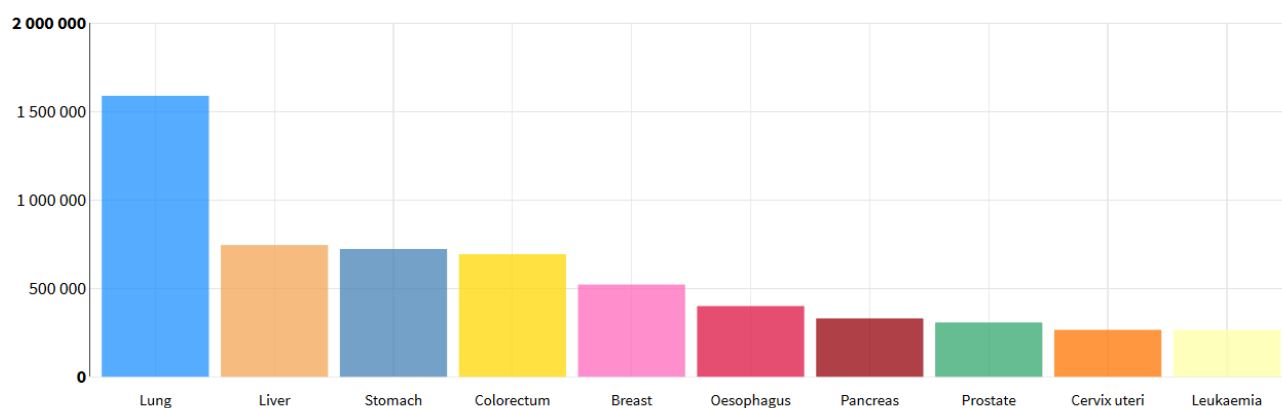


Figure 18. Mortalité par type de cancer estimé dans le monde en 2012 (extrait d'IARC– OMS) (45)

- Cancer du sein chez la femme

Le cancer du sein chez l'homme étant très marginal (moins de 1% des cancers du sein totaux), il convient de se focaliser exclusivement sur les données épidémiologiques chez la femme.

En effet, il est le premier cancer observé chez la femme à la fois dans les pays développés et dans les pays en développement représentant un cancer sur quatre dans le monde chez la femme en 2012. La même année, près de 6,3 millions de femmes vivaient avec un cancer du sein diagnostiqués dans les cinq dernières années (45).

Sur la période 2008-2012, on observe au niveau mondial une nette augmentation de l'incidence et de la mortalité avec une hausse respective de 20% et 14% (46).

L'espérance de vie plus élevée, le développement de l'urbanisation et l'adoption des modes de vie occidentaux sont responsables en grande partie de la croissance mondiale de l'incidence du cancer du sein (47).

De fortes inégalités entre les pays riches et pauvres existent et sont observables à travers des taux d'incidence plus élevés dans les régions développées mais des taux de mortalité plus importants dans les régions moins développées faute de dépistage précoce, de sous diagnostic et d'accès aux traitements. En effet, les taux d'incidence varient de près de un pour quatre à travers les différentes régions du monde, avec des taux de 27 nouveaux cas pour 100 000 femmes en Afrique centrale et 96 en Europe occidentale (Figure 19).

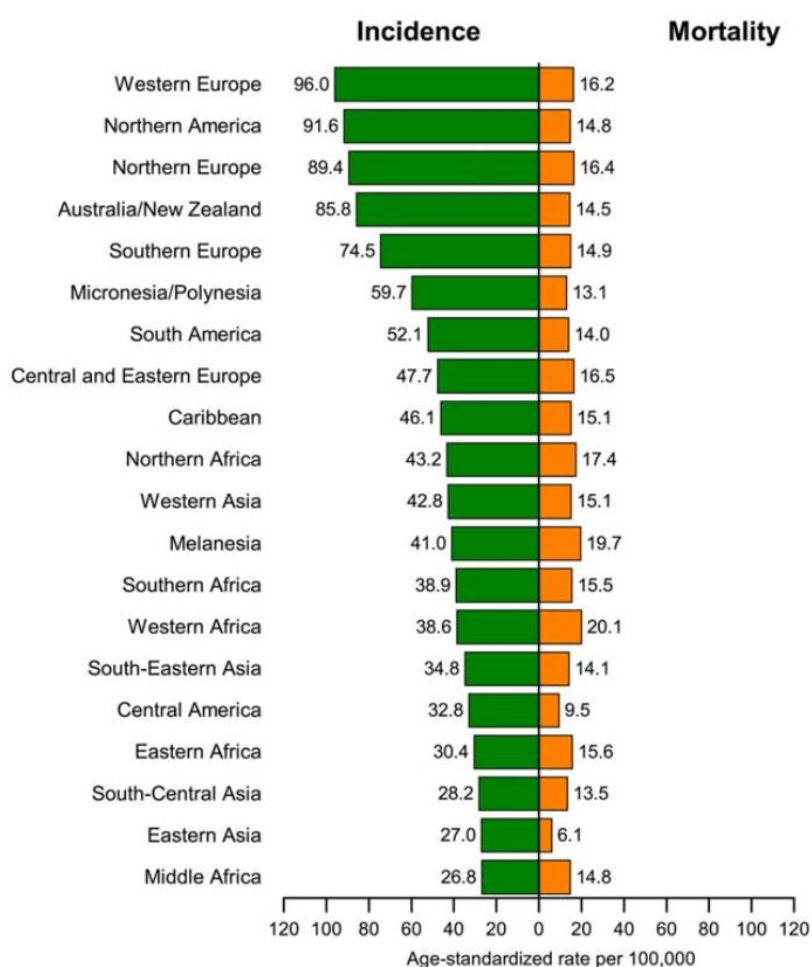


Figure 19. Incidence et mortalité du cancer du sein standardisé selon l'âge dans le monde en 2012 (48)

L'Europe orientale, l'Amérique du Sud, l'Afrique du Sud et l'Asie occidentale ont des taux d'incidence modérés, mais ceux-ci sont en hausse. Les taux d'incidence les plus faibles sont constatés dans la majeure partie des pays africains, mais là aussi ces taux d'incidence sont en hausse (Figure 20).

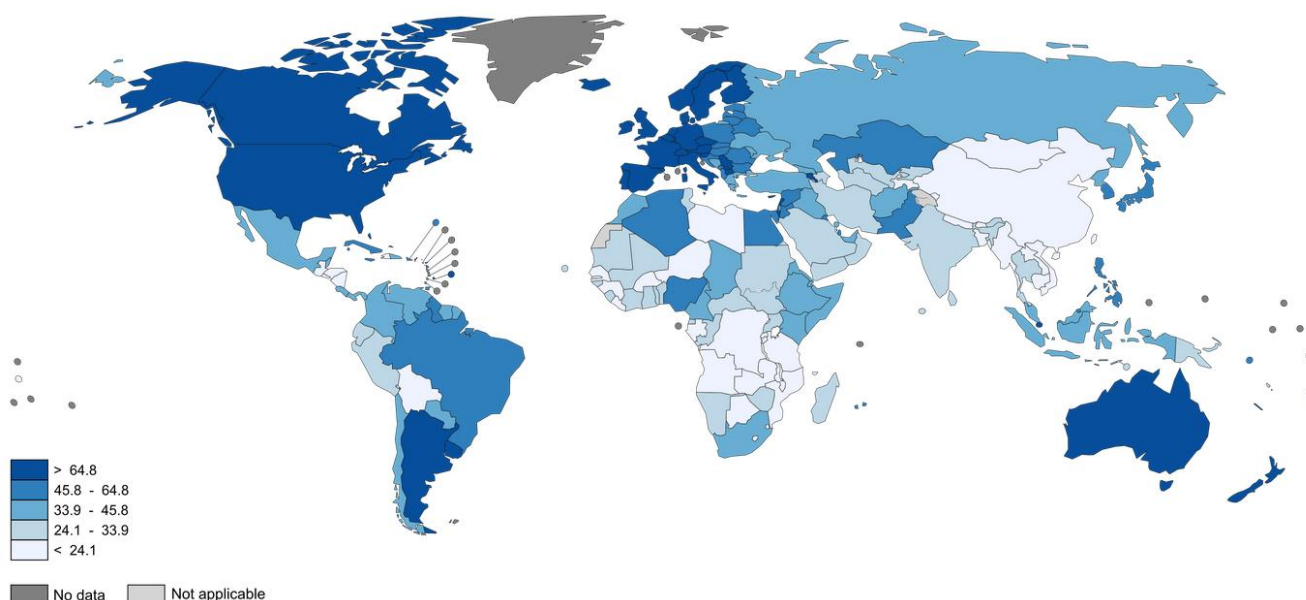


Figure 20. Estimation de l'incidence du cancer du sein standardisée selon l'âge dans le monde en 2012 (extrait de IARC–OMS) (45)

Les écarts de mortalité entre les différentes régions du monde sont moins importants que pour l'incidence, environ 15 cas pour 100 000 femmes (46), grâce aux taux de survie très favorables dans les pays développés. Le taux le plus favorable est observé en Asie de l'Est avec 6 décès pour 100 000 femmes et de 20 pour 100 000 femmes pour le défavorable en Afrique de l'Ouest (49).

Enfin, bien que l'on considère cette maladie comme une maladie du monde développé, une majorité de l'ensemble des décès par cancer du sein (62%) surviennent dans les pays en développement (Figure 21) (50).

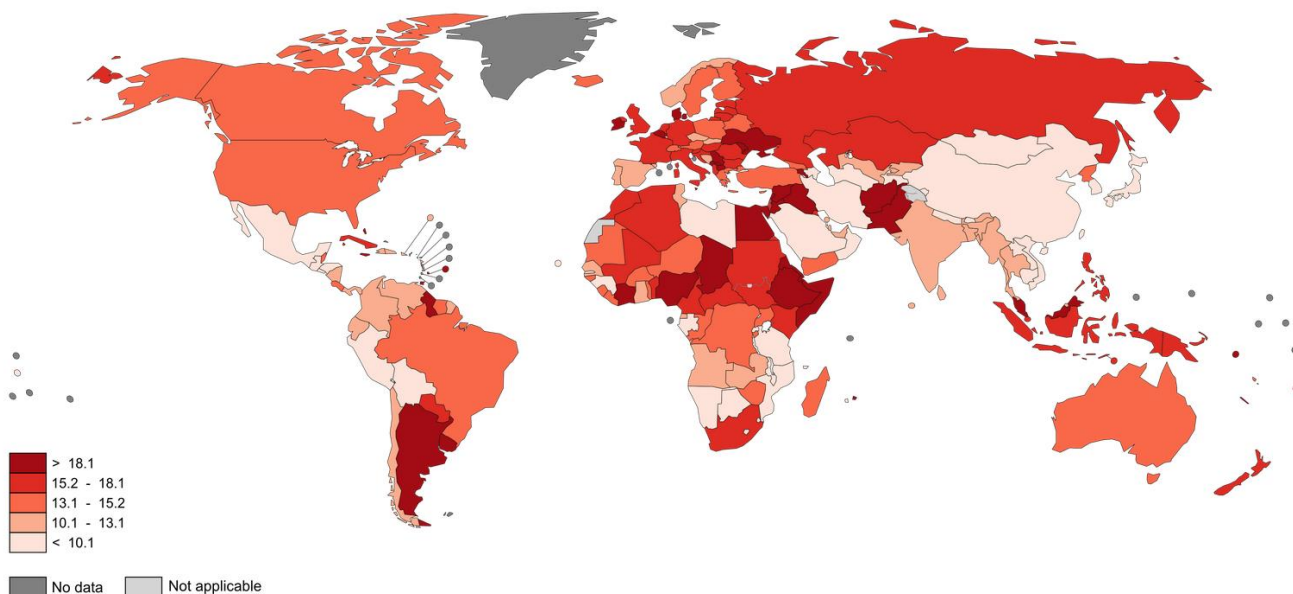


Figure 21. Estimation de la mortalité du cancer du sein standardisée selon l'âge dans le monde en 2012 (extrait de IARC–OMS) (45)

➤ France

En France comme de nombreux pays industrialisés à niveau de vie élevé, le cancer du sein est, chez la femme, le cancer le plus fréquent et meurtrier avec environ 54 000 nouveaux cas et 11 900 décès en 2015 (51).

Suivant la même évolution que la majorité des cancers, le risque d'être atteint de cancer du sein augmente avec l'âge avec moins de 10% des cancers du sein survenant avant 35 ans en France.

L'incidence augmente ensuite régulièrement jusqu'à l'âge de 65 ans lié entre autre au fait que le dépistage par mammographie tous les deux ans devient généralisé pour la tranche de 50 à 74 ans en France.

➤ Plan cancer 2014-2019 en France

L'OMS encourage la lutte contre le cancer du sein dans le cadre des programmes nationaux de lutte contre le cancer et préconise son intégration à la prévention des maladies non transmissibles et à la lutte contre ces maladies (47).

En France, le plan cancer 2014-2019 doté de 1,5 milliards d'euros a pour ambition de donner à chacun les mêmes chances de guérir et de mettre plus rapidement les innovations scientifiques au service des malades. Il comprend 17 objectifs regroupés autour de quatre grandes priorités de santé :

- Guérir plus de personnes malades
- Préserver la continuité et la qualité de vie
- Investir dans la prévention et la recherche
- Optimiser le pilotage et les organisations

2.1.2 Anatomie du sein (51)

Le sein est un organe pair contenant des glandes mammaires dont la fonction principale est l'allaitement des nouveau-nés et nourrissons.

Chaque sein contient :

- Une glande mammaire, elle-même composée de quinze à vingt compartiments séparés par du tissu graisseux. Chacun des compartiments de la glande mammaire est constitué de lobules et de canaux dont le rôle est de respectivement produire le lait en période d'allaitement et transporter le lait vers le mamelon.
- Du tissu de soutien constitué de vaisseaux, de fibre et de graisse.

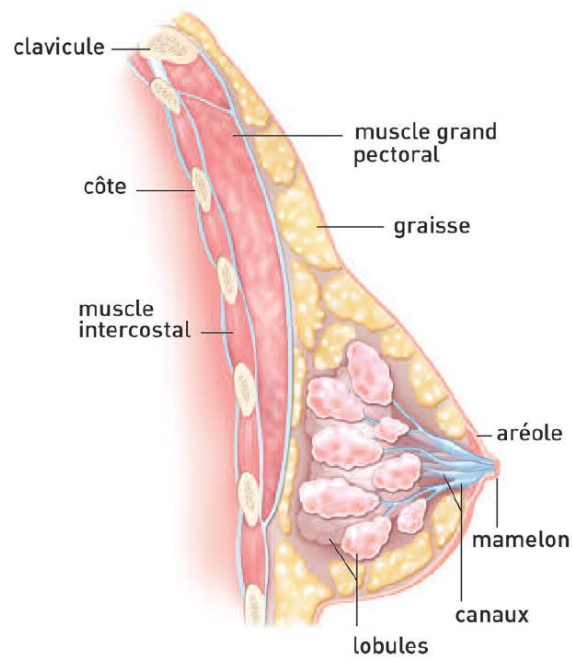


Figure 22. Structure du sein chez un sujet sain (51)

Les lobules et les canaux mammaires sont bordés par deux types de cellules :

- Les cellules luminales qui entourent la lumière des lobules et des canaux
- Les cellules myoépithéliales (ou basales) qui entourent les cellules luminales et sont au contact de la membrane basale.

D'autres cellules, appelées cellules souches sont situées dans les canaux en faible nombre et ont la capacité de se différencier en cellule basale ou luminale (Figure 23).

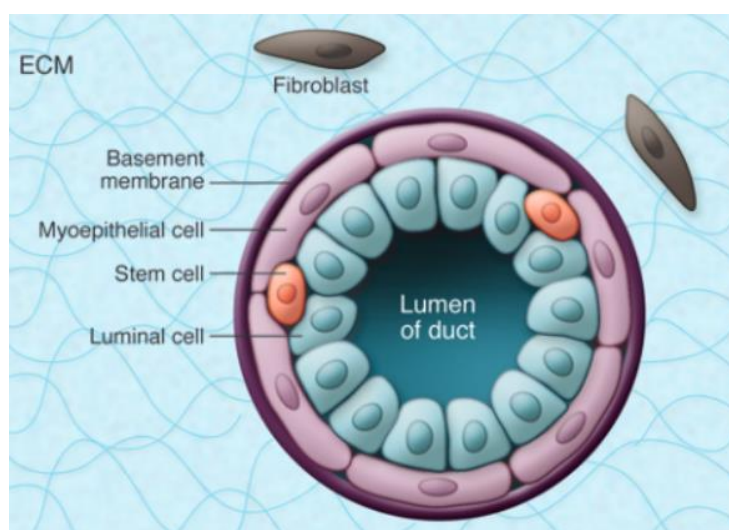


Figure 23. Schéma représentant un canal mammaire composé de la membrane basale, des cellules basales ou myoépithéliales, des cellules souches et des cellules luminales (52)

La glande mammaire se développe et fonctionne sous l'influence des hormones sexuelles fabriquées par les ovaires :

- Les œstrogènes permettent le développement des seins au moment de la puberté et jouent un rôle important tout au long de la grossesse (assouplissement des tissus, augmentation du volume sanguin nécessaire à l'alimentation du bébé, etc...).
- La progestérone joue un rôle dans la différenciation des cellules du sein et sur le cycle menstruel, en préparant par exemple l'utérus à une éventuelle grossesse.

Le sein est aussi parcouru des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques. Les vaisseaux et les ganglions lymphatiques composent le système lymphatique dont les principaux rôles sont de permettre la circulation des globules blancs, des hormones et des nutriments, de drainer les liquides interstitiels et de participer à la détoxification des organes du corps humain.

Les ganglions lymphatiques du sein sont principalement situés (Figure 24) :

- Au niveau de l'aisselle (ganglions axillaires),
- Au-dessus de la clavicule (ganglions sus-claviculaires),
- Sous la clavicule (ganglions sous claviculaires ou infra-claviculaires),
- A l'intérieur du thorax, autour du sternum (ganglions mammaires internes).

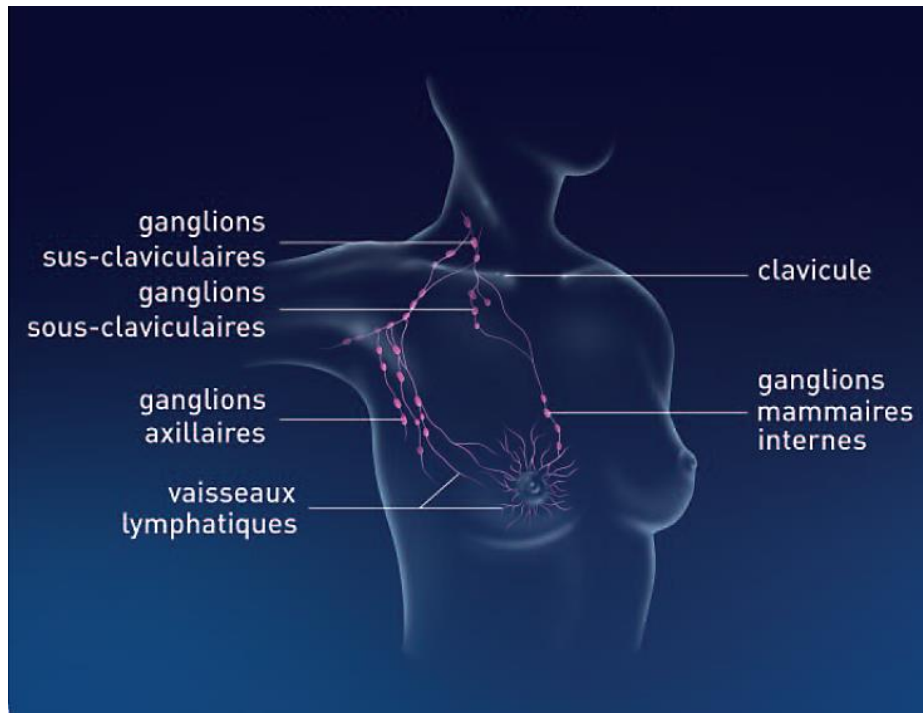


Figure 24. Les différents ganglions lymphatiques du sein (51)

2.1.3 Classifications et stades cliniques des cancers du sein

2.1.3.1 Classifications du cancer du sein

Le cancer du sein revêt de nombreuses formes comprenant des caractéristiques morphologiques et des signes cliniques très différents selon les cellules à partir desquelles le cancer se développe et selon les marqueurs produits par les tumeurs.

➤ Catégories histologiques

Selon le type histologique de la tumeur, le cancer du sein se différencie en trois catégories.

Les adénocarcinomes sont les cancers les plus fréquents (95%) se développant à partir des cellules épithéliales de la glande mammaire. Ce groupe comprend les deux premiers types de cancer du sein à savoir l'adénocarcinome canalaire et l'adénocarcinome lobulaire. La troisième catégorie regroupe tous les cancers sous leurs formes rares (51).

Lorsqu'un carcinome apparaît, les cellules cancéreuses sont d'abord peu nombreuses et limitées aux canaux ou aux lobules du sein formant ce que l'on appelle un carcinome *in situ*.

Si aucun dépistage, diagnostic et traitement ne sont mis en place, la tumeur va proliférer, pouvoir franchir la membrane basale et ainsi infiltrer le tissu qui entoure les canaux et les lobules, il s'agit alors de carcinome infiltrant (Figure 25).

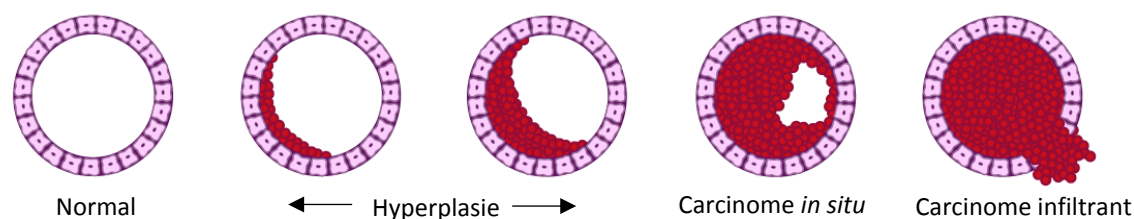


Figure 25. Progression d'un adénocarcinome canalaire in situ à un adénocarcinome canalaire infiltrant sur une coupe transversale (53)

Les cellules cancéreuses peuvent alors se détacher de la tumeur et emprunter le réseau circulatoire *via* les vaisseaux sanguins ou les vaisseaux lymphatiques pour former des cellules cancéreuses métastatiques en atteignant d'autres parties du corps telles que les ganglions axillaires, les os, le foie, les poumons et les ganglions lymphatiques plus éloignés du sein.

➤ Catégories moléculaires

Récemment, le développement des analyses génomiques a permis d'analyser simultanément l'expression de plusieurs milliers de gènes grâce aux puces à ADN, puis ensuite par séquençage à haut débit. Ces nouvelles méthodes permettent de regrouper les tumeurs en fonction de leur profil d'expression génique et ainsi de proposer une nouvelle classification dite moléculaire pour le cancer du sein (52).

Les premières études réalisées en 2000 ont d'abord réparti les cancers du sein en deux groupes principaux en fonction de l'expression cellulaire des récepteurs aux œstrogènes (ER) et ont identifié quatre sous-types de carcinomes en les comparant au tissu normal : ER⁺/luminal, basal-like, Erb-B2 et normal-like (54).

Actuellement, quatre sous-types moléculaires majoritaires sont décrits : basal, HER2⁺ (Human Epidermal Receptor ou Récepteur Epidermique Humain), luminal A et luminal B. Pour chaque sous-classe, les marqueurs biologiques et les types histologiques des tumeurs ont été étudiés. Chaque sous-type de cancer a ses propres particularités en termes de

pronostic vital, mais aussi de réponse aux prises en charge thérapeutique. La connaissance du sous-type de cancer *via* le dépistage précoce a un intérêt majeur dans la prise en charge du traitement des cancers du sein.

Basal

Les tumeurs basales sont caractérisées par l'expression de gènes identiques à ceux exprimés par des lignées de cellules myoépithéliales. Les tumeurs ont le phénotype suivant : ER⁻, HER2⁻ et sont en majorité récepteurs à la progestérone PR⁻. Par extension, on parle de tumeurs « triple-négatif » qui comprend un grand nombre de tumeur de type basal.

HER2

Ce groupe inclut toutes les tumeurs HER2⁺, quelle que soit leurs expressions des récepteurs hormonaux. Ces tumeurs ont tendance à grossir plus rapidement que les cancers luminaux et sont traitées grâce à des thérapies ciblant la protéine HER2.

Luminal

Les tumeurs lumineuses comprennent des tumeurs ER⁺ dont l'expression génique est identique aux lignées de cellules lumineuses. On distingue deux sous-groupes :

- Luminal A : HER2⁻, ER⁺, PR⁺
- Luminal B : HER2^{+/+}, ER⁺, PR⁺

Malgré les avancées technologiques et scientifiques, les connaissances sur les sous-types moléculaires doivent encore être approfondies. Les sous-types décrits précédemment sont eux-mêmes hétérogènes, et certains autres sous-types ne sont identifiés aujourd'hui que partiellement :

- baso-luminal exprimant les marqueurs communs aux cellules basales et lumineuses.
- normal-like proche de l'expression génique des cellules du tissu mammaire normal et dont le phénotype n'est pas encore connu.

De plus, il reste environ 10 à 15% de tumeurs non classées actuellement et n'appartenant à aucun groupe précédemment cité.

➤ Grades (51)

L'examen anatomopathologique de la tumeur permet de caractériser le grade. Trois paramètres sont étudiés et permettent de définir l'agressivité de la tumeur de la plus faible (grade I) à la plus élevée (grade III) :

- **L'architecture tumorale** : en acquérant un certain degré de malignité, la cellule tumorale perd progressivement sa fonction d'origine et commence à changer d'apparence. La cellule tumorale est indifférenciée lorsqu'elle a perdu toutes ses caractéristiques d'origine et devient alors agressive.
- **La forme et la taille du noyau** de la cellule.
- **Le nombre de cellules en division** ou activité mitotique reflétant la vitesse à laquelle les cellules cancéreuses se développent. Plus une cellule se développe rapidement et plus le risque de propagation du cancer est élevé.

Tableau II. Récapitulatif des caractéristiques des principaux sous-types moléculaires du cancer du sein (55)

Sous-types		Origine	Phénotype	Fréquence	Pronostic	Grade
Triple-négatif ou basal like		Cellule myoépithéliale	HER2 ⁻ , ER ⁻ , PR ⁻	15-20%	Défavorable	Grade III
HER2		Non connue	HER2 ⁺ , ER ⁻ , PR ⁻	5-15%	Défavorable	Grade II et III
Luminal	Luminal A	Cellule luminaire	HER2 ⁻ , ER ⁺ , PR ⁺	30-70%	Favorable (> luminal B)	Grade I
	Luminal B	Cellule luminaire	HER2 ^{-/+} , ER ⁺ , PR ⁺	10-20%	Favorable	Grade I

Un pronostic s'évalue sur la façon dont le cancer affectera la personne et comment celle-ci réagira au traitement. Les tumeurs hormono-dépendantes sont habituellement associées à un bon pronostic. Elles sont souvent de grades plus bas et donc moins agressives, et se propagent moins que les tumeurs non hormono-sensibles. De plus, ce sous-type de cancer réagit généralement bien à l'hormonothérapie.

Un cancer du sein HER2⁺ est quant à lui plus agressif et plus susceptible de se propager qu'un cancer du sein HER2⁻, et engendre donc un mauvais pronostic.

2.1.3.2 Stades cliniques du cancer du sein (56)

La connaissance des différents sous-types de cancer du sein est évidemment primordiale pour la prise en charge thérapeutique mais le stade du cancer reste tout aussi important car il permet de déterminer l'évolution de la maladie.

Pour évaluer son étendue, trois critères sont pris en compte : la taille et l'infiltration de la tumeur, l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques et la présence ou non de métastase(s). La tumeur est ainsi classée selon la classification **TNM** (Tumor ou tumeur, Nodes ou ganglions, Metastasis ou métastases) (57).

- **La taille et l'infiltration de la tumeur** : Comme il a été expliqué précédemment, les cellules cancéreuses se forment en très grande majorité au niveau des canaux et des lobules (carcinome *in situ*). Par la suite, elles vont naturellement traverser la membrane basale pour se propager à d'autres organes (carcinome infiltrant). L'étude de la taille et de l'infiltration de la tumeur permettent de donner une indication forte quant à l'évolution de la maladie. La cotation va de T0 (tumeur primitive non palpable) à T4 (tumeur avec extension directe soit à la paroi thoracique ou à la peau).
- **L'atteinte ou non des ganglions lymphatiques** : Lorsque les cellules cancéreuses s'infiltrant et commencent à se disséminer grâce au réseau circulatoire, les premières structures faisant office de réservoir de cellules métastatiques sont les ganglions lymphatiques. C'est lors de l'examen clinique que le médecin va rechercher par palpation la présence de ganglions enflés. Le nombre de ganglions envahis et leurs emplacements permettent d'en savoir plus sur le niveau de propagation du cancer. La cotation va de N0 (absence d'envahissement ganglionnaire) à N3 (envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires par exemple).
- **La présence ou non de métastase(s)** : Les cellules cancéreuses peuvent envahir d'autres organes que les ganglions lymphatiques et y développer des métastases à distance. La cotation va de M0 (absence de métastase à distance) à M1 (présence de métastase(s) à distance).

Par exemple, un cancer du sein classé T2N1M1 correspond à une tumeur de taille comprise entre 2cm et 5cm ayant envahi 1 à 3 ganglions axillaires et présentant une ou plusieurs métastase(s) à distance.

2.2 Dépistage et diagnostic du cancer du sein

De nombreux facteurs de risque du cancer du sein sont constitutifs des individus, par conséquent ils ne sont pas liés directement à l'environnement ou aux modes de vie, et ne peuvent pas être maîtrisés à l'aide de moyens préventifs. Le cancer du sein a aussi pour particularité d'évoluer lentement pendant de nombreuses années sans entraîner le moindre symptôme, douleur ou grosseur. Ces deux caractéristiques mettent en évidence l'importance de réaliser un dépistage le plus précocement possible afin d'améliorer les chances de survie et de limiter les séquelles liées à certains traitements (58) (Figure 26).

Le scénario C présent dans la figure 26 représente l'approche la plus efficace pour augmenter l'espérance de vie et diminuer les séquelles chez une personne qui serait atteinte du cancer du sein en procédant à un dépistage précoce permettant le diagnostic du cancer, un suivi et une prise en charge thérapeutique adaptés dans un intervalle de temps le plus court.

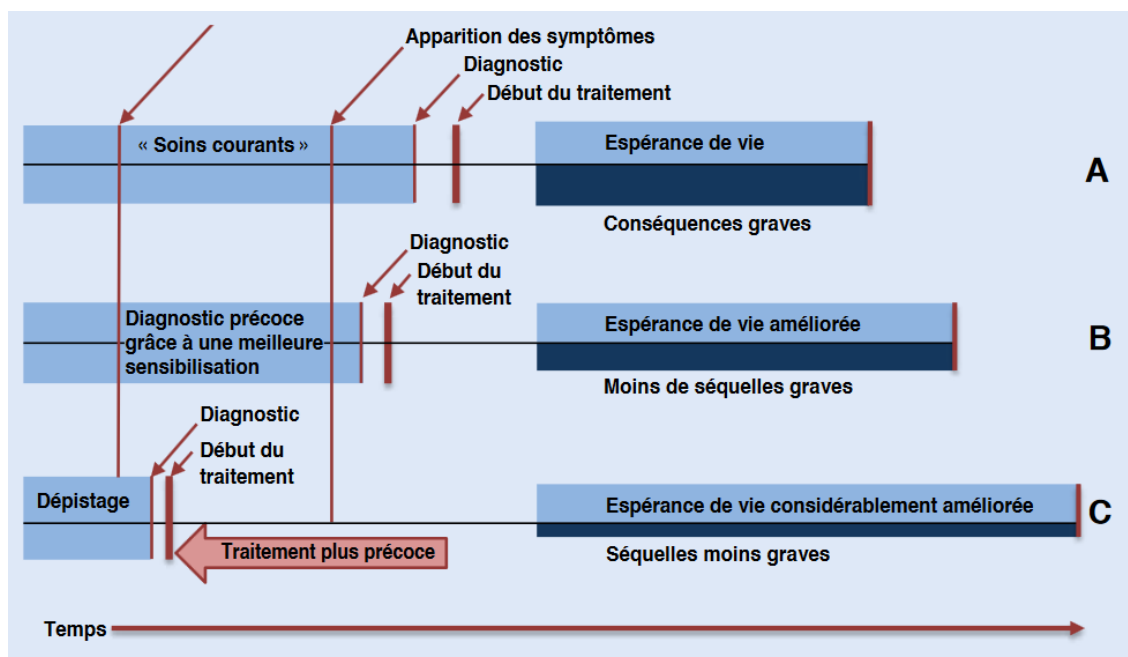


Figure 26. Schéma représentant les différents scénarios d'une personne diagnostiquée à trois moments au cours de l'évolution de la maladie (59)

Quelle que soit la méthode de dépistage précoce utilisée, le succès d'un dépistage précoce dans la population repose essentiellement sur une planification rigoureuse et un programme bien organisé et durable visant le bon groupe de population (60).

Les stratégies recommandées pour un dépistage précoce varient en fonction des revenus, des infrastructures et de la typologie des cancers et des populations atteintes dans chaque pays. Les pays à revenu faible ou intermédiaire ne peuvent que très difficilement suivre un programme de dépistage par mammographie très coûteux, demandant de bonnes infrastructures médicales et une mise en place d'un programme à long terme (47).

2.2.1 Examen clinique

L'autopalpation est une technique essentielle, ne permettant que de détecter les tumeurs visibles et palpables. L'efficacité en termes de dépistage n'est pas encore bien démontrée, cependant il a été constaté que cette pratique permet aux femmes de se responsabiliser et de prendre en charge leur propre santé. L'auto-examen est donc recommandé pour sensibiliser les femmes à risque, plutôt que comme une méthode de dépistage (61).

La technique consiste à se mettre debout devant un miroir et d'inspecter les seins pour en vérifier l'absence d'écoulement du mamelon, de crevasses ou de plis anormaux et de rechercher une sensation de boule ou de fossette dans le sein et près des aisselles pour détecter d'éventuelles anomalies au niveau des ganglions lymphatiques.

L'autopalpation est recommandée dès l'âge de 25 ans et peut s'effectuer tous les mois, après la survenue des règles.

2.2.2 Mammographie

La mammographie est la meilleure méthode de dépistage chez les femmes de plus de 50 ans présentant un risque moyen de cancer du sein; elle permet de réduire la mortalité par cancer du sein de 20% à 30% chez les femmes de plus de 50 ans dans les pays à revenu élevé lorsque le taux de dépistage est supérieur à 70% (62).

La mammographie est un examen radiologique des seins réalisé par deux clichés pour chaque sein positionné entre deux plaques (Figure 27).



Figure 27. Deux clichés de mammographie révélant une lésion dans le sein droit. Clichés gauche : projection oblique médio-latérale, cliché droit : projection cranio-caudale (63)

En France, le programme de dépistage organisé actuellement invite toutes les femmes de 50 à 74 ans à réaliser tous les deux ans une mammographie prise en charge financièrement par l'assurance maladie. Concernant les patientes à risque, une surveillance clinique plus assidue et des examens de dépistage plus fréquents et plus diversifiés (échographie et IRM) sont organisés. En 2014, le taux de participation de la population cible était de 52,1%, en dessous des recommandations européennes de 70% (64).

2.3 Le cancer du sein : une maladie multifactorielle

Les causes exactes du cancer du sein ne sont pas encore totalement définies et connues, cependant la probabilité de développer un cancer du sein a été associée à certains facteurs de risque. Cette notion d'augmentation du risque de survenue de cancer par de multiples facteurs définit le cancer du sein comme une maladie multifactorielle.

A ce jour, plusieurs facteurs sont connus, mais il existe encore une incertitude quant à leurs implications et degrés d'influence sur le cancer du sein. Ils se décomposent en deux grandes catégories : les facteurs de risque liés au mode de vie, et les facteurs de risque non influençables, liés en grande partie aux antécédents.

2.3.1 Age

L'âge est le premier facteur de risque du cancer du sein. Le risque chez les jeunes femmes est peu élevé, environ 10 % des cas de cancer du sein se manifestent chez les moins de 35 ans. Le cancer du sein se développe le plus souvent autour de 60 ans avec près de 50% des cancers du sein diagnostiqués entre 50 et 69 ans et environ 28% sont diagnostiqués après 69 ans (56).

C'est la raison pour laquelle toutes les femmes âgées de 50 à 74 ans sont invitées, dans le cadre du dépistage organisé du cancer du sein, à bénéficier, tous les deux ans, d'une mammographie en France.

2.3.2 Antécédents personnels et familiaux

2.3.2.1 Antécédents personnels

➤ Antécédents de cancer du sein

Une femme guérie d'un cancer du sein est confrontée à deux risques de récurrence : la rechute du premier cancer ou le développement d'un nouveau cancer du sein appelé récurrence. Le risque de récurrence du cancer au niveau du sein traité est 3 à 4 fois plus élevé, comparé à une femme du même âge sans antécédent de cancer du sein. Ce risque peut augmenter jusqu'à 8 à 10 fois, chez les femmes atteintes précédemment de cancer canalaire ou lobulaire *in situ* (56).

➤ Exposition à des radiations médicales

L'exposition à de nombreuses radiations jeune comme les irradiations chez l'enfant, pour traiter un cancer, augmente le risque de cancer du sein. Le niveau de risque est en rapport avec la dose totale reçue et l'âge de la femme. Le risque de développer un cancer du sein est très élevé chez une femme ayant reçu des irradiations avant 20 ans, tandis que le risque devient faible après 40 ans (65).

Concernant le risque lié à la mammographie, de nombreuses études ont mis en évidence que les bénéfices de dépistage de cancer du sein par mammographie étaient plus importants que le risque d'exposition à une radiation surtout chez les femmes de 50 ans et plus (66).

2.3.2.2 Antécédents familiaux

La plupart des femmes atteintes d'un cancer du sein n'ont aucun antécédent de cancer du sein dans leurs familles. Seulement 13% des femmes diagnostiquées du cancer du sein ont une personne au premier degré (mère, sœur, fille) atteintes de ce cancer (67). Cependant, il faut noter le risque de développer le cancer du sein est doublé avec la présence d'antécédents familiaux (68). Les recherches scientifiques n'ont pas permis de savoir exactement si cette disposition familiale était due au hasard, à un mode de vie commun aux membres de la famille ou à un facteur héréditaire transmis des parents aux enfants.

Seule une faible proportion des cancers du sein, 5% à 10 %, sont héréditaires, c'est-à-dire attribuable à une mutation génétique (51). Les mutations géniques héréditaires des gènes *BRCA1* (BReast Cancer gene 1) et *BCRA2* sont très bien connues et représentent la majorité des mutations héréditaires. On estime qu'environ 2 femmes sur 1000 sont porteuses d'une mutation du *BRCA1* ou du *BRCA2* dans le monde (56). Ces deux gènes participent à la réparation des lésions que l'ADN subit régulièrement. La présence de mutations dans l'un de ces deux gènes perturbe cette fonction, et fait augmenter fortement le risque de cancer du sein et de l'ovaire.

La personne porteuse de cette mutation ne se traduit pas systématiquement par l'apparition d'un cancer mais le risque reste cependant très élevé (69):

- *BCRA1* : 55-65% de risque de développer un cancer du sein jusqu'à 70 ans
- *BCRA2* : environ 45% de risque de développer un cancer du sein jusqu'à 70 ans.

2.3.3 Style de vie

➤ Obésité

L'obésité est liée à un risque plus important de développer le cancer du sein de l'ordre de 10 à 20% (tour de taille > 160cm) (70).

En effet, l'adiposité est associée positivement à une augmentation des taux plasmatiques d'œstrogènes chez les femmes en post-ménopause et à un risque accru de survenue de cancer du sein (71). Une méta analyse de 34 études de cohorte confirment une relation entre le gain de poids des femmes adultes et le risque de cancer ; chaque tranche de 5kg/m² de prise de poids chez la femme en post-ménopause est associée à une augmentation de cancer du sein de 11% (72).

➤ **Activité physique**

Une femme pratiquant une activité physique régulière présente 10-20% de risque en moins d'être atteint d'un cancer du sein comparé à une femme moins active. Cependant le bénéfice est clairement plus net chez les femmes en post-ménopause (73).

➤ **Tabac**

La consommation de tabac est une cause possible de l'augmentation du risque de plusieurs cancers mais son lien avec le cancer du sein est encore en cours d'investigation. De nombreuses études tendent à démontrer que la consommation de tabac à long terme et à un âge précoce pourrait augmenter le risque de survenue (74,75) tandis que d'autres études ont démontré le contraire (76).

➤ **Alcool**

La consommation d'alcool est le seul facteur de risque nutritionnel établi du cancer du sein, ce risque augmente d'environ 11% pour une consommation moyenne d'une boisson alcoolisée par jour. Le lien entre l'alcool et le cancer du sein reste encore très méconnu mais l'éthanol pourrait affecter le métabolisme des bactéries intestinales. Après une consommation d'alcool chronique chez des rats, des scientifiques ont mis en évidence que les voies métaboliques des stéroïdes étaient altérées dont celle du 4-hydroxyoestrone, un métabolite des œstrogènes ayant un lien avec la formation de tumeurs induites par les œstrogènes (77).

➤ **Antibiotiques**

De nombreuses études ces dernières dizaines d'années ont démontré que les antibiotiques perturbaient la population bactérienne intestinale.

Une étude nord-américaine de cas témoins incluant 2266 femmes atteintes d'un cancer du sein et 7953 contrôles sains a démontré que la prise d'antibiotiques sur une longue période est associée à une augmentation du risque de cancer du sein (odds ratio de 2,07). Dans cette étude, toutes les classes d'antibiotiques sont associées à une augmentation du risque de cancer du sein même après ajustement de certains facteurs comme le statut de ménopause, l'âge et les antécédents familiaux. Les résultats de cette étude sont cependant nuancés par d'autres recherches démontrant des augmentations de risque moins élevées (odds ratio de 1,17) (78) voire aucun lien (79).

2.4 Exposition aux œstrogènes et conséquences sur le cancer du sein chez la femme

2.4.1 Généralités

Les œstrogènes sont des hormones sexuelles femelles constituant un groupe de stéroïdes. Leur structure est basée sur un noyau œstrane, constitué de quatre cycles hydrocarbonés et dont les modifications de substitutions telles que des groupes méthyle ou hydroxyle, permettent de différencier les molécules de cette famille.

➤ Œstrogènes naturels

Trois formes d'œstrogènes naturels existent : l'œstrone (E1), le 17β-œstradiol (E2) et l'œstriol (E3) (Figure 28). Le 17β-œstradiol est l'œstrogène endogène dont l'effet biologique est le plus puissant de l'organisme, suivi par l'œstrone, l'œstriol quant à lui n'est observé qu'à de forte concentration pendant la grossesse.



Figure 28. Structure chimique des œstrogènes naturels (80)

Des enzymes, telles que la 17β-hydroxystéroïde déhydrogénase et la 16-α-hydroxylase, permettent, respectivement, l'inter-conversion de E1/E2 et la formation de l'E3 à partir de l'E1 ou l'E2.

Chez la femme en période d'activité génitale, la synthèse des œstrogènes s'effectue à partir du cholestérol, principalement au niveau des ovaires, pendant la phase folliculaire. Le cholestérol est dégradé et subit de multiples réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse conduisant à la formation d'androgènes précurseurs des œstrogènes. Un enzyme appelée aromatasase vient ensuite convertir les androgènes en œstrogènes.

➤ Œstrogènes de synthèse

Les œstrogènes de synthèse sont le plus souvent dérivés du noyau du 17β -œstradiol. La molécule de synthèse la plus administrée est l'éthinylestradiol, qui diffère de l'E2 par son radical éthinyl en C17, empêchant partiellement sa conversion dans l'organisme en œstrogènes E1 et E2. Cet œstrogène rentre dans la composition des contraceptifs hormonaux et a pour principal mode d'action l'inhibition de la FSH (Hormone Folliculo-Stimulante), provoquant l'atrophie de l'ovaire et inhibition de l'ovulation.

2.4.2 Impact des œstrogènes sur le cancer du sein

L'implication des œstrogènes dans les processus de carcinogénicité dans le sein est mis en évidence depuis de nombreuses années par des études scientifiques (81,82).

Les œstrogènes amplifient les réponses des cellules sensibles aux hormones stéroïdes par l'interaction des récepteurs aux œstrogènes (REs), membres de la superfamille des récepteurs aux hormones nucléaires qui agissent comme un facteur de transcription après fixation d'un ligand. Il existe deux sous-types d'ER, alpha et beta (83). L'ER α est essentiellement exprimé dans les organes génitaux féminins (utérus, glande mammaire et ovaires), mais aussi dans les os et le foie. L'ER β est retrouvé principalement dans le côlon, les ovaires, la moelle épinière et le cerveau (84).

2.4.2.1 Mécanisme d'action (85)

Après diffusion à travers la membrane plasmique cellulaire, les œstrogènes peuvent activer la transcription de gènes par diverses voies de signalisation, génomiques et non génomique (Figure 29).

- **Mécanisme transcriptionnel classique** (ERE dépendant)

Dans le mécanisme classique, l'œstrogène atteint le milieu intracellulaire par diffusion à travers la membrane plasmique et se lie aux ERs localisés dans le cytoplasme ou dans le noyau. Ce complexe œstrogène-ER nucléaire se fixe ensuite directement ou indirectement à des facteurs de transcription ERE (Estrogen Responsive Element) situés en amont des gènes cibles, à l'aide de protéines corégulatrices entraînant une modification des niveaux d'ARNm, intermédiaire pour la synthèse de protéine, et *in fine* une réponse physiologique.

- **Mécanisme transcriptionnel œstrogène indépendant**

Des facteurs de croissance tel que l'EGF (Epidermal Growth Factor) peuvent activer des kinases qui phosphorylent des ERs ; ces derniers se fixent alors à l'ADN au niveau des séquences ERE sans intervention d'œstrogène.

- **Mécanisme transcriptionnel ERE-indépendant**

Les récepteurs des œstrogènes sont capables de moduler tout aussi bien l'expression de gènes qui ne possèdent pas de séquence ERE. Une fois le complexe œstrogène-ER formé et transloqué dans le noyau cellulaire, celui-ci est capable d'interagir directement avec d'autres facteurs de transcriptions fixés sur les régions promotrices de gènes cibles.

- **Mécanisme initié à la membrane (non génomique)**

Ce type de mécanisme permet d'obtenir des effets biologiques rapides contrairement aux mécanismes transcriptionnels s'accomplissant en plusieurs heures. Les ERs localisés à la membrane activent des kinases, conduisant à des modifications rapides de protéines cytoplasmiques ou bien à des régulations transcriptionnelles.

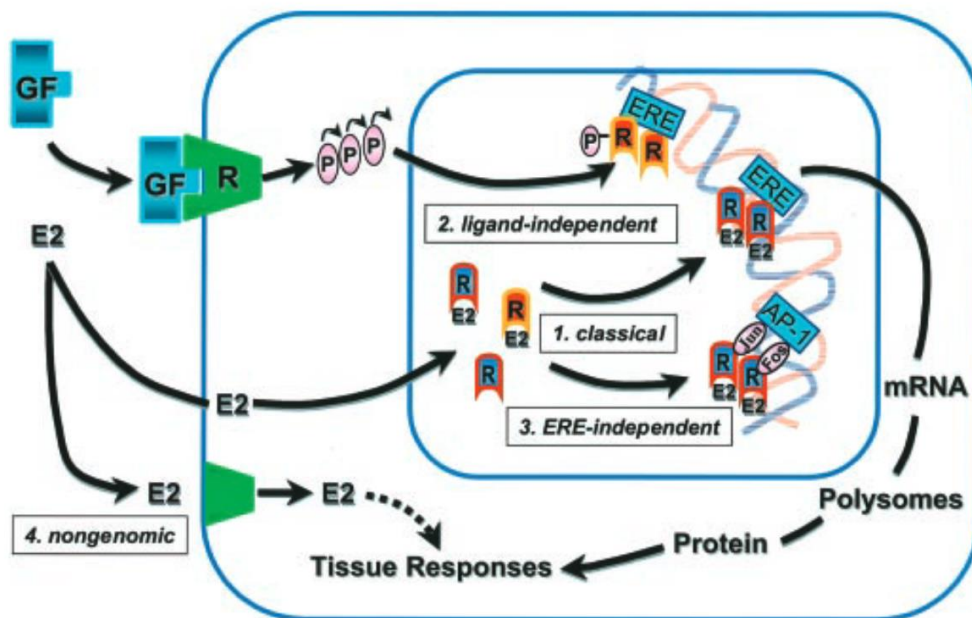


Figure 29. Différents mécanismes d'action des œstrogènes. 1 : mécanisme transcriptionnel classique, 2 : mécanisme transcriptionnel œstrogène indépendant, 3 : mécanisme transcriptionnel ERE-indépendant, 4 : mécanisme initié à la membrane (non génomique) (85)

Les quatre mécanismes d'actions sont représentés dans la figure 29 dont les trois premiers activent les récepteurs aux œstrogènes par la voie génomique et le quatrième par la voie non génomique conduisant à des effets physiologiques rapides.

2.4.2.2 Association des œstrogènes et du cancer du sein en période de pré et post-ménopause

La ménopause est une étape importante chez la femme car elle signifie un arrêt des cycles menstruels. Elle survient généralement chez les femmes vers l'âge de 50 ans et se traduit notamment par des modifications de taux d'hormones sexuelles très importantes dont les œstrogènes (Figure 30).

En période de pré-ménopause, les œstrogènes sont synthétisés principalement par les ovaires, puis c'est au tour du tissu adipeux de devenir le principal fournisseur d'œstrogènes en post-ménopause. Le tissu adipeux ne permet cependant pas de synthétiser des œstrogènes à un taux similaire en période de pré-ménopause ce qui explique la chute de concentration plasmatique (Figure 30).

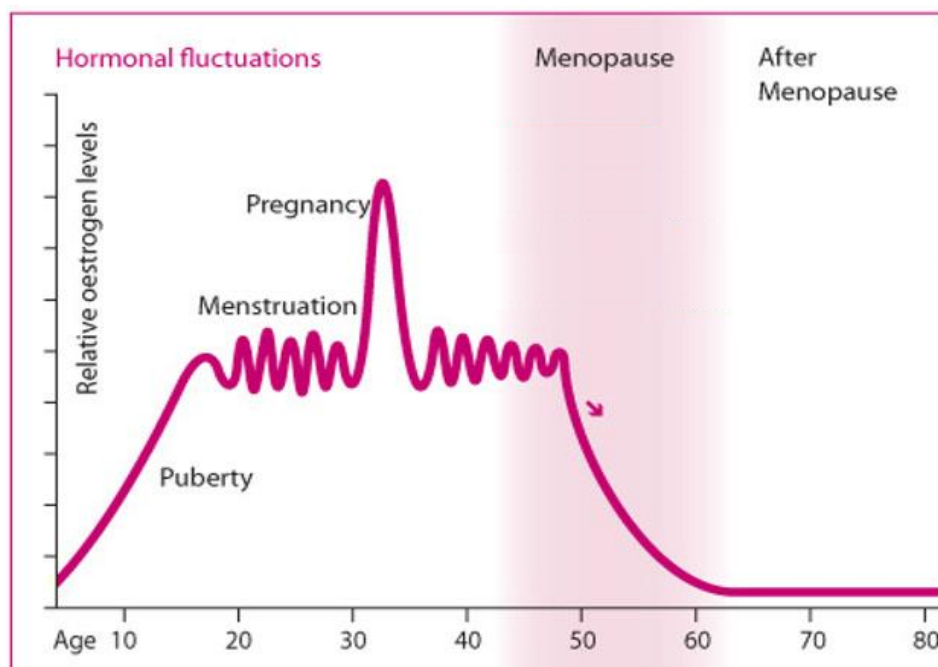


Figure 30. Fluctuation du taux relatif d'œstrogènes sanguin au cours de la vie d'une femme (86)

L'œstrogène est connu pour être une cause avérée dans l'étiologie du cancer du sein ER⁺ et joue un rôle important dans l'initiation et la promotion de la croissance des cellules néoplasiques (87). L'hypothèse qu'une concentration élevée d'œstrogènes pendant la grossesse augmentait la probabilité de la survenue d'un cancer du sein a attiré l'attention des scientifiques sur le potentiel effet oncogénique des œstrogènes. Cette hypothèse a été validée chez la femme lors d'exposition à de fortes concentrations en œstrogènes pendant des grossesses gémellaires (88) et dans les années 1970 après l'interdiction de la prescription d'œstrogène synthétique appelé diéthylstilbestrol entraînant notamment une augmentation du risque de cancer du sein chez les filles nées de ces grossesses (89).

Post-ménopause

Aujourd'hui, l'association entre le niveau d'hormones sexuelles et le risque de cancer du sein est très bien établi (90–92).

Des scientifiques ont réalisé une méta-analyse en combinant les données de 9 études chez 663 femmes ayant développées un cancer du sein et 1765 femmes sans cancer en période de post-ménopause. Le risque relatif (RR) de cancer du sein est environ deux fois plus élevé chez les femmes avec les taux les plus élevés d'E2 (1er quintile), comparé aux femmes avec les taux les moins élevés (quintile de référence) (90).

Une des principales limites de ces études basées sur l'étude d'échantillons sanguins est que le RR est calculé sur seulement une mesure de la concentration plasmatique d'œstrogènes par femme.

L'estimation du RR est certes basée sur un grand groupe d'individus, cependant le seul fait de ne pas analyser les taux d'œstrogènes sur une période longue tend à fragiliser ces résultats.

Le travail de certains scientifiques a donc consisté à analyser des échantillons sanguins sur une période de suivi plus importante. Les échantillons sanguins ont été collectés en 1989-1990 et en 2000-2002 chez un sous-groupe de 707 femmes. Les résultats démontrent que l'association entre le RR de cancer du sein et la concentration plasmatique d'E2 reste la même que ce soit dans les 10 ans ou dans les 10-20 ans avant le diagnostic de cancer. Ainsi le RR est deux fois supérieur chez les femmes avec les concentrations d'E2 les plus élevées, comparé à celles aux plus faibles concentrations comme précédemment démontré. De plus,

cette association est plus marquée chez les femmes atteintes de tumeurs hormono-dépendantes (ER⁺/PR⁺) avec des taux d'E2 les plus élevés, associés à une augmentation du RR de 2,8 comparé aux femmes avec les taux d'E2 les plus faibles (RR=1,1) (93).

Pré-ménopause

Malgré l'évidence du lien entre le taux élevé d'œstrogène chez la femme en post-ménopause et la survenue du cancer du sein, les études scientifiques se focalisant uniquement sur la période de pré-ménopause n'ont pas montré une association aussi soutenue. Cependant, il a été observé que les femmes avec des taux d'incidence faibles de cancer du sein étaient le plus souvent associées à des concentrations d'E2 sérique faibles, que ce soit avant ou après la période de la ménopause (94).

La principale limite de l'étude du taux d'œstrogènes en période de pré-ménopause est que les niveaux de concentrations de ces hormones varient très largement pendant le cycle menstruel chez la femme, rendant l'étude de l'exposition d'œstrogènes au long terme difficile. De plus, des études incluant des effectifs importants sont faibles à ce jour, tandis que la plupart des autres études sont de taille moyenne voire petite (environ 20-40 patientes). Les cancers du sein chez les jeunes femmes sont aussi rares et aboutissent ainsi plus difficilement à des résultats associés à une puissance statistique forte.

Des scientifiques ont réalisé une méta-analyse en 2011 de sept études prospectives étudiant le lien entre le taux d'E2 endogène et le cancer du sein (693 cas de cancers étudiés). Une association positive entre les taux d'E2 et le cancer du sein a été démontré, et selon ces travaux, des concentrations d'E2 doublées augmenteraient le risque de cancer du sein d'environ 10%. Cependant, les auteurs ont conscience que les variations de concentration plasmatique d'E2 diffèrent considérablement selon les phases du cycle menstruel (folliculaire et lutéale) et que par conséquent ces résultats doivent être confirmés par de nouvelles études étudiant l'impact du taux d'œstrogènes séparément pour chaque phase (95).

2.4.3 Mécanisme de conjugaison des œstrogènes

Un des grands principes de la carcinogénèse est que les composés carcinogènes requièrent souvent une activation métabolique pour former le génotoxique ou le métabolite carcinogène (96). Ce principe implique une balance entre des mécanismes métaboliques d'activation et de désactivation. L'hypothèse que les œstrogènes puissent contribuer au cancer du sein comme composé génotoxique direct, a soulevé la possibilité que la balance entre les œstrogènes activés et désactivés, soit à l'origine d'un potentiel effet carcinogène.

La formation d'œstrogènes conjugués est depuis un certain temps reconnue comme la voie principale de métabolisation des œstrogènes (97). L'œstrone et le 17 β -œstradiol sont biotransformés en œstrogènes conjugués par l'intermédiaire de sulfotransférases (SULTs) et d'UDP-glucuronosyltransférases (UGTs) (Figure 31). Dans le foie, les œstrogènes sont conjugués par glucuronidation et par sulfonation pour permettre leurs excrétions biliaires, urinaires et fécales. Des études ont démontré que 65% du 17 β -œstradiol, 48% de l'œstrone et 23% d'œstriol injectés et marqués radioactivement chez la femme sont retrouvés dans la bile (98). Environ 10 à 15% de 17 β -œstradiol, d'œstrone et d'œstriol injectés et radiomarqués ont été trouvés sous la forme conjugués dans les selles, une proportion significative d'œstrogènes est réabsorbée dans la circulation sanguine (99).

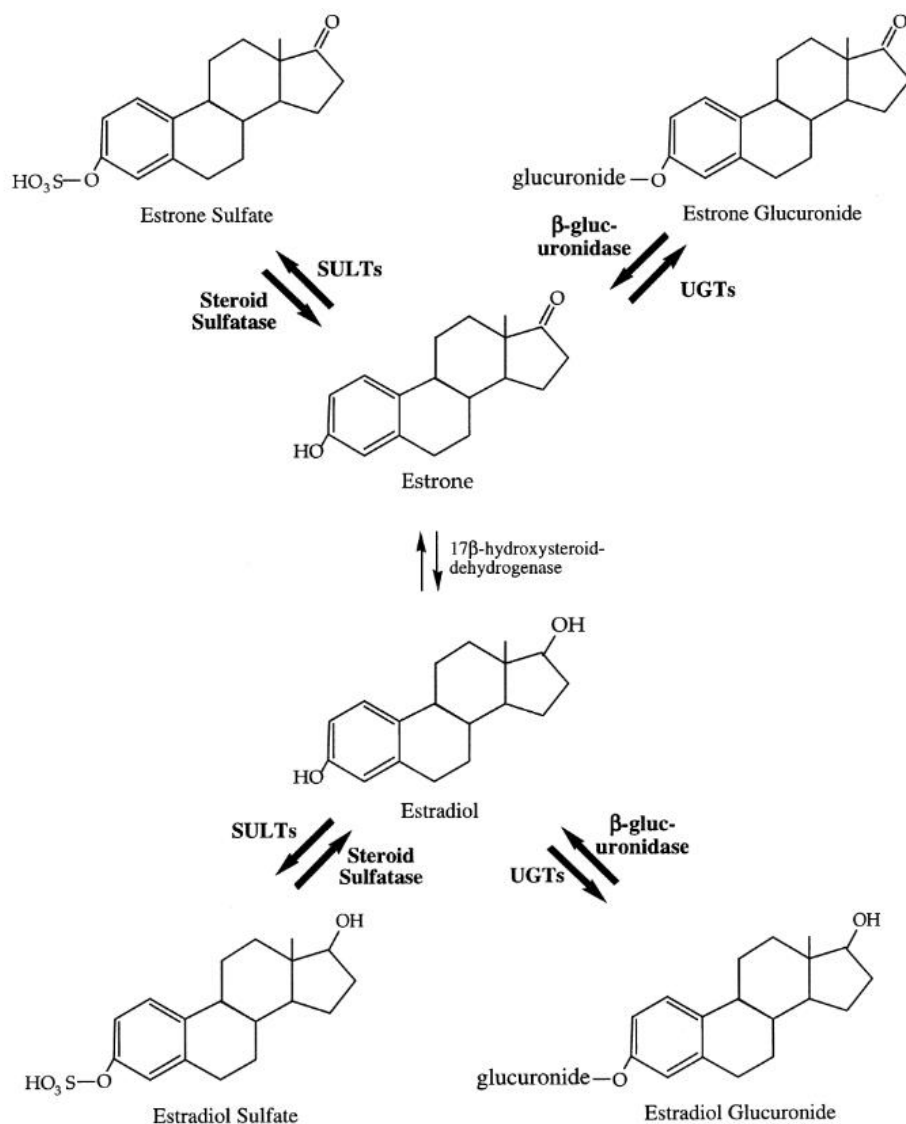


Figure 31. Voies de conjugaison et de déconjugaison de l'œstrone et du 17β-œstradiol (100)

Il convient de noter que les œstrogènes conjugués ne sont pas de bons ligands pour les ERs et donc ne favorisent pas l'activité de ces récepteurs. Il a été démontré que la conjugaison des œstrogènes par les sulfates et les glucuronides permettaient la formation de métabolites oestrogéniques moins actifs, plus polaires et donc plus facilement excrétables.

Le sulfate d'œstrone (forme conjuguée inactive) est le métabolite plasmatique circulant le plus abondant avec des concentrations environ 10 fois supérieures à celles de l'œstrone (forme déconjuguée active) (101). Il est d'ailleurs actuellement envisagé que ce composé inactif en concentration élevé dans le corps humain, serait transporté jusqu'aux tissus cibles, grâce au système circulatoire, puis transféré dans les cellules, et hydrolysé en œstrone par une sulfatase de stéroïde puis en 17β-œstradiol actif par une 17β-hydroxystéroïde

déhydrogénase. Ainsi, l'œstrogène activé peut se lier aux ERs et initier des transcriptions de gènes sensibles à la fixation des ERs. Le transport de sulfate d'œstrone jusqu'aux cellules sensibles aux œstrogènes n'est pas encore bien connu, cependant les études ont démontré qu'un transporteur d'anion appelé OATP1 possède une forte affinité avec les œstrogènes conjugués (sulfate et glucuronide) (102).

Cette transformation cyclique des œstrogènes a été mise en évidence dans les cellules de mammifères où la sulfonation et désulfonation d'hormones stéroïdes représentent un mécanisme important dans la régulation de l'activité des œstrogènes intracellulaire. Au vue de l'importance de l'activité de sulfatase de stéroïdes dans la formation d'œstrogènes intra-tumorale, le développement de traitements inhibiteurs de sulfatase de stéroïdes pour des tumeurs hormono-sensibles a été initié (103).

➤ Sulfonation

La conjugaison d'œstrogènes en sulfates d'œstrogènes est catalysée par plusieurs enzymes de la famille des sulfotransférases (SULTs). Ces enzymes catalysent le transfert de sulfate (SO_3^-) d'un cofacteur enzymatique sur les œstrogènes. Cette activité a été mesurée dans de nombreux tissus humains comme le foie, l'intestin grêle, les reins, l'utérus, le sein... (104) Le niveau d'activité des SULTs sur les œstrogènes est élevé dans le foie humain et contribue significativement aux taux plasmatiques élevés de sulfate d'œstrone.

L'association entre l'activité des SULTs sur les œstrogènes et le cancer du sein a été un sujet de recherche dans le passé. Il a été précédemment démontré que l'expression des SULTs dans les tumeurs du sein était associée positivement au statut hormonal de la tumeur.

Cependant, cette découverte est mise en difficulté par d'autres recherches scientifiques aboutissant à une absence de consensus. Cela s'explique notamment par le fait qu'il existe de multiples enzymes SULTs contribuant à la sulfonation des œstrogènes et une variabilité interindividuelle importante (104). De plus, les SULTs sont sujets à de nombreuses inhibitions dont les isoformes ont des niveaux de sensibilité différents.

➤ Glucuronidation

Les enzymes de glucuronidation sont catalysés par différents composés de la famille des UDP-glucuronosyltransférases (UGTs). Ces enzymes catalysent la conjugaison d'un acide UDP-glucuronique sur les œstrogènes (105). La glucuronidation a été observée dans de nombreux tissus similaires à ceux de l'activité de sulfonation dont le tissu mammaire.

Les œstrogènes glucuronides ont été beaucoup moins étudiés que le sulfate d'œstrone en tant que précurseur d'hormones stéroïdes du fait de leurs plus faibles concentrations plasmatiques et de leurs rôles principaux dans l'excrétion d'œstrogènes conjugués dans les urines et la bile (106).

Il est cependant démontré que les tumeurs du sein expriment des niveaux élevés de β -glucuronidases, enzyme catalysant l'hydrolyse des œstrogènes glucuronides. L'existence du cycle de transformation des œstrogènes glucuronides n'est cependant pas encore démontrée dans le tissu mammaire (107).

III. Microbiote intestinal, œstrogènes et cancer du sein

3.1 Généralités

Les deux premiers chapitres ont permis d'aborder plusieurs éléments importants concernant l'interaction microbiote intestinal-hôte et le développement du cancer du sein. Ainsi, nous avons pu démontrer le rôle considérable du microbiote intestinal sur les grands mécanismes physiologiques locaux et généraux chez l'homme et sa sensibilité aux facteurs extérieurs engendrant des modifications de sa composition. Le microbiote intestinal, considéré comme un organe à part entière peut tout aussi bien être bénéfique, que délétère pour l'hôte.

Tout comme le microbiote intestinal, le cancer du sein se développe lentement et dans un environnement complexe. Les études scientifiques suggèrent que de nombreux facteurs influencent sa survenue et son développement.

Depuis maintenant plusieurs dizaines d'années et grâce aux avancées technologiques en termes d'analyse de composition du microbiote intestinal, les recherches axées sur le lien entre ce dernier et l'apparition du cancer du sein sont facilitées et de nombreuses études tentent de comprendre les mécanismes potentiellement responsables. Ces recherches nous amènent à considérer le microbiote intestinal comme un potentiel arbitre dans l'apparition de certains cancer du sein, en lien avec la régulation du taux d'œstrogènes chez la femme. Cette hypothèse sera présentée dans cette troisième partie.

3.2 Métabolisme des œstrogènes par le microbiote intestinal

➤ Lien entre le microbiote intestinal et le métabolisme des œstrogènes

L'évidence du rôle central du microbiote intestinal dans le métabolisme des œstrogènes a été démontrée en 1969. Des rats exempts de germes appelés axéniques excrétaient des quantités de stéroïdes déconjugués trop faibles dans les selles pour être identifiées par technique de spectrométrie de masse à cette époque, tandis que les rats conventionnels excrétaient des niveaux de stéroïdes déconjugués bien plus importants, reflétant l'activité de déconjugaison des bactéries intestinales résiduelles (108).

Il convient de noter que le rôle du microbiote intestinal chez l'hôte est souvent attribué à l'ensemble des bactéries qui le compose, mais ce sont parfois certaines bactéries spécifiques qui en sont la cause, notamment concernant la métabolisation des œstrogènes.

Des scientifiques se sont intéressés à la capacité de certaines bactéries intestinales à métaboliser les œstrogènes conjugués excrétés dans la bile. Ils ont ainsi défini l'estrobolome, comme l'ensemble des gènes de bactéries capable de métaboliser les œstrogènes conjugués (109).

Comme le rappelle la figure 32, les œstrogènes sont principalement produits par les ovaires, les glandes surrénales et le tissu adipeux. Les œstrogènes subissent un premier métabolisme hépatique où ils sont conjugués par hydroxylation irréversible à la position C-2, C-4 ou C-16 du cycle du stéroïde. Ces œstrogènes conjugués ou métabolites d'œstrogènes sont éliminés du corps humain dans l'urine, la bile ou les selles. Les métabolites d'œstrogènes excrétés dans la bile peuvent être déconjugués par des bactéries intestinales grâce à l'activité d'une sulfatase de stéroïde et d'une β -glucuronidase.

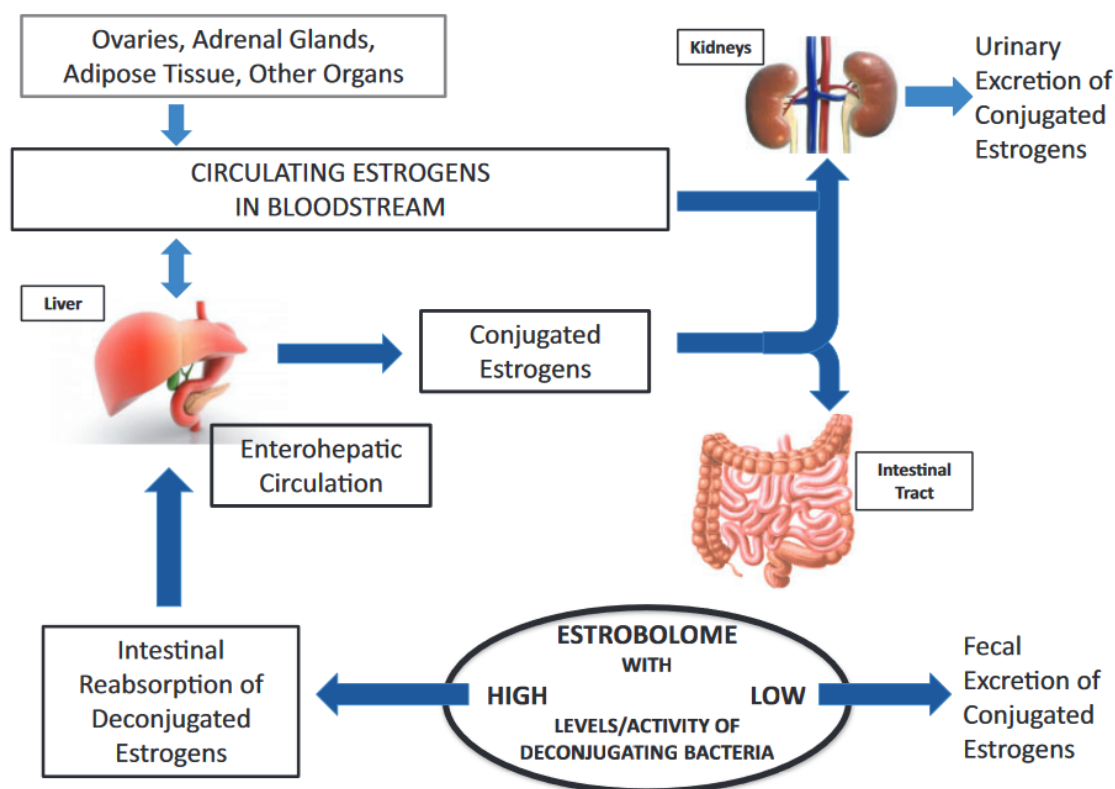


Figure 32. L'estrobolome et son influence sur la circulation entéro-hépatique des œstrogènes (109)

Cette nouvelle métabolisation des œstrogènes permet leur réabsorption dans la circulation sanguine au niveau de l'intestin distal (Figure 33). En modulant la circulation des œstrogènes dans le foie et l'intestin, appelée circulation entéro-hépatique, l'estrobolome affecte l'excrétion des œstrogènes et *in fine* la concentration plasmatique en œstrogènes.

Ainsi, lorsque l'estrobolome est fortement représenté au sein du microbiote intestinal chez la femme, les œstrogènes conjugués éliminés dans la bile sont réabsorbés après déconjugaison en quantité plus importante dans la circulation sanguine et entraîne une augmentation sensible de la concentration plasmatique d'œstrogènes.

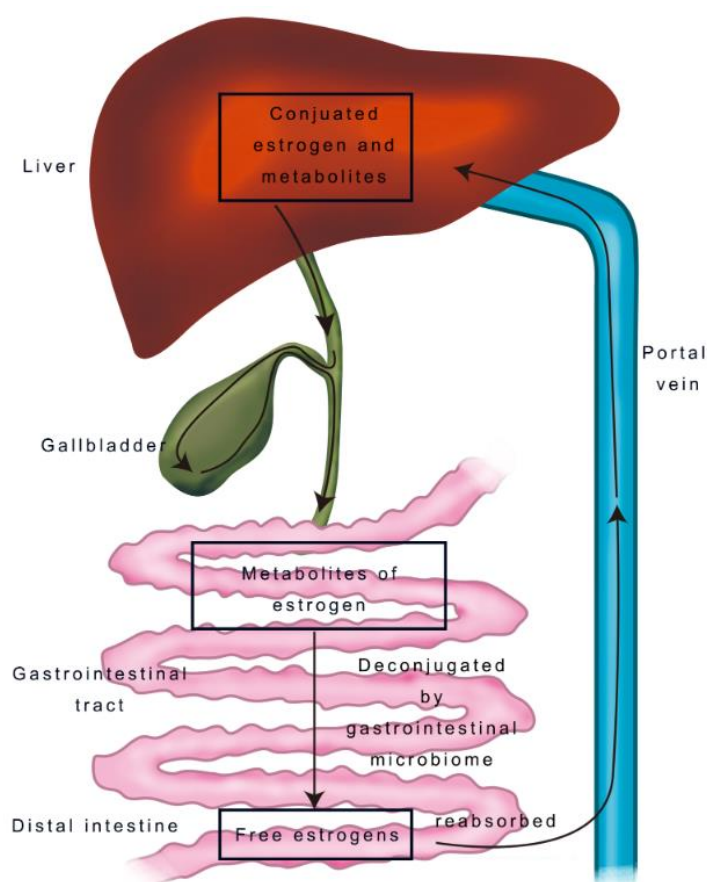


Figure 33. Circulation entéro-hépatique des œstrogènes (110)

En 2015, des chercheurs ont évalué l'association entre la composition du microbiote fécal et la variation des concentrations d'œstrogènes et de métabolites d'œstrogènes urinaires à travers une étude transversale chez 60 femmes saines en post-ménopause (111). Les œstrogènes et leurs métabolites urinaires ont été mesurés grâce à une technique standard (chromatographie en phase liquide- spectrométrie de masse) et le microbiote fécal a été évalué en utilisant le séquençage du gène ARNr 16s bactérien.

L'étude a démontré que la diversité microbienne intestinale est statistiquement positivement associée à l'augmentation du ratio métabolites des œstrogènes/œstrogènes (E1 et E2) urinaires (Figure 34). L'augmentation de ce ratio est directement associée à l'ordre *Clostridiales* avec la famille *Ruminococcaceae*. *Ruminococcus* est le genre le plus positivement associé à l'augmentation de ce ratio, tandis que le genre *Bacteroides* est quant à lui positivement associé à la diminution du ratio.

Comme il a été rappelé précédemment, les métabolites d'œstrogènes sont des composés œstrogéniques moins actifs et plus facilement excrétables. Ainsi des taux élevés de métabolites d'œstrogènes urinaires sont associés à une diminution des concentrations plasmatiques d'œstrogènes non conjugués et donc à un risque réduit de survenue de cancer du sein hormono-dépendant chez la femme. Cette étude suggère donc que le risque de survenue de cancer du sein serait moins élevé chez les femmes en post-ménopause disposant d'une diversité bactérienne fécale élevée.

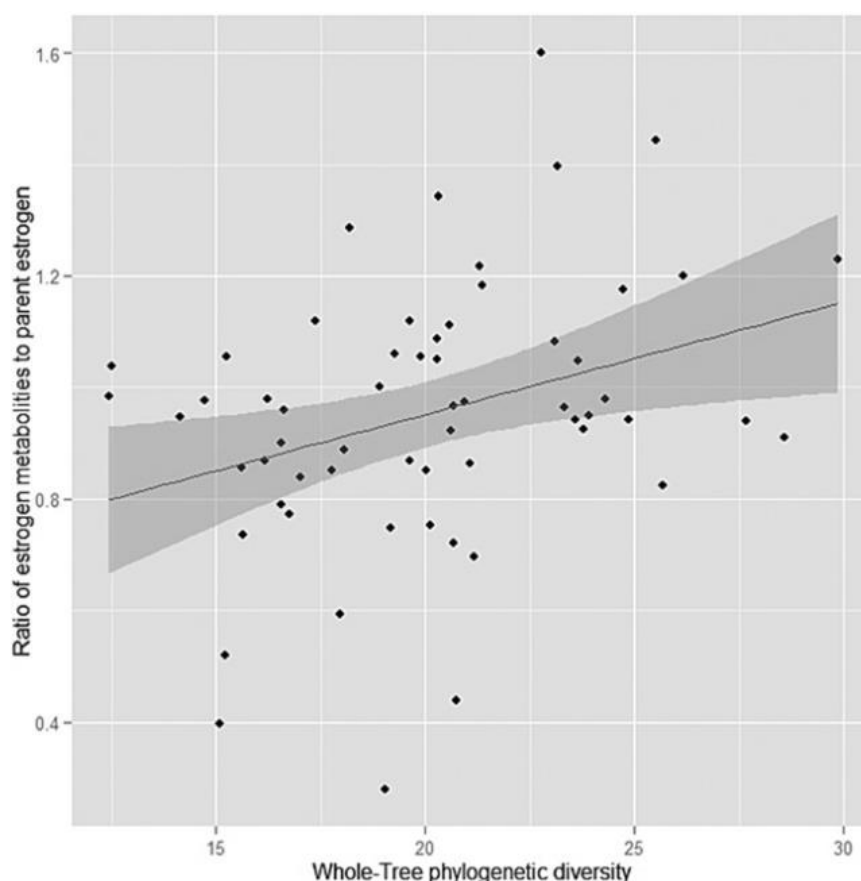


Figure 34. Association linéaire entre la diversité bactérienne fécale et le ratio métabolites d'œstrogènes/œstrogènes urinaires (E1, E2) (111)

Les œstrogènes glucuronides, métabolites d'œstrogènes par conjugaison d'une enzyme UDP-glucuronosyltransférase (UGT) ont été très peu étudiés car ils ne représentent qu'une faible concentration plasmique des métabolites d'œstrogènes et ont un fort potentiel excrétables (106). Cependant, l'enzyme β -glucuronidase est quant à elle nettement plus étudiée pour son rôle de déconjugaison des œstrogènes glucuronides (Figure 35).

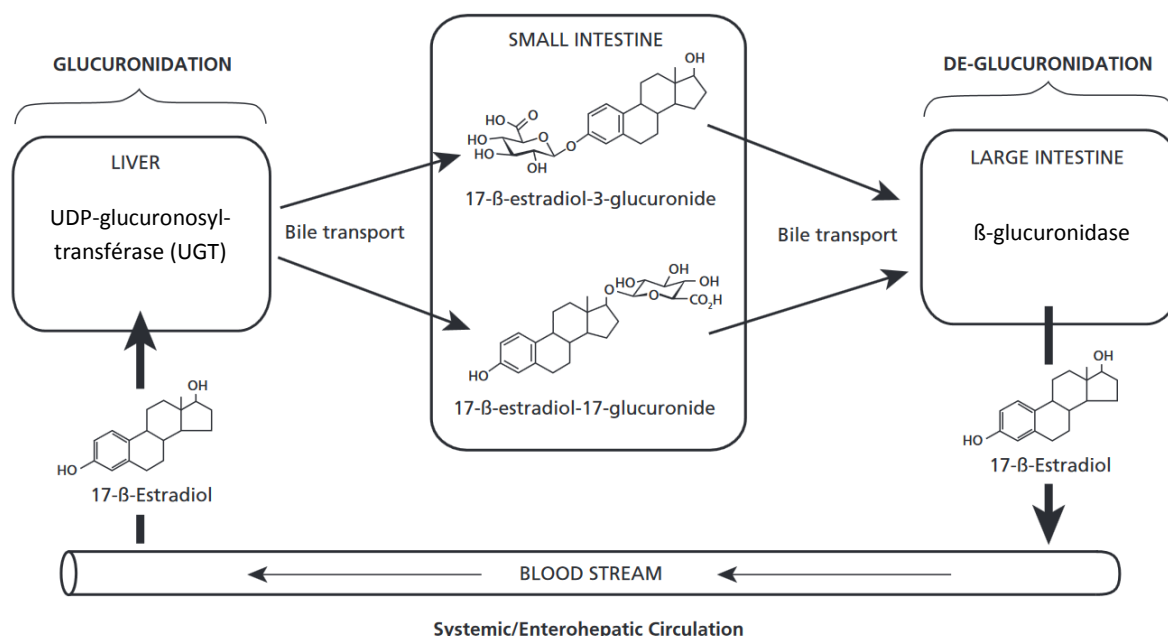


Figure 35. Cycle de glucuronidation et déglucuronidation du 17 β -œstradiol (E2) (112)

Les mêmes scientifiques ayant travaillé sur les ratios d'œstrogènes urinaires ont ensuite démontré la relation entre la richesse du microbiote intestinal, les œstrogènes fécaux et plasmatiques et l'activité des β -glucuronidases chez la femme post ménopausée et chez l'homme (113). Ils ont ainsi confirmé que la diversité bactérienne fécale influençait positivement l'excrétion des œstrogènes plasmatiques *via* des métabolites urinaires, mais ont aussi mis en évidence que l'activité de l'enzyme β -glucuronidase diminuait les taux d'œstrogènes et de métabolites d'œstrogènes fécaux.

En d'autres termes, plus l'activité de la β -glucuronidase est importante au sein du microbiote fécal et plus les œstrogènes éliminés par la bile sont réabsorbés dans la circulation sanguine et entéro-hépatique (Figure 36).

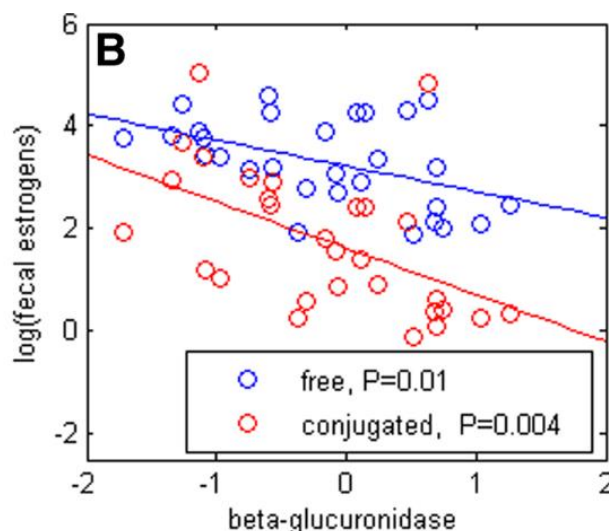


Figure 36. Corrélation entre l'activité de la β -glucuronidase et le taux d'œstrogènes et de métabolites d'œstrogènes fécaux chez 22 hommes et 7 femmes post-ménopausées (113)

Ces études ont démontré le lien étroit entre la diversité du microbiote intestinal, l'influence de certains genres bactériens le composant, et la métabolisation des œstrogènes. Il est aujourd'hui essentiel d'obtenir des données puissantes et fiables concernant le lien direct entre la composition du microbiote intestinal et le risque de survenue du cancer du sein hormono-dépendant ER⁺.

➤ Lien entre le microbiote intestinal, métabolisme des œstrogènes et cancer du sein

Les études scientifiques démontrant la relation directe entre le cancer du sein et le microbiote intestinal sont très limitées à ce jour (tableau III). Deux de ces études sont présentées dans cette partie.

Goedert et al.

Cette étude cas-témoins a comparé le microbiote intestinal de 48 femmes post-ménopausées atteintes de cancer du sein en prétraitement (tumeurs : 42 ER⁺, 37 PR⁺, 5 HER2⁺) et de 48 femmes saines (114).

Une différence de distribution des espèces bactériennes du microbiote fécal a été démontrée significativement entre ces deux groupes avec une plus faible diversité du microbiote fécal chez les femmes atteintes de cancer versus contrôle. Certains genres bactériens ont notamment été observés à des taux plus élevés chez les patientes versus

groupe contrôle de l'ordre de 1% ou plus appartenant particulièrement à l'ordre *Clostridiales* (genre *Clostridiaceae* et *Ruminococcaceae*, famille *Faecalibacterium*).

De plus, l'odds ratio du cancer du sein diminue significativement avec la diversité du microbiote fécal, respectivement de 80% et de 70% pour le tertile médian et le tertile le plus élevé par rapport au tertile référent (Figure 37). Il convient de noter que cette relation n'est cependant pas linéaire.

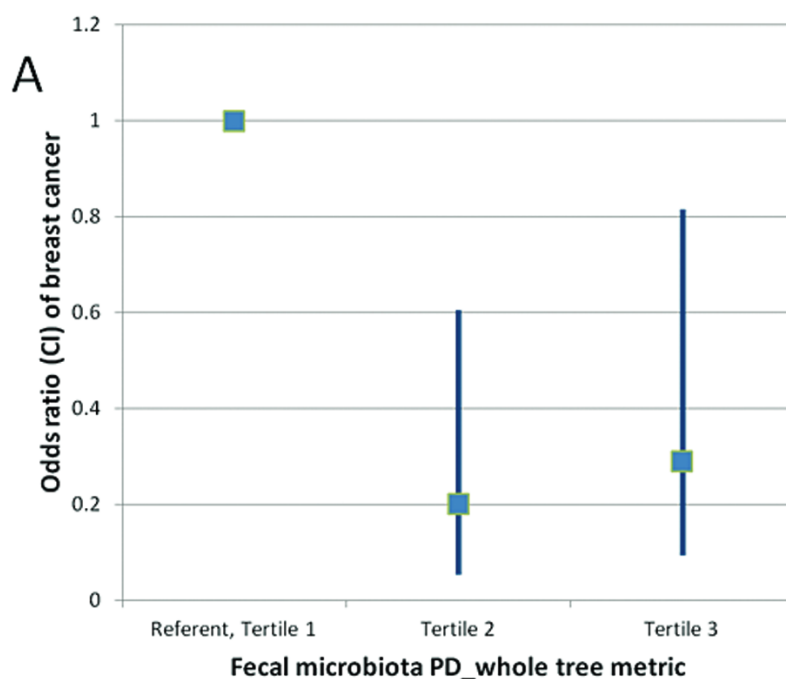


Figure 37. Odds ratio du cancer du sein par tertile de diversité microbienne intestinale (114)

Bard et al.

Cette étude a pour but d'évaluer la relation entre la composition du microbiote intestinal et les caractéristiques clinico-biologiques (stade clinique du cancer du sein et indice de masse corporel ou IMC) de femmes atteintes de cancer du sein. Des données cliniques et des échantillons fécaux de 32 femmes atteintes de cancer du sein au stade précoce ont été collectés avant toute intervention thérapeutique. La plupart des patientes étaient atteintes de cancer lobulaires invasifs (84%), stade 0 (49%), grade histologique II (61,3%), ER⁺/PR⁺ (90%) et HER2⁺ (15%).

Une diminution du nombre total de *Firmicutes*, *F. prausnitzii*, *Blautia* sp et *E. lenta* a été démontrée chez les patientes obèses ou en surpoids versus patientes avec un IMC normal.

L'espèce *Blautia sp* est retrouvée en plus forte abondance chez les patientes avec un grade plus élevé. Pour évaluer les différences de composition microbienne en fonction du stade clinique, deux groupes ont été constitués : stade 0-I versus stade II-III. Aucune différence significative du nombre total de bactéries n'a été observée entre ces deux groupes. Cependant, les nombres totaux de *Bacteroidetes*, *Clostridium coccoides*, *C. leptum*, *F. prausnitzii* et *Blautia sp* sont significativement supérieurs dans le groupe stade II-III versus groupe stade 0-I.

Cette étude souligne le fait que certaines bactéries du microbiote intestinal sont présentes en plus grand nombre chez des patientes atteintes de cancer du sein avec des grades ou stades élevés. Cependant, il est nécessaire de confirmer la relation entre ces différences de composition et la survenue de cancer du sein (115).

Tableau III. Etudes cliniques étudiant le rôle du microbiote intestinal sur le métabolisme des œstrogènes et le cancer du sein

Etude	Type d'étude	Taille échantillon	Résultats	Bactéries concernées
Fuhrman (111)	Etude transversale	60	Une diversification du microbiote fécal chez les femmes saines en post-ménopause entraîne une augmentation du ratio métabolites d'œstrogènes-œstrogènes urinaires.	Augmentation du ratio métabolites d'œstrogènes-œstrogènes urinaires : ○ Ordre <i>Clostridiales</i> ○ Famille <i>Ruminococcaceae</i> ○ Genre <i>Ruminococcus</i>
Goedert (114)	Etude cas-témoins	96	Les femmes post-ménopausées atteintes de cancer du sein ont un microbiote fécal altéré avec une faible diversité.	Augmentation de la présence chez les femmes atteintes de cancer du sein : ○ Famille <i>Clostridiaceae</i> ○ Famille <i>Ruminococcaceae</i> ○ Genre <i>Faecalibacterium</i>
Bard (115)	Etude transversale	31	Différence significative de la composition du microbiote fécal chez des femmes atteintes de cancer du sein au stade précoce en fonction du stade clinique, du grade de la tumeur et de l'IMC.	Augmentation de la présence chez les femmes atteintes de cancer du sein de stade clinique II-III : ○ <i>Phylum Bacteroidetes</i> ○ <i>Clostridium coccoides</i> ○ <i>Clostridium leptum</i> ○ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ○ <i>Blautia sp</i>
Minelli (116)	Etude cas-témoins	48	La composition du microbiote fécal chez les femmes atteintes de cancer du sein diffère de celui des femmes saines en termes d'abondance et de diversité bactérienne.	Augmentation de la présence chez les femmes atteintes de cancer du sein : ○ Classe <i>Clostridia</i> (pré-ménopause, ménopause stade tardif) ○ Genre <i>Lactobacillus</i> (pré-ménopause, ménopause stade précoce, ménopause stade tardif) ○ Genre <i>Bacteroides</i> (pré-ménopause, ménopause stade précoce) ○ <i>E. coli</i> (ménopause stade précoce)

Les bactéries de l'ordre *Clostridiales* (clusters *C. coccoides*, *C. leptum*), l'espèce *F. prausnitzii* et la famille *Ruminococcaceae* sont les plus étudiées dans les résultats corrélant le microbiote intestinal au métabolisme des œstrogènes.

Le microbiome module les concentrations plasmatiques d'œstrogènes grâce à son activité de déconjugaison des métabolites d'œstrogènes qui pourrait affecter le risque de survenue de cancer hormono-dépendant dont le cancer du sein ER⁺. A ce jour, l'activité de déconjugaison du microbiote intestinal la plus étudiée est l'activité de l'enzyme β -glucuronidase.

Les gènes de la β -glucuronidase provenant du microbiote intestinal ont été décrits depuis plusieurs dizaines d'années. Le gène *gus* est communément retrouvé dans le microbiote intestinal, tandis que le gène *BG* a été plus récemment décrit par analyse du métagénome. Au sein du microbiote intestinal, le gène *BG* est bien représenté à travers les *phyla Bacteroidetes* et *Firmicutes* tandis que le gène *gus* est plus exprimé chez le *phylum Firmicutes* (117).

La structure des β -glucuronidases bactériennes contient une asparagine et une lysine (motif N-K) au sein du site actif modulant l'activité fonctionnelle de l'enzyme. Une autre enzyme appelée β -galactosidase ne contenant pas ce motif N-K et se différenciant par les positions C-4 et C-5 a été retrouvée dans les cellules bactériennes et catalyse l'hydrolyse des mêmes substrats.

De nombreuses genres et espèces bactériennes du microbiote intestinal contiennent des gènes codant pour la β -glucuronidase et β -glucuronidase chez l'homme (tableau IV), soulignant la prévalence de cette enzyme et étendant les observations précédentes sur les bactéries ayant une activité de déconjugaison des œstrogènes.

Tableau IV. Principales genres bactériens codant pour les enzymes β -glucuronidase et/ou la β -galactosidase (109)

Genres bactériens	β -glucuronidase	β -galactosidase
<i>Bacteroides</i>	+	+
<i>Bifidobacterium</i>	+	+
<i>Clostridium</i>	+	+
<i>Escherichia</i>	+	+
<i>Faecalibacterium</i>	+	+
<i>Lactobacillus</i>	+	+
<i>Roseburia</i>	+	+
<i>Bacteroides</i>	-	+
<i>Bifidobacterium</i>	-	+
<i>Butyrivibrio</i>	-	+
<i>Enterobacter</i>	-	+
<i>Staphylococcus</i>	-	+
<i>Streptococcus</i>	-	+
<i>Ruminococcus</i>	-	+
<i>Roseburia</i>	-	+

De plus, une étude a permis d'identifier une classe unique de β -glucuronidase (H11G11-BG) chez les *Firmicutes* dont de nombreuses espèces appartiennent à des genres bactériens déjà connus pour leurs activités de β -glucuronidase et leurs potentiels liens avec la survenue de cancer du sein : *Clostridium bartlettii*, *Ruminococcus gnavus*, *Roseburia inulinivorans*, et *Faecalibacterium prausnitzii* (118) (Figure 38). Cette classe unique de β -glucuronidase est retrouvée aussi chez certaines espèces du genre *Bacteroides*, et est donc présente dans les deux groupes bactériens responsables de la majorité de la voie métabolique de déglucuronidation dans l'intestin chez l'Homme.

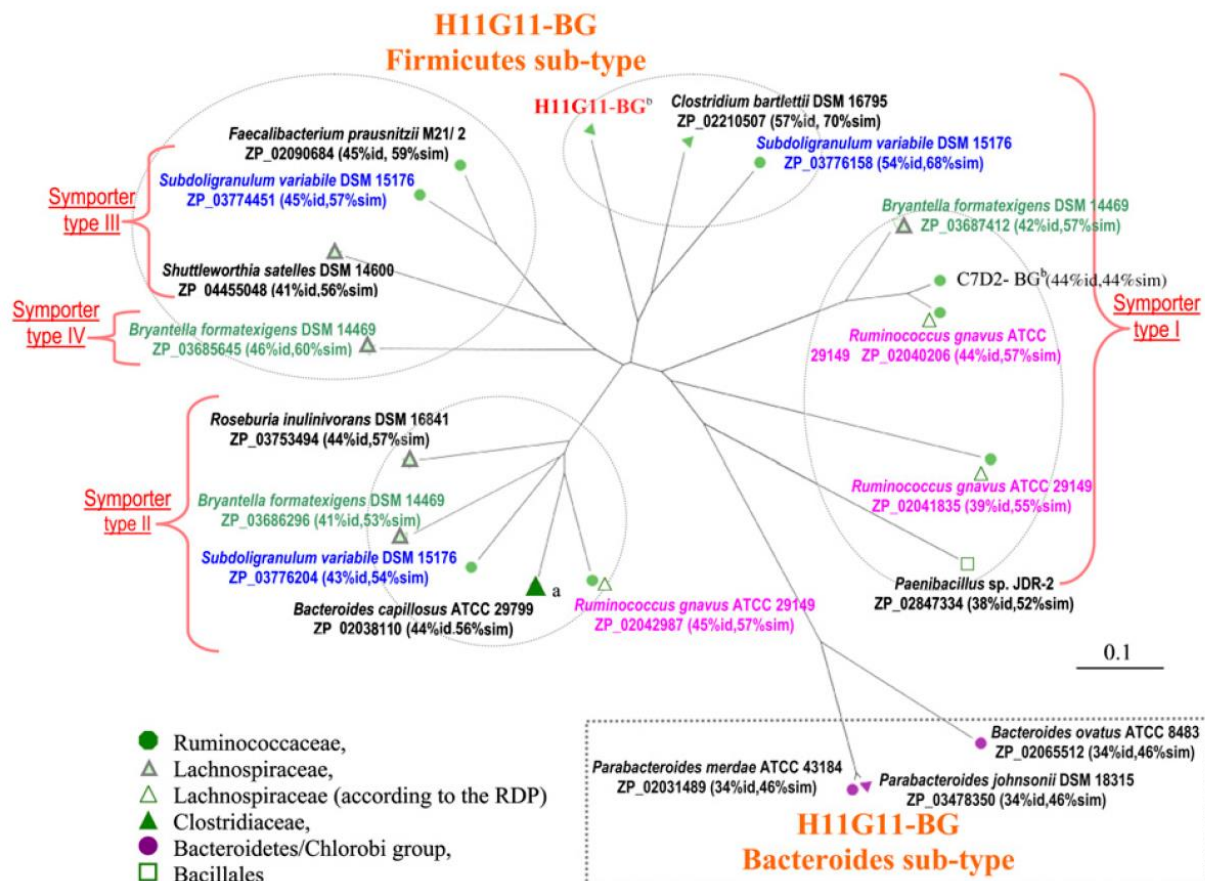


Figure 38. Identification d'une classe unique de β -glucuronidase (H11G11-BG) chez certaines espèces de Firmicutes et Bacteroides (118)

Les différents travaux menés actuellement tentent donc d'identifier non seulement les bactéries possédant une activité de β -glucuronidase élevée, mais aussi les gènes les plus représentés et les plus actifs physiologiquement codant pour cette enzyme.

Malgré le peu de données concernant le lien direct entre l'activité de la β -glucuronidase et le cancer du sein, cette enzyme apparait comme l'une des causes biologiques qui pourrait favoriser l'augmentation du risque de cancer du sein chez la femme.

3.3 Les habitudes alimentaires responsables de la modulation de l'activité de β -glucuronidase

La composition du microbiote intestinal est affectée en grande partie par le mode de vie comme l'alimentation pouvant favoriser la sélection de certaines populations bactériennes au dépend d'autres (29,119). Ainsi, certaines habitudes alimentaires vont moduler

quantitativement et qualitativement le microbiote intestinal et donc l'activité de la β -glucuronidase.

L'augmentation de l'activité de la β -glucuronidase a été observée chez des sujets sains consommant des aliments élevés en matières grasses ou en protéines, tandis qu'une consommation de fibres, à base de végétaux et faible en protéines animales diminue son activité. Cette activité est donc largement augmentée chez les consommateurs de viandes contrairement aux végétariens (120).

De plus, un régime omnivore (végétaux et viandes) est associé positivement à une augmentation de la quantité de bactéries intestinales appartenant au cluster Clostridial XIVa (*Eubacterium sp*, *Roseburia sp*, *Butyrivibrio sp*) ayant une activité de β -glucuronidase élevée (121).

Des recherches sur l'activité de la β -glucuronidase lors de la croissance en culture d'*E. coli* ont permis de mettre en évidence que cette activité est contrôlée par la densité de population bactérienne, suggérant la présence d'un quorum sensing *in vivo* affectant le niveau d'activité de l'enzyme (122). L'expression du gène de l'enzyme β -glucuronidase pourrait donc être influencée par la densité du microbiote intestinal sinon sa diversité pour atteindre le quorum sensing et augmenter son activité.

Enfin, une étude clinique nutritionnelle a été réalisée pour suivre l'influence du changement de régime alimentaire sur l'activité de la β -glucuronidase chez des végétariens. Les individus du groupe test ont adopté un régime alimentaire strictement végétarien pendant 1 mois, puis ont adopté des habitudes alimentaires conventionnelles pendant le second mois.

Ce groupe test a été comparé à un groupe contrôle ayant suivi le régime alimentaire conventionnel omnivore pendant les deux mois d'étude. L'activité de la β -glucuronidase a été mesurée dans les selles et une augmentation d'environ 33% a été observée chez les individus du groupe test, suite au changement d'alimentation. Les activités de ces enzymes reviennent à des valeurs normales après 2 semaines de reprise du régime alimentaire végétarien (123).

Cette étude soutient une hypothèse soulevée auparavant dans des travaux scientifiques s'intéressant à l'excrétion des œstrogènes chez les femmes végétariennes. Ainsi, les femmes

adoptant un régime végétarien excrètent 2 à 3 fois plus d'œstrogènes dans les selles que les femmes adoptant un régime conventionnel omnivore. Les scientifiques confirment qu'une quantité plus importante d'œstrogènes a échappé à la réabsorption et a été éliminée dans les selles (124).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'intérêt scientifique porté sur le microbiote intestinal et ses potentiels effets bénéfiques est en net augmentation depuis ces dernières années, notamment poussé par les avancées technologiques.

Les recherches scientifiques permettant d'étudier les interactions entre le microbiote intestinal et le cancer du sein couvrent un large spectre de disciplines, incluant la microbiologie, l'oncologie, l'endocrinologie, la recherche préclinique, l'épidémiologie, les bio-statistiques et la bio-informatique. Les études cliniques traitant ce sujet nécessitent donc la collaboration de différents scientifiques spécialistes de ces disciplines.

Pour conforter des résultats encourageants, il est aussi indispensable de pouvoir recueillir des données scientifiques provenant de grands échantillons représentatifs de la population féminine, notamment en termes de facteurs de risque du cancer du sein. De grandes études épidémiologiques longitudinales sur le cancer du sein devraient inclure au sein de leurs protocoles la création de bio-banques d'échantillons fécaux. Les principales contraintes seraient tout d'abord d'obtenir un accord entre les différentes parties prenantes des études pour pouvoir manipuler ces échantillons, puis d'assurer une standardisation de la collecte, de la conservation et de la manipulation des échantillons afin d'éviter les biais. Pour cela, la création de projets à l'échelle européenne voire internationale, serait un avantage considérable dans l'avancée des connaissances scientifiques concernant le microbiote intestinal et le cancer du sein.

Les modèles animaux sont aussi de précieux outils pour comprendre les variations de composition du microbiote intestinal, car ils permettent de tester des hypothèses sous certaines conditions spécifiques, difficiles voire non réalisables chez l'Homme. Cependant, les études chez l'Homme à grande échelle restent nécessaires pour identifier et confirmer les effets biologiques en lien avec des facteurs de risque (génétiques, alimentaires, environnementaux) affectant le microbiote intestinal.

Idéalement, les prochaines investigations devraient être menées sur des échantillons de population importants et sur des modèles animaux en ciblant dans les protocoles les

bactéries intestinales responsables de l'activité de la β -glucuronidase. Cela permettrait de confirmer scientifiquement l'association entre l'activité de la β -glucuronidase et le cancer du sein, mais aussi de cibler les patientes pouvant être concernées par de potentielles avancées en termes de prévention du cancer du sein.

En effet, comme présenté dans le troisième chapitre de cette thèse, les différences de composition du microbiote intestinal influencent les taux plasmatiques d'œstrogènes. Une diversité élevée du microbiote intestinal permettrait de diminuer les taux plasmatiques d'œstrogènes et par conséquent diminuerait le risque de survenue de cancer du sein hormono-dépendant. L'abondance de certains *phyla*, ordres, groupes ou espèces bactériennes pourraient donc, à terme être considérée comme un facteur aggravant concernant le risque de survenue de cancer du sein hormono-dépendant.

Si les premiers résultats se confirment et sont suffisamment puissants d'un point de vue biologique et statistique, le microbiote intestinal pourrait être pris en compte dans l'appréciation du risque de survenue de cancer du sein. Une simple collecte d'échantillon fécal permettrait de connaître le degré de susceptibilité d'augmentation du taux d'œstrogènes plasmatiques par l'activité de la β -glucuronidase. Un suivi renforcé pendant les périodes de dépistage pourrait être encouragé par la découverte d'une forte expression de β -glucuronidase chez certaines patientes jusqu'alors non considérées à risque. L'objectif principal de cette prévention primaire serait de diminuer l'incidence du cancer du sein hormono-dépendant chez ces catégories de patientes.

De plus, il faut noter que la composition du microbiote intestinal est interconnectée avec d'autres facteurs de risque du cancer du sein préétablis comme l'obésité et les habitudes alimentaires, l'alcool, l'âge, tous entraînant une dysbiose intestinale. Par exemple, après connaissance de la composition du microbiote fécal, un régime alimentaire spécifique adopté chez des femmes obèses en post ménopause permettrait de contrôler non seulement ce facteur de risque mais aussi de pouvoir entraîner une diminution du taux plasmatique d'œstrogènes en modifiant la composition du microbiote intestinal.

Il convient d'admettre que toutes ces hypothèses restent à démontrer scientifiquement, mais il reste facilement concevable de penser qu'au vue des interactions étroites entre le

microbiote intestinal et son hôte, les prochaines découvertes ou hypothèses validées permettront de poursuivre ces efforts scientifiques sur des cibles différentes.

En effet, une étude clinique néerlandaise devrait être menée, pendant deux ans à partir de la fin de l'année 2017, avec pour objectif de démontrer chez la femme atteinte de cancer du sein hormono-dépendant en post-ménopause premièrement l'influence de la composition du microbiote intestinal et de l'activité de la β -glucuronidase sur les taux plasmatiques d'œstrogènes lors d'une thérapie par inhibiteur de l'aromatase et deuxièmement l'influence de la composition du microbiote intestinal sur les taux plasmatiques d'endoxifène, métabolite actif du tamoxifène utilisé en hormothérapie (125).

Pour conclure, cette volonté d'individualiser la prévention et le traitement de patientes atteintes de cancer du sein est très intéressante et encourageante car la notion de médecine personnalisée est en passe de devenir le fondement des soins de demain.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mystery microbes in our gut could be a whole new form of life [Internet]. New Scientist. [cité 26 mars 2017]. Disponible sur: <https://www.newscientist.com/article/mg22830474-800-mystery-microbes-in-our-gut-could-be-a-whole-new-form-of-life/>
2. The human intestinal microbiota - main.pdf [Internet]. [cité 4 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/showarticlefile/267520/main.pdf>
3. Chapitre 2 th 2 5ème : l'entrée du glucose dans le sang - SVTMARTIN [Internet]. [cité 27 mars 2017]. Disponible sur: <https://sites.google.com/site/martinsvt38/5eme/5eme-theme-2-le-fonctionnement-de-l-organisme/chapitre-2-th-2-5eme-l-entree-du-glucose-dans-le-sang>
4. Funkhouser LJ, Bordenstein SR. Mom Knows Best: The Universality of Maternal Microbial Transmission. *PLOS Biol.* 20 août 2013;11(8):e1001631.
5. Fouhy F, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C, Cotter PD. Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. *Gut Microbes.* juin 2012;3(3):203-20.
6. Stark PL, Lee A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J Med Microbiol.* mai 1982;15(2):189-203.
7. Arrieta M-C, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM, Finlay B. The Intestinal Microbiome in Early Life: Health and Disease. *Front Immunol* [Internet]. 5 sept 2014 [cité 15 nov 2016];5. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4155789/>
8. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal Microbiota of 6-week-old Infants Across Europe: Geographic Influence Beyond Delivery Mode, Breast-feeding, and Antibiotics. *ResearchGate.* 1 juill 2010;51(1):77-84.
9. Masson E. Métagénomique du microbiote intestinal : les applications potentielles [Internet]. EM-Consulte. [cité 4 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/267536/metagenomique-du-microbiote-intestinal-les-applica>
10. Barbut F, Joly F. Le microbiote intestinal : équilibre et dysbiose. *Hépatogastro Oncol Dig.* 1 nov 2010;17(6):511-20.
11. Classification scientifique des espèces. In: Wikipédia [Internet]. 2017 [cité 12 mars 2017]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Classification_scientifique_des_esp%C3%A8ces&oldid=134213190
12. Masson E. The human intestinal microbiota [Internet]. EM-Consulte. [cité 4 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/267520/the-human-intestinal-microbiota>
13. Flore microbienne intestinale: physiologie et pathologie digestives. John Libbey Eurotext; 2004. 274 p.
14. Lepage P, Seksik P, Sutren M, de la Cochetière M-F, Jian R, Marteau P, et al. Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis.* mai 2005;11(5):473-80.
15. Chap-13_Fondamentaux-pathologie-digestive_Octobre-2014 - chap-13_fondamentaux-pathologie-digestive_octobre-2014.pdf [Internet]. [cité 5 janv 2017]. Disponible sur:

http://www.snfge.org/sites/default/files/SNFGE/Formation/chap-13_fondamentaux-pathologie-digestive_octobre-2014.pdf

16. Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, et al. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol.* 2012;13(6):R42.
17. Marteau P, Pochart P, Doré J, Béra-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. Comparative Study of Bacterial Groups within the Human Cecal and Fecal Microbiota. *Appl Environ Microbiol.* oct 2001;67(10):4939-42.
18. Campeotto F, Waligora-Dupriet A-J, Doucet-Populaire F, Kalach N, Dupont C, Butel M-J. Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroentérologie Clin Biol.* mai 2007;31(5):533-42.
19. Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2001;107(1):129-34.
20. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29 juin 2010;107(26):11971-5.
21. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 2009;9:123.
22. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 mars 2011;108(Suppl 1):4586-91.
23. Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, et al. Through Ageing, and Beyond: Gut Microbiota and Inflammatory Status in Seniors and Centenarians. *PLoS ONE* [Internet]. 17 mai 2010 [cité 17 févr 2017];5(5). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871786/>
24. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly (PDF Download Available). *ResearchGate* [Internet]. [cité 17 févr 2017]; Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/229152782_Gut_microbiota_composition_correlates_with_diet_and_health_in_the_elderly
25. Blaser MJ. The microbiome revolution. *J Clin Invest.* 1 oct 2014;124(10):4162-5.
26. Albenberg LG, Wu GD. Diet and the Intestinal Microbiome: Associations, Functions, and Implications for Health and Disease. *Gastroenterology.* mai 2014;146(6):1564-72.
27. Zivkovic AM, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci.* 15 mars 2011;108(Supplement 1):4653-8.
28. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 août 2010;107(33):14691-6.
29. Modi SR, Collins JJ, Relman DA. Antibiotics and the gut microbiota [Internet]. 2014 [cité 12 janv 2017]. Disponible sur: <https://www.jci.org/articles/view/72333/pdf>

30. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol WJG*. 7 août 2015;21(29):8787-803.
31. OMS | Résistance aux antibiotiques [Internet]. WHO. [cité 23 févr 2017]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/fr/>
32. EM microbiote intestinal.pdf.
33. Masson E. Activités métaboliques du microbiote intestinal humain [Internet]. EM-Consulte. [cité 4 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/267535/activites-metaboliques-du-microbiote-intestinal-hu>
34. Flore microbienne intestinale: physiologie et pathologie digestives. John Libbey Eurotext; 2004. 274 p.
35. Meresse B, Cerf-Bensussan N. Innate T cell responses in human gut. *Semin Immunol*. juin 2009;21(3):121-9.
36. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 4: 478-485 (PDF Download Available) [Internet]. ResearchGate. [cité 8 mars 2017]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/8532665_Macpherson_AJ_Harris_NL_Interactions_between_commensal_intestinal_bacteria_and_the_immune_system_Nat_Rev_Immunol_4_478-485
37. Les fonctions majeures du microbiote intestinal (PDF Download Available) [Internet]. [cité 8 mars 2017]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/250766139_Les_fonctions_majeures_du_microbiote_intestinal
38. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*. oct 2004;17(4):840-62.
39. Cardona ME. Effect of probiotics on five biochemical microflora-associated characteristics, in vitro and in vivo. *Food Nutr Res*. 1 juin 2002;46(2):73-9.
40. Böttcher MF, Nordin EK, Sandin A, Midtvedt T, Björkstén B. Microflora-associated characteristics in faeces from allergic and nonallergic infants. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. nov 2000;30(11):1590-6.
41. Infections de *Salmonella typhimurium* chez microbiologiste - source-r.com [Internet]. [cité 19 sept 2017]. Disponible sur: <http://www.source-r.com/infections-de-salmonella-typhimurium-chez-microbiologiste/>
42. Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer K-H, et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol*. sept 2014;12(9):635-45.
43. Arnold JW, Roach J, Azcarate-Peril MA. Emerging Technologies for Gut Microbiome Research. *Trends Microbiol*. nov 2016;24(11):887-901.
44. Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet TIG*. mars 2008;24(3):133-41.
45. Cancer today [Internet]. [cité 10 mai 2017]. Disponible sur: <http://gco.iarc.fr/today/home>

46. Dernières statistiques mondiales sur le cancer - pr223_F.pdf [Internet]. [cité 10 mai 2017]. Disponible sur: https://www.iarc.fr/fr/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_F.pdf
47. OMS | Cancer du sein: prévention et lutte contre la maladie [Internet]. [cité 24 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/fr/>
48. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 1 mars 2015;65(2):87-108.
49. Globocan 2012 - Home [Internet]. [cité 10 mai 2017]. Disponible sur: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
50. WHO | The global burden of disease: 2004 update [Internet]. WHO. [cité 24 avr 2017]. Disponible sur: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/
51. Institut National Du Cancer - Accueil [Internet]. [cité 29 mars 2017]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/>
52. Bertos NR, Park M. Breast cancer — one term, many entities? *J Clin Invest*. 3 oct 2011;121(10):3789-96.
53. Leading expert claims effective treatment for DCIS is vital for continued reduction in Australia's breast cancer mortality rate [Internet]. [cité 19 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.mq.edu.au/newsroom/2014/08/18/leading-expert-claims-effective-treatment-for-dcis-is-vital-for-continued-reduction-in-australias-breast-cancer-mortality-rate/>
54. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 17 août 2000;406(6797):747-52.
55. Molecular Subtypes of Breast Cancer | Susan G. Komen® [Internet]. [cité 5 juin 2017]. Disponible sur: <http://ww5.komen.org/BreastCancer/SubtypesofBreastCancer.html>
56. Le cancer du sein : points clés - Cancer du sein | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 24 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Les-points-cles>
57. TNM | UICC [Internet]. [cité 22 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.uicc.org/resources/tnm>
58. Anderson BO, Yip C-H, Smith RA, Shyyan R, Sener SF, Eniu A, et al. Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries. *Cancer*. 15 oct 2008;113(S8):2221-43.
59. IARC_50years-FR-web-12.pdf [Internet]. [cité 23 mai 2017]. Disponible sur: http://www.iarc.fr/fr/publications/books/iarc50/IARC_50years-FR-web-12.pdf
60. Guideline implementation for breast healthcare in low- and middle-income countries - Yip - 2008 - Cancer - Wiley Online Library [Internet]. [cité 2 mai 2017]. Disponible sur: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.23842/abstract>
61. Le programme de dépistage organisé - Dépistage du cancer du sein | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 24 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Depistage-et-detection-precoce/Depistage-du-cancer-du-sein/Le-programme-de-depistage-organise>

62. World Cancer Report 2008 [Internet]. [cité 1 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/>
63. Earlier detection of breast cancer by computer assisted decision making in screening - Diagnostic Image Analysis Group [Internet]. [cité 24 mai 2017]. Disponible sur: http://www.diagnijmegen.nl/index.php/Earlier_detection_of_breast_cancer_by_computer_assisted_decision_making_in_screening
64. Le programme de dépistage organisé - Dépistage du cancer du sein | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 24 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Depistage-et-detection-precoce/Depistage-du-cancer-du-sein/Le-programme-de-depistage-organise>
65. Risk of second breast cancer in female Hodgkin's lymphoma survivors: a meta-analysis. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 6 juin 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22639888>
66. Yaffe MJ, Mainprize JG. Risk of radiation-induced breast cancer from mammographic screening. *Radiology*. janv 2011;258(1):98-105.
67. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet Lond Engl*. 27 oct 2001;358(9291):1389-99.
68. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 5 juin 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9180149>
69. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 5 juin 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17416853>
70. van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun SS, Adami HO, Beeson L, Folsom AR, et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol*. 15 sept 2000;152(6):514-27.
71. Keum N, Greenwood DC, Lee DH, Kim R, Aune D, Ju W, et al. Adult weight gain and adiposity-related cancers: a dose-response meta-analysis of prospective observational studies. *J Natl Cancer Inst*. févr 2015;107(2).
72. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet Lond Engl*. 16 févr 2008;371(9612):569-78.
73. Wu Y, Zhang D, Kang S. Physical activity and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat*. févr 2013;137(3):869-82.
74. Gaudet MM, Gapstur SM, Sun J, Diver WR, Hannan LM, Thun MJ. Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 17 avr 2013;105(8):515-25.
75. Smoking before the first pregnancy and the risk of breast cancer: a meta-analysis. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 5 juin 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21719745>

76. Smoking before the birth of a first child is not associated with increased risk of breast cancer: findings from the British Women's Heart and Health... - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 5 juin 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15226777>
77. Bjørkhaug ST, Skar V, Medhus AW, Tollisen A, Bramness JG, Valeur J. Chronic alcohol overconsumption may alter gut microbial metabolism: a retrospective study of 719 13C-D-xylose breath test results. *Microb Ecol Health Dis* [Internet]. 17 mars 2017 [cité 18 juill 2017];28(1). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5443100/>
78. Friedman GD, Oestreicher N, Chan J, Quesenberry CP, Udaltsova N, Habel LA. Antibiotics and risk of breast cancer: up to 9 years of follow-up of 2.1 million women. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. nov 2006;15(11):2102-6.
79. Velicer CM, Heckbert SR, Lampe JW, Potter JD, Robertson CA, Taplin SH. Antibiotic use in relation to the risk of breast cancer. *JAMA*. 18 févr 2004;291(7):827-35.
80. Ng HW, Perkins R, Tong W, Hong H. Versatility or Promiscuity: The Estrogen Receptors, Control of Ligand Selectivity and an Update on Subtype Selective Ligands. *Int J Environ Res Public Health*. 26 août 2014;11(9):8709-42.
81. Yager JD, Liehr JG. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1996;36:203-32.
82. Safe SH. Interactions between hormones and chemicals in breast cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998;38:121-58.
83. MacGregor JI, Jordan VC. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev*. juin 1998;50(2):151-96.
84. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, et al. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev*. déc 2006;58(4):773-81.
85. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 17 juin 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11459850>
86. Understanding Menopause Symptoms with Promensil [Internet]. Promensil Menopause Relief. [cité 19 août 2017]. Disponible sur: <http://promensilusa.com/understanding-menopause/>
87. Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. déc 2006;102(1-5):89-96.
88. Cerhan JR, Kushi LH, Olson JE, Rich SS, Zheng W, Folsom AR, et al. Twinship and Risk of Postmenopausal Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2 févr 2000;92(3):261-5.
89. Intrauterine exposures, pregnancy estrogens and breast cancer risk: where do we currently stand? | Breast Cancer Research | Full Text [Internet]. [cité 10 juill 2017]. Disponible sur: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr1615>
90. Group TEH and BCC. Endogenous Sex Hormones and Breast Cancer in Postmenopausal Women: Reanalysis of Nine Prospective Studies. *J Natl Cancer Inst*. 17 avr 2002;94(8):606-16.
91. Dorgan JF, Longcope C, Stanczyk FZ, Stephenson HE, Hoover RN. Re: Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*. 17 févr 1999;91(4):380-1.

92. Kaaks R, Rinaldi S, Key TJ, Berrino F, Peeters PHM, Biessy C, et al. Postmenopausal serum androgens, oestrogens and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Endocr Relat Cancer*. déc 2005;12(4):1071-82.
93. Zhang X, Tworoger SS, Eliassen AH, Hankinson SE. Postmenopausal plasma sex hormone levels and breast cancer risk over 20 years of follow-up. *Breast Cancer Res Treat*. févr 2013;137(3):883-92.
94. Key TJ. Serum oestradiol and breast cancer risk. *Endocr Relat Cancer*. juin 1999;6(2):175-80.
95. Premenopausal endogenous oestrogen levels and breast cancer risk: a meta-analysis [Internet]. [cité 13 juin 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3241538/>
96. Miller JA. Research in chemical carcinogenesis with Elizabeth Miller--a trail of discovery with our associates. *Drug Metab Rev*. 1994;26(1-2):1-36.
97. Guengerich FP. Metabolism of 17 alpha-ethynylestradiol in humans. *Life Sci*. 1990;47(22):1981-8.
98. Sandberg AA, Slaunwhite WR. Studies on Phenolic Steroids in Human Subjects. II. The Metabolic Fate and Hepato-Biliary-Enteric Circulation of C14-Estrone and C14-Estradiol in Women1. *J Clin Invest*. août 1957;36(8):1266-78.
99. Adlercreutz H, Järvenpää P. Assay of estrogens in human feces. *J Steroid Biochem*. déc 1982;17(6):639-45.
100. Monographs, Journal of The National Cancer Institute No. 27, 2000 [Internet]. [S.l. : 2000. Disponible sur: <http://hdl.handle.net/2027/umn.31951d01962604e>
101. Pasqualini JR, Gelly C, Nguyen BL, Vella C. Importance of estrogen sulfates in breast cancer. *J Steroid Biochem*. 1989;34(1-6):155-63.
102. Pasqualini JR, Gelly C, Nguyen BL, Vella C. Importance of estrogen sulfates in breast cancer. *J Steroid Biochem*. 1989;34(1-6):155-63.
103. Nussbaumer P, Billich A. Steroid sulfatase inhibitors. *Med Res Rev*. 1 juill 2004;24(4):529-76.
104. JNCI Monographs | Oxford Academic [Internet]. [cité 9 juill 2017]. Disponible sur: <https://academic.oup.com/jncimono>
105. Albert C, Vallée M, Beaudry G, Bélanger A, Hum DW. The monkey and human uridine diphosphate-glucuronosyltransferase UGT1A9, expressed in steroid target tissues, are estrogen-conjugating enzymes. *Endocrinology*. juill 1999;140(7):3292-302.
106. Ebner T, Remmel RP, Burchell B. Human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase catalyzes the glucuronidation of ethinylestradiol. *Mol Pharmacol*. avr 1993;43(4):649-54.
107. Main drug-metabolizing enzyme systems in human breast tumors and peritumoral tissues. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 9 juill 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8339260>
108. Eriksson H, Gustafsson J-Å, Sjövall J. Steroids in Germfree and Conventional Rats. *Eur J Biochem*. 1 juin 1969;9(2):286-90.

109. Kwa M, Plottel CS, Blaser MJ, Adams S. The Intestinal Microbiome and Estrogen Receptor-Positive Female Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst.* août 2016;108(8).
110. Yang J, Tan Q, Fu Q, Zhou Y, Hu Y, Tang S, et al. Gastrointestinal microbiome and breast cancer: correlations, mechanisms and potential clinical implications. *Breast Cancer.* 5 oct 2016;1-9.
111. Fuhrman BJ, Feigelson HS, Flores R, Gail MH, Xu X, Ravel J, et al. Associations of the Fecal Microbiome With Urinary Estrogens and Estrogen Metabolites in Postmenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab.* déc 2014;99(12):4632-40.
112. Plotnikoff GA. Three Measurable and Modifiable Enteric Microbial Biotransformations Relevant to Cancer Prevention and Treatment. *Glob Adv Health Med.* 1 mai 2014;3(3):33-43.
113. Flores R, Shi J, Fuhrman B, Xu X, Veenstra TD, Gail MH, et al. Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: a cross-sectional study. *J Transl Med.* 21 déc 2012;10:253.
114. Goedert JJ, Jones G, Hua X, Xu X, Yu G, Flores R, et al. Investigation of the Association Between the Fecal Microbiota and Breast Cancer in Postmenopausal Women: a Population-Based Case-Control Pilot Study. *JNCI J Natl Cancer Inst [Internet].* 1 juin 2015 [cité 25 oct 2016];107(8). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4554191/>
115. Luu TH, Michel C, Bard J-M, Dravet F, Nazih H, Bobin-Dubigeon C. Intestinal Proportion of *Blautia* sp. is Associated with Clinical Stage and Histoprognostic Grade in Patients with Early-Stage Breast Cancer. *Nutr Cancer.* 17 févr 2017;69(2):267-75.
116. Minelli EB, Beghini AM, Vesentini S, Marchiori L, Nardo G, Cerutti R, et al. Intestinal Microflora as an Alternative Metabolic Source of Estrogens in Women with Uterine Leiomyoma and Breast Cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 1 juin 1990;595(1):473-9.
117. McIntosh FM, Maison N, Holtrop G, Young P, Stevens VJ, Ince J, et al. Phylogenetic distribution of genes encoding β -glucuronidase activity in human colonic bacteria and the impact of diet on faecal glycosidase activities. *Environ Microbiol.* 1 août 2012;14(8):1876-87.
118. Gloux K, Berteau O, El oumami H, Béguet F, Leclerc M, Doré J. A metagenomic β -glucuronidase uncovers a core adaptive function of the human intestinal microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 mars 2011;108(Suppl 1):4539-46.
119. Hullar MAJ, Burnett-Hartman AN, Lampe JW. Gut microbes, diet, and cancer. *Cancer Treat Res.* 2014;159:377-99.
120. Reddy BS, Weisburger JH, Wynder EL. Fecal bacterial beta-glucuronidase: control by diet. *Science.* 1 févr 1974;183(4123):416-7.
121. Matijašić BB, Obermajer T, Lipoglavšek L, Grabnar I, Avguštin G, Rogelj I. Association of dietary type with fecal microbiota in vegetarians and omnivores in Slovenia. *Eur J Nutr.* juin 2014;53(4):1051-64.
122. Leung JW. Population density-dependent regulation of *E. coli* beta- glucuronidase gene expression. *Dig Dis Week.* 2003;
123. Ling WH, Hänninen O. Shifting from a conventional diet to an uncooked vegan diet reversibly alters fecal hydrolytic activities in humans. *J Nutr.* avr 1992;122(4):924-30.

124. Goldin BR, Adlercreutz H, Dwyer JT, Swenson L, Warram JH, Gorbach SL. Effect of diet on excretion of estrogens in pre- and postmenopausal women. *Cancer Res.* sept 1981;41(9 Pt 2):3771-3.
125. trial data [Internet]. [cité 23 août 2017]. Disponible sur:
<http://www.trialregister.nl/trialreg/admin/rctview.asp?TC=6296>

ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AGCC : Acide Gras à Chaîne Courte

ARNr16s: Acide RiboNucléique Ribosomique 16S

BRCA: BReast CAncer

CMF: Cytométrie en Flux

EGF: Epidermal Growth Factor

ERE : Estrogen Responsive Element

ER : Estrogens Receptor (récepteur aux œstrogènes)

FISH: Hybridation *In Situ* en Fluorescence

FSH: Hormone Folliculo-Stimulante

IARC: International Agency for Research in Cancer

Ig: Immunoglobuline

IGF: Insulin-like Growth Factor

IMC: Indice de Masse Corporel

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

MAC: Composés Associés au Microbiote

MetaHIT: Metagenomics of the Human Intestinal Tract

NIH: National Institute of Health

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PR : Progesterone Receptor (récepteur de la progestérone)

PCR : Polymerase Chain Reaction

RR : Risque Relatif

UFC : Unité Formant Colonie

Vu, le Président du jury,

Vu, le Directeur de thèse,

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom - Prénoms : Rolland – Hugo Yves Jean René

Titre de la thèse :

Le microbiote intestinal : son implication dans le métabolisme des œstrogènes et ses conséquences sur le cancer du sein chez la femme

Résumé de la thèse :

Le microbiote intestinal, considéré comme un organe caché, joue un rôle primordial dans les fonctions digestives, métaboliques, immunitaires et neurologiques chez son hôte. Ces dernières années, les avancées en termes d'analyse de la composition du microbiote intestinal ont permis d'approfondir les connaissances scientifiques concernant d'éventuelles interactions avec certaines maladies. La relation entre la survenue du cancer du sein, premier cancer chez la femme dans le monde, et le microbiote intestinal est un axe de recherche suivi de près par les scientifiques. Des hypothèses concernant l'implication du microbiote intestinal dans le métabolisme des œstrogènes ont été soulevées et de potentielles perspectives de prévention en lien avec le microbiote intestinal pourraient être envisagées.

MOTS CLÉS :

MICROBIOTE INTESTINAL, CANCER DU SEIN, ŒSTROGENE, METABOLISME, PREVENTION

JURY

Président : **Mr Jean-Marie BARD,**
Professeur de Biochimie Générale et Clinique
Faculté de Pharmacie de Nantes

Assesseurs : **Mme Christine BOBIN-DUBIGEON,**
Maître de Conférences de Pharmacologie
Faculté de Pharmacie de Nantes

Mme Françoise LE VACON,
Docteur en Biologie

Adresse de l'auteur : 8 rue Georges Brassens
44120 Vertou, France