

*Embryologie expérimentale*

## La génistéine réprime l'induction des bourgeons prostatiques par la testostérone

par Miwako Saito, Toshiharu Mitsui & Takeo Mizuno

*Département de Sciences fondamentales pour Pharmacie, Faculté des Sciences pharmaceutiques, Teikyo Université, Sagamiko, Tsukui-gun, Kanagawa-ken, 199-0195, Japon*

Reçu le 30 novembre 1999

### RÉSUMÉ

Nous avons étudié l'induction des bourgeons prostatiques dans le sinus urogénital d'embryons de Rat cultivé en présence de testostérone et de génistéine, un inhibiteur de l'activité du récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGF). Il a été observé que la génistéine peut exercer son action inhibitrice sur la prolifération des cellules de l'épithélium du sinus et

l'induction des bourgeons prostatiques provoquées par la testostérone. Les résultats confirment notre hypothèse que les facteurs de croissance tels que l'EGF, sécrétés par le mésenchyme du sinus activé par la testostérone, provoquent la formation de bourgeons prostatiques dans le sinus fœtal.

### SUMMARY Genistein inhibits testosterone-induced prostatic bud formation

Genistein, a phytoestrogen and a kind of endocrine disrupters, inhibits tyrosine-specific protein kinase activity of the epidermal growth factor (EGF) receptor. It is also effective both in the suppression of the prostatic cell proliferation and the prostate carcinogenesis. We have recently demonstrated that several growth factors, like EGF, transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), or keratinocyte growth factor (KGF), can induce prostatic bud formation in the absence of androgen. The present study was performed to investigate whether genistein can suppress testosterone-induced prostatic bud formation. Urogenital sinuses of 16.5-day male rat fetuses were cultured organotypically for 5 days in a serum-free medium containing 10 or 100 ng/ml genistein and 50 ng/ml testosterone.

The number and total volume of prostatic buds were analyzed by laser scanning microscopy and computerized. We found that genistein inhibits significantly testosterone-induced prostatic bud formation. In the presence of genistein, cell proliferation of the sinus epithelium was suppressed and the number of prostatic buds and total volume of the buds were reduced as compared with those in the sinuses cultured with testosterone alone. Genistein did not appear to cause necrosis of the sinus. These results support our hypothesis that growth factors like EGF secreted from the sinus mesenchyme activated by testosterone are involved in the induction and stimulation of growth of the prostatic buds.

### INTRODUCTION

Le développement de la glande prostatique dépend de la présence des androgènes, mais on ne connaît pas encore les détails du rôle des androgènes sur l'induction de la glande prostatique. L'étude autoradiographique des stéroïdes a démontré que, dans le sinus urogénital du fœtus, l'incorporation de la  $^3\text{H}$ -testostérone dans les noyaux est observée exclusivement dans les cellules mésenchymateuses (19). Un traitement androgénique court du sinus a montré que l'exposition aux androgènes pendant un jour, au début d'une culture de 5 jours, suf-

fit pour induire le développement des bourgeons prostatiques (7, 18). L'étude par immunofluorescence a démontré que l'EGF est induit dans le mésenchyme du sinus, 2 heures seulement après le traitement par la testostérone (16). Les androgènes induisent l'ARNm d'EGF dans le tractus reproducteur (5). Nous avons rapporté précédemment que l'EGF, le TGF- $\alpha$  ou le KGF peut induire le développement des bourgeons prostatiques dans le sinus de l'embryon de Rat normal (10, 14) et l'embryon de Souris dépourvu de récepteurs d'androgènes (11). Nous avons aussi montré qu'un traitement de 8 heures par l'EGF au début d'une culture de 5 jours peut provo-

quer, en l'absence d'androgènes, la formation de bourgeons prostatiques (15).

La génistéine est un phyto-œstrogène contenu dans le soja ; c'est un perturbateur endocrinien qui réprime l'activité de tyrosine-kinase spécifique du récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGF) (1, 2). La génistéine réprime aussi la croissance de cellules prostatiques cancéreuses (4, 12, 13, 17).

Dans cette note, nous avons étudié le pouvoir répressur de la génistéine vis-à-vis de l'induction de la formation de bourgeons prostatiques par la testostérone et de leur croissance ultérieure.

## ANIMAUX, MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons utilisé des sinus urogénitaux d'embryons mâles de rats Wistar normaux de 16,5 jours. Les sinus sont cultivés à 36,5°C pendant 5 jours dans le milieu 199 (Gibco, Grand Island) additionné de 1 mg/ml d'albumine bovine Fraction V (Sigma, St. Louis), de 10 µg/ml d'insuline bovine (Sigma) et de 10 µg/ml d'apotransferrine de Rat (Sigma) selon la technique de Trowell modifiée (6), en présence de 10 ou 100 ng/ml de génistéine (Funakoshi, Tokyo) et 50 ng/ml de testostérone (Sigma). La testostérone est ajoutée 30 minutes après le traitement par la génistéine. Les milieux de culture sont changés tous les deux jours. À la fin de la période de culture, les explants sont fixés dans le liquide de Bouin et les coupes sont colorées à l'hématoxyline-éosine. Le nombre et le volume total des bourgeons prostatiques sont analysés à l'aide d'un microscope à balayage laser Fluoview (Olympus, Tokyo) et sont calculés sur l'ordinateur.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le nombre et le volume total des bourgeons prostatiques dans un sinus urogénital cultivé pendant 5 jours sur le milieu qui contient de la testostérone sont diminués par la génistéine (Tableau I). En présence de 100 ng/ml de génistéine, le nombre des bourgeons dans un sinus est diminué de presque deux tiers et le volume total des bourgeons d'environ un tiers, par comparaison avec un sinus traité seulement par la testostérone, et la prolifération de l'épithélium du sinus est réduite par la génistéine d'environ la moitié.

Le volume du sinus urogénital est diminué par la génistéine jusqu'à 70 %, tandis que le rapport du volume total de bourgeons au volume du sinus est diminué de presque un demi par la génistéine. Donc, la génistéine inhibe fortement la croissance des bourgeons prostatiques. Cependant, nos observations montrent que la génistéine ne provoque aucune nécrose des tissus du sinus.

La génistéine est une substance inhibitrice de l'activité tyrosine-kinase des récepteurs de l'EGF (1, 2, 8), et un inhibiteur de l'ADN topo-isomérase II (9) et aussi de la croissance de cellules normales et cancéreuses (3, 4, 12,

TABLEAU I. – Influence de la génistéine sur le sinus urogénital cultivé en présence de testostérone.

	T	G10 + T	G100 + T
Nombre B	44 ± 11 (100)	26 ± 23 (59)	26 ± 23 (59)
Vol. B (× 10 <sup>6</sup> µm <sup>3</sup> )	50,9 ± 10,6 (100)	41,7 ± 31,9 (82)	17,6 ± 13,3 (35)
IME (%)	1,36 ± 0,04 (100)	0,76 ± 0,23 (56)	0,65 ± 0,24 (48)
Vol. sinus (× 10 <sup>6</sup> µm <sup>3</sup> )	1 086 ± 102 (100)	933 ± 329 (86)	756 ± 66 (70)
Vol. B/Vol. sinus (%)	4,7 ± 0,8 (100)	3,7 ± 2,5 (79)	2,2 ± 1,5 (47)

T : testostérone.

G10 : 10 ng/ml de génistéine.

G100 : 100 ng/ml de génistéine.

Nombre B : nombre de bourgeons prostatiques dans un sinus urogénital.

Vol. B : volume total de bourgeons dans un sinus.

IME : index mitotique dans l'épithélium du sinus (pourcentage des cellules en métaphase, anaphase et télophase).

Vol. sinus : volume d'un sinus.

13, 17). Dans cette note, nous montrons que la génistéine exerce son action inhibitrice de la prolifération des cellules de l'épithélium du sinus et de l'induction des bourgeons prostatiques par la testostérone et leur croissance ultérieure. Ces résultats confirment notre hypothèse que les facteurs de croissance tels que l'EGF, le TGF-α ou le KGF sont sécrétés à partir du mésenchyme du sinus urogénital stimulé par les androgènes, et que leur action stimulante sur l'épithélium du sinus induit la formation des bourgeons prostatiques et favorise leur croissance (10, 11, 14, 15, 16).

## BIBLIOGRAPHIE

1. Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M. & Fukami Y., Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 5592-5595.
2. Dalu A., Haskell J. F., Coward L. & Lamartinière. C. A., Genistein, a component of soy, inhibits the expression of the EGF and ErbB2/Neu receptors in the rat dorsolateral prostate. *Prostate*, 1998, 37, 36-43.
3. Fotsis T., Pepper M., Adlercreutz H., Hase T., Montesano R. & Schweigerer L., Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. *J. Nutr.*, 1995, 125, 790s-797s.
4. Geller J., Sionit L., Partido C., Li L., Tan X., Youngkin T., Nachtsheim D. & Hoffman R. M., Genistein inhibits the growth of human-patient BPH and prostate cancer in histoculture. *Prostate*, 1998, 34, 75-79.
5. Gupta C. & Singh M., Stimulation of epidermal growth factor gene expression during the fetal mouse reproductive tract differentiation: role of androgen and its receptor. *Endocrinology*, 1996, 137, 705-711.
6. Lasnitzki I., Action and interaction of hormones and 3-methylcholanthrene on the ventral prostate gland of the rat *in vitro*. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1965, 35, 339-348.

7. Lasnitzki I. & Mizuno T., Induction of the rat prostate gland by androgens in organ culture. *J. Endocrinol.*, 1977, *74*, 47-55.
8. Linassier C., Pierre M., Le Pecq J. B. & Pierre J., Mechanisms of action in NIH-3T3 cells of genistein, an inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1990, *39*, 187-193.
9. Markovits J., Linassier C., Fosse P., Couprie J., Pierre J., Jacquemin-Sablon A., Saucier J. M., Le Pecq J. B. & Larsen A. K., Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.*, 1989, *49*, 5111-5117.
10. Mizuno T., Saito M. & Tanemura S., Induction des bourgeons prostatiques en l'absence d'androgènes. *C. R. Soc. Biol.*, 1994, *188*, 601-603.
11. Mizuno T. & Saito M., Induction de bourgeons prostatiques dans le sinus urogénital d'embryons de Souris *Tfm* dépourvu de récepteurs d'androgènes. *C. R. Soc. Biol.*, 1996, *190*, 497-501.
12. Naik H. R., Lehr J. E. & Pienta K. J., An *in vitro* and *in vivo* study of antitumor effects of genistein on hormone refractory prostate cancer. *Anticancer Res.*, 1994, *14*, 2617-2619.
13. Onozawa M., Fukuda K., Ohtani M., Akaza H., Sugimura T. & Wakabayashi K., Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 1998, *28*, 360-363.
14. Saito M. & Mizuno T., Le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) peut induire des bourgeons prostatiques en l'absence d'androgènes. *C. R. Soc. Biol.*, 1995, *189*, 637-641.
15. Saito M. & Mizuno T., Induction de bourgeons prostatiques par un traitement court avec des facteurs de croissance. *C. R. Soc. Biol.*, 1997, *191*, 261-265.
16. Saito M. & Mizuno T., Induction du facteur de croissance de l'épiderme (EGF) dans le sinus urogénital par un traitement androgénique court. *C. R. Soc. Biol.*, 1998, *192*, 1025-1028.
17. Schleicher R. L., Lamartinière C. A., Zheng M. & Zhang M., The inhibitory effect of genistein on the growth and metastasis of a transplantable rat accessory sex gland carcinoma. *Cancer Lett.*, 1999, *136*, 195-201.
18. Takeda H., Lasnitzki I. & Mizuno T., Analysis of prostatic bud induction by brief androgen treatment in the fetal rat urogenital sinus. *J. Endocrinol.*, 1986, *110*, 467-470.
19. Takeda H., Mizuno T. & Lasnitzki I., Autoradiographic studies of androgen-binding sites in the rat urogenital sinus and postnatal prostate. *J. Endocrinol.*, 1985, *104*, 87-92.

