



**HAL**  
open science

# Impact d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 et/ou d'une exposition aux alkylphénols sur la physiopathologie de la glande mammaire

Clémence Chamard-Jovenin

## ► To cite this version:

Clémence Chamard-Jovenin. Impact d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 et/ou d'une exposition aux alkylphénols sur la physiopathologie de la glande mammaire. Cancer. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0232 . tel-01673798v2

**HAL Id: tel-01673798**

**<https://hal.science/tel-01673798v2>**

Submitted on 20 Mar 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



**École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

**Thèse**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE**

**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

par **Clémence CHAMARD-JOVENIN**

**Impact d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 et/ou d'une exposition aux  
alkylphénols sur la physiopathologie de la glande mammaire**

**Le 9 décembre 2016**

**Membres du jury :**

Rapporteurs :

**Virginie Rouiller-Fabre**, Professeur, Université Paris VII,

**Catherine-Laure Tomasetto**, Professeur, IGBMC, Illkirch,

Examineurs :

**Aurélie Müller-Gueudin**, Maître de Conférences, Université de Lorraine,

**Rochdi Merzouki**, Professeur, Université de Lille 1,

**Taha Boukhobza**, Professeur, Université de Lorraine, co-directeur de thèse,

**Hélène Dumond**, Maître de Conférences, Université de Lorraine, directeur de thèse.

## **Remerciements**

On garde le meilleur pour la fin de rédaction... ou le « c'est pas plus facile que le reste » peut être....

### ***Merci...***

Merci à mon jury de thèse d'avoir accepté de juger mon travail, ainsi que pour leur participation à ma soutenance de thèse. Merci à Virginie Rouiller-Fabre, Catherine-Laure Tomasetto, Aurélie Müller-Gueudin et Rochdi Merzouki ! Merci !

Merci à mon ex maître de stage de M1 et M2, puis directrice de thèse Hélène Dumond qui a toujours été là pour les discussions très scientifiques, quand je partais un peu trop loin ou pas du tout assez dans mes réflexions, mais aussi dans les nombreuses discussions très « salle café »... Merci pour l'accueil dans l'équipe, pour l'encadrement pendant ces 5 années. J'ai grandi dans l'équipe au fil du temps, j'ai appris beaucoup et pas que professionnellement. Merci pour tout !

Merci à mon co-directeur de thèse, Taha Boukhobza ! Réussir à se comprendre entre mathématicien et biologiste n'a pas toujours été facile, mais j'ai adoré apprendre à tes côtés. Je suis sûre que j'aurais pu apprendre encore plus en y consacrant plus de temps (non je ne veux pas que la thèse s'éternise mais...). Merci également pour tous les moments « non sérieux » où franchement ça fait plaisir de pouvoir sourire/rire (en culpabilisant un tout petit peu, car tout ceci ne fait pas avancer mon « niveau » sur Matlab). Merci !

Merci à Amand Chesnel ! Là, je n'aurais pas assez de 10 thèses pour apprendre tout ce que j'ai à savoir en biologie moléculaire. Merci d'avoir tenté de me transmettre ta passion sur tout plein de sujets, merci pour le partage du bureau pendant 4 ans. Merci pour les spécialités bretonnes et les

conversations sur « la pluie et le beau temps » ! Et merci aussi pour la co-gestion de la partie souris, pas facile de s'organiser, mais je pense que l'on a à peu près réussi... Au mieux en tout cas ! Merci pour tout !

Merci à Lucie d'avoir été une super alliée pendant mes débuts au laboratoire. J'ai beaucoup appréciée ton aide, nos discussions. Toujours de bonne humeur, tu as maintenant un super poste à toi, mais tu manques à l'équipe (et à moi). Merci !

Merci à Imane ! Tu terminais ta thèse quand je suis arrivée, j'ai néanmoins fortement appréciée nos conversations et ta gentillesse. Merci !

Merci Cyril, tu as été mon co-stagiaire pour mes débuts au laboratoire. Pour rappel de nos conversations dans le « bureau frigo » ou en salle café, je te dis merci ! Merci également à tous les stagiaires qui sont passés au laboratoire pour leur contribution à notre projet mais aussi pour les discussions partagées ensemble. Merci !

Merci Hussein pour la transmission du flambeau et merci Charlène, qui j'espère, va porter encore bien loin le projet. Un merci tout particulier à toi, Charlène, pour ton enthousiasme et ta force !  
Merci !

Merci à Chloé, Martine et Dominique Meng, sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Merci !

## ***Mais aussi....***

Merci à toi, Marion ! Tu es partie pour de contrées lointaines (hélas pour moi, tant mieux pour vous), mais je n'oublie pas que c'est en partie grâce à toi que je suis là. Sans ton soutien en L3 alors que je venais d'accoucher, je n'aurais peut-être pas été aussi loin dans mon projet. Merci pour tout le reste aussi... À tout bientôt, maintenant je vais avoir plus de temps pour voyager. Merci à toi du fond du cœur !

Merci à toutes les personnes qui ont croisé ma vie personnelle et professionnelle ! Vous m'avez tous apporté un petit quelque chose qui m'a permis d'être celle que je suis aujourd'hui. La liste est sûrement très longue, je voulais juste avoir une pensée pour vous ! Merci !

Merci à mes parents, à mon frère, d'avoir également contribué à m'amener là où je suis aujourd'hui. Merci pour votre soutien, pour votre intérêt pour ce que je fais ! Merci de m'avoir porté dans mes débuts et malgré mes choix parfois hasardeux. Merci !

Et un grand merci à toi qui partages ma vie. Tout ça c'est grâce à toi et plus encore ! Plus de 10 ans que tu supportes mes études (et moi par la même occasion), tu n'as connu que ça de moi. Le côté positif, c'est que tu n'as pas pris peur tout de suite, j'y suis allée progressivement dans l'investissement (bon calcul de ma part !). Merci de m'avoir épaulé pendant toutes ces années, même si je te reproche encore parfois de ne pas assez m'aider (je suis vraiment de mauvaise foi...). Merci d'être en plus d'un super mari, un super papa, tu m'as donné de magnifiques cadeaux dans la vie, ton total soutien malgré ta grande passion pour ton travail (un peu trop d'ailleurs, mais est-ce que je peux te le reprocher vraiment...) et surtout nos enfants ! C'est grâce à toi que j'ai eu des alternatives à la pensée unique « thèse thèse thèse thèse thèse ». Grâce à toi, j'ai pu me demander « comment je vais avoir le temps de rédiger cette fichue discussion (en retard car je fais tout à la dernière seconde) alors que numéro 1 est en pleine rébellion (comme toujours), numéro 2 est malade (comme d'habitude), numéro 3 me prend déjà beaucoup d'énergie et tu es en déplacement

(pile quand il ne faut pas) ? ». Au moins je ne me suis pas ennuyée et j'ai pu compter sur toi dès que tu le pouvais. Merci pour tout ! Merci et encore merci !

Et donc bien entendu, merci à mes 2 princesses qui m'ont permis de m'évader et sans qui la thèse n'aurait pas eu la même saveur... Merci mes chéries !



# TABLE DES MATIÈRES

<b>Analyse bibliographique.....</b>	<b>6</b>
<i>I. La glande mammaire : organisation générale et mammogénèse .....</i>	<i>7</i>
1. La glande mammaire.....	7
2. Mammogénèse .....	9
2.1 Période embryonnaire : formation d'un arbre primitif.....	10
a. Formation des placodes mammaires .....	10
b. Différenciation en bourgeons mammaires.....	10
c. Formation de l'arbre mammaire primitif .....	11
d. Début du dimorphisme sexuel de la glande mammaire.....	12
2.2 Période post-natale : puberté, lactation, involution .....	12
a. Puberté et croissance canalaire de la glande mammaire.....	12
• Mécanismes moléculaires .....	13
• Constituants cellulaires des TEB .....	14
b. Cycle œstrien : remodelage de l'arbre mammaire.....	14
c. Gestation et lactation : alvéologénèse et lactogénèse.....	15
d. Involution .....	17
3. Les cellules souches mammaires (MaSC).....	18
<i>II. Développement anormal de la glande mammaire .....</i>	<i>19</i>
1. Epidémiologie du cancer du sein .....	20
2. Facteurs de risque du cancer du sein.....	21
2.1 Facteurs de risque internes.....	22
a. L'âge .....	22
b. Imprégnation hormonale de l'individu : puberté, grossesse, allaitement et ménopause .....	22
• Âge de la ménarche et de la ménopause .....	23
• Parité et âge au premier enfant .....	23
• Allaitement .....	24
c. Prédispositions génétiques dans le cancer du sein .....	24
• Gènes à haute pénétrance.....	24
• Gènes à pénétrance modérée .....	24
• Gènes à faible pénétrance .....	25
d. Antécédents de pathologie bénigne de la glande mammaire.....	25



2.2	Facteurs de risque externes .....	25
a.	Facteurs de risques comportementaux : obésité, alcool et tabac .....	26
•	Alcool .....	26
•	Tabac.....	27
•	Surpoids et inactivité physique.....	27
b.	Contraceptifs hormonaux et traitements hormonaux substitutifs .....	27
•	Les THS.....	28
•	Les contraceptifs.....	28
c.	Risques environnementaux : polluants et radiations ionisantes.....	29
•	Les perturbateurs endocriniens.....	29
•	Les radiations ionisantes.....	30
3.	Carcinogénèse : initiation, promotion et progression d'un processus tumoral .....	30
3.1	Description .....	30
3.2	Caractéristiques du cancer .....	31
3.3	Le cancer du sein .....	31
4.	Classification moléculaire des tumeurs mammaires et approches thérapeutiques.....	32
4.1	Les tumeurs de profil luminal A .....	33
4.2	Les tumeurs de profil luminal B.....	33
4.3	Les tumeurs de type « HER2-enrichi » .....	34
4.4	Les tumeurs de profil « basal-like ».....	34
4.5	Les tumeurs de profil « claudin-low » .....	35
4.6	Les tumeurs de profil « normal-like » .....	35
III.	<i>Les hormones stéroïdes et leurs récepteurs.....</i>	36
1.	Biosynthèse des œstrogènes .....	37
2.	Récepteurs nucléaires des œstrogènes .....	38
2.1	Structure en domaines des récepteurs nucléaires.....	39
a.	Domaine A/B et région AF-1 : transactivation ligand-indépendante .....	39
b.	Domaine C : liaison à l'ADN .....	40
c.	Domaine D : la région charnière du récepteur .....	40
d.	Domaine E/F et région AF-2 : transactivation ligand-dépendante .....	40
2.2	Le récepteur ER $\alpha$ .....	41
a.	Le gène ESR1.....	41
b.	Structure du récepteur ER $\alpha$ (ER $\alpha$ 66) .....	41
2.3	Le récepteur ER $\beta$ .....	42
a.	Le gène ESR2 et les différents variants d'ARNm .....	42

b.	Structure de la protéine ER $\beta$ .....	43
2.4	Structure protéique des récepteurs ER $\alpha$ et ER $\beta$ .....	43
3.	Les ERR .....	44
4.	Les récepteurs membranaires des œstrogènes .....	45
4.1	Récepteur des œstrogènes couplé aux protéines G (GPER) .....	45
4.2	Variants du récepteur aux œstrogènes $\alpha$ .....	46
4.3	Le cas du variant ER $\alpha$ 36 .....	46
5.	Mécanismes d'action des récepteurs aux œstrogènes .....	47
5.1	Corégulateurs transcriptionnels .....	48
a.	Coactivateurs .....	48
b.	Corépresseurs .....	49
5.2	Voies génomiques des œstrogènes .....	50
a.	Voie génomique classique des œstrogènes : ligand- et ERE-dépendante .....	50
b.	Voie génomique ERE-indépendante .....	50
c.	Voie génomique indépendante du ligand .....	51
d.	Voie non génomique initiée à la membrane .....	52
6.	Cas particulier du mode d'action d'ER $\alpha$ 36 dans les tumeurs hormonosensibles .....	53
6.1	Croissance et progression tumorale .....	53
6.2	Résistance aux traitements anti-tumoraux .....	56
IV.	<i>Les perturbateurs endocriniens et leurs effets sur la santé humaine</i> .....	58
1.	Perturbateurs endocriniens : généralités .....	58
•	Les polluants pharmaceutiques .....	61
•	Polluants industriels .....	61
•	Polluants phytosanitaires .....	62
•	Polluants « naturels » .....	62
2.	Les PE et leurs effets sur l'Homme .....	63
3.	Effets sur la santé humaine : dose, période et effets cocktail .....	64
2.1	Notion de dose .....	64
2.2	Notion de fenêtre d'exposition et de transmission à la descendance .....	65
2.3	Notion d'effets cocktail .....	69
4.	Le contexte de la thèse : les alkylphénols à longue chaîne en mélange .....	69
•	Le 4-nonylphénol (NP) .....	70
•	Le 4 tert-octylphénol (OP) .....	71
	<b>Contexte et objectifs de la thèse</b> .....	<b>72</b>

<b>Résultats .....</b>	<b>75</b>
<i>I. Le variant ER<math>\alpha</math>36 : lien avec la progression tumorale du cancer du sein ? .....</i>	<i>76</i>
1. Introduction .....	76
2. Méthodes et résultats .....	77
3. Discussion .....	80
4. Perspectives à la suite de ce travail .....	83
<i>II. Modifications du phénotype des cellules épithéliales mammaires in vivo et in vitro en cas de surexpression d'ER<math>\alpha</math>36 .....</i>	<i>84</i>
1. Introduction .....	85
2. Résultats .....	85
2.1 Données des transcriptomes des lignées MCF-10A/ER $\alpha$ 36 et MCF-10A/Zeo .....	85
a. Termes GO prédits par enrichissement de termes GO .....	86
b. Voies de signalisation prédites par enrichissement de voies KEGG .....	86
c. Régulateurs prédits des DEG .....	86
2.2 Validation des résultats <i>in silico</i> par l'expérimentation <i>in vitro</i> .....	87
a. Rôle de la surexpression d'ER $\alpha$ 36 sur la division cellulaire .....	87
b. Rôle de la surexpression d'ER $\alpha$ 36 sur l'échappement à l'apoptose .....	88
c. Rôle de la surexpression d'ER $\alpha$ 36 sur la migration cellulaire .....	88
2.3 Conséquences d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire murine .....	89
3. Discussion .....	90
4. Perspectives à la suite de ce travail .....	95
<i>III. Effets transgénérationnels de l'exposition à des alkylphénols à faible dose sur l'acquisition d'un phénotype néoplasique-like de la glande mammaire .....</i>	<i>95</i>
1. Introduction .....	96
2. Résultats .....	97
2.1 Effets transgénérationnels sur le développement de la glande mammaire murine d'une exposition fœtale au mélange M4 .....	97
2.2 Effets du mélange M4 dans la lignée de cellules épithéliales mammaires saines MCF-10A .....	99
a. Analyse du transcriptome des cellules MCF-10A exposées au M4 .....	99
b. Validation <i>in vitro</i> .....	99
2.3 Expression d'ER $\alpha$ 36, méthylation du promoteur et exposition au M4 .....	100
3. Discussion .....	101
3.1 Effets de l'exposition au M4 sur le développement de la glande mammaire murine .....	101
3.2 ER $\alpha$ 36 : régulation par les alkylphénols et médiateur de la transformation néoplasique .....	102

4. Résultats complémentaires .....	105
5. Perspectives à la suite de ce travail .....	105
<b>Discussion générale et Perspectives .....</b>	<b>107</b>
<i>I. L'expression et l'activité d'ER<math>\alpha</math>36 dans la glande mammaire peut-elle être caractéristique d'une progression tumorale ? .....</i>	<i>108</i>
1. Expression d'ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire pathologique .....	108
2. Activité d'ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire pathologique .....	110
3. Apport de l'aspect pluridisciplinaire de cette étude .....	112
<i>II. ER<math>\alpha</math>36 : acteur du développement anormal de la glande mammaire ? .....</i>	<i>113</i>
1. Discussion des résultats <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> .....	113
2. Apport de l'aspect pluridisciplinaire de cette étude .....	116
<i>III. Les PE jouent-ils un rôle dans le développement anormal de la glande mammaire sous le contrôle d'ER<math>\alpha</math>36 ? .....</i>	<i>117</i>
1. Conséquences d'une exposition aux alkylphénols <i>in vivo</i> .....	117
2. Conséquences d'une exposition aux alkylphénols <i>in vitro</i> .....	121
3. Apport de l'aspect pluridisciplinaire de cette étude .....	122
<b>Conclusion.....</b>	<b>123</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>125</b>

# Abréviations

## A, B, C....

ADAM... a disintegrin and metalloprotease	ADH... antidiuretic hormon
ADN... acide désoxyribonucléique	AF1... activation function 1
AF2... activation function 2	AI... aromatase inhibitor
AMPC... adenosine monophosphate cyclique	AR... androgen receptor
ARC... association pour la recherche sur le cancer	AREG... amphireguline
ARN... acide ribonucléique	ARNm... acide ribonucléique messenger
ATM... ataxia telangiectasia mutated	ATP... adenosine triphosphate
BCL2... b-cell lymphoma 2	BMP... bone morphogenic protein
BPA... bisphénol A	BPF... bisphénol F
BPS... bisphénol S	BRCA... breast cancer
BRIP1... BRCA1-interacting protein 1	C10... $\beta$ -chemokine
CASP8... caspase 8	CD24... cluster of differentiation 24
CD49... cluster of differentiation 49	CDH1... cadherin-1
CHEK2... checkpoint kinase 2	CITED1... Cbp/p300-interacting transactivator 1
CK... cytokératine	CSF-1... colony stimulating factor 1
CXCR4... C-X-C chemokine receptor type 4	

## D, E, F....

DBD... DNA-binding domain	DCIS... ductal carcinoma in situ
DDT... dichlorodiphényltrichloroéthane	DES... diéthylstilbestrol
DFS... disease free survival	DHHC... aspartate-histidine-histidine-cysteine
DNMT... DNA methyltransferase	E1... œstrone
E2... œstradiol	E3... œstriol
E4... œstétrol	EE2... éthinyl estradiol
EGF... epidermal growth factor	EPA... agence de protection de l'environnement
EpCAM... epithelial cell adhesion molecule	ER $\alpha$ ... estrogen receptor $\alpha$
ER $\alpha$ 46... estrogen receptor $\alpha$ 46	ER $\alpha$ 36... estrogen receptor $\alpha$ 36
ER $\beta$ ... estrogen receptor $\beta$	ERBB2... human epidermal growth factor receptor 2
ERBB3... human epidermal growth factor receptor 3	ERE... estrogen response element

ERK... extracellular signal-regulated kinases  
ERRE... ERR-response element  
FGF... fibroblast growth factor

ERR... estrogen-related receptor  
ESR1/2... estrogen receptor 1/2  
FGFR2... fibroblast growth factor receptor 2

## **G, H, I, J....**

GH... growth hormone  
GRP94... heat shock protein 90kDa  $\beta$  member 1  
HER2... human epidermal growth factor receptor 2  
HPL... human placental lactogen  
HSP... heat shock proteins  
IGF1... insulin-like growth factor-1  
JAK2/STAT5... janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 5

GPER... G protein-coupled estrogen receptor 1  
HAT... histone acetyltransferases  
HMT... histone methyltransferases  
HRE... hormone response element  
IARC... internat. agency for research on cancer  
IHC... immunohistochimie

## **K, L, M, N....**

KI67... marqueur de prolifération  
LIF... leukemia inhibitory factor  
MAP3K1... mitogen-activated protein 3kinase 1  
MaSC... mammary stem cell  
MFGE8... milk fat globule-EGF factor 8 protein  
Msx2... Msh homeobox 2  
N-CoR... nuclear receptor corepressor  
NF- $\kappa$ B... nuclear factor-kappa B  
NOAEL... no observable adverse effect level  
NPE... éthoxylates de nonylphénol

LBD... ligand binding domain  
M4... 4NP/4tOP (30:1)  
MAPK... mitogen-activated protein kinases  
Mek... MAPK-kinase  
MR... récepteur aux minéralocorticoïdes  
MTA1... metastasis Associated 1  
NF1... neurofibromatose 1  
NLS... nuclear localization signal  
NP... nonylphénol  
NRIP1... nuclear receptor interacting protein 1

## **O, P, R, S....**

OP... octylphénol  
P63... tumor protein p63

P450scc... cholesterol side-chain cleavage enz.  
PALB2... partner and localizer of BRCA2

PARP1... poly(ADP-ribose) polymérase 1	PE... perturbateurs endocriniens
PI3K/Akt... phosphoinositide 3-kinase	PND... postnatal Day
PNRPE... programme nat. de recherche sur les PE	PR... progesterone receptor
PrLR... prolactin receptor	PTEN... phosphatase and tensin homolog
PTHrP... parathyroid hormone-related protein	RANKL... receptor activator of NF- $\kappa$ B
RAR... retinoic acid receptor	RS... récepteur aux stéroïdes
SCA1... stem cells antigen-1	SERM... selective estrogen receptor modulators
SNP... single-nucleotide polymorphism	Sp1... specificity protein 1
SPI2A... serpin 2a	SRC 1/3... steroid receptor coactivator-1/3
StAR... steroidogenic acute regulatory protein	
STAT3/5... signal transducer and activator of transcription 3/5	
STK11... serine/threonine kinase 11	SWI/SNF... switch/sucrose non-fermentable

## **T, V, W....**

TACE... tumor necrosis factor- $\alpha$ converting enz.	TAF... facteurs associés aux TBP
TAM... tamoxifène	TBP... TATA box binding protein
TDLU... terminal ductal-lobular unit	TEB...terminal end buds
TGF $\beta$ ... transforming growth factor $\beta$	THS... traitement hormonal substitutif
TIMP 3/4... Metalloproteinase inhibitor 3/4	TN... triple négatif
TNM... tumor, nodes, metastasis	TP53... tumor protein p53
VEGF... vascular endothelial growth factor	WAP... whey acidic protein

## Avant-propos

*Le terme « cancer du sein » désigne les tumeurs malignes de la glande mammaire quel que soit leur tableau clinique. Ces pathologies présentent la plus forte incidence parmi les cancers féminins et constituent la première cause de décès par cancer chez la femme en France métropolitaine.*

*L'initiation d'un cancer résulte d'une combinatoire de facteurs encore mal identifiés et qui seront décrits dans l'analyse bibliographique. Dès 1990, l'hypothèse selon laquelle une exposition périnatale à des perturbateurs endocriniens pouvait jouer un rôle dans cette initiation a été avancée. Depuis il a été décrit qu'une exposition précoce pouvait entraîner des modifications à long terme résultant de perturbations du mode de différenciation des cellules saines de la glande mammaire. À l'âge adulte, ces altérations sont susceptibles d'augmenter le risque d'une transformation néoplasique des cellules épithéliales mammaires.*

Ce travail fait suite à l'étude de l'influence de micropolluants en mélange sur la croissance de tumeurs testiculaires d'origine germinale réalisée par Hussein Ajj durant sa thèse. Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe a montré aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, qu'un mélange d'alkylphénols à longue chaîne, oestrogéno-mimétique présumé, induisait des effets mitogènes dans des cellules tumorales testiculaires. Dans ces travaux, la progression tumorale a été décrite comme étant médiée par un variant du récepteur aux œstrogènes  $\alpha$  : ER $\alpha$ 36 (Ajj et al., 2013).

En partant de ces observations, les objectifs de ma thèse étaient de répondre à plusieurs questions en conduisant une démarche pluridisciplinaire avec des techniques *in silico*, *in vitro* et *in vivo*.

Dans une première partie, je développerai les résultats d'une étude rétrospective d'analyses d'échantillons de tumeurs mammaires réalisée en collaboration avec des cliniciens du centre P. Strauss (Strasbourg). Cette étude avait pour but de valider d'éventuels marqueurs prédictifs de la progression tumorale, notamment le variant ER $\alpha$ 36, afin d'affiner le statut moléculaire de chaque tumeur et de personnaliser la thérapeutique utilisée. La modélisation de réseaux de gènes d'intérêt a permis de distinguer les gènes bons classificateurs en fonction de leurs expressions. La conclusion de ce travail avance le fait qu'en fonction du niveau d'expression d'ER $\alpha$ 36, une classification des



tumeurs mammaires peut être réalisée et ainsi permettre de cibler au mieux le traitement à utiliser en fonction de la progression tumorale prédite par l'expression du variant de récepteur aux œstrogènes  $\alpha$ .

J'ai ensuite poursuivi cette démarche pluridisciplinaire pour établir le rôle d'ER $\alpha$ 36 dans l'initiation tumorale indépendamment ou déclenchée par une exposition aux perturbateurs endocriniens (PE). Ces recherches ont été réalisées *in silico* à partir de données transcriptomiques de cellules épithéliales mammaires immortalisées exposées ou non aux perturbateurs endocriniens, *in vitro* pour l'analyse des voies de signalisation impliquées et la validation des résultats *in silico*, mais également *in vivo* chez des souris (espèce n'exprimant pas naturellement ER $\alpha$ 36) sauvages ou transgéniques pour ER $\alpha$ 36, exposées ou non au mélange de PE.

Dans la dernière partie du manuscrit, je procéderai à une discussion des différents résultats obtenus, de l'apport des aspects multidisciplinaires de cette étude et les perspectives à envisager pour compléter ce travail.

# **Analyse bibliographique**

# **I. La glande mammaire : organisation générale et mammogénèse**

Le développement de la glande mammaire est l'une des caractéristiques fondamentales définissant les Mammifères. Les premières preuves de lactation dans l'évolution ont été retrouvées sur des fossiles de la période du Trias (200 Ma), avant l'apparition des premiers Mammifères (Capuco and Akers, 2009).

Cet organe, dont le nombre et la morphologie dépend de l'espèce, assure la fonction de nutrition par la sécrétion du lait chez la femelle, mais également l'apport d'une protection immunitaire efficace pour le nouveau-né.

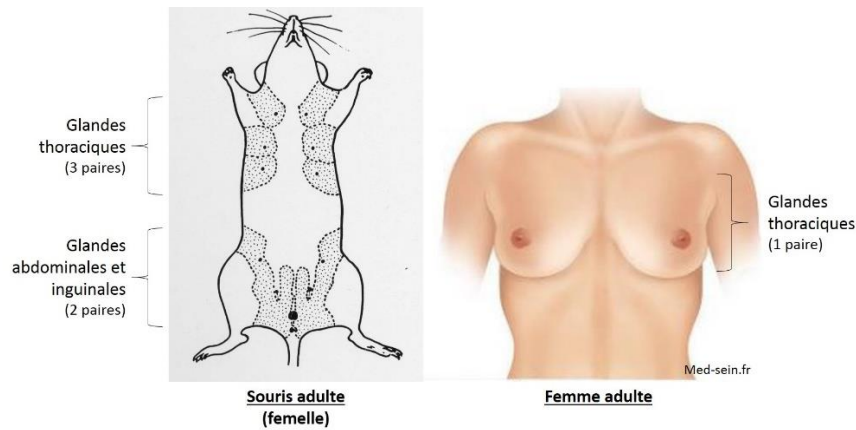
Durant ma thèse, j'ai travaillé avec le modèle murin *in vivo* pour étudier les conséquences d'une exposition à un mélange de perturbateurs endocriniens sur le développement de la glande mammaire. C'est pourquoi, je me limiterai dans cette revue bibliographique à décrire la structure et le mode de fonctionnement de la glande mammaire murine (*Mus musculus*) et humaine (*Homo sapiens*).

## **1. La glande mammaire**

### **1.1 Description**

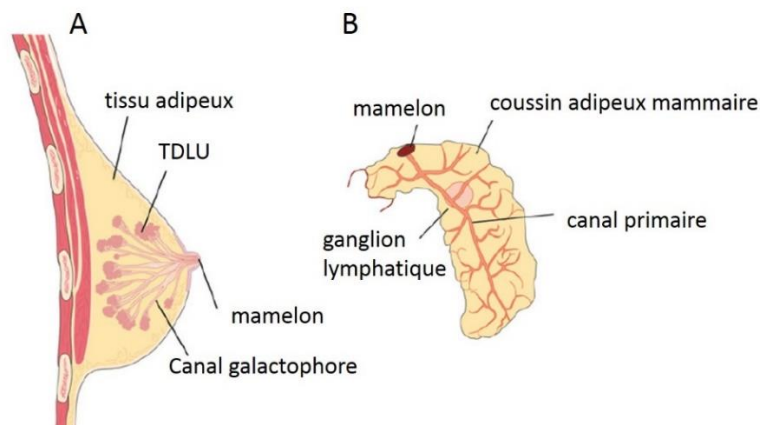
La glande mammaire est une glande exocrine d'origine ectodermique, insérée dans un coussin adipeux. Son développement complet ne sera effectué que tardivement, à l'âge adulte au moment de la gestation, période pendant laquelle les mécanismes de lactation se mettent en place. La structure anatomique de cet organe présente des disparités en fonction de l'espèce, malgré une différenciation cellulaire conservée de l'épithélium mammaire, ainsi qu'une fonctionnalité similaire dans les mécanismes amenant à la production du lait.

Le compartiment épithélial de la glande mammaire, portant la fonction sécrétoire de l'organe, est inséré dans du stroma ou mésenchyme mammaire. Ce dernier assure un rôle de soutien du compartiment épithélial. Cette configuration tissulaire est conservée chez tous les mammifères.



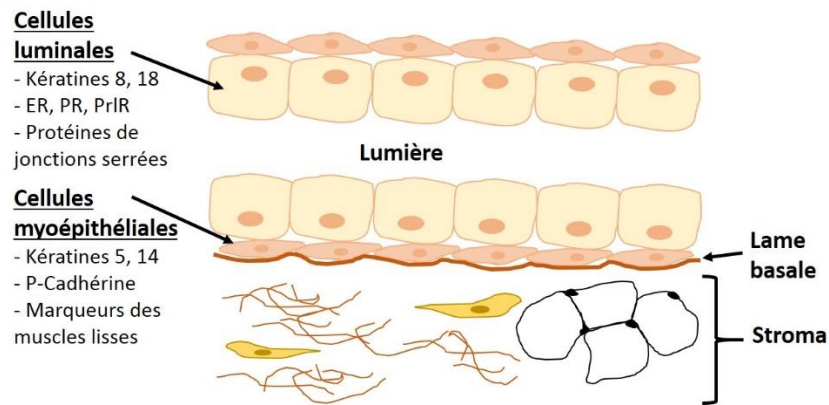
**Figure 1 : Localisation anatomique à l'âge adulte de la glande mammaire dans l'espèce humaine et murine.**

La souris femelle à l'âge adulte possède 3 paires de glandes mammaires thoraciques, une paire de glande abdominale et une paire de glande inguinale. La femme adulte présente une paire de glande mammaire en position antéro-supérieure thoracique.



**Figure 2 : Organisation schématique à l'âge adulte de la glande mammaire dans l'espèce humaine et murine.**

A. La glande mammaire chez la femme comprend un regroupement d'unités lobulo-canalaires terminales (TDLU) insérées en profondeur dans du tissu adipeux. Ces TDLU se regroupent dans des canaux galactophores et aboutissent au mamelon. B. L'arbre mammaire murin à l'âge adulte comprend des ramifications secondaires et tertiaires insérées dans un coussin adipeux. Ces ramifications se rejoignent dans un canal primaire se terminant par un mamelon. Un ganglion lymphatique, organe clé du système immunitaire, se situe à proximité de chaque glande mammaire (Adapté de Visvader, 2009)



**Figure 3 : Représentation schématique de l'épithélium mammaire**

L'épithélium mammaire forme une bicouche de cellules luminales et myoépithéliales, séparées du stroma mammaire par une lame basale. Les cellules luminales et myoépithéliales sont caractérisées par des marqueurs spécifiques décrits sur cette figure. (Adapté de Faraldo et al., 2005)

Dans l'espèce humaine, une paire unique de glandes mammaires se développe de part et d'autre du sternum dans la partie antéro-supérieure du thorax. Tandis que chez la souris, cinq paires de glandes mammaires sont dénombrées : 3 en position antéro-supérieure du thorax, une paire abdominale et une paire inguinale (Figure 1).

Chez la femme, la glande mammaire est constituée par un regroupement de canaux ramifiés. Ces arbres mammaires insérés dans du stroma sont reliés entre eux dans un canal débouchant au mamelon. Chaque branche ou canal lobulaire se termine par des alvéoles ou unités lobulo-canaliaires terminales (Terminal ductal lobular units ou TDLU), qui sécréteront le lait au moment de la lactation.

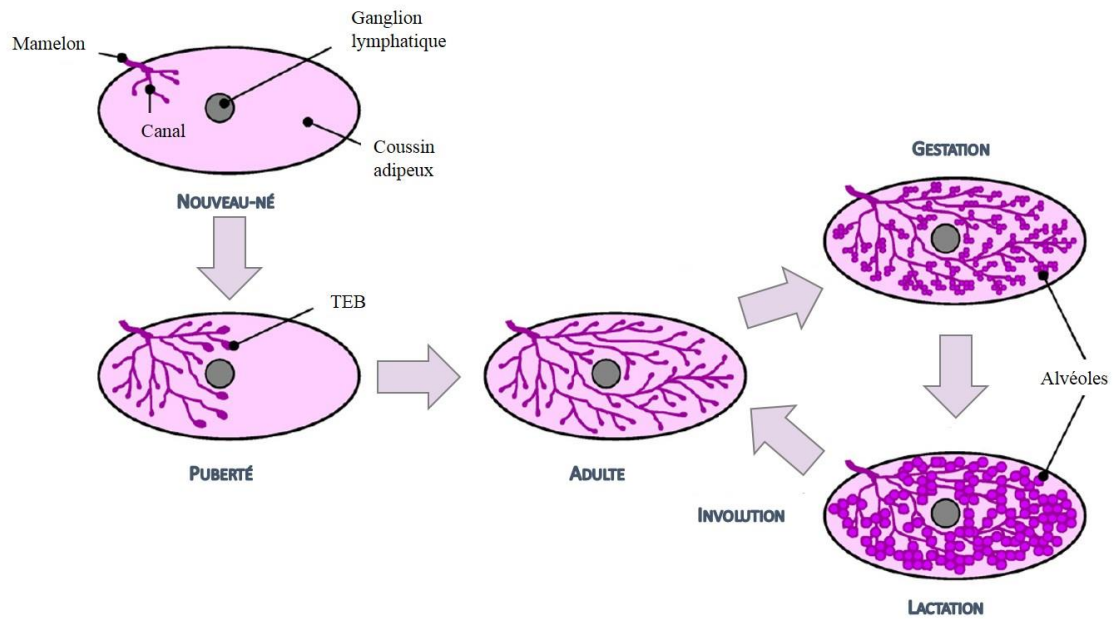
La glande mammaire murine est constituée à l'âge adulte d'un arbre unique avec un canal qui, en fonction du moment dans le cycle œstrien, présentera des alvéoles aux extrémités de ses branches. La différenciation alvéolaire terminale se fera lors de la gestation, avec une sécrétion du lait au niveau des bourgeons terminaux (Terminal end buds ou TEB) (Figure 2).

Comparativement, la glande mammaire de la souris présente un compartiment adipeux plus important que la glande mammaire humaine. Cette dernière est composée de tissu fibreux en plus grande quantité (Visvader, 2009).

## **1.2 Constituants de la glande mammaire**

L'épithélium de la glande mammaire forme une bicouche de cellules pseudostratifiées (Figure 3). Les cellules luminales au contact de la lumière sont de forme cuboïdale. En profondeur se trouve une couche de cellules aplaties, les cellules myoépithéliales. Les cellules luminales expriment les protéines du cytosquelette : cytokératines 8 et 18, des protéines des jonctions serrées (claudines) ainsi que pour certaines les récepteurs aux œstrogènes (ER), à la progestérone (PR) et à la prolactine (PrlR) (Briskin and O'Malley, 2010; Inman et al., 2015; Kendrick et al., 2008). Les cellules myoépithéliales sont caractérisées par l'expression de la P-cadhérine, des cytokératines 5 et 14, du facteur de transcription p63 et des marqueurs de muscle lisse (Deugnier et al., 2002; Williams and Daniel, 1983).

L'épithélium mammaire est séparé du stroma mammaire par une lame basale. Le stroma est composé d'adipocytes, de fibroblastes, des cellules immunitaires, des vaisseaux sanguins, des



**Figure 4 : Différents stades de différenciation de la glande mammaire chez la souris**

A la naissance, suite à la morphogénèse embryonnaire, la glande mammaire présente un arbre primitif inséré dans le coussin adipeux et relié à un mamelon. A la suite de signaux hormonaux lors de la puberté, une prolifération importante des cellules épithéliales canalaire aboutit à l'extension de l'arbre mammaire avec création d'extrémités alvéolaires qui sont pleinement fonctionnelles pour la lactation. L'arrêt de la succion au sevrage de la descendance entraîne une apoptose importante des TEB, phénomène appelé involution de la glande mammaire. À proximité de chaque arbre mammaire se trouve un ganglion lymphatique, organe clé du système immunitaire. (Adapté de Watson and Neoh, 2008)

vaisseaux lymphatiques, de fibres nerveuses entourées de matrice extracellulaire. Ce compartiment est indispensable à l'organogénèse embryonnaire de la glande mammaire, ainsi qu'au dimorphisme sexuel de l'organe.

Les adipocytes sécrètent notamment du VEGF, de la leptine et de la prolactine (Hovey and Aimo, 2010). Tandis que les fibroblastes, producteurs de la matrice extracellulaire produisent également des facteurs permettant sa dégradation, tels que les métalloprotéinases MMP (Simian et al., 2001). Les cellules immunitaires du stroma mammaire portent des récepteurs qui participent à leur recrutement au sein du compartiment stromal. CSF-1, éotaxine et C10 sont des chimiokines qui activent le rôle des macrophages et éosinophiles dans la morphogénèse mammaire (Gouon-Evans et al., 2000). Les lymphocytes B et T, ainsi que les macrophages possèdent des récepteurs à la prolactine (Brisken and Ataca, 2015; Chavez-Rueda et al., 2005).

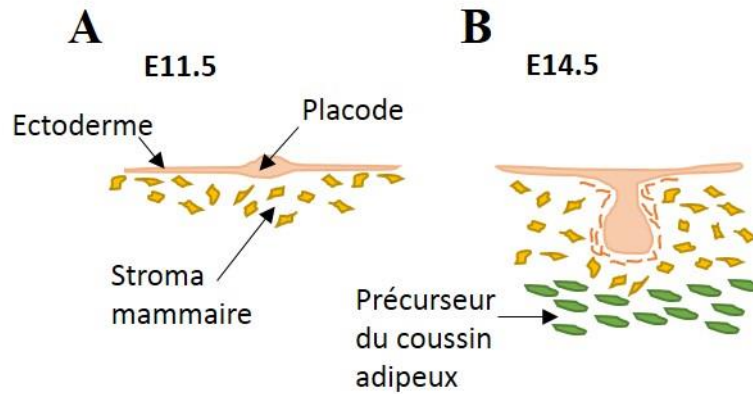
## **2. Mammogénèse**

Le développement de la glande mammaire chez la souris est séquentiel : on distingue 2 phases principales:

- la période embryonnaire, avec la formation d'un arbre primitif et le début du dimorphisme sexuel sous l'influence du mésenchyme dense et de la testostérone fœtale.
- la phase postnatale qui sera la plus importante. De la naissance à la puberté, la glande se met « au repos ». Puis des signaux hormonaux lors de la puberté et éventuellement au moment de la gestation vont conduire à une différenciation complète de la glande. À ce moment-là, le dimorphisme entre mâle et femelle sera complet. En fin de lactation, au sevrage de la descendance, la glande subit une involution (Macias and Hinck, 2012).

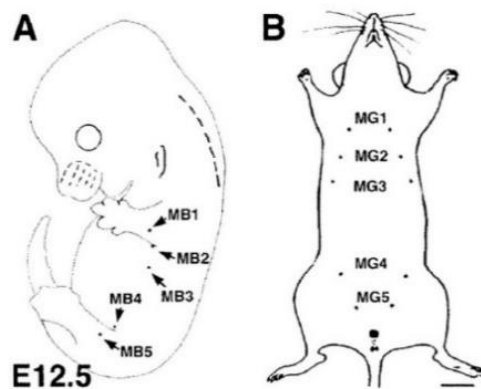
Toutes ces étapes de prolifération, différenciation et remodelage sont sous le contrôle de différents stimuli (internes mais également externes) qui rythment l'évolution architecturale de la glande (Figure 4).





**Figure 5 : Représentation schématique de la mammogénèse embryonnaire au stade E11,5 et 14,5**

A. La morphogénèse de la glande mammaire chez la souris commence au stade E10,5 avec la formation de 2 crêtes mammaires suivant un axe antéro-postérieur entre les pattes avant et les pattes arrières de chaque côté du flanc de l'embryon. À partir de ces lignes, les cellules ectodermiques migrent en 5 localisations : les placodes au stade E11,5. B. Le bourgeon mammaire est tapissé par des cellules mésenchymateuses constituant le mésenchyme dense. A partir du stade 14,5, un coussin adipeux primitif est formé par différenciation du mésenchyme dense. Les cellules épithéliales du bourgeon mammaire plonge vers ce précurseur du coussin adipeux. (Adapté de Veltmaat et al., 2003)



**Figure 6 : Localisation des glandes mammaires murines chez l'embryon et à l'âge adulte**  
 A : Positions des bourgeons mammaires chez l'embryon de E12,5. Les bourgeons mammaires se sont différenciés à partir des placodes suivant un axe antéro-postérieur entre les pattes avant et arrière : 3 paires thoraciques, une paire abdominale et une paire inguinale. MB : mammary bud (bourgeon mammaire). B : Positions des glandes mammaires chez la femelle adulte. MG : mammary gland (glande mammaire). Echelle : 670µm pour l'embryon, 1cm pour l'adulte. (Adapté de Veltmaat et al., 2003)

## **2.1 Période embryonnaire : formation d'un arbre primitif**

*La mammogénèse embryonnaire reste assez limitée, comparativement à la période postnatale. De plus, contrairement à cette dernière, elle est indépendante de signaux hormonaux. Néanmoins, l'exposition à des hormones exogènes ou à des perturbateurs endocriniens peut modifier le développement normal de la glande pendant cette période (Brisken and O'Malley, 2010). Cette thématique sera présentée dans le chapitre 4 de l'analyse bibliographique, relatif aux effets des perturbateurs endocriniens sur la santé.*

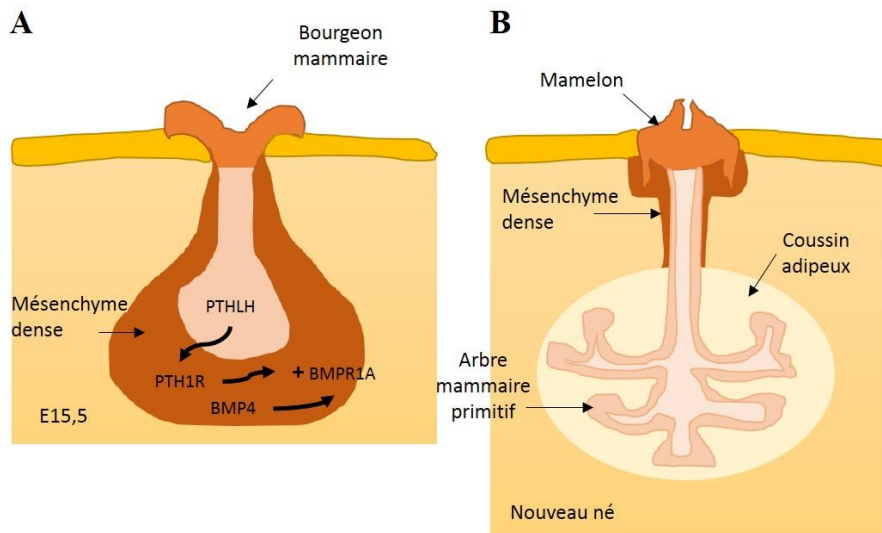
### **a. Formation des placodes mammaires**

Chez la souris, à partir du stade E10,5 (10,5 jours de vie embryonnaire), se forme de manière parallèle une paire de crêtes issue de l'ectoderme. Ces crêtes suivent l'axe antéro-postérieur sur la partie ventrale de l'embryon entre les pattes avant et arrière. Au stade E11,5, les cellules des crêtes mammaires ont migré de manière asymétrique pour former cinq paires de placodes. Ce mécanisme est contrôlé par la liaison de FGF10 sur le récepteur FGFR2-IIIb (Hynes and Watson, 2010). Plusieurs couches d'ectoderme font apparaître les placodes sous forme de « lentille » en surface de l'embryon (Figure 5A). Tandis que dans l'espèce humaine, une seule paire de placodes est mise en place durant le premier trimestre vers 5-6 semaines de grossesse (Dall et al., 2016; Javed and Lteif, 2013; Macias and Hinck, 2012).

### **b. Différenciation en bourgeons mammaires**

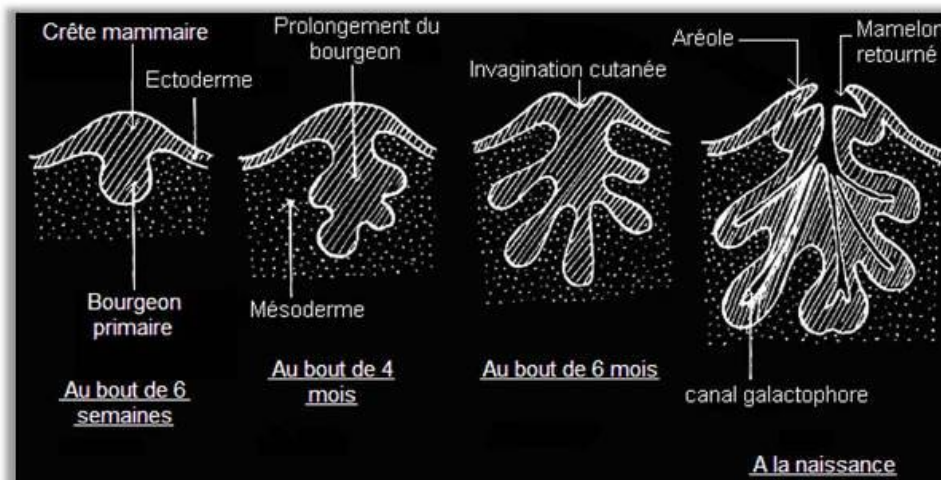
Au stade E12,5-13,5 chez la souris (en fin de premier trimestre chez l'Homme), les placodes se différencient en 5 paires de bourgeons de cellules épithéliales qui se surélèvent en surface de l'épiderme, puis s'allongent en profondeur (Dall et al., 2016). Ces 10 bourgeons mammaires évolueront au cours de la différenciation de l'organe en 10 glandes mammaires chez la souris adulte (Figure 6).

Des cellules mésenchymateuses se condensent autour du bourgeon pour constituer le mésenchyme dense mammaire au stade E13,5-14,5. Le mésenchyme dense exprime des glycoprotéines de la



**Figure 7 : Représentation schématique de la mammogénèse embryonnaire au stade 15,5 et en fin de gestation**

A. La communication entre l'épithélium mammaire et le mésenchyme dense néoformé par PTHrP et son récepteur de type I conduit à la formation du mamelon et à l'expansion canalaire de l'arbre primitif mammaire. B. En fin de gestation, au stade 18.5, le cordon de cellules épithéliales inséré dans le coussin adipeux se ramifie en un arbre mammaire primitif. (Adapté de Macias and Hinck, 2012)



**Figure 7bis : Mammogénèse fœtale dans l'espèce humaine**

Une paire de placodes est mise en place durant le premier trimestre vers 5-6 semaines de grossesse, puis le bourgeon mammaire commence à s'allonger dans le mésoderme en fin de premier trimestre de gestation. L'ébauche de la glande mammaire humaine s'invagine dans l'épithélium du bourgeon mammaire au bout de 6 mois. À la naissance, les glandes mammaires, mâle et femelle, sont anatomiquement semblables et constituent un arbre mammaire primitif non fonctionnel. La maturation fonctionnelle de l'organe chez l'individu féminin aura lieu à la puberté en présence des hormones sexuelles endogènes. (source : Bruno Quercia, Manon Gautheron et Alice Lepouze 2011 – 2012)

matrice extracellulaire comme la tenascine et la fibronectine, ainsi que des récepteurs aux androgènes et œstrogènes (Sakakura et al., 2013).

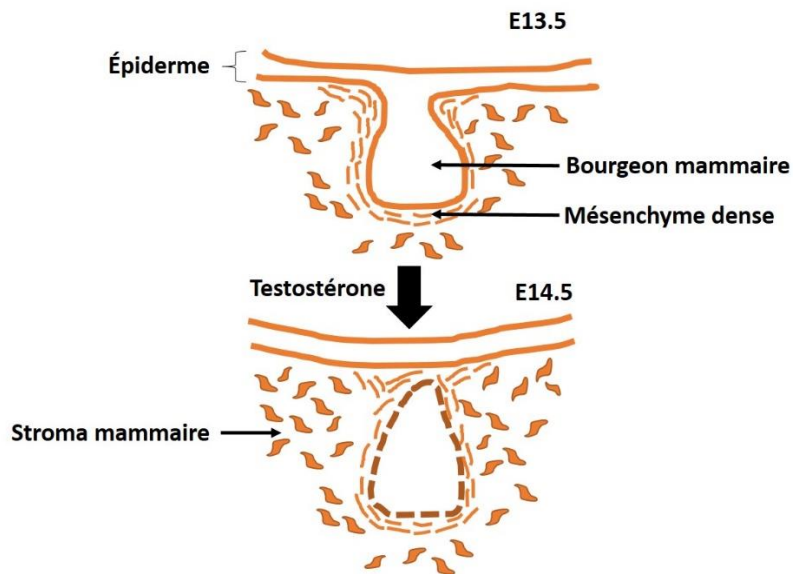
Le précurseur du coussin adipeux quant à lui se différencie à partir du mésenchyme dense profond au stade E14,5 (Figure 5B), il est moins dense et est au contact du germe du cordon épithélial en formation (Sakakura et al., 2013; Veltmaat et al., 2003). Ce tissu synthétise de la laminine et du protéohéparane sulfate (Kimata et al., 1985).

### **c. Formation de l'arbre mammaire primitif**

Une communication entre l'épithélium mammaire et le mésenchyme dense se fait par le biais d'un signal entre le peptide apparenté à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) du bourgeon et son récepteur de type I dans le mésenchyme (Figure 7A). L'activation du récepteur induit l'expression de BMP4 par le mésenchyme dense, qui exprimera alors le récepteur de BMP1A. Un rétrocontrôle négatif de cette boucle se fait par l'expression de la protéine noggin par le mésenchyme dense, ce qui bloque la production du PTHrP par le bourgeon (Hens et al., 2007; Macias and Hinck, 2012; Sakakura et al., 2013).

Grâce à ces mécanismes intercellulaires, l'ébauche de la glande mammaire s'invagine dans l'épithélium du bourgeon mammaire, puis s'allonge en cordon à partir du stade E15,5 à travers le mésenchyme dense vers le précurseur du coussin adipeux (Inman et al., 2015; Sakakura et al., 1987). Au stade E16,5-18, un épaississement de l'épithélium au niveau de l'invagination se met en place ; cette zone correspond au futur mamelon. De plus, l'induction du facteur de transcription *Msx2* inhibe la formation de follicule pileux à proximité du mamelon (Hens et al., 2007; Macias and Hinck, 2012; Veltmaat et al., 2003).

En parallèle de ce mécanisme, le canal primitif commence à se ramifier et une lumière se forme (Inman et al., 2015). En fin de gestation, au stade E18,5 chez la souris, un arbre mammaire primitif de taille réduite constitué d'un canal principal et de 10-15 branches est formé (Macias and Hinck, 2012; Sakakura et al., 1987), alors que dans l'espèce humaine, 15 à 20 lobes se rassemblent en une seule extrémité, le mamelon (Javed and Lteif, 2013) (Figure 7bis). Chez la souris, à la naissance, l'arbre mammaire primitif est composé de canaux épithéliaux rudimentaires et du stroma (tissu conjonctif, fibroblastes et tissu adipeux) (Richert et al., 2000) (Figure 7B).



**Figure 8 : Inhibition de la mammogénèse embryonnaire chez la souris mâle**

La morphogénèse de la glande mammaire reste identique chez la souris mâle et femelle jusqu'au stade E13. A partir de ce stade, sous l'action d'androgènes (testostérone) produits par les testicules, le bourgeon mammaire s'atrophie et se détache de l'épiderme. Le dimorphisme sexuel sera complet après l'action des hormones au moment de la puberté. (Adapté de Veltmaat et al., 2003)

#### **d. Début du dimorphisme sexuel de la glande mammaire**

Chez la souris, la mammogénèse présente un dimorphisme sexuel (Figure 8). En effet, chez le mâle, le développement de la glande mammaire ne suit pas le même processus à partir du stade E13. Les récepteurs aux androgènes situés dans le mésenchyme dense mammaire sont activés par des androgènes produits par les testicules à partir de ce stade (Sakakura et al., 1987, 2013). Le bourgeon mammaire s'atrophie puis se détache de l'épiderme au stade E15. Ce dimorphisme est encore plus évident après la puberté du fait de la présence des hormones sexuelles (Richert et al., 2000).

*La glande est dite quiescente de la naissance jusqu'au sevrage (3 semaines environ chez la souris), période où des signaux hormonaux vont initier les premières phases de la puberté. Il est néanmoins à préciser que sous l'influence des hormones maternelles, les nouveau-nés humains peuvent présenter une sécrétion des glandes mammaires, ce lait est appelé « lait de sorcière ». Cette « crise néonatale » est transitoire dans les premiers jours de vie (Macias and Hinck, 2012).*

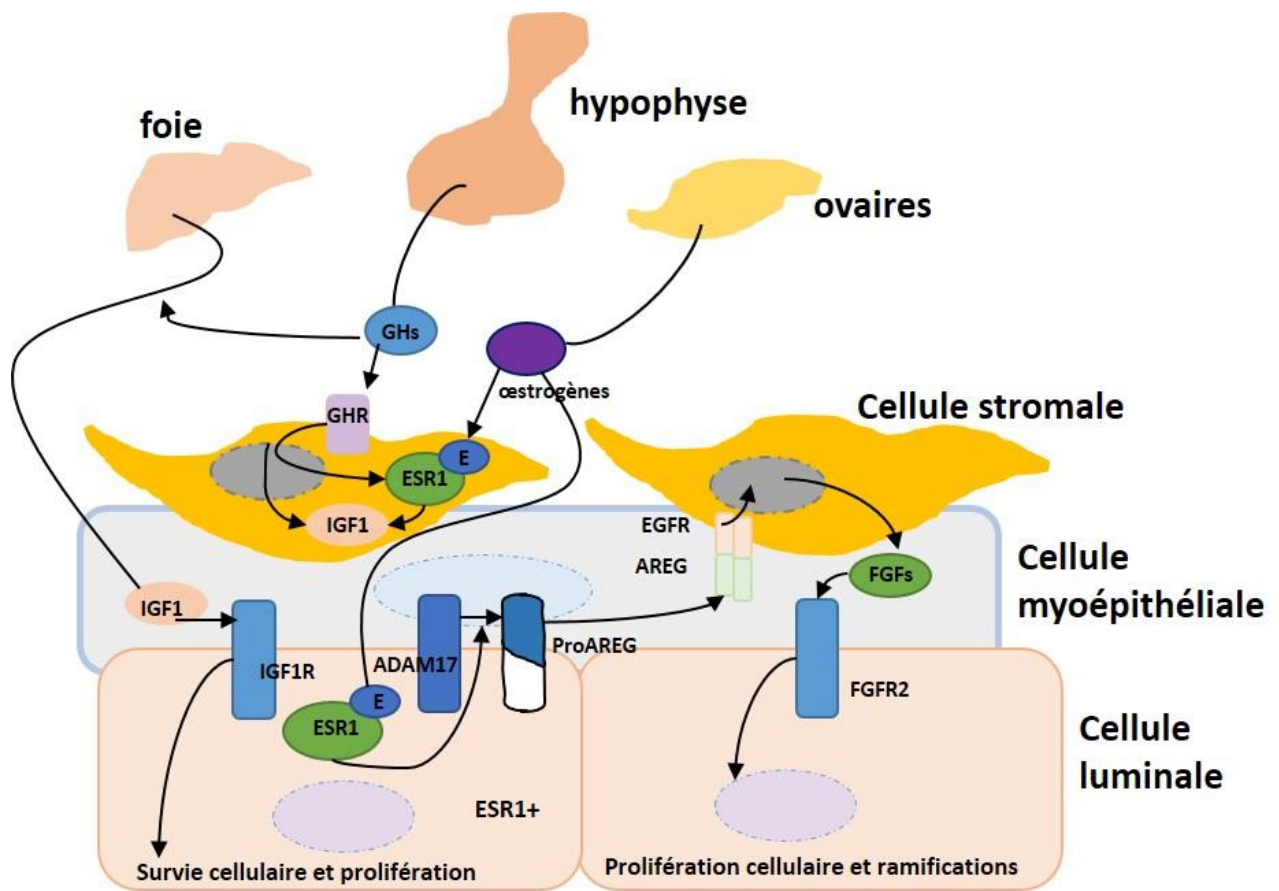
### **2.2 Période post-natale : puberté, lactation, involution**

Cette période se divise en 2 grandes phases de croissance : la croissance canalaire pendant la puberté et la différenciation alvéolaire pendant la gestation (Richert et al., 2000).

Au cours du développement postnatal de la glande, les différents constituants cellulaires sont indispensables à la morphogénèse de l'organe et à l'involution post-lactation. Plusieurs études ont montré que les mécanismes les mettant en jeu pouvaient être critiques lors d'une tumorigénèse (Brady et al., 2016; Gouon-Evans et al., 2000; Wiseman and Werb, 2002).

#### **a. Puberté et croissance canalaire de la glande mammaire**

*Pendant la période néo-natale (avant le sevrage), la glande mammaire « au repos » croît de manière allométrique à l'organisme. La puberté chez la souris débute au moment du sevrage à 3 semaines (PND21) avec des signaux hormonaux entraînant une prolifération importante de la glande mammaire. Cette période perdure jusque 6 semaines post-naissance, néanmoins les modifications de l'arbre mammaire se poursuivent jusqu'à 10-12 semaines. Les premiers TEB*



**Figure 9 : Représentation schématique des mécanismes moléculaires de la mammogénèse pendant la puberté**

L'extension de l'arbre mammaire par ramifications et prolifération des cellules canalaire est sous le contrôle de différents mécanismes moléculaires. La GH, sécrétée par l'hypophyse, en combinaison avec des œstrogènes ovariens et la production du facteur de croissance insuline like (IGF1) déclenche la prolifération des cellules stromales et épithéliales. En parallèle de ce mécanisme, la liaison des œstrogènes sur ER $\alpha$  entraîne l'activation d'un ligand du récepteur à l'EGF : AREG. La liaison de ce ligand à son récepteur dans les cellules stromales induit la production de facteurs de croissances des fibroblastes dont le récepteur FGFR2, activé dans les cellules luminales, contrôle le phénomène de ramification de l'arbre mammaire. (Adapté de Macias and Hinck, 2012)

*apparaissent vers 3 semaines, puis des ramifications secondaires et tertiaires se développent conduisant à un allongement de l'arbre mammaire (Richert et al., 2000).*

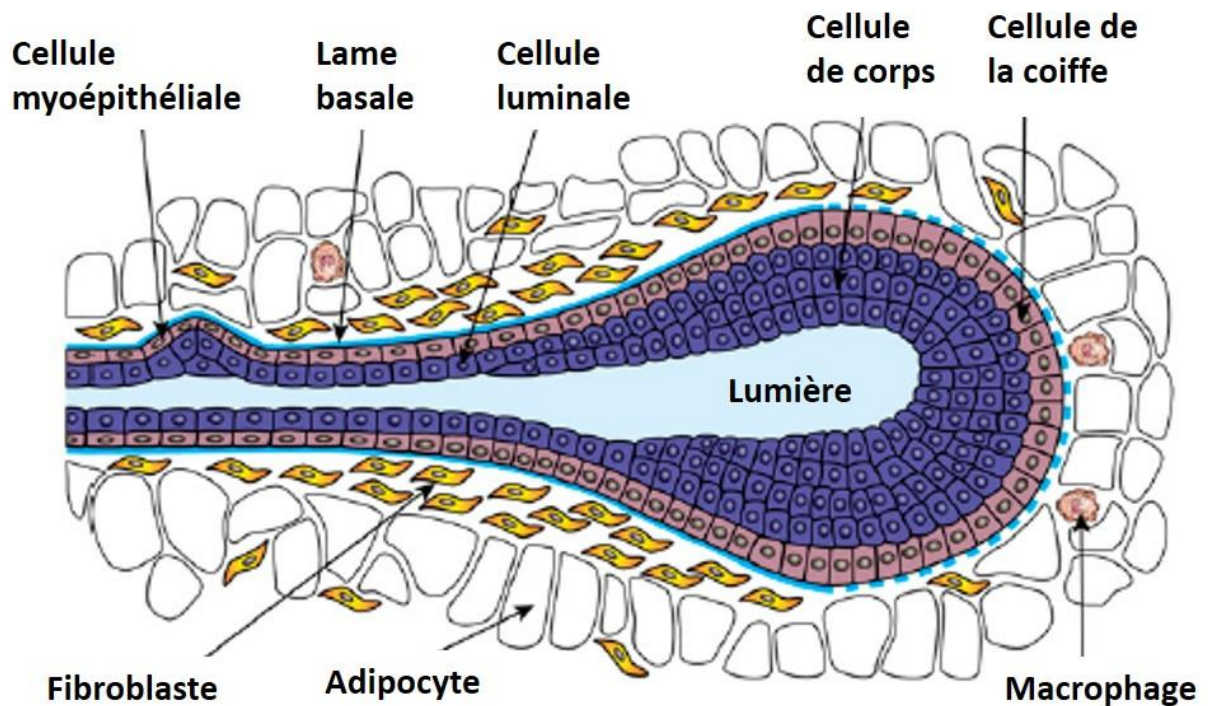
- ***Mécanismes moléculaires***

L'hypophyse sécrète en grande quantité pendant la puberté un facteur, l'hormone de croissance (GH), qui régule la prolifération des cellules de la glande mammaire, par la production du facteur de croissance insuline like 1 (IGF1) dans le stroma mammaire, ainsi que dans les cellules épithéliales. Cette prolifération est aussi sous le contrôle d'œstrogènes produits par les ovaires au moment de la puberté (Macias and Hinck, 2012) (Figure 9).

En effet, les œstrogènes agissent principalement par liaison au récepteur ER $\alpha$  présents dans l'épithélium mammaire (Krege et al., 1998). Cette voie sera alors activée en collaboration avec des co-activateurs transcriptionnels comme CITED1 (CBP/p300 interacting transactivator 1), SRC-1 (steroid receptor co-activator 1), SRC-3 (steroid receptor co-activator 3), NRIP1 (Nuclear receptor interacting protein 1) pour amener à la libération d'un ligand inactif du récepteur à l'EGF, l'amphiréguline (AREG) (McBryan et al., 2008; Nautiyal et al., 2013). AREG est activé par clivage à la surface des cellules épithéliales par une protéine de la famille ADAM, ADAM17 (aussi appelé TACE pour Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme). AREG va alors agir de façon paracrine sur des récepteurs à l'EGF présents sur les cellules stromales à proximité. Cette activation est médiée par un complexe hétérodimérique EGFR/ERBB2 et/ou EGFR/ERBB3, ce qui induit la libération de différents facteurs comme des FGF (facteur de croissance des fibroblastes), dont le récepteur FGFR2 se trouve sur les cellules épithéliales (McBryan et al., 2008; Qu et al., 2006; Sebastian et al., 1998). D'autres protéines sont indispensables à cette prolifération de l'épithélium, telles que des métalloprotéinases (MMP2, MMP3, MMP14) ou encore MFGE8 (milk fat globule-EGF factor 8). Ces mécanismes conduisent à la forte prolifération des cellules épithéliales et à la croissance canalaire de la glande mammaire par création de ramifications (McBryan et al., 2008; Sternlicht et al., 2005).

Pendant la puberté, 3 isoformes de la famille de TGF $\beta$  (TGFB1, TGFB2, TGFB3) agissent sur la croissance canalaire de l'arbre mammaire. Il a notamment été montré dans l'épithélium mammaire que TGFB1 pourrait avoir un effet inhibiteur par une action autocrine, bien qu'il soit





**Figure 10: Organisation schématique d'un bourgeon terminal de la glande mammaire (TEB)**

Après la puberté, des bourgeons terminaux immatures (TEB) sont formés aux extrémités de l'arbre mammaire. Ils sont composés de cellules de corps et de cellules de la coiffe dans l'axe apico-basal. Ces deux types de cellules épithéliales sont progéniteurs des cellules luminales et myoépithéliales et se distinguent par des marqueurs spécifiques. (Adapté de Visvader, 2009)

paradoxalement nécessaire pour l'élongation du canal par voie paracrine (Ingman and Robertson, 2008).

La morphogénèse de l'organe pendant la puberté serait donc la synthèse de facteurs pro et antiprolifératifs, ce qui permettrait la modulation fine des espacements entre les ramifications de l'arbre mammaire (Macias and Hinck, 2012).

- ***Constituants cellulaires des TEB***

L'ensemble de ces mécanismes moléculaires durant la puberté conduit à l'apparition de TEB, zones de forte prolifération, chez la souris (Figure 10). Ces bourgeons non fonctionnels sont composés de plusieurs types de cellules épithéliales : les cellules de la coiffe au contact de la lame basale et des cellules luminales, dites de corps, au contact de la lumière. Le bourgeon se poursuit par un canal recouvert de cellules luminales puis de cellules myoépithéliales en suivant l'axe apico-basal.

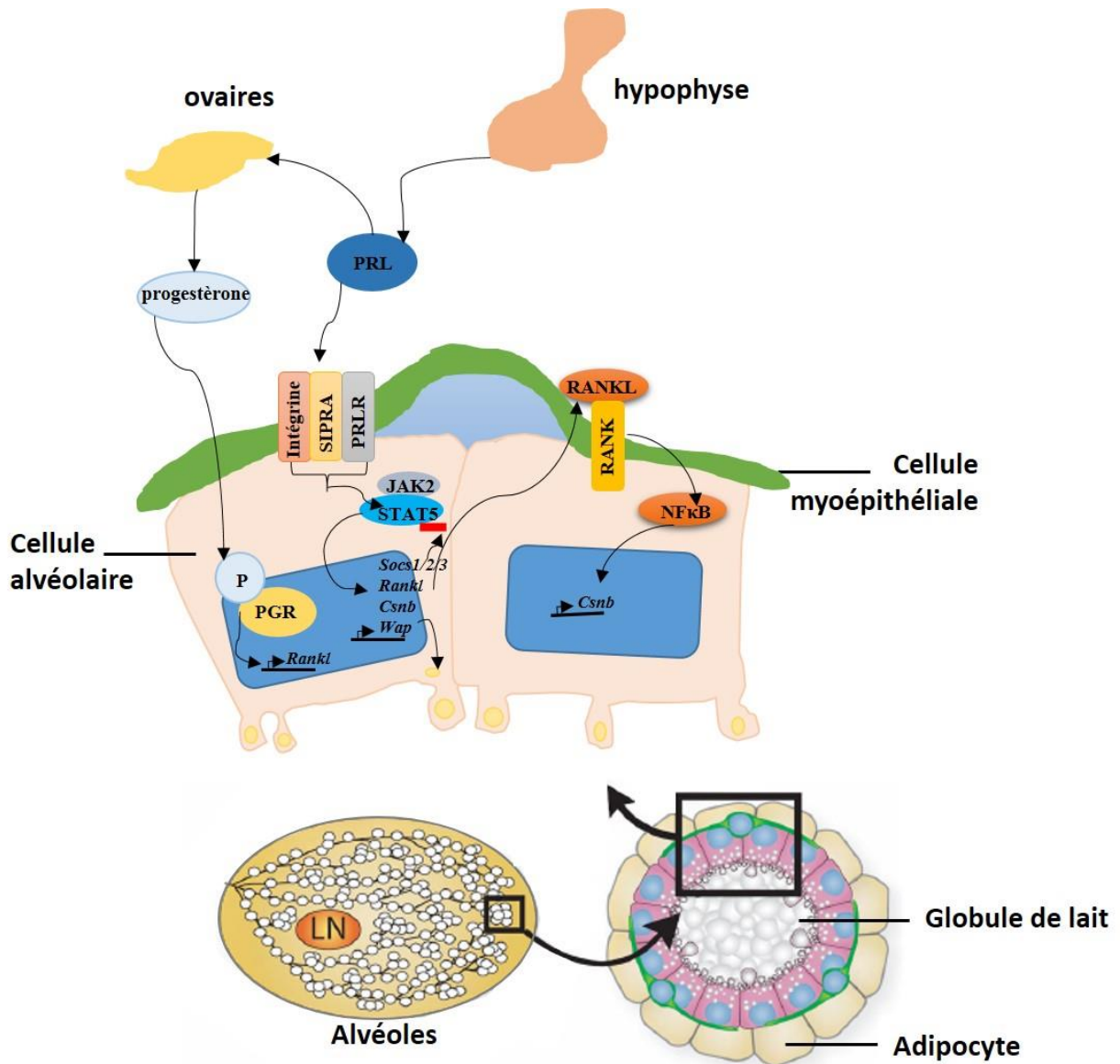
Les cellules de la coiffe sont des cellules indifférenciées multipotentes (Daniel and Silberstein, 2000; Srinivasan et al., 2003). Elles expriment le récepteur néogénine dont le ligand, Netrin1, est exprimé par les cellules de corps. La liaison de la Netrin1 sur son récepteur permettrait la stabilité de l'architecture des TEB (Faraldo et al., 2005). Les cellules de corps au contact de la lumière dans les TEB expriment également la E-cadhérine (Srinivasan et al., 2003).

Les cellules de la coiffe sont progénitrices des cellules myoépithéliales et expriment les mêmes marqueurs décrits précédemment dans la partie 1.2 (Deugnier et al., 2002; Williams and Daniel, 1983).

## **b. Cycle œstrien : remodelage de l'arbre mammaire**

Chez la femelle vierge, à chaque cycle œstrien, l'épithélium mammaire prolifère et se renouvelle sous contrôle de modifications des métalloprotéinases MMP9, MMP13 et des inhibiteurs de métalloprotéinases TIMP3, TIMP4 (Fata et al., 2001).

Après la puberté, des cycles œstriens de 4 à 6 jours se mettent en place chez la souris sous dépendance d'hormones ovariennes (œstrogène et progestérone). La glande mammaire subit des



**Figure 11: Représentation schématique des mécanismes moléculaires de l'alvéologénèse et lactogénèse pendant la gestation**

La prolactine (PRL) et la progestérone vont agir conjointement pour permettre la maturation fonctionnelle des cellules alvéolaires et l'établissement de la lactogénèse, en activant notamment RANKL et la voie JAK2/STAT5 (Adapté de Macias and Hinck, 2012).

remodelages de son tissu épithélial au cours de ces cycles et des oscillations hormonales dans l'organisme. Pendant la première phase du cycle, l'hormone stéroïdienne ovarienne, l'œstradiol, va entraîner de façon indirecte une prolifération de l'épithélium canalaire mammaire avec une ramification transitoire des branches. Puis pendant le diœstrus, en fin de cycle, la baisse progressive de la progestérone en absence de gestation induira une apoptose massive des branches néoformées par le biais d'inhibiteurs de MMP, tels que TIMP1 et une modulation de l'expression de membres de la famille de Bcl-2 (induction de Bcl-2, répression de Bax). Ce remodelage de l'arbre mammaire pendant la phase post-ovulatoire (diœstrus) est aussi sous le contrôle de la tenascine ; le gène Hox6 pourrait avoir un rôle initiateur de ce processus (Andres and Strange, 1999; Silberstein et al., 2006).

### **c. Gestation et lactation : alvéologénèse et lactogénèse**

*Afin de permettre la lactation, la glande mammaire nécessite une totale maturation de l'organe comprenant la formation d'alvéoles fonctionnelles. Ces mécanismes se produisent pendant la gestation. Tout d'abord, l'arbre va continuer de s'étendre dans le coussin adipeux avec la création de branches secondaires et tertiaires (voir figure 2). Par la suite, l'alvéologénèse se produit aux extrémités des branches. En fin de gestation, les cellules épithéliales alvéolaires sont alors capables de sécréter le lait.*

Pendant la gestation, d'importantes modifications de l'épithélium mammaires vont avoir lieu. Le stroma subit également une amplification de la vascularisation, une réorganisation des fibroblastes et des adipocytes, ainsi que des cellules immunitaires (Need et al., 2014).

En début de gestation, la prolactine (Prl), une hormone hypophysaire, permet le maintien du corps jaune, sécréteur de progestérone (Andrews et al., 2001; Neville et al., 2002) (Figure 11). La progestérone, sécrétée par le corps jaune puis par le placenta, ainsi que la prolactine vont agir conjointement, *via* la liaison au récepteur PR-B. Cette liaison va induire l'activation de RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) et de la cycline D1 (Mulac-Jericevic et al., 2003). Ces deux acteurs protéiques sont indispensables pour la maturation fonctionnelle des cellules alvéolaires sécrétrices (Need et al., 2014).

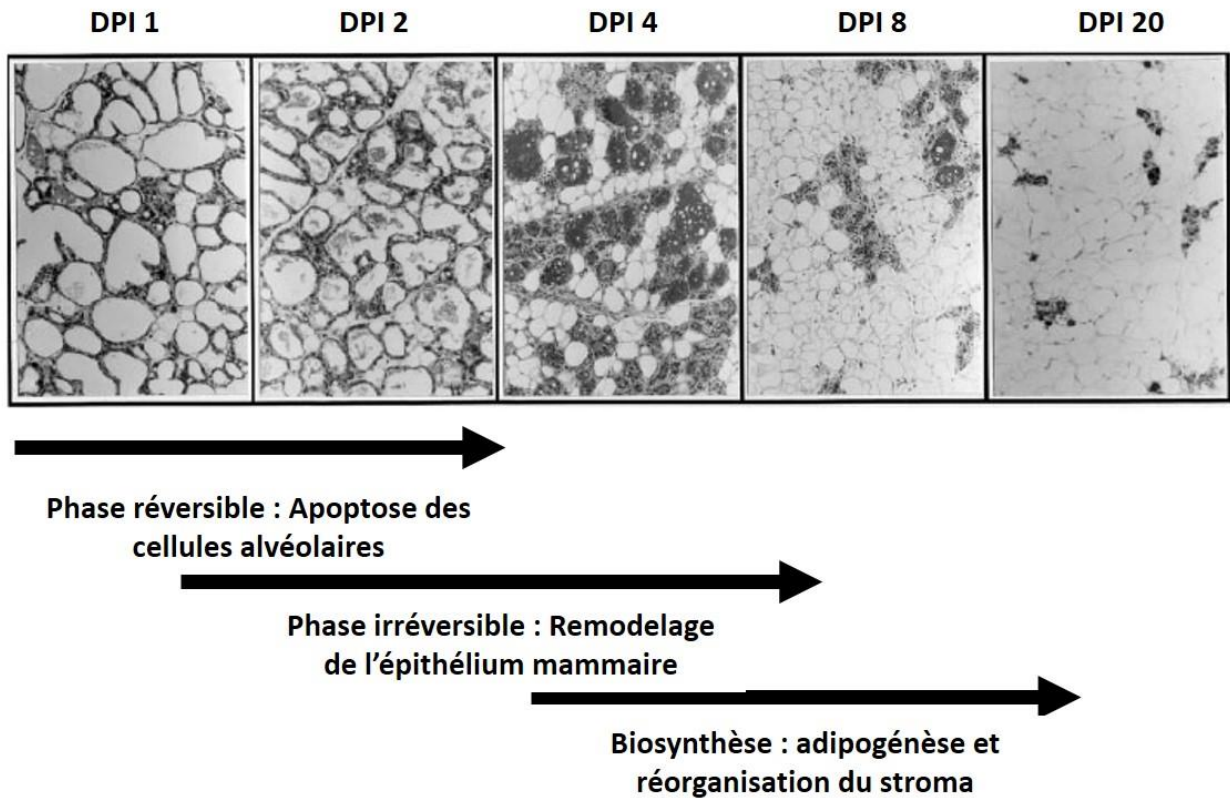
De plus, la voie JAK2/STAT5 activée par la liaison de Prl sur son récepteur est nécessaire dans l'alvéologénèse mais également dans la lactation avec la production de WAP (whey acidic protein) et de la  $\beta$ -caséine, deux composants essentiels du lait (Wagner et al., 2004).

La voie PI3K/Akt semble également jouer un rôle puisqu'on observe l'activation d'Akt1 en fin de gestation. Il y a alors production de prolactine autocrine ce qui induirait l'initiation de la lactation (Oliver and Watson, 2013). La première étape de la lactogénèse se déroule en fin de gestation: la production de lait est inhibée par une forte concentration de progestérone plasmatique. Néanmoins des protéines du colostrum peuvent être retrouvées dans le sang. Le colostrum est le premier lait sécrété par la glande mammaire (Rezaei et al., 2016). En comparaison avec le lait mature, il est plus riche en protéines, sels minéraux et vitamines liposolubles, et moins en vitamines hydrosolubles, lactose et lipides. Ils participent tous les deux à la protection immunitaire du nouveau-né par la présence d'immunoglobulines en grande quantité.

D'autres facteurs comme l'hormone lactogène placentaire (HPL), les glucocorticoïdes et l'hormone de croissance participent à la mise en place de la lactation pendant la gestation (Neville et al., 2002). Néanmoins, le rôle de GH pendant l'alvéologénèse est discuté.

À la naissance, une chute de la progestérone lève l'inhibition de la production du lait, ce qui amorce la deuxième phase de la lactogénèse. Dans le même temps, une forte production de prolactine a lieu. Ces deux processus combinés entraînent la synthèse de composants du lait tels que le lactose, ainsi qu'une croissance terminale de la glande mammaire dépendante des récepteurs à la prolactine (Brisken and O'Malley, 2010; Camarillo et al., 2001; Rezaei et al., 2016). La succion du nouveau-né entraîne une libération de l'ocytocine par l'hypothalamus ce qui induit la contraction des cellules myoépithéliales. Ce mécanisme permet l'acheminement du lait depuis les alvéoles jusqu'au mamelon (Gimpl and Fahrenholz, 2001; Rezaei et al., 2016).

La lactation est maintenue par la sécrétion de la prolactine et de l'ocytocine, qui pour la première agit sur les cellules alvéolaires sécrétrices et pour la seconde stimule les cellules myoépithéliales qui acheminent le lait jusqu'au mamelon (Neville et al., 2002). Ce mécanisme d'entretien de la lactation est appelée galactopoïèse.



**Figure 12 : Aspects histologiques et caractéristiques principales de l'involution de la glande mammaire**

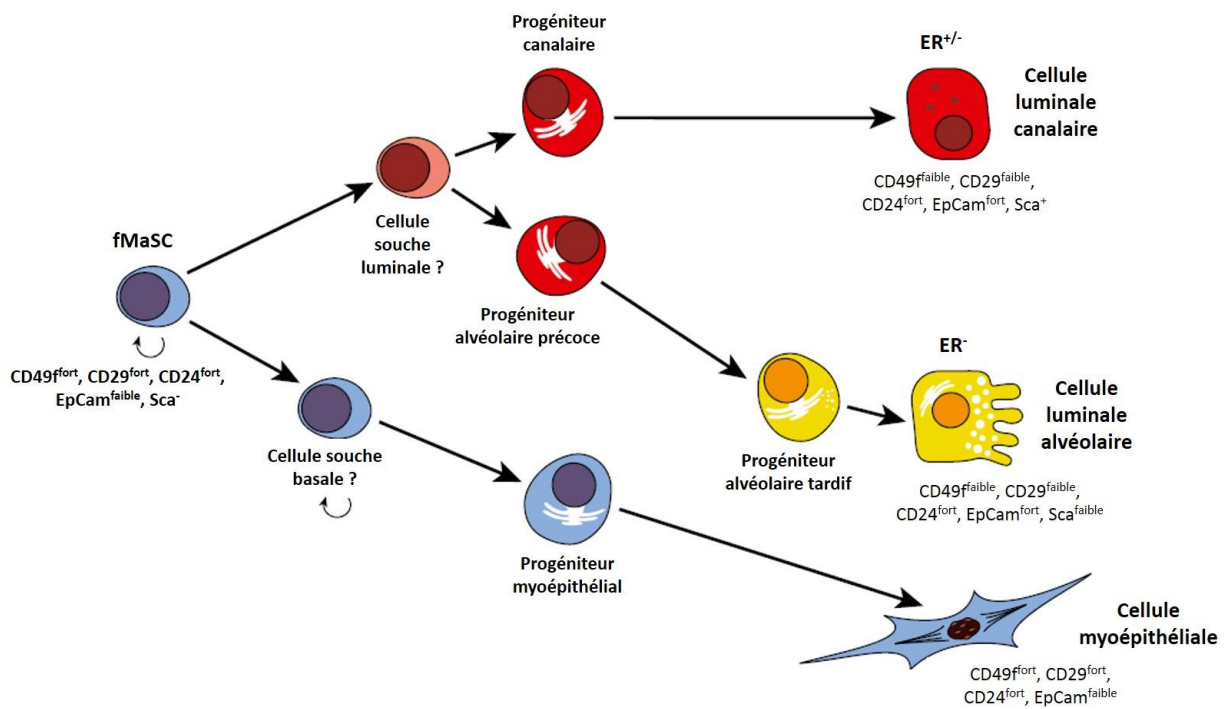
L'involution de la glande mammaire comprend plusieurs phases. Tout d'abord, une première phase réversible à la suite de l'arrêt de la succion des nouveau-nés qui se caractérise par un mécanisme d'apoptose des cellules alvéolaires. Cette phase est suivie par une phase irréversible avec un remodelage complet de l'épithélium, conjointement à une restructuration du stroma mammaire adjacent. En fin d'involution, la glande mammaire présente un aspect similaire à son état prégestationnel. (DPI : jour post involution). (Adapté de Alexander et al., 2001)

#### **d. Involution**

*L'involution de la glande mammaire est un mécanisme induit en absence de succion par la descendance au moment du sevrage (PND21). Ce phénomène amène un remodelage complet de l'arbre mammaire avec une apoptose massive des bourgeons alvéolaires sécréteurs de laits et des ramifications secondaires et tertiaires. En fin d'involution (après 3 semaines chez la souris), l'arbre mammaire a une configuration similaire à un état pré-gestationnel et est prêt à entrer dans un nouveau cycle reproducteur (Richert et al., 2000).*

Ce mécanisme se déroule en deux phases et concerne uniquement les structures localisées dans la glande mammaire (Figure 12). La première phase, réversible, dure 48h et est initiée à l'arrêt de la succion, ce qui entraîne une chute de la sécrétion d'ocytocine. Les cellules alvéolaires expriment alors des marqueurs d'apoptose comme le clivage de la caspase 3 (Baxter et al., 2007; Radisky and Hartmann, 2009). Le lait s'accumule dans les alvéoles conduisant à une baisse de la production hormonale de prolactine. À ce moment, des modifications transcriptionnelles ont lieu, comme l'activation de NF- $\kappa$ B et de LIF (leukemia inhibitory factor), des facteurs pro-apoptotiques Bax et Bcl-x, l'inhibition de Stat5, NF1 et Oct1. L'activation de Stat3 par LIF semble avoir un rôle prépondérant dans ce mécanisme (Baxter et al., 2007; Kritikou et al., 2003; Marti et al., 1999; Watson and Neoh, 2008). Il y a alors induction de l'expression des cathepsines B et L (protéases lysosomales) et inhibition de l'expression de serpin 2a spi2A, ce qui entraîne la perméabilisation des membranes lysosomales dans un processus Stat3-dépendant (Kreuzaler et al., 2011). C'est à partir de ce stade que le remodelage sera visible pendant la deuxième phase de l'involution avec une réorganisation des cellules canaliculaires par apoptose massive et la restructuration du stroma mammaire avec un phénomène d'adipogénèse (Alexander et al., 2001; Richert et al., 2000; Watson, 2006). Des métalloprotéinases (MMP2, MMP3, MMP9) interviennent dans ce processus. Enfin, des phagocytes éliminent les débris cellulaires engendrés par ces mécanismes (Watson, 2006). Cette seconde phase est irréversible.

Le réseau mammaire revient à sa configuration post-puberté, il faudra une autre gestation pour que le mécanisme de maturation alvéolaire avec sécrétion du lait se remette en place.



**Figure 13 : modèle hypothétique de la hiérarchie des lignages épithéliaux de la glande mammaire**

Toutes les populations de cellules épithéliales de la glande mammaire sont issues de la même cellule mère : fMaSC. Cette population de cellules souches fœtales est bipotente et donnera naissance aux 2 lignages cellulaires caractéristiques de l'épithélium mammaire : la lignée luminaire et la lignée myoépithéliale. Les marqueurs caractéristiques décrits permettent de discriminer les différentes populations par cytométrie en flux. (Adapté de Visvader, 2009)



### 3. Les cellules souches mammaires (MaSC)

*L'existence de cellules souches mammaires a été exploré afin de comprendre les mécanismes à l'origine de la tumorigénèse mammaire. En effet, différents types de tumeurs mammaires existent et peuvent se distinguer notamment par leurs caractéristiques moléculaires, relatives aux différentes sous-populations des lignages de cellules épithéliales mammaires.*

En fonction de la période du cycle reproducteur (cycle œstrien, gestation, lactation, involution), la glande mammaire subit des remodelages tissulaires importants alternant prolifération et apoptose des cellules. Ces mécanismes montrent une capacité au tissu à s'auto-renouveler et à se différencier vers les lignages cellulaires différents de l'organe. Ces deux caractéristiques (auto-renouvellement et différenciation) ont été mises en évidence en 1959 par Kenneth B. DeOme (Deome et al., 1959) par transplantation orthotopique chez la souris C3H de fragments d'épithélium mammaire dans un tissu adipeux dépourvu de glande mammaire. Après plusieurs semaines de transplantation, DeOme et collègues ont constaté le développement de canaux épithéliaux. De plus, cette théorie de régénération du tissu mammaire a été appuyée en 1975 par Charles W. Daniel. Son équipe conclut que toute portion de l'épithélium mammaire peut se régénérer dans un environnement adéquat : le tissu adipeux.

Cette régénération de la glande mammaire à partir de l'épithélium transplanté laisse à penser qu'il y a, disséminées dans toutes portions des canaux mammaires, des cellules souches mammaires, appelées MaSC dans la littérature, à l'origine de ce mécanisme. Les caractéristiques de ces différentes populations épithéliales ont été explorées plus précisément depuis les années 2000 en les purifiant par cytométrie en flux et par l'étude des marqueurs spécifiques des populations cellulaires (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006).

Au sein de l'épithélium mammaire, deux lignées sont distinguées : une lignée de cellules luminales au contact de la lumière et une lignée de cellules myoépithéliales basales. Un modèle hypothétique de la hiérarchie cellulaire conduisant à la ségrégation de ces deux lignées épithéliales a été établi (Figure 13).

La cellule mère à l'origine de ces deux lignées filles est appelée fMasSC pour cellule souche mammaire fœtale. Cette population de cellules multipotentes, présente pendant la vie embryonnaire, constitue donc la première population de cellules souches mammaires. La

proportion de fMaSC augmente fortement au cours de la mammogénèse. Ces cellules souches possèdent des caractéristiques des deux lignées cellulaires de la glande mammaire, telles que l'expression des cytokératines lumineales 8 et 18, ainsi que la cytokératine 14 et la vimentine (caractéristiques myoépithéliales) (Shackleton et al., 2006; Spike et al., 2012; Visvader and Stingl, 2014). Ces cellules présentent les marqueurs de surface CD24<sup>fort</sup>, CD49f<sup>fort</sup> (sous-unité  $\alpha 6$  des intégrines), CD29<sup>fort</sup> (sous-unité  $\beta 1$  des intégrines), EpCAM<sup>fort</sup> et sont ER $\alpha$ -. Elles ont un potentiel clonogénique supérieur aux cellules souches mammaires adultes (aMaSC) *in vitro* et *in vivo* (Makarem et al., 2013).

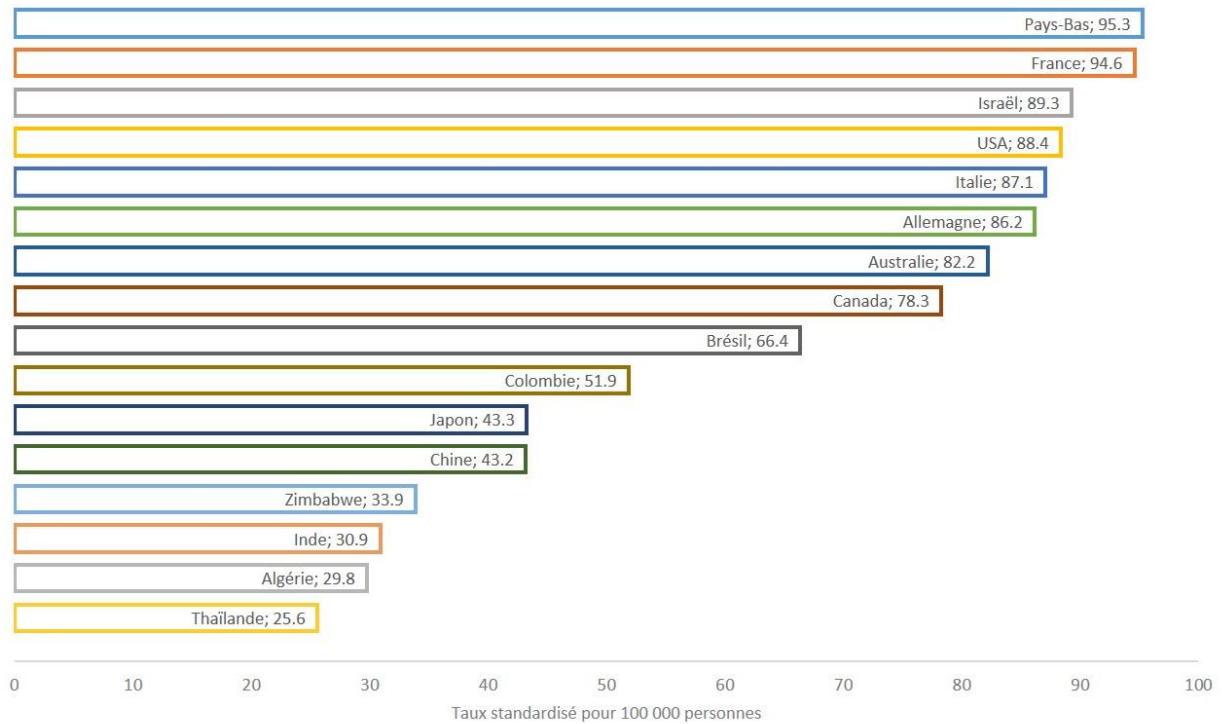
Dans la glande mammaire adulte, trois types de progéniteurs épithéliaux sont retrouvés : des progéniteurs formant des colonies portant des marqueurs spécifiques des cellules lumineales, des progéniteurs formant des colonies portant des marqueurs spécifiques des cellules basales myoépithéliales et enfin des progéniteurs bipotents aboutissant à ces deux types de lignages cellulaires (Stingl et al., 2001). Les deux premiers progéniteurs ont été partiellement décrits précédemment dans la partie 2.2.a, en effet les cellules de la coiffe caractérisées par l'expression des cytokératines 5 et 14 sont à l'origine des cellules myoépithéliales, tandis que les cellules de corps (cytokératines 8, 18 et 19+) sont à l'origine des cellules lumineales. Les cellules lumineales sont EpCam<sup>fort</sup>, CD29<sup>faible</sup> et CD49f<sup>faible</sup>, tandis que les cellules basales sont EpCam<sup>faible</sup>, CD29<sup>fort</sup> et CD49f<sup>fort</sup> (Sreekumar et al., 2015; Visvader, 2009; Visvader and Stingl, 2014).

Au cours de la gestation, il y a formation de cellules alvéolaires par différenciation à partir des progéniteurs de type luminal. Les cellules alvéolaires, contrairement aux cellules lumineales canalairees n'expriment pas Sca1 (Stem Cell Antigen 1) et sont ER $\alpha$ - (les cellules canalairees sont ER $\alpha$ +/-).

## II. Développement anormal de la glande mammaire

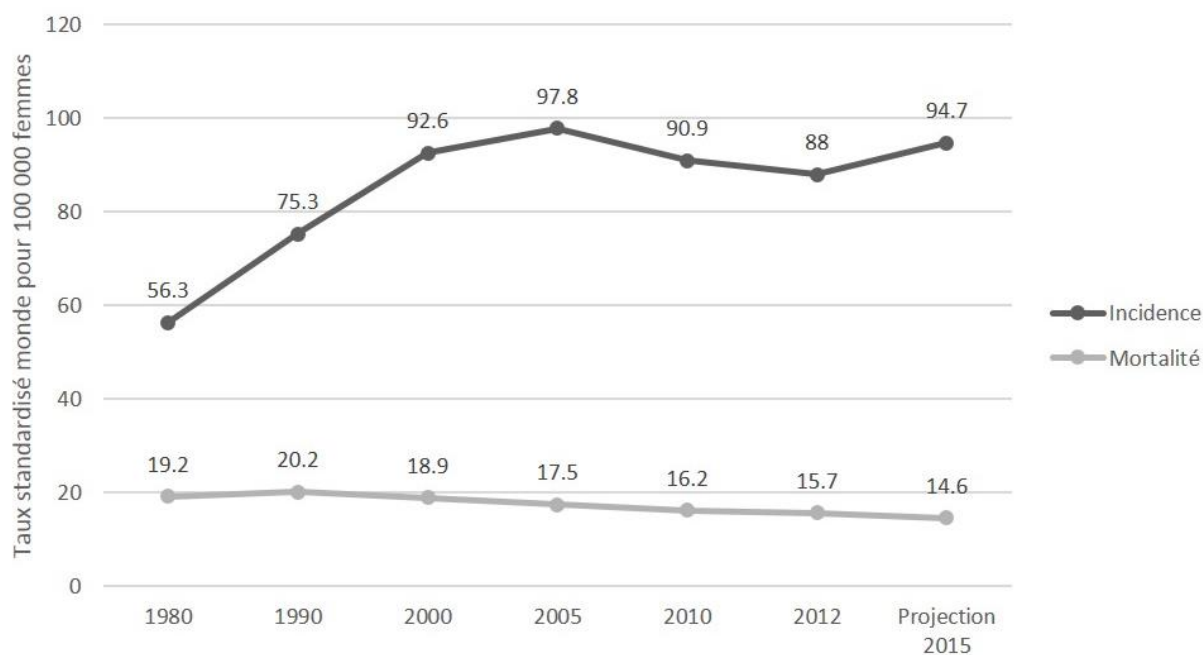
*Le terme « cancer du sein » désigne les tumeurs malignes de la glande mammaire quel que soit leur tableau clinique. Ces pathologies présentent la plus forte incidence parmi les cancers féminins et constituent la première cause de décès par cancer chez la femme en France métropolitaine.*

## Incidence du cancer du sein chez la femme sur la période 2006-2007



**Figure 14 : Incidence du cancer du sein chez la femme sur la période 2006-2007**

L'incidence du cancer du sein présente une variation pouvant aller jusqu'à un facteur 5 dans le monde. Ainsi des pays tels que la Thaïlande et l'Algérie montre une incidence assez faible avec un taux standardisé inférieur à 30 cas pour 100 000 femmes, tandis que des pays comme les Pays-Bas ou la France présentent un taux autour de 95 cas pour 100 000 femmes. Adapté de American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition



**Figure 15 : Évolution de l'incidence et de la mortalité pour le cancer du sein chez la femme en France de 1980-2015**

De 1980 à 2000, l'incidence du cancer du sein en France augmente, tandis que la mortalité diminue. Puis, l'incidence du cancer du sein présente une diminution jusqu'en 2012 ; il est néanmoins à observer que les projections 2015 indiquent une nouvelle augmentation de l'incidence. La mortalité par cancer du sein est toujours en décroissance. Les projections en 2015 représentent des hypothèses d'évolution élaborées par modélisation statistique d'après l'observation des données recueillies de 1980 à 2011. Source : Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. (Adapté de INCa 2013, Léone et al., 2015)

*L'initiation d'un cancer résulte d'une combinatoire de facteurs encore mal identifiés, parmi lesquels l'exposition périnatale à des polluants ou perturbateurs endocriniens que je développerai dans la dernière partie de cette analyse bibliographique. Cette exposition précoce peut entraîner des modifications à long terme résultant de perturbations du mode de différenciation des cellules saines de la glande mammaire. À l'âge adulte, ces altérations sont susceptibles d'augmenter le risque d'une transformation néoplasique des cellules épithéliales mammaires.*

## **1. Epidémiologie du cancer du sein**

En 2012, les données du GLOBOCAN indiquaient que 14,1 millions de nouveaux cas de cancer pour 8,2 millions de décès étaient recensés par an dans le monde entier. Les cancers présentant l'incidence et la mortalité la plus forte sont le cancer du poumon et le cancer du sein, respectivement chez l'homme et chez la femme. Le cancer du sein contribue pour 1,7 millions de nouveaux cas et près de 522 000 décès en 2012, ce qui représente 25% de l'incidence et 15% de la mortalité pour cancer chez la femme dans le monde. Une variation de l'incidence jusque 5 fois peut être retrouvée entre les pays. Les pays dits « développés » comme les pays européens présentent une incidence plus élevée que les pays d'Afrique ou encore d'Asie (Figure 14). Ces observations peuvent s'expliquer par différents points développés un peu plus loin (dépistage plus précoce, facteurs de risque) (IARC)

Depuis 2004, en France, le cancer est la première cause de décès (29,8% en 2009), devant les maladies de l'appareil circulatoire (27% en 2009, Inserm-CépiDc). En 2011, le cancer du sein présentait la plus forte incidence des cancers féminins (33,4%) en France métropolitaine devant le cancer colorectal (12%) et constituait la première cause de décès par cancer chez la femme cette même année (18,3%, Francim, InVS). Les tumeurs mammaires peuvent également toucher les hommes mais de manière beaucoup plus sporadique (inférieur à 1% des cas diagnostiqués) et résultent généralement de prédispositions génétiques. Par rapport au niveau mondial, l'incidence du cancer du sein en France se situe dans la moyenne haute des pays industrialisés avec plus de 94 cas pour 100 000 femmes.

Depuis 1980, le nombre de tumeurs mammaires diagnostiquées augmente (Figure 15). Ce phénomène peut s'expliquer par une modification des comportements reproducteur et alimentaire,

par l'utilisation de contraceptifs oraux et de traitements hormonaux substitutifs à la ménopause, ainsi que par des dépistages plus précoces (Parkin, 2009; Torre et al., 2015). À partir des années 2000 et jusque 2008, la courbe de l'incidence du cancer du sein présente une diminution assez nette, puis la tendance semblerait être à une hausse de l'incidence du cancer du sein ces dernières années (Molinié et al., 2014). L'âge moyen au diagnostic en 2012 était de 63 ans en France. Le taux de mortalité tend à diminuer avec un âge médian de 73 ans au décès en 2012 (Institut National du Cancer, 2014). Ces observations sont expliquées dans la littérature par des campagnes organisées de dépistages et donc la mise en place de prises en charge thérapeutiques du cancer plus précoces, par l'amélioration de l'efficacité de ces thérapies et par des limitations strictes des traitements contre les effets de la ménopause (Clarke et al., 2006; Daubisse-Marliac et al., 2010; Glass et al., 2007; Jemal et al., 2010; MacMahon and Cole, 2008). Avec une mortalité moyenne à 5 ans de 15% entre 1989 et 2007, le cancer du sein demeure encore actuellement une pathologie pour laquelle la recherche est particulièrement sollicitée afin de comprendre les causes d'échappement ou de résistance aux traitements et de mettre en œuvre de nouvelles thérapies (Francim, InVS 2013). C'est dans ce cadre que s'inscrit la première partie des résultats que je présenterai.

Enfin, comme indiqué précédemment, il est à noter que les taux d'incidence supérieurs dans les pays à ressources élevées peuvent être liés au diagnostic plus précoce et plus efficace, mais aussi au mode de vie et à des facteurs environnementaux (*Institut National du Cancer*, 2011). En effet, l'initiation de la carcinogénèse est favorisée par des facteurs appelés facteurs de risque du cancer, qui sont de différents types et qui participent pour 55% de l'incidence du cancer du sein (Binder-Foucard et al., 2014).

## **2. Facteurs de risque du cancer du sein**

Les facteurs de risque du cancer du sein sont des éléments susceptibles d'augmenter le risque de développer ce cancer, ils peuvent être classés en deux catégories.

Les **facteurs de risque internes** sont inhérents à la personne qui développera le cancer et sont qualifiés d'inévitables. Tandis que les **facteurs de risque externes** regroupent les événements

relatifs à notre comportement et les risques environnementaux auxquels nous sommes exposés, ils sont - plus ou moins - évitables.

Quel que soit l'origine de ces risques, une hiérarchie a été mise en place. Le risque de développer un cancer du sein est qualifié de moyen quand il n'existe ni prédisposition génétique, ni d'antécédent de lésion précancéreuse mammaire. Ce risque est évalué à 12% (Krishnamurthy et al., 2016). Le risque élevé concerne des personnes présentant un antécédent familial au premier degré avant 50 ans par exemple, ou encore des antécédents d'hyperplasie atypique (Hartmann et al., 2014). Enfin les mutations héréditaires de BRCA1 ou BRCA2 contribuent à un risque qualifié de très élevé de développer un cancer du sein (Krishnamurthy et al., 2016).

## **2.1 Facteurs de risque internes**

Ces facteurs de risque regroupent les risques liés à la personne elle-même : son âge, son patrimoine génétique, son histoire hormonale.

### **a. L'âge**

Plus d'un nouveau cas sur deux de cancer du sein en France touche la femme âgée de 50 à 74 ans, et parmi ces femmes 47% ont plus de 65 ans (projection pour 2015, Léone et al., 2015). Ces chiffres montrent que l'âge est le premier facteur de risque de développer ce cancer (Institut National du Cancer, 2014). Cette pathologie est rare chez la femme de moins de 35 ans, et exceptionnelle en dessous de 20 ans (Brinton et al., 2008; Colditz et al., 2014). L'accumulation de dommages génétiques au cours de la vie contribue à faire de l'âge le premier facteur de risque de nombreux cancers.

### **b. Imprégnation hormonale de l'individu : puberté, grossesse, allaitement et ménopause**

En 1926, une épidémiologiste anglaise J. Lane-Claypon décrivait un possible lien entre la survenue du cancer du sein et différents facteurs relatifs au cycle reproducteur féminin (Press and Pharoah, 2010).

Depuis, le développement d'un processus tumoral mammaire a notamment été montré comme étant influencé par l'imprégnation hormonale au cours de la vie : plus l'exposition au système endogène des œstrogènes est importante, plus le risque de développer un cancer du sein l'est également. De ce fait, les différentes étapes clés du cycle reproducteur de la femme jouent un rôle dans l'étiologie de cette pathologie (Kelsey et al., 1993; Russo and Russo, 2000).

- ***Âge de la ménarche et de la ménopause***

Depuis le 19<sup>ème</sup> siècle, aussi bien en France que dans d'autres pays industrialisés, l'âge des premières règles ou ménarche diminue. Cette maturité sexuelle plus précoce chez la femme peut être la conséquence de différents facteurs socio-économiques et environnementaux, par exemple l'exposition à des perturbateurs endocriniens, une alimentation riche en protéines animales, une activité physique insuffisante (Berkey et al., 2000; Colditz et al., 2014; Karapanou and Papadimitriou, 2010; Parent et al., 2003). Ce phénomène a un impact sur la santé future de la femme, en contribuant notamment à l'augmentation du risque de développer un cancer du sein (Colditz et al., 2014; Parsa and Parsa, 2009; de Waard and Trichopoulos, 1988). L'allongement de la période reproductive féminine entraîne notamment la hausse de ce risque pour les cancers du sein hormono-dépendants (Li et al., 2008). Une précocité de la ménopause aurait alors un effet protecteur (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012) ; ce lien a été démontré dès 1956 (Bode and Dong, 2009).

- ***Parité et âge au premier enfant***

De plus, une première grossesse tardive, voire la nulliparité, contribue également à ce risque accru de développer un cancer (Clavel-Chapelon and E3N-EPIC Group, 2002; Tamakoshi et al., 2005). Ainsi, plus la première grossesse a lieu précocement, plus la différenciation totale de la glande mammaire peut se dérouler tôt, ce qui aurait un effet protecteur vis-à-vis de l'initiation d'un processus tumoral (Pontén et al., 1990). En effet, plus le temps entre la ménarche et la naissance du premier enfant est court, plus le temps d'exposition aux œstrogènes endogènes le sera également. Cette période est critique quant à l'exposition à des carcinogènes (Colditz and Frazier, 1995).



<u>Gène</u>	<u>Chromosome</u>	<u>Syndrome</u>	<u>Organes</u>	<u>Risque</u>	<u>Références</u>
<b>BRCA1 et BRCA2</b>	17 et 13	syndrome héréditaire de prédisposition au cancer du sein et de l'ovaire	Ovaire, sein	40-85%	Easton (1995), INCa, Krishnamurthy (2016), Malone (2000), Petrucelli (2010), Rakha (2008), Walsh (2006), Wooster (1995).
<b>PTEN</b>	10	Cowden	Endomètre, sein, thyroïde	25-50x	Apostolou (2013), Li (1997), Mester (2015), Nelen (1997), Petrucelli (2010), Pilarski (2009 et 2013)
<b>TP53</b>	17	Li Fraumeni	Muscles, sein, os	18-60 x	Apostolou (2013), Krishnamurthy (2016), Walsh (2006).
<b>STK11</b>	19	Peutz-Jeghers	Ovaire, sein, testicule		Apostolou (2013)
<b>CDH1</b>	16		Cancer gastrique, sein	39-54%	McVeigh 2014, Schrader 2008

**Tableau 1 : Susceptibilité génétique à haute pénétrance dans le cancer du sein**

Ce tableau recense les gènes « suppresseurs de tumeurs » pouvant subir des mutations délétères et considérés comme « gènes de susceptibilité à haute pénétrance » dans le cancer du sein. Leurs localisations chromosomiques, les syndromes, organes et risques associés sont également présentés dans ce tableau.

- **Allaitement**

L'idée que la durée de l'allaitement pourrait jouer un rôle dans la susceptibilité de développer un cancer du sein avant la ménopause avait été suggérée par Lane-Clayton en 1926 (Press and Pharoah, 2010). Depuis de nombreuses études épidémiologiques soulignent qu'il peut y avoir un effet protecteur en cas d'allaitement long. Néanmoins cet effet est difficile à quantifier de par la difficulté de trouver un nombre suffisant de femmes pour des études statistiques sur l'allaitement long. Cet effet protecteur est expliqué par certains par l'absence de cycle ovulatoire lors de l'allaitement, et donc un taux réduit d'œstrogènes endogènes, cumulé à une production de prolactine (Key and Pike, 1988; Lipworth et al., 2000).

### **c. Prédispositions génétiques dans le cancer du sein**

Outre ces facteurs, la prédisposition génétique explique 5 à 10% des cas de cancer du sein (*American Cancer Society*, 2012). Ces cancers dus à des gènes de susceptibilités peuvent être scindés en trois groupes en fonction de la pénétrance du gène : gènes à haute pénétrance, à pénétrance modérée et à faible pénétrance.

- **Gènes à haute pénétrance**

**BRCA1, BRCA2, PTEN, TP53, STK11, CDH1** sont des gènes « suppresseurs de tumeurs » qui peuvent subir des mutations délétères conduisant au développement d'un cancer du sein. Le mode de transmission à la descendance est autosomique dominant, ce qui contribue à une forte prévalence de ces gènes dans la population (Apostolou and Fostira, 2013; McVeigh et al., 2014; Shiovitz and Korde, 2015) (Tableau 1).

- **Gènes à pénétrance modérée**

D'autres mutations touchent des gènes dits à pénétrance modérée : CHEK2, BRIP1, ATM, PALB2. Ce sont des gènes en interaction avec BRCA1 et/ou BRCA2 et leurs mutations augmentent le risque de développer un cancer du sein de l'ordre de deux fois (Shiovitz and Korde, 2015).

- ***Gènes à faible pénétrance***

Enfin, parmi les cancers à prédisposition génétique sont retrouvés des cancers en lien avec du polymorphisme nucléotidique (SNP) à faible pénétrance comme par exemple dans le gène FGFR2, CASP8 ou MAP3K1 (Apostolou and Fostira, 2013; Shiovitz and Korde, 2015).

#### **d. Antécédents de pathologie bénigne de la glande mammaire**

L'imagerie radiographique peut permettre la discrimination entre une glande mammaire saine et une glande mammaire pathologique. Néanmoins, cette technique présente des biais (biais techniques et en fonction de la période du cycle menstruel, le tissu mammaire voit sa densité se modifier). Cette visualisation des différents composants histologiques de l'organe permet d'observer la proportion de chaque compartiment : adipeux ou fibroglandulaire. De ce fait, un tissu très opaque, qualifié de dense, comprend un pourcentage supérieur à 75% de tissu fibroglandulaire, au détriment du tissu adipeux. Dans ce cas, le risque de développer un cancer du sein est multiplié par 4 par rapport à un tissu peu dense (Dumalaon-Canaria et al., 2014).

Par ailleurs, dans une étude rétrospective en Espagne de 1994 à 2011, regroupant 545 171 femmes, une augmentation du risque de plus de 2 fois est observée chez les femmes diagnostiquées préalablement pour une pathologie bénigne de la glande mammaire (Castells et al., 2015). Tandis que dans les hyperplasies atypiques canalaire (tumeur bénigne du sein), le risque de développer une pathologie maligne de l'organe est de l'ordre de 4 à 5 fois plus importante pour un âge donné (Moore et al., 1997).

## **2.2 Facteurs de risque externes**

En parallèle de ces facteurs de risque que l'on peut qualifier d'inévitables, nous pouvons citer des facteurs de risques évitables liés aux habitudes alimentaires et comportementales de l'individu, ainsi que l'exposition à des facteurs cancérigènes de son environnement. Ce type d'exposition contribue à 40% des cas de cancer en France (INCa, 2015)

De ce fait, la prévention du cancer prend en compte ces éléments. Il est décrit que plus de 30% des décès par cancer sont évitables en modifiant les habitudes de la personne diagnostiquée (WHO, 2015).

#### **a. Facteurs de risques comportementaux : obésité, alcool et tabac**

Les habitudes alimentaires et comportementales peuvent conduire à une prédisposition au développement de cancer. C'est notamment le cas avec le cancer du sein. En France, l'alcool, l'obésité et l'inactivité physique contribuent à 25% des cas de cancer du sein (Pizot et al., 2016).

- *Alcool*

En 1987, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC=IARC) a établi que l'alcool était un carcinogène (plus précisément l'éthanol), la relation avec le cancer du sein a été admise vingt ans après (IARC, 2010). La consommation d'alcool altère le niveau d'expression des hormones endogènes, en augmentant leur concentration circulante, ce qui entraîne une modification des voies biologiques associées, notamment des voies conduisant à la prolifération des cellules épithéliales mammaires (Al-Sader et al., 2009).

Il a été montré que 8,6% des nouveaux cas et 7,3% des décès par cancer du sein dans le monde en 2012 étaient imputables à une consommation d'alcool (supérieure à 10g/jour). Par ailleurs, une augmentation du risque de 7 à 10 % est notée pour chaque consommation quotidienne de 10g supplémentaire d'alcool (Hamajima et al., 2002; Howell et al., 2014). L'incidence du cancer du sein relative à une consommation d'alcool varie géographiquement avec de forts taux dans le Nord et l'Ouest de l'Europe (12,4 cas pour 100 000) et de faibles taux en Asie (0,9 cas pour 100 000), correspondant à la consommation différente de ces zones géographiques (Al-Sader et al., 2009; Shield et al., 2016).

La consommation excessive d'alcool en fin d'adolescence et avant la première grossesse est corrélée avec un risque accru de développer des tumeurs bénignes de la glande mammaire, voire un cancer du sein dépendant des œstrogènes (Liu et al., 2013).

- ***Tabac***

La fumée de tabac contient des milliers de substances chimiques, dont 20 sont connues ou suspectées d'être des carcinogènes de la glande mammaire d'après le CIRC (Johnson et al., 2011; Pimhanam et al., 2014; Reynolds, 2013). Ces carcinogènes entraînent la formation d'adduits à l'ADN, qui peuvent induire à long terme des modifications délétères et irréversibles du fonctionnement des cellules épithéliales mammaires (Hecht, 2002).

L'exposition au tabac n'est pas clairement montrée comme étant inducteur du développement du cancer du sein, mais il est à noter que ce facteur de risque est corrélé à la consommation importante d'alcool (Hamajima et al., 2002). Le facteur de risque « alcool-tabac » est donc pris en compte parmi les facteurs de risque comportementaux pouvant être contrôlés. La période entre la ménarche et la première grossesse est également la plus sensible (Gram et al., 2005; Reynolds, 2013).

- ***Surpoids et inactivité physique***

D'autres facteurs externes peuvent également jouer sur la mortalité par cancer du sein, comme un surpoids/obésité post-ménopausal (9%) et l'inactivité physique (10 %) (Danaei et al., 2005).

Il est décrit qu'un indice de masse corporelle supérieur à 35 (seuil de l'obésité) avant la ménopause a plutôt un effet protecteur vis-à-vis du cancer du sein (risque de 0,7). Tandis que l'effet est contraire après la ménopause avec un risque de 2 fois supérieur à une personne de corpulence normale (McPherson et al., 2000). L'excès de poids peut jouer sur différents points critiques dans l'initiation d'un cancer comme l'altération des voies insulino-résistantes ou encore dans le déséquilibre de la balance leptine-adiponectine (Grossmann and Cleary, 2012).

## **b. Contraceptifs hormonaux et traitements hormonaux substitutifs**

La prise de traitements hormonaux que ce soit des traitements hormonaux substitutifs (THS) ou des contraceptifs contribuent à augmenter l'imprégnation hormonale de l'individu et de ce fait est en lien avec le risque reproducteur de développer un cancer du sein.

- ***Les THS***

Ils sont utilisés pour réduire les troubles liés à la ménopause, ils sont composés d'œstrogènes et de progestérone. Administrés à partir des années 1980, ils ont été quelques années plus tard mis en cause dans l'incidence croissante du cancer de sein. Depuis, leur utilisation a fortement diminué, ainsi que l'incidence du cancer du sein invasif chez les femmes de 50 à 75 ans, cibles de ce traitement (Daubisse-Marliac et al., 2010). En 2006, 10% des décès par cancer du sein en France étaient imputables à la prise de THS d'après l'Institut de Veille Sanitaire (Hill et al., 2011).

Les tumeurs des patientes ayant reçu des THS sont de meilleur pronostic que celles des patientes n'ayant pas reçu de THS. En effet, la dépendance de la tumeur vis-à-vis des œstrogènes contribue à sa réponse aux traitements anti-œstrogéniques. De plus, elles sont diagnostiquées plus précocement et sont donc de bas grades (Dietel, 2010).

Hou et collègues décrivent dans une étude longitudinale de 9300 cas de cancers du sein chez des femmes ménopausées aux Etats-Unis, que la prise de THS chez les femmes en surpoids ou obèses n'engendrerait pas un sur-risque de développer un cancer du sein (Hou et al., 2013).

- ***Les contraceptifs***

Les contraceptifs hormonaux dits œstroprogestatifs sont classés cancérogènes de groupe 1 par le CIRC depuis 2005, correspondant à un risque avéré (Cogliano et al., 2005; Autier et al., 2007). Ils sont composés d'un œstrogène et d'un progestatif à des doses différant en fonction de la pilule utilisée.

Les données de 54 études épidémiologiques regroupant des femmes ayant un cancer du sein et des femmes sans cancer du sein conduisent à la conclusion qu'une prise de contraceptif oral entraîne une augmentation du risque de 10 à 30% par rapport à des femmes n'ayant jamais pris ce traitement (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996; Parsa and Parsa, 2009). Ce constat a été observé dans des anciennes cohortes pour des pilules dites normodosées. Il est également décrit que le risque revient à la normale après 10 ans d'arrêt de la prise du contraceptif (Cogliano et al., 2005).

Néanmoins tous les cancers ne voient pas leur risque augmenter du fait de la prise d'un contraceptif hormonal. En effet le risque est réduit pour les cancers de l'endomètre et de l'ovaire et cette protection perdue après l'arrêt pendant, respectivement, 15 et 20 ans (Cogliano et al., 2005).

### **c. Risques environnementaux : polluants et radiations ionisantes**

D'après la fondation ARC, les risques liés à l'environnement sont responsables de 3 à 9% des décès par cancer. Ces risques regroupent l'exposition à des polluants comme les pesticides ou autres perturbateurs endocriniens, mais aussi l'exposition à des radiations ionisantes (naturelles ou artificielles). De plus, ces risques environnementaux peuvent être majorés dans le cadre de certaines activités professionnelles.

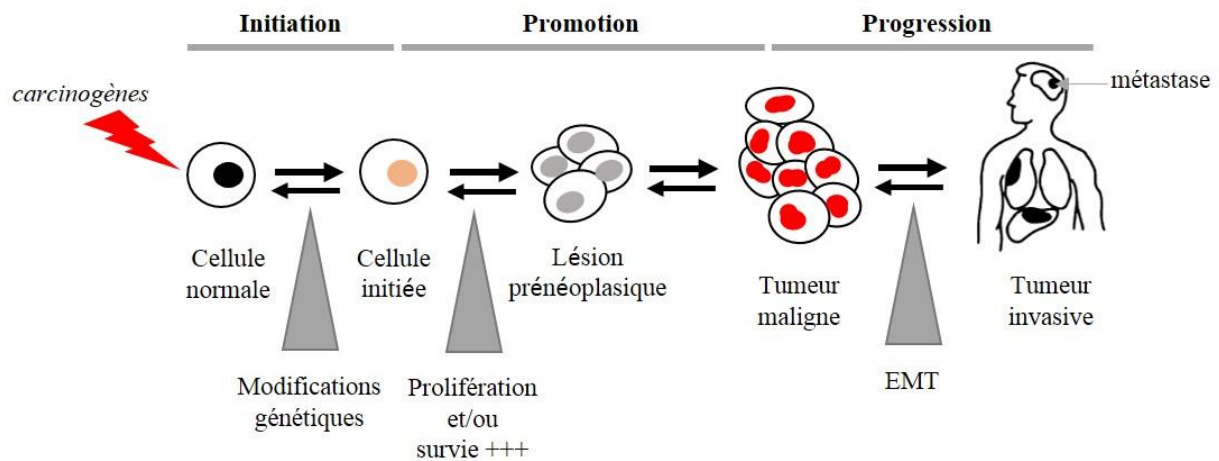
- ***Les perturbateurs endocriniens***

L'exposition à des polluants ou à des perturbateurs endocriniens (PE) peut augmenter le risque de survenue de cancer du sein. Il est à noter que les contraceptifs hormonaux et THS sont eux-mêmes des perturbateurs endocriniens. Les substances chimiques les composant sont des hormones de synthèse proches des hormones naturelles (ANSES, 2013). De plus, ils peuvent contenir certains composés synthétiques classés parmi les PE comme le 17  $\alpha$ -éthynyl-estradiol (EE2).

Un autre perturbateur endocrinien bien connu est le diéthylstilbestrol (DES) administré aux femmes enceintes à partir des années 1940 afin d'éviter les avortements spontanés. Il est décrit à partir des années 1970 que ce composé œstrogénique entraîne des effets multigénérationnels avec notamment chez la descendance féminine des problèmes de fertilité et le risque accru de développer un cancer du sein (Hilakivi-Clarke, 2014).

De par notre alimentation, nous sommes exposés aux phytoestrogènes contenus dans le soja (isoflavone) ou encore dans les graines, de lin notamment (lignanes). La consommation de ces composés aurait un rôle protecteur vis-à-vis du développement d'un cancer du sein (Brenner et al., 2016; Dagdemir et al., 2013).

*Je développerai l'impact des perturbateurs endocriniens sur la santé humaine dans une prochaine partie.*



**Figure 16 : Les différentes étapes de la carcinogénèse**

Ce mécanisme se découpe en 3 phases. La première, l'initiation, est déclenchée après exposition de cellules normales à des carcinogènes. La cellule normale subit des modifications génétiques ou épigénétiques et devient une cellule initiée. Par la suite, un promoteur entraîne une prolifération anarchique et/ou une survie accrue de ces cellules initiées qui forment alors une lésion préneoplasique (hyperplasie cellulaire). Enfin, après une transition épithélio-mésenchymateuse et le passage de la lame basale, les cellules tumorales migrent vers des tissus à distance de la tumeur primaire, où elles s'implantent pour former des métastases. (Adapté de Harris, 1991; Rivenbark and Coleman, 2012)



- ***Les radiations ionisantes***

Les radiations ionisantes sont retrouvées dans l'étiologie des cancers. Des cohortes de femmes survivantes des bombes atomiques ou ayant reçu des radiations dans un but thérapeutique ont permis d'étudier l'impact de ces rayons sur la carcinogénèse mammaire. Le rôle de ces rayons ionisants dans le développement du cancer dépend de l'âge de la personne au moment de l'exposition, de la dose reçue, ainsi que de la répétition (dans le cadre thérapeutique). La prise en compte des facteurs de risque reproducteur (âge de la première grossesse et multiparité) semblerait réduire le risque engendré par une exposition à des radiations ionisantes pendant les périodes critiques que sont la petite enfance et la puberté (Carmichael et al., 2003; Ronckers et al., 2005).

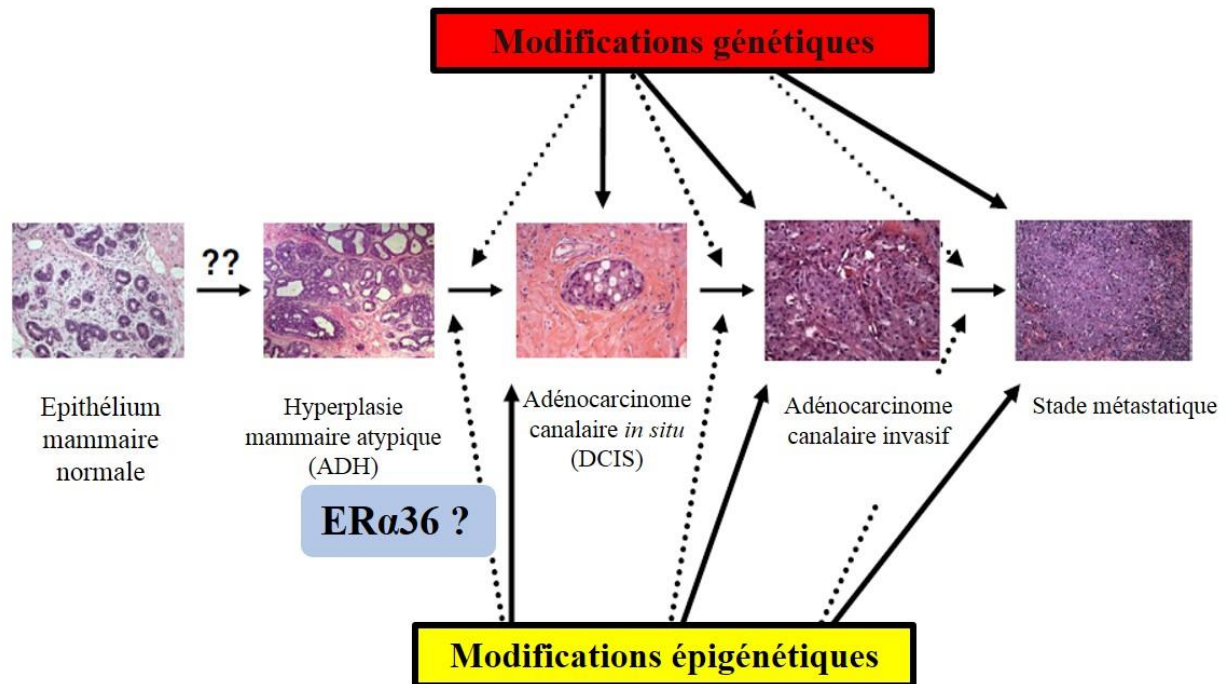
### **3. Carcinogénèse : initiation, promotion et progression d'un processus tumoral**

*La carcinogénèse est un mécanisme complexe regroupant l'ensemble des phénomènes ou événements conduisant à la transformation tumorale d'un tissu sain. Ce mécanisme se déroule en 3 phases : l'initiation, la promotion et la progression (Figure 16). Les multiples facteurs conduisant à ce processus dans le cas du cancer du sein ont été décrits dans la partie sur les facteurs de risque. La carcinogénèse d'un tissu se caractérise par un dérèglement de l'expression génique (activation d'oncogènes et inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs). Le résultat du cumul de ces événements confère à la cellule saine des caractéristiques de cellules tumorales (par exemple : résistance à l'apoptose, prolifération, migration, invasion cellulaire).*

#### **3.1 Description**

La première phase de la carcinogénèse, phase d'**initiation** d'un processus tumoral, fait suite à l'exposition de cellules normales à des carcinogènes de diverses origines (chimiques, physiques, biologiques). Cette exposition entraîne des épimutations modifiant les systèmes biologiques notamment dans les mécanismes de réponses aux signaux intra et intercellulaires.

L'étape suivante est nommée **promotion** du cancer où, sous l'impulsion d'un promoteur (hormonal par exemple), les cellules transformées (ou initiées) vont commencer à présenter une prolifération



**Figure 17 : Transformation tumorale du tissu sain de la glande mammaire**

À partir d'altérations, les cellules normales de l'épithélium mammaire vont proliférer de manière anarchique formant une hyperplasie mammaire atypique (ADH). Par la suite, sous le contrôle de différentes modifications génétiques et épigénétiques, les cellules vont se développer en adénocarcinome *in situ*, qui sera limité à l'épithélium canalaire. Lors de l'étape de dissémination ou progression, les cellules de l'adénocarcinome invasif auront la capacité de passer la lame basale pour se disséminer dans les tissus adjacents. À partir de ce stade, les cellules disséminées peuvent former des métastases à distance de la tumeur d'origine. Dans le cas du cancer du sein, des foyers métastatiques peuvent être retrouvés dans les os, le foie, les poumons et le cerveau. Durant ma thèse, nous avons cherché à évaluer le rôle d'ER $\alpha$ 36 dans l'acquisition de propriétés caractéristiques de la transformation tumorale de la glande mammaire.

Abréviations : ADH : Atypical Ductal Hyperplasia ou hyperplasie mammaire atypique; DCIS : Ductal Carcinoma *In Situ* ou adénocarcinome canalaire *in situ*. (Adapté de Rivenbark and Coleman, 2012)

anarchique et/ou une survie accrue. Au moins 6 évènements sont nécessaires à partir d'une cellule saine pour aboutir à la formation d'une tumeur (Harris, 1991).

La dernière étape de la carcinogénèse est la **progression** ou **dissémination** tumorale. Durant cette période, les cellules tumorales développent des caractéristiques leur permettant de migrer et d'envahir des tissus à distance de la zone du cancer primaire. Ce processus est permis par une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules tumorales invasives.

### 3.2 Caractéristiques du cancer

En 2000, Hanahan et Weinberg ont décrit les caractéristiques majeures du cancer, qu'ils ont par la suite complétées en 2011 (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Ces caractéristiques sont : l'instabilité génomique, l'autonomie vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance cellulaire, la résistance à l'apoptose, la capacité à se répliquer à l'infini, l'induction de l'angiogenèse, la capacité à se disséminer dans l'organisme (invasion), la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire et la capacité à éviter une destruction par le système immunitaire (Dai et al., 2016).

*Afin d'étudier le rôle du variant de récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes ER $\alpha$ 36 dans les effets du mélange d'alkylphénols in vitro dans l'acquisition d'un phénotype néoplasique-like de la glande mammaire, certaines de ces caractéristiques ont été explorées.*

### 3.3 Le cancer du sein

95% des cancers du sein se développent à partir des cellules épithéliales mammaires (Figure 17) (INCa). La première modification est l'apparition d'une **hyperplasie dite atypique des cellules épithéliales des canaux** (ADH) voire une dysplasie. Ce stade est considéré comme étant un état précancéreux bénins où les lésions observées ont les mêmes caractéristiques que les cancers du sein *in situ*, mais à un nombre moindre (Moore et al., 1997; Page et al., 1985). Puis par le biais de modifications génétiques et/ou épigénétiques, un **adénocarcinome canalaire *in situ*** (DCIS) se forme. Seules les cellules épithéliales canalaire prolifèrent de manière anarchique, sans traverser la lame basale ou altérer la couche de cellules myoépithéliales. Il est décrit dans la littérature que

Marqueurs de type épithéliaux (cytokératines)
Récepteurs hormonaux (ER, PR, AR)
Récepteurs de facteurs de croissance (HER)
Marqueurs anti-apoptotiques (Bcl-2, p53)
Marqueurs de prolifération (KI67)
Marqueurs d'invasion (MMP, Intégrines)
Marqueurs de voies de transduction du signal (PI3K/AKT)
Marqueurs du cycle cellulaire (cyclines et kinases dpdts cyclines CDK)
Facteurs impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Cadhérines, Snail, Slug...)
Facteurs du contrôle métastatique
Facteurs relatifs à l'angiogénèse
Marqueurs de cellules souches
Facteurs interagissant avec le microenvironnement tumoral
Petites molécules régulatrices (microRNAs ou RNAs non codants)

**Tableau 2 : Marqueurs permettant l'établissement de la classification moléculaire du cancer du sein**

Les différents marqueurs décrits ci-dessus permettent de discriminer les différents sous-types moléculaires de tumeurs mammaires. (Adapté de ZHANG et al., 2014)

40% des lésions issues de DCIS non traitées peuvent devenir invasives (Cowell et al., 2013). Au stade d'**adénocarcinome infiltrant** (ou invasif), les cellules tumorales peuvent traverser la lame basale et des foyers métastatiques se forment à distance du site d'origine. Dans le cas du cancer du sein, des **métastases** peuvent apparaître à différents sites comme l'os, le foie, les poumons ou encore le cerveau.

#### **4. Classification moléculaire des tumeurs mammaires et approches thérapeutiques**

Depuis plus de 20 ans, les classifications cliniques des tumeurs mammaires prennent en compte l'aspect histologique, le grade, et le stade (TNM) afin d'orienter au mieux le choix thérapeutique. Néanmoins, la volonté croissante de personnaliser les traitements et l'apparition de résistances par des mécanismes inexpliqués, a mis en lumière une grande hétérogénéité des tumeurs, nécessitant une classification plus fine qui s'appuie sur des critères d'expressions géniques multiples.

Une classification moléculaire en 4 sous-types a été publiée, en 2000 par Perou et collègues, et discrimine des tumeurs dites **luminales**, **basales**, **HER2-enrichis** ou **normal like**. Cette classification, validée et mise à jour depuis par différentes équipes, associe le statut de 3 récepteurs : le récepteur aux œstrogènes  $\alpha$  (Estrogen Receptor ER), le récepteur à la progestérone (Progesterone Receptor PR) et le récepteur du facteur de croissance épidermique 2 humain (Human Epidermal growth factor Receptor 2 HER2), ainsi que le taux de prolifération et l'expression de marqueurs pronostics (Eroles et al., 2012; Hoadley et al., 2014) (Tableau 2).

En fonction du sous-type moléculaire de la tumeur, le pronostic diffère ainsi que la réponse thérapeutique à apporter.

En premier lieu, la chirurgie peut permettre l'ablation de la tumeur. Différents types de mastectomie sont possibles en fonction de l'étendue de la maladie (avec ou sans ganglions lymphatiques axillaires et muscles pectoraux). En parallèle, d'autres thérapies existent : le traitement réalisé (chimiothérapie, hormonothérapie, radiothérapie) avant la chirurgie afin de diminuer la taille de la tumeur sera appelé « néoadjuvant ». Après l'intervention, ce traitement sera appelé « thérapie adjuvante » et permet d'amplifier le bénéfice de l'intervention et de réduire les risques de récurrence (NCI, 2013).

Sous-type moléculaire	Fréquence	ER/PR/HER2	Prolifération	Pronostic	Thérapeutiques
<b>Luminal A</b>	28-31%	ER+PR+HER2-	Faible	Exc	Hormonothérapie
<b>Luminal B</b>	20%	ER±PR±HER2±	Elevée	Interméd/Mauv	Hormonothérapie
<b>HER2-enrichi</b>	15-20%	ER-PR-HER2+	Elevée	Mauv	Thérapie ciblée Chimiothérapie
<b>Basal-like</b>	15%	ER-PR-HER2-	Elevée	Mauv	Chimiothérapie
<b>Normal-like</b>	5-10%	ER-PR-HER2-	Faible	Interméd/Mauv	Chimiothérapie
<b>Claudin-low</b>	10%	ER-PR-HER2-	Elevée	Mauv	Chimiothérapie

**Tableau 3 : Sous-types moléculaires de tumeurs mammaires**

Les 6 sous-types moléculaires de tumeurs mammaires sont classés en fonction de leur statut ER/PR/HER2. Pour chaque sous-type, la fréquence est également indiquée de même que le niveau de prolifération, le pronostic à 10 ans post-diagnostic et la thérapeutique usuellement utilisée.

*Abréviations :* Exc : excellent ; Interméd : intermédiaire ; Mauv : mauvais. (Adapté de Eroles et al., 2012; Prat and Perou, 2011)

Les autres thérapies mises en place sont la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie (anti-œstrogènes ou inhibiteurs d'aromatase) et la thérapie ciblée.

#### **4.1 Les tumeurs de profil luminal A**

Ces tumeurs sont les plus fréquentes parmi les cancers du sein (28 à 31% des cas) (Prat and Perou, 2011). Elles sont majoritairement ER+/PR+/HER- (90%ER+, 89%PR+, 14%HER2+) (Katherine A. Hoadley, Fabrice Andre, Matthew J. Ellis & Charles M. Pero, 2014). De par leurs caractéristiques communes avec les cellules luminales épithéliales des canaux mammaires (expression de gènes activés par ER, comme Bcl2 et les cytokératines 8 et 18), ces tumeurs sont qualifiées de luminales. Les « luminales A » expriment faiblement les gènes de prolifération tels que l'antigène KI67 (expression inférieure ou égale à 14%), et sont généralement de bon pronostic pour la survie (95% à 5 ans post-diagnostic). Elles sont, la plupart du temps, dépistées précocement à un faible grade histologique (Tableau 3).

Du fait de leur dépendance aux œstrogènes, elles sont traitées par des thérapies anti-œstrogéniques comme des inhibiteurs d'aromatase de 3<sup>ème</sup> génération (AI) chez les femmes ménopausées, des SERMs comme le tamoxifène ou encore avec un antagoniste sélectif (pure selective regulators of ER) comme le fulvestrant (Eroles et al., 2012; Zhang et al., 2014).

#### **4.2 Les tumeurs de profil luminal B**

Tout comme les précédentes, elles présentent des caractéristiques communes avec les cellules luminales épithéliales. Néanmoins, elles ont un taux de prolifération plus élevé, avec une expression plus importante de gènes de prolifération comme KI67 (>14%) ou encore la cycline B1. Elles présentent une surexpression ou une amplification de HER2 plus souvent que les « luminales A » (98%ER+, 82%PR+, 24%HER2+) et parfois de EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor ou HER1) (Katherine A. Hoadley, Fabrice Andre, Matthew J. Ellis & Charles M. Pero, 2014). Ces tumeurs, regroupant 20% des cas, présentent un phénotype plus agressif, avec un dépistage à un grade plus élevé (Eroles et al., 2012; Prat and Perou, 2011). La survie à 5 ans post-diagnostic est de l'ordre de 50% (Zhang et al., 2014).

Badve et collègues avancent en 2007 que la différence quant à la survie des patientes entre les deux types de tumeurs lumineales ER+ pourrait être le résultat d'interaction entre ER et d'autres facteurs tels que des coactivateurs, corépresseurs et facteurs de transcription modulant l'activité du récepteur (Badve et al., 2007).

Une partie des tumeurs de ce sous-type sont traitées par hormonothérapie comme les « lumineales A ». Mais pour la majorité des « lumineales B », la thérapeutique utilisée est la chimiothérapie.

#### **4.3 Les tumeurs de type « HER2-enrichi »**

Ce groupe de tumeurs (15 à 20% des cas) présente une amplification du gène codant HER2/ERBB2 sur le chromosome 17. Elles portent peu de caractéristiques lumineales mais surexpriment des gènes de prolifération cellulaire. Pour la majorité, elles sont ER-/PR-/HER2+ (38%ER+, 20%PR+, 72%HER2+) (Katherine A. Hoadley, Fabrice Andre, Matthew J. Ellis & Charles M. Pero, 2014). 75% de ces tumeurs ont un grade élevé, elles sont de mauvais pronostic et plus de 40% présentent une mutation du gène TP53.

Ces tumeurs ont une forte sensibilité à la chimiothérapie avec de bons taux de réponses (contrairement aux tumeurs « lumineales »), mais elles peuvent également être traitées avec des anticorps anti-HER2 (trastuzumab) ou des inhibiteurs de tyrosine kinase (lapatinib) (Eroles et al., 2012).

#### **4.4 Les tumeurs de profil « basal-like »**

Ces tumeurs (15% des cas) expriment des gènes présents dans les cellules basales myoépithéliales mammaires, d'où le nom de ce sous-type. Ces gènes sont notamment les cytokératines CK5 et CK6, P-cadhérine, c-Kit ou encore EGFR (Hoadley et al., 2007; Nielsen et al., 2004; Prat and Perou, 2011). Les tumeurs « basal-like » sont classées parmi les tumeurs de mauvais pronostic et n'expriment ni ER, ni PR, ni HER2 (8%ER+, 7%PR+, 7%HER2+), elles sont ainsi répertoriées parmi les tumeurs « triple-négatives » (TN) (Katherine A. Hoadley, Fabrice Andre, Matthew J. Ellis & Charles M. Pero, 2014). Le diagnostic de ces tumeurs se fait souvent à un stade plus avancé et donc à un haut grade tumoral (Eroles et al., 2012).



Le développement d'un cancer du sein de ce profil est corrélé avec différents facteurs de risque décrits précédemment (ménarche précoce, parité tardive...). Les tumeurs d'origine génétique par mutation dans BRCA1 sont de profil « basal-like » (Nielsen et al., 2004). De plus, malgré le fait que le risque de cancer chez les jeunes femmes d'origine africaine est plus faible que dans les autres populations, des études épidémiologiques relèvent que les cancers qui se développent chez ces patientes sont majoritairement indépendants des récepteurs hormonaux, classés parmi les tumeurs TN (Huo et al., 2009).

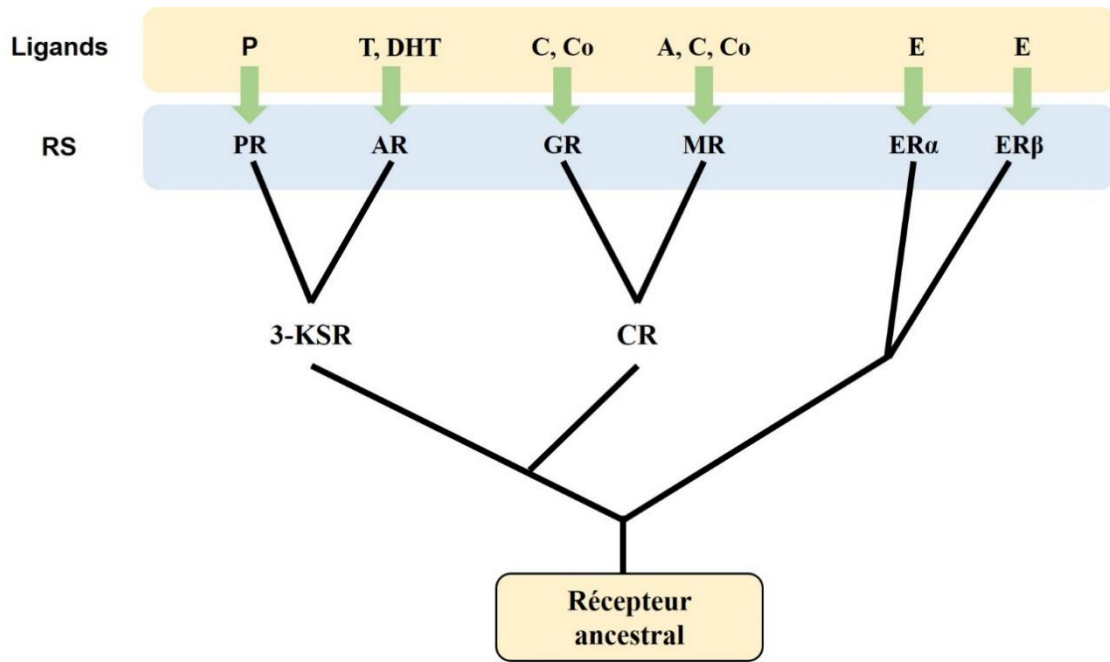
Tout comme les tumeurs de type « HER2-enrichi », les tumeurs « triple-négatives » (pas seulement les tumeurs « basal-like) ont une forte sensibilité à la chimiothérapie. Les tumeurs « basales » sont traitées avec un inhibiteur des PARP1 (Olaparib). Leurs actions sur l'instabilité génétique des cellules cancéreuses contribuent à leur mort. Ces tumeurs peuvent également être traitées par des agents anti-EGFR (récepteurs présents dans au moins 50% des cellules en IHC) : anticorps anti-EGFR (Cétuximab ou Panitumumab) ou inhibiteur (Gefitinib ou Erlotinib) (Nielsen et al., 2004).

#### **4.5 Les tumeurs de profil « claudin-low »**

Elles font partie du dernier sous-type mis en évidence en 2007 et comprennent environ 10% des cas de tumeurs du sein (Herschkowitz et al., 2007; Prat and Perou, 2011). Elles sont également classées parmi les tumeurs « triple-négatives » et sous-tendent un pronostic mauvais à long-terme. Ces tumeurs présentent des caractéristiques communes avec les tumeurs de profil « basal-like », mais sont surtout caractérisées par la perte de l'expression de protéines de jonctions serrées et d'adhésion cellulaire (claudines 3/4/7, occludine, E-cadhérine). Ces tumeurs présentent donc des caractéristiques de transition épithélio-mésenchymateuse. Elles ont également des caractéristiques communes avec les cellules souches mammaires MaSC (Prat et al., 2010).

#### **4.6 Les tumeurs de profil « normal-like »**

Ces tumeurs n'expriment aucun des marqueurs de la classification, elles sont aussi répertoriées dans les tumeurs « triple-négatives ». 5 à 10% des cas de cancer du sein font partie de ce groupe et sont caractérisés par de fortes expressions géniques caractéristiques des cellules basales. Elles



**Figure 18 : Arbre phylogénétique de la famille des récepteurs aux stéroïdes**

Les récepteurs aux hormones stéroïdes (RS) sont issus de plusieurs duplications à partir d'un récepteur ancestral. Leurs ligands naturels principaux sont cités au-dessus de chaque récepteur.

*Abréviations:* A, aldostérone; AR, récepteur aux androgènes; C, cortisol; Co, corticostérone; CR, récepteur aux corticoïdes; DHT, dihydrotestostérone; ER $\alpha$ , récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes; ER $\beta$ , récepteur  $\beta$  aux œstrogènes; E, œstrogènes; GR, récepteur aux glucocorticoïdes; 3-KSR, récepteur 3-kétostéroïde; MR, récepteur des minéralocorticoïdes; P, progestérone; PR, récepteur à la progestérone; T, testostérone. (Adapté de Thornton, 2001)

présentent un pronostic intermédiaire entre les tumeurs de profil luminal et les tumeurs de profil «basal-like».

Il est à noter que la majorité des tumeurs « triples négatives » sont GPER+ (G Protein-coupled Estrogen Receptor 1 « positives »), EGFR+ (Girgert et al., 2012) et expriment certains variants du récepteur  $\alpha$  des œstrogènes (Voir chapitre suivant) (Rao et al., 2011; Zhang et al., 2011). Néanmoins, le statut EGFR de ces tumeurs « triple négatives » est relativement discuté parmi les auteurs.

*Bien que la réceptivité aux œstrogènes semble toujours constituer un facteur clé du choix thérapeutique et que la classification des tumeurs en fonction de leur statut moléculaire ER+/ER- (classification d'Eroles) soit utilisée pour la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques, il est à noter que les formes membranaires des ER clonées récemment (GPER, variants de ER $\alpha$ ), ne sont toujours pas prises en compte dans la classification des tumeurs mammaires. Je décrirai les mécanismes déclenchés par les voies de signalisations dépendantes de ces récepteurs dans la partie suivante.*

### III. Les hormones stéroïdes et leurs récepteurs

Les **récepteurs des hormones stéroïdes** (RS) appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires et plus précisément au type I. Ces récepteurs sont des facteurs de transcription dont l'activation est dépendante de la fixation d'un ligand (naturel ou synthétique). Ils interviennent comme médiateurs de différents processus physiologiques majeurs tels que la différenciation sexuelle, la reproduction, l'homéostasie tissulaire et le métabolisme mais sont également impliqués dans des mécanismes pathologiques comme le diabète ou le cancer.

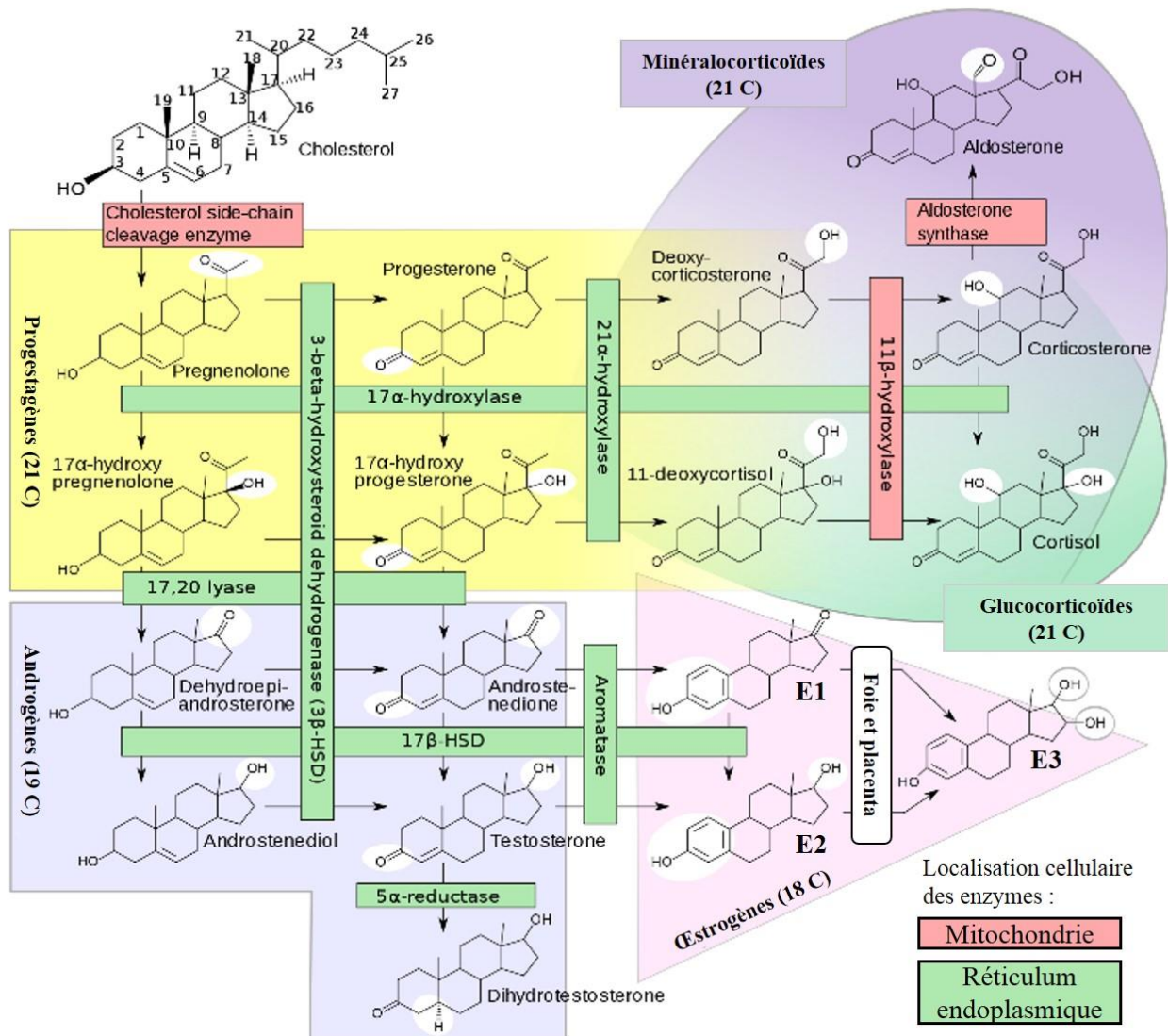
Cette famille de RS est issue d'un même récepteur ancestral, dont le gène s'est dupliqué en différents récepteurs aux hormones stéroïdiennes au moment de l'établissement de la lignée des chordés, il y a 400 à 500 millions d'années (Kelley and Thackray, 1999; Thornton et al., 2003) (Figure 18). Il existe différents récepteurs dans cette catégorie chez les vertébrés: deux récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ), un récepteur à la progestérone (PR), un récepteur aux androgènes

<b>Gène</b>	<b>Nomenclature internationale</b>
<b>ESR1</b>	NR3A1
<b>ESR2</b>	NR3A2
<b>GR</b>	NR3C1
<b>MR</b>	NR3C2
<b>PGR</b>	NR3C3
<b>AR</b>	NR3C4

**Tableau 4 : Les récepteurs aux hormones stéroïdes**

Les récepteurs aux hormones stéroïdes sont synthétisés à partir de 6 gènes différents dont la nomenclature internationale établie en 1999 est décrite dans ce tableau.

*Abréviations:* AR, Androgen Receptor; ESR1, Estrogen Receptor 1; ESR2, Estrogen Receptor 2; GR, Glucocorticoid Receptor; MR, Mineralocorticoid Receptor; PGR, Progesterone Receptor.



**Figure 19 : Biosynthèse des œstrogènes**

La stéroïdogénèse consiste en la biosynthèse enzymatique des différents stéroïdes à partir d'un précurseur : le cholestérol. Les œstrogènes sont produits à partir des androgènes dans un mécanisme décrit dans le texte. L'œstérol, non figuré ici, est quant à elle synthétisée à partir de l'E2 et l'E3 dans le foie fœtal par l'action enzymatique de la 15 $\alpha$ - et 16 $\alpha$ -hydroxylase (Coelingh Bennink et al., 2008). (Adapté de Häggström et al., 2014)

(AR), un récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et un récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) (Tableau 4) (Thornton, 2001; White and Parker, 1998).

Leurs ligands naturels sont des stéroïdes, des hormones lipophiles dérivées du cholestérol. Par ailleurs, des ligands, synthétiques ou non, peuvent aussi se fixer sur ces récepteurs. Dans le cas des récepteurs aux œstrogènes, nous pouvons citer le tamoxifène (agoniste qui bloque l'accès aux récepteurs du ligand naturel, le  $17\beta$ -œstradiol) mais aussi des perturbateurs endocriniens (PE) comme le bisphénol A (BPA).

Une caractéristique de ces récepteurs nucléaires est de posséder une activité indépendante de la fixation d'hormones stéroïdes, leurs ligands naturels (White and Parker, 1998). Les différents modes d'action seront présentés un peu plus loin.

## 1. Biosynthèse des œstrogènes

Les œstrogènes sont produits majoritairement par les ovaires mais également par le foie et le tissu adipeux (White and Parker, 1998). Les principaux œstrogènes naturels circulants sont l'œstrone (E1), le  $17\beta$ -œstradiol (E2), l'œstriol (E3), et dans une moindre mesure l'œstétrol (E4) (Samavat and Kurzer, 2015). E2, considérée comme étant une hormone féminine, voit sa concentration fluctuer pendant le cycle menstruel avec un pic en fin de phase folliculaire. Le taux circulant chez la femme varie de 50 à 200 pg/mL de sérum. L'œstradiol est aussi présent chez l'homme mais en moindre quantité dans la circulation ; la quantité intratesticulaire varie d'un individu à l'autre entre 0,41 et 3,9 ng/mL (Roth et al., 2010).

Les principales hormones stéroïdiennes comme les œstrogènes sont synthétisées à partir du cholestérol par une voie de biosynthèse enzymatique (Figure 19). La stéroïdogénèse nécessite que le cholestérol soit localisé dans les mitochondries : le transport du précurseur se fait à l'aide d'une protéine porteuse de cholestérol, la protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein). La première étape de transformation du cholestérol est alors médiée par l'enzyme cytochrome P450<sub>sc</sub> (side-chain cleavage) et aboutit à la synthèse de la prégnénolone dans la membrane mitochondriale interne. Ensuite, différentes étapes enzymatiques permettent notamment la synthèse d'androgènes qui seront à l'origine de la conversion en œstrogènes. L'œstrone E1 et l'œstradiol E2 sont produits par aromatisation de la testostérone et de l'androstènedione. Ces deux hormones E1 et E2 peuvent

également être synthétisées par l'action de 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase par interconversion. L'œstriol E3 est produite à partir de l'œstrone avec comme composé intermédiaire le 16 $\alpha$ -hydroxyœstrone (Thomas and Potter, 2013).

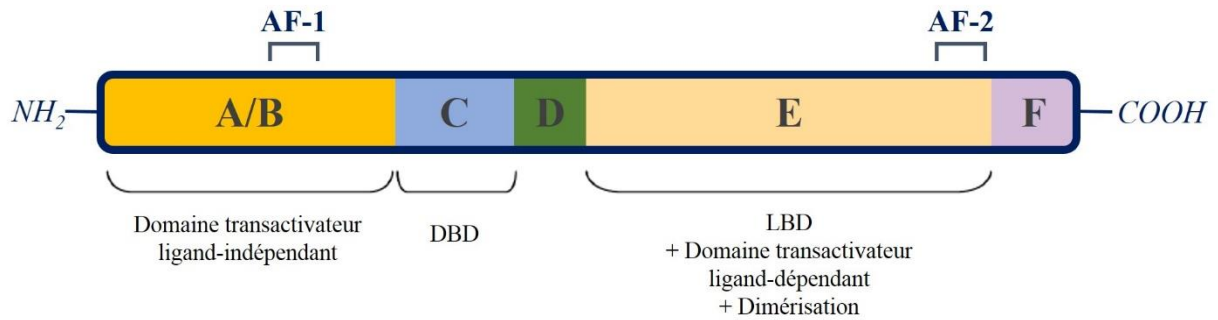
## 2. Récepteurs nucléaires des œstrogènes

*Dans le cadre de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à la famille des récepteurs aux œstrogènes (classe NR3A) puisque ces récepteurs jouent un rôle majeur dans les mécanismes de différenciation de l'épithélium mammaire dans le contexte physiologique et pathologique (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999).*

Les récepteurs aux œstrogènes font partie du groupe des récepteurs aux stéroïdes sexuels avec les récepteurs aux androgènes et les récepteurs à la progestérone. Les œstrogènes sont les principales hormones sexuelles féminines. Ces hormones ont un rôle primordial dans le développement et la différenciation de l'appareil génital féminin, la morphogénèse de la glande mammaire mais également dans le système nerveux central et le squelette. Comme décrit dans la partie précédente, les œstrogènes peuvent aussi avoir un rôle dans les mécanismes de tumorigénèse (Thomas and Potter, 2013).

Il existe plusieurs types de récepteurs aux œstrogènes ER : les récepteurs nucléaires **ER $\alpha$**  et **ER $\beta$**  d'une part, les récepteurs membranaires, tels que le récepteur membranaire aux œstrogènes couplé aux protéines G (**GPER**) et les variants d'ER $\alpha$  (**ER $\alpha$ 46**, **ER $\alpha$ 36**) d'autre part.

Dans les années 1960, l'existence d'un récepteur déclencheur des voies génomiques et liant les œstrogènes était suggéré (Gorski et al., 1968; Zhao et al., 2008). Vingt-cinq ans plus tard, un premier récepteur est cloné (Greene et al., 1986) ; il sera nommé ER $\alpha$  à la suite de l'identification d'un autre récepteur aux œstrogènes en 1996 chez le rat puis chez la souris et chez l'Homme : ER $\beta$  (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996). Ces deux récepteurs présentent des homologies importantes quant à leur structure et présentent les six domaines fonctionnels caractéristiques des récepteurs nucléaires. Leur action est déclenchée après fixation de leur ligand naturel, l'œstradiol, en induisant les voies génomiques des œstrogènes. Les détails de ces voies seront décrits ultérieurement.



**Figure 20 : Organisation schématique des récepteurs nucléaires**

Les récepteurs nucléaires ont la caractéristique de présenter une configuration conservée de leur structure en domaines. De l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale à l'extrémité COOH-terminale, on distingue le domaine A/B avec la région AF-1 permettant la transactivation indépendamment du ligand, le domaine C avec la région DBD de liaison à l'ADN, le domaine D charnière, le domaine E/F avec les fonctions de liaison au ligand LBD, de dimérisation et la région AF-2 pour la transactivation ligand-dépendante.



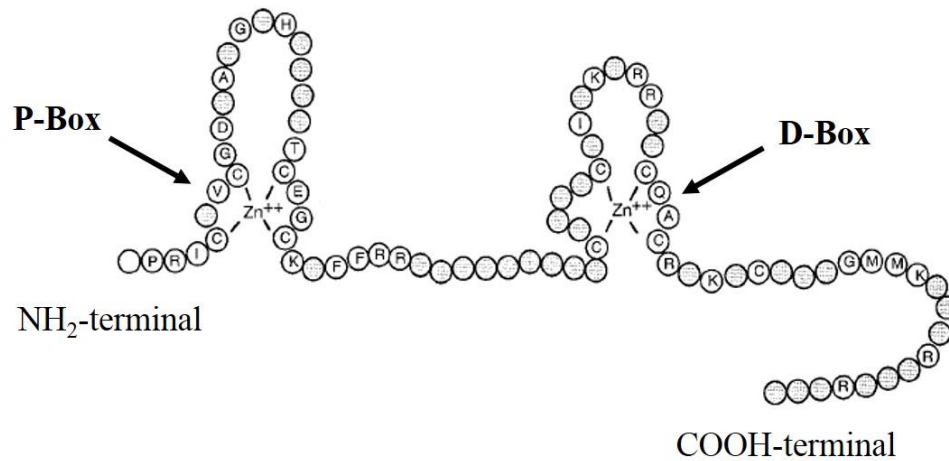
## 2.1 Structure en domaines des récepteurs nucléaires

Tous les récepteurs nucléaires présentent une configuration fonctionnelle en domaines qui est relativement conservée (Figure 20). On décrit quatre domaines depuis l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminal (N-terminal) vers l'extrémité COOH-terminal (C-terminal): le **domaine A/B** (portant le domaine de transactivation ligand-indépendant AF-1), le **domaine C** avec la fonction de liaison à l'ADN (DBD), la **région charnière D** et le **domaine E/F** avec les fonctions de dimérisation, liaison du ligand (LBD) et transactivation dépendante du ligand (AF-2). Les domaines les plus conservés parmi les récepteurs nucléaires sont le DBD et le LBD.

### a. Domaine A/B et région AF-1 : transactivation ligand-indépendante

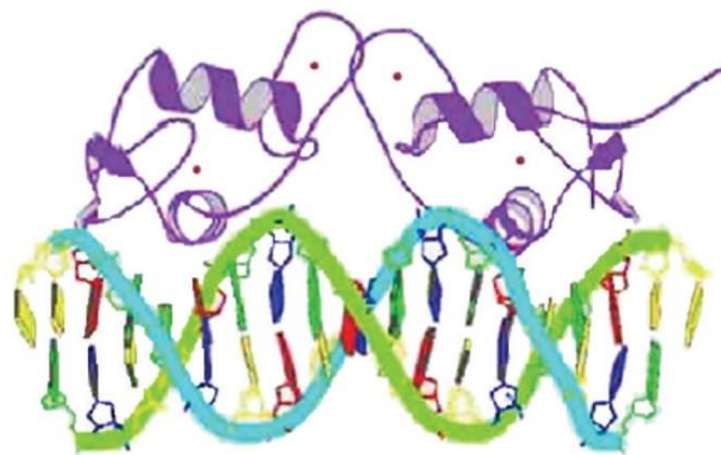
Ce domaine localisé en N-terminal est le moins conservé, que ce soit de par la longueur ou l'homologie de séquence en acides aminés entre les récepteurs nucléaires (McEwan et al., 2007). Chez certains récepteurs nucléaires, cette région porte le domaine de transactivation AF-1, indépendant de la liaison du ligand. L'activation de ce domaine peut être autonome mais elle est également requise en complément de l'activité de la région de transactivation ligand-dépendante AF-2 pour réaliser une activité transcriptionnelle totale (Rochette-Egly, 2003). Cette activité est retrouvée chez le récepteur aux œstrogènes  $\alpha$  (Robinson-Rechavi et al., 2003). Pour ce qui est du récepteur aux œstrogènes  $\beta$ , son domaine AF-1 étant imparfait en comparaison avec celui d'ER $\alpha$ , la synergie avec la région AF-2 est très limitée (Sotoca et al., 2012).

De nombreux sites de sumoylation et de phosphorylation sont présents dans ce domaine, ce qui permet l'interaction du récepteur nucléaire avec différents cofacteurs (corépresseurs ou coactivateurs). La phosphorylation des résidus correspondants est régulée par des kinases comme par exemple les Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) qui peuvent phosphoryler certains résidus sérine de ER $\alpha$  ou ER $\beta$  (Kobayashi et al., 2000). La liaison directe ou indirecte du récepteur nucléaire avec des corépresseurs et coactivateurs module la plasticité de la structure du complexe, ce qui contribue à la liaison du récepteur sur les séquences HRE (Hormone Response Element) et l'expression transcriptionnelle des gènes cibles (McEwan et al., 2007).



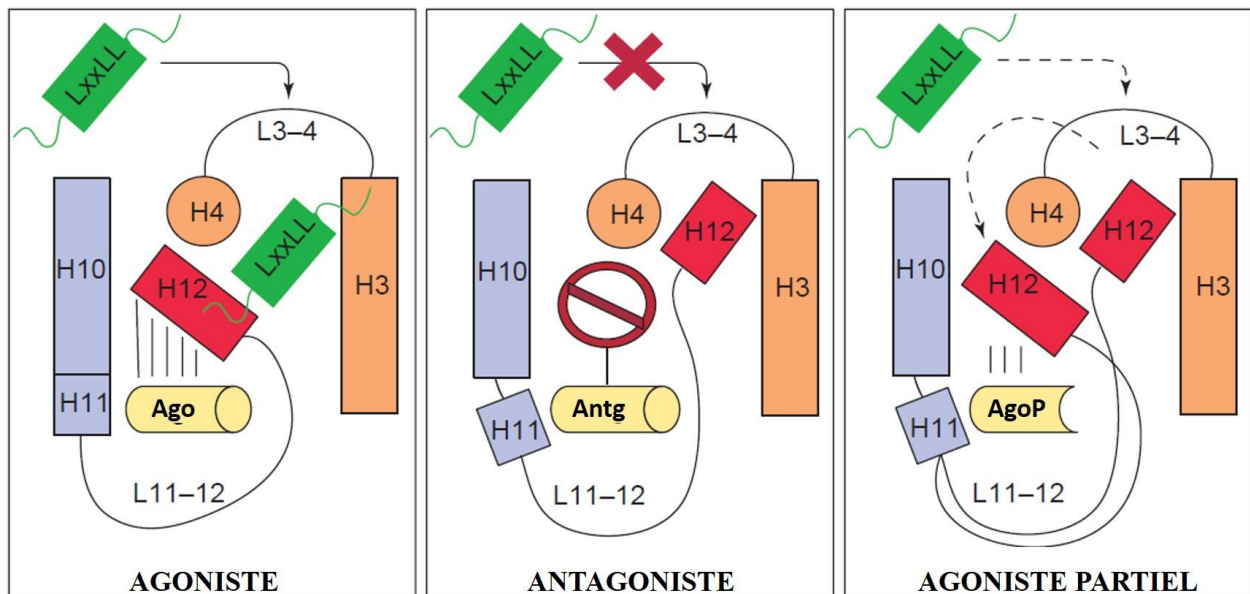
**Figure 21 : Organisation schématique du domaine C de liaison à l’ADN des récepteurs nucléaires**

Le domaine C du récepteur nucléaire comprend 2 structures indispensables à sa fonction. En NH<sub>2</sub>-terminal se trouve la boîte proximale P et en COOH-terminal la boîte distale D, leurs fonctions sont décrites dans le texte. (Adapté de Aranda and Pascual, 2001)



**Figure 22 : Structure cristallographique du DBD du récepteur α aux œstrogènes et d’une région ERE**

Cette figure représente la structure cristallographique du complexe DBD d’ERα66 (en violet) avec la séquence ERE d’un gène cible. Elle a été générée grâce à une banque de données protéiques. (Kumar et al., 2011)



**Figure 23 : Nature du ligand et conformation du domaine LBD d'ER $\alpha$**

Selon la nature du ligand lié au récepteur ER $\alpha$ , le domaine LBD subit une modification de sa conformation. Ainsi, la liaison d'un agoniste (à gauche) entraîne une stabilisation de l'hélice H12 et des cofacteurs peuvent se fixer sur les séquences consensus LxxLL. Par contre, si un antagoniste se présente dans la poche de liaison au ligand (au centre), les hélices H12 et H11 voient leurs positions se modifier ce qui déstabilise le complexe et empêche la fixation de cofacteurs. Enfin en cas de liaison du récepteur avec un agoniste partiel, la stabilisation du complexe via l'hélice H12 est de plus faible intensité, il en est de même pour la liaison avec les cofacteurs transcriptionnels.

Abréviations: Ago, agoniste; AgoP, agoniste partiel; Antg, antagoniste. (Adapté de Bourguet et al., 2000)

### **b. Domaine C : liaison à l'ADN**

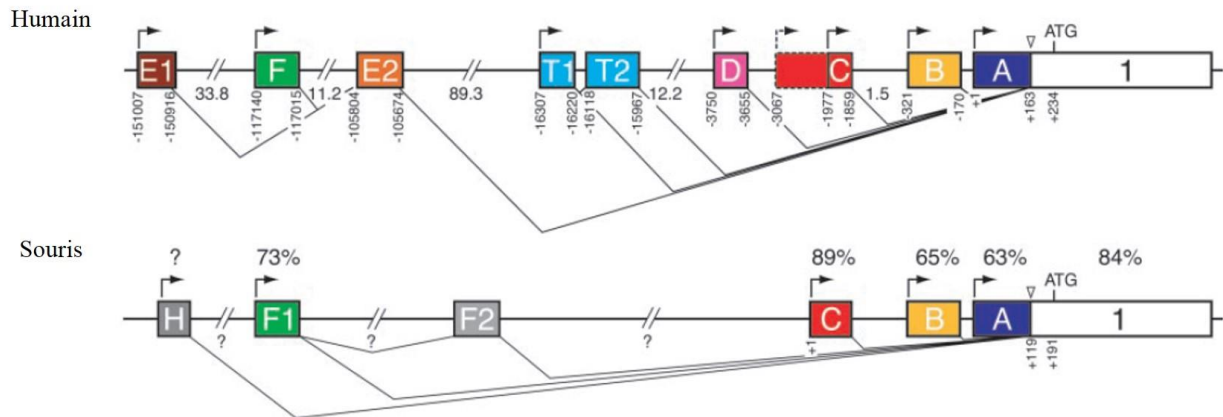
La structure en double doigt de zinc du domaine C constitue un site de liaison DBD à l'ADN du côté N-terminal (région P-box) et permet la dimérisation du récepteur du côté C-terminal (région D-box). Ce domaine central est le plus conservé et comprend environ 60 à 70 acides aminés. Les deux sous-domaines fonctionnels de cette région sont chacun constitués de 4 cystéines englobant un ion zinc  $Zn^{2+}$ , ce qui permet la formation de deux hélices  $\alpha$  perpendiculaires (Figure 21). La boîte proximale P permet la reconnaissance spécifique des séquences HRE et la fixation du récepteur sur ces motifs, tandis que la boîte distale D reconnaît l'espacement entre les sites HRE et est impliquée dans la dimérisation du récepteur (homodimérisation ou hétérodimérisation, en fonction du récepteur impliqué) (Aranda and Pascual, 2001; Kumar and Thompson, 1999).

### **c. Domaine D : la région charnière du récepteur**

Le domaine D est une région très flexible, dite charnière, qui est peu conservée (Aranda and Pascual, 2001). Sa structure souple permet la rotation du DBD et donc la liaison à l'ADN (Figure 22). Malgré une séquence peu conservée, cette région présente les signaux de translocation nucléaire NLS. Quand le ligand est fixé au récepteur, cette séquence NLS est démasquée par une modulation de la conformation de la protéine entre DBD et LBD. La protéine est alors transloquée dans le noyau (Kumar et al., 2011).

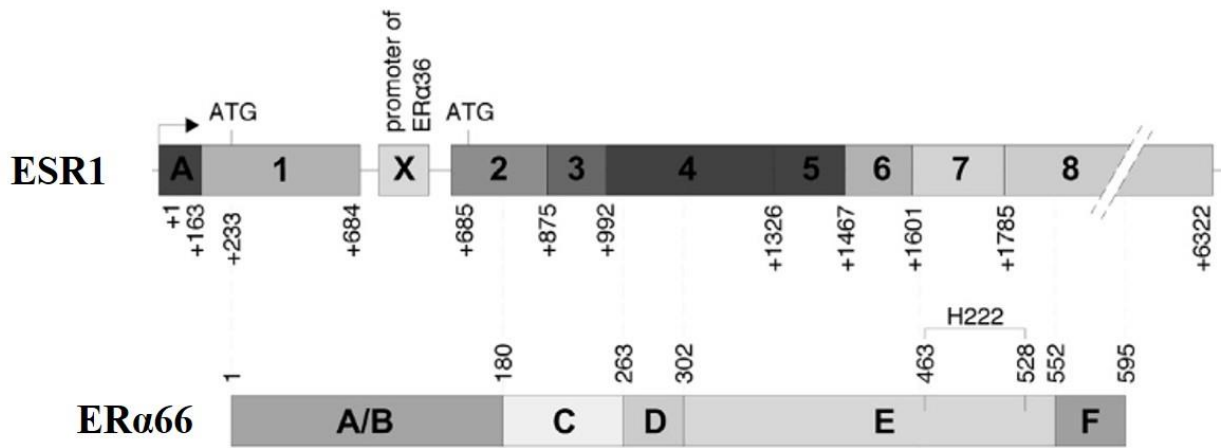
### **d. Domaine E/F et région AF-2 : transactivation ligand-dépendante**

Le domaine E/F, très conservé parmi les RS, se localise à l'extrémité COOH-terminale et porte un domaine de liaison au ligand hydrophobe : le LBD. De plus, du côté de la terminaison carboxyle de cette poche, une région de transactivation ligand-dépendante AF-2 est constituée des hélices H3, H5 et H12. L'orientation de l'hélice H12 est dépendante de la nature du ligand fixé (Figure 23). La fixation d'un agoniste dans le LBD stabilise la conformation de l'hélice avec les hélices H3 et H5, ce qui permet à des coactivateurs potentiels de se fixer sur le récepteur. Ces coactivateurs peuvent se fixer au sein de cette région AF-2 sur des séquences spécifiques (LxxLL : Leucine, 2 acides aminés, 2 leucines). *A contrario*, la fixation d'un antagoniste modifie la conformation structurale



**Figure 24 : Régions promotrices du gène ESR1 dans l'espèce humaine et murine**

Le gène ESR1 présente de multiples promoteurs qui sont tissu- et espèce- dépendants. Par exemple, chez l'Homme, dans la glande mammaire saine ER $\alpha$  est majoritairement transcrit à partir du promoteur B, tandis que c'est le promoteur A qui est actif dans les lignées de cellules cancéreuses mammaires. Chez la souris, 6 régions promotrices sont distinguées. Les exons conservés entre les deux espèces sont représentés de la même couleur et le pourcentage d'homologie est indiqué au-dessus. Les exons H et F2 chez la souris ne sont pas décrits chez l'Homme. (Kos et al., 2001)



**Figure 25 : Gène et protéine du récepteur aux œstrogènes  $\alpha$**

Le gène ESR1 est transcrit en ARNm, en passant par une étape d'épissage des introns. La protéine wt produite de 66kDa (ER $\alpha$ 66) par traduction de l'ARNm est formée des domaines caractéristiques des récepteurs nucléaires. Dans le premier intron se trouve un promoteur alternatif qui permet la production d'un variant du récepteur : ER $\alpha$ 36. (Sołtysik and Czekaj, 2015)

de ces hélices, ce qui empêche la fixation de coactivateurs nécessaires à la fonction de transactivation (Heldring et al., 2007).

## **2.2 Le récepteur ER $\alpha$**

### **a. Le gène ESR1**

Le gène codant le récepteur ER $\alpha$  (NR3A1), appelé ESR1, est localisé pour l'espèce humaine sur le chromosome 6 (6q25.1) (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999). Ce gène de 140 kb comporte 8 exons et 7 introns (Chamkasem and Toniti, 2015). Une comparaison entre les espèces montre une bonne conservation de la séquence d'ADNc d'ER $\alpha$ , excepté dans la partie 5'. En effet, sept promoteurs sont distingués, conduisant à une expression spécifique de la protéine ER $\alpha$  en fonction du tissu et de l'espèce (Figure 24) (Kos et al., 2001). L'ARNm canonique (provenant de la transcription à partir du promoteur A) a une taille de 6,3kb (Townson and O'Connell, 2006). Les ARNm obtenus à partir des multiples promoteurs diffèrent dans la partie 5'UTR mais, après épissage puis traduction, tous ces variants transcriptionnels donnent naissance à une protéine wt de 66 kDa d'où le nom du récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes : ER $\alpha$ 66 (Reid et al., 2002).

### **b. Structure du récepteur ER $\alpha$ (ER $\alpha$ 66)**

La traduction de l'ARNm de ce récepteur aboutit à une protéine de 595 acides aminés pour une masse moléculaire de 66 kDa. Cette protéine prédominante dans la glande mammaire, mais également dans le tractus reproducteur féminin, renferme plusieurs domaines fonctionnels de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale tels que décrits précédemment : le domaine A/B, le domaine central C, le domaine charnière D et le domaine E/F (Hall et al., 2001; Heldring et al., 2007). L'exon 1 et une partie de l'exon 2 codent pour le domaine N-terminal AF-1, tandis que le reste de l'exon 2 et l'exon 3 pour le domaine de liaison au ligand (DBD) et les exons 4 à 8 pour le domaine de liaison au ligand et l'extrémité C-terminale avec le domaine AF-2 (Figure 25) (Townson and O'Connell, 2006).

La protéine cytoplasmique ER $\alpha$ , formant un homodimère ou hétérodimère avec ER $\beta$ , se relocalise dans le noyau où elle déclenche des voies génomiques de signalisation après liaison à une séquence

spécifique de 17 paires de bases formant la séquence ERE (Townson and O'Connell, 2006). Ce motif a été identifié chez *Xenopus laevis*, puis chez le poulet par alignement de séquences (Klinge, 2001). Les chercheurs à l'origine de cette découverte se sont rendus compte que des homologies de séquences de 4 « blocs » étaient retrouvés en amont des gènes de la vitellogénine (précurseur des protéines vitellines). Cette séquence est un palindrome avec 2 séquences répétées inversées de 5'-GGATC-3' entrecoupées par un espace de 3 nucléotides aléatoires (Dobrzycka et al., 2003; Klinge, 2001; Robinson-Rechavi et al., 2003). Il peut être parfait ou imparfait (différence de 1 ou plusieurs nucléotides).

Dans la glande mammaire saine, 10 à 20% des cellules épithéliales expriment ER $\alpha$  (Le Romancer et al., 2011; Russo et al., 1999). L'étude du développement de l'arbre mammaire chez une souris KO pour le récepteur semble indiquer le caractère essentiel de l'expression d'ER $\alpha$  durant la mammogénèse (Couse and Korach, 1999).

## **2.3 Le récepteur ER $\beta$**

### **a. Le gène ESR2 et les différents variants d'ARNm**

Le gène codant le récepteur ER $\beta$  (NR3A2) chez l'Homme est appelé ESR2 et se localise sur le chromosome 14 q23.2 (Chamkasem and Toniti, 2015; Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999). Certaines études suggèrent que ce récepteur pourrait avoir un rôle de « suppresseur de tumeur », en effet son expression est plutôt liée à des activités antiprolifératives et pro-apoptotiques dans les tumeurs mammaires (Leygue and Murphy, 2013; Sotoca et al., 2012; Zhao et al., 2008).

Le locus ESR2 a une taille d'environ 61,2 kb et est composé de 8 exons pour 7 introns. La séquence de ce gène présente quelques particularités. Ainsi, du côté 5', il existe 2 exons non traduits, 0N et 0K, qui pourraient agir comme promoteurs de ce gène. De plus, un épissage alternatif des derniers exons codants en C-terminal (exons 8 et 9) aboutit à la transcription de variants d'ARNm de ce récepteur. Quatre variants de ER $\beta$ 1 wt sont distingués dans l'espèce humaine : ER $\beta$ 2 (ou  $\beta$ cx), ER $\beta$ 3, ER $\beta$ 4 et ER $\beta$ 5 (Hirata et al., 2001; Zhao et al., 2008).



## **b. Structure de la protéine ER $\beta$**

L'ARNm wt code pour une protéine de 530 acides aminés et une taille estimée de 59,2 kDa, appelée : ER $\beta$  (ou ER $\beta$ 1) (Haldosén et al., 2014; Kampa et al., 2013). Cette protéine a une configuration en domaines typique des récepteurs nucléaires et se localise dans le noyau et le cytoplasme des cellules mammaires saines et cancéreuses.

Suite à l'épissage alternatif, les quatre variants d'ARNm sont traduits en protéines, et présentent des spécificités quant à leur distribution tissulaire (Younes and Honma, 2011). Ces protéines diffèrent à partir de l'acide aminé en position 469, situé dans la poche de liaison au ligand. Par exemple, la protéine ER $\beta$ 2 comprend 495 acides aminés pour 55,5 kDa, l'exon 8 est remplacé par la traduction de l'exon 9, spécifique de ce variant, en 26 acides aminés en C-terminal. Cette protéine qui semble ne pas lier de ligand, formerait des complexes hétérodimériques avec ER $\alpha$ , et agirait en dominant négatif sur ce dernier (Haldosén et al., 2014; Ogawa et al., 1998).

## **2.4 Structure protéique des récepteurs ER $\alpha$ et ER $\beta$**

Les récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont issus d'une duplication d'un gène ancestral. L'étude de la structure des protéines ER $\alpha$  et ER $\beta$  montre qu'il y a une extrême conservation quant au domaine DBD, avec une homologie de séquence supérieure à 95%, tandis que les autres domaines sont moins conservés. L'homologie de séquences est de 55% pour le domaine LBD, de 36% pour le domaine D et de 17% pour le domaine A/B (Hall et al., 2001; Kumar et al., 2011; Zhao et al., 2008). Ces caractéristiques structurales expliquent les différences fonctionnelles de ces deux récepteurs nucléaires aux œstrogènes.

En effet, bien que les deux LBD aient une structure tridimensionnelle très proche, la poche de liaison au ligand d'ER $\beta$  est plus petite (de l'ordre de 20%). De ce fait, l'affinité de fixation des ligands potentiels, naturels ou synthétiques, est modifiée (Haldosén et al., 2014; Zhao et al., 2008).

De plus, le domaine charnière D semble indispensable à la transactivation E2- et ligand-indépendante chez le récepteur ER $\alpha$ , ainsi qu'à la dimérisation et à la fixation des protéines chaperonnes HSP (Marino et al., 2006). Ce domaine serait un lien entre les domaines AF-1 et AF-2 en présence du cofacteur SRC-1. Ce potentiel transactivateur du domaine AF-1 n'est pas présent chez ER $\beta$  (Kobayashi et al., 2000; Zwart et al., 2010). Une autre différence entre les deux

récepteurs concerne le signal de localisation nucléaire : ER $\alpha$  présente plusieurs NLS, tandis qu'ER $\beta$  n'en présente qu'une seule (Zwart et al., 2010).

### 3. Les ERR

Parmi les récepteurs nucléaires, il existe un groupe dont, à l'heure actuelle, les ligands endogènes restent à identifier. Ce sont les récepteurs dits « orphelins », affiliés à cette superfamille par similarité de séquence et leur organisation caractéristique en domaines.

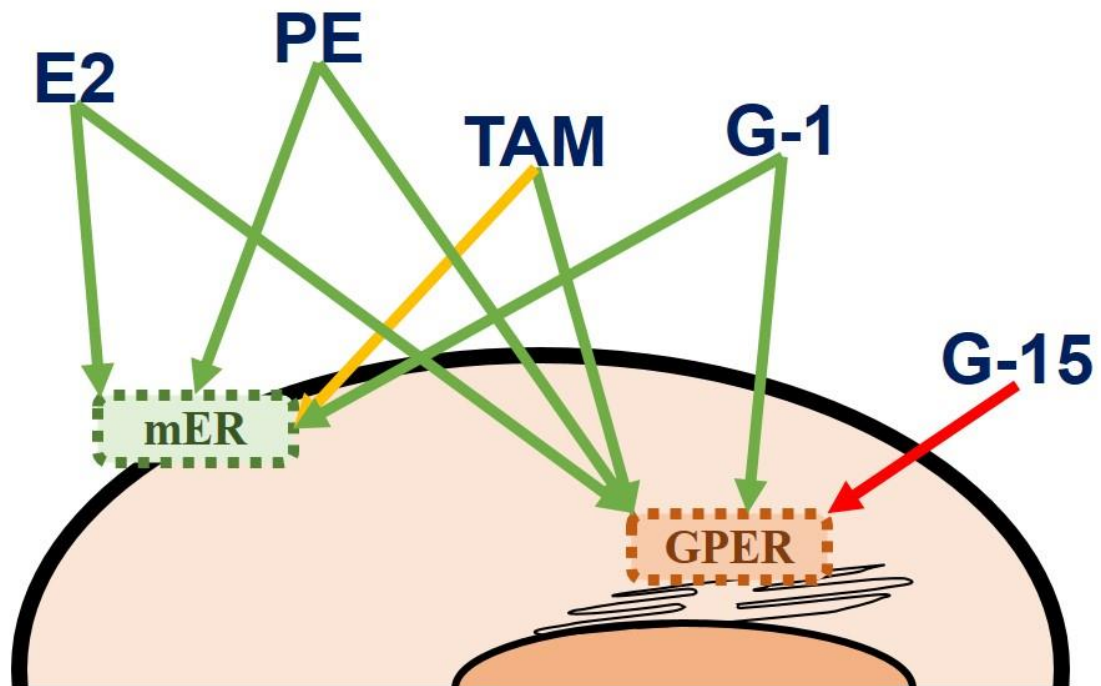
Un groupe de récepteurs orphelins est décrit comme étant proche des récepteurs aux œstrogènes : les **ERR** (estrogen related receptor, NR3B) (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999). Ils partagent les mêmes gènes cibles et des corégulateurs communs. Trois ERR ont été découverts :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Ils ne lient pas les œstrogènes bien qu'ils aient une séquence proche de celles de leurs récepteurs. Le DBD de ERR $\alpha$  présente 68% d'homologie de séquence avec ER $\alpha$ . La faible similarité de séquence du LBD avec ER $\alpha$  (37%) peut expliquer que ce récepteur ne lie pas le 17 $\beta$ -œstradiol (Giguère, 2002; Horard and Vanacker, 2003; Ranhotra, 2010).

Comme tous les récepteurs nucléaires, ces récepteurs sont des facteurs de transcription. Ils peuvent se fixer sur les ERE comme décrit pour les ER, de plus les ERR peuvent aussi se lier à l'ADN sous forme monomérique sur des sites nommés ERRE pour ERR-Response Element : 5'-TnAAGGTCA-3' (n : nucléotide aléatoire) (Giguère, 2002).

Il est décrit qu'ERR $\alpha$  est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein. Après analyse d'une cohorte de patientes présentant un cancer du sein, l'expression de ce récepteur a été mise en relation avec celle d'ERBB2 et présente une corrélation inverse à l'expression d'ER $\alpha$  et de PR (Misawa and Inoue, 2015).

Aucun ligand endogène n'a pour l'heure été identifié, il est toutefois avancé que certains phytoœstrogènes pourraient agir en agoniste de ces récepteurs tandis que le diéthylstilbestrol et le métabolite du tamoxifène (4-OHT) pourraient être des antagonistes des récepteurs ERR $\beta$  et ERR $\gamma$  (Misawa and Inoue, 2015).

Comme indiqué précédemment dans la partie sur le développement anormal de la glande mammaire, la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire est l'une des caractéristiques



**Figure 26 : Ligands des récepteurs membranaires des œstrogènes**

Les récepteurs membranaires des œstrogènes (mER) comme ER $\alpha$ 36 et GPER présentent une affinité variable pour le ligand naturel, l'œstradiol (E2). Les perturbateurs endocriniens (PE) ainsi que le tamoxifène peuvent être des agonistes du variant du récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$ 36. Le tamoxifène, les PE, tout comme G-1 sont des agonistes de GPER, tandis que G-15 est un antagoniste de ce récepteur. (Adapté de Barton, 2012)

majeures du cancer. Or, un lien a été établi dans le cancer du sein entre  $ERR\alpha$  et une modification du métabolisme amenant à un processus de prolifération cellulaire.  $ERR\alpha$  serait également considéré comme un marqueur de mauvais pronostic dans cette étude. Tandis qu' $ERR\gamma$  semblerait avoir un rôle opposé et son expression serait en lien avec une inhibition de la croissance cellulaire *in vitro* et *in vivo* (Tam and Giguère, 2016).

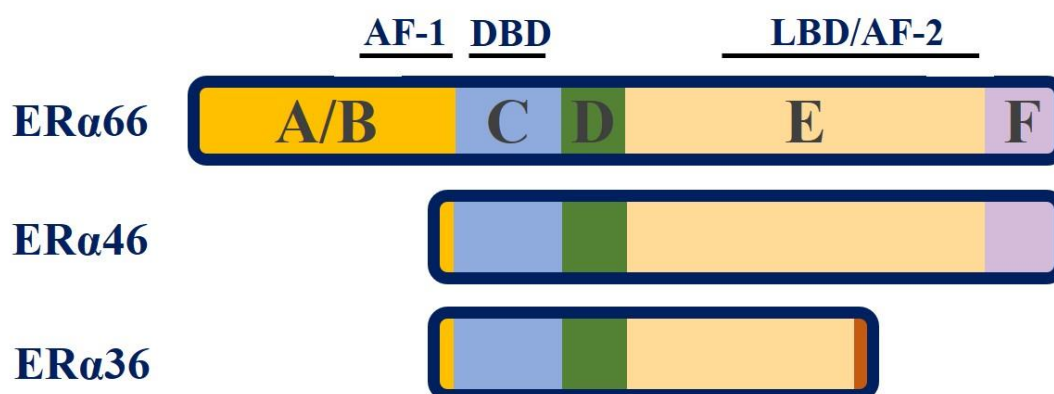
#### **4. Les récepteurs membranaires des œstrogènes**

Les récepteurs nucléaires aux œstrogènes ne sont pas les seuls à intervenir dans la signalisation œstrogénique. En effet, ces mécanismes peuvent également impliquer le récepteur à 7 passages transmembranaires couplé aux protéines G **GPER**, ainsi que les variants d' $ER\alpha$  :  **$ER\alpha46$**  et  **$ER\alpha36$** .

##### **4.1 Récepteur des œstrogènes couplé aux protéines G (GPER)**

Le récepteur des œstrogènes couplé aux protéines G GPER (ou GPR30), identifié en 1996, appartient à la super famille des récepteurs couplés aux protéines G. Le locus de son gène, situé sur le chromosome 7 (bras court), présente quatre variants transcriptionnels et code pour une protéine de 375 acides aminés, composée de 7 domaines transmembranaires couplée à une protéine G. Ce récepteur se localise au niveau de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique (Ohshiro et al., 2012; Qian et al., 2016).

En tant que médiateur de voies transcriptionnelles non génomiques initiées à la membrane cellulaire, GPER intervient dans de multiples organes comme le rein, le cœur, les glandes surrénales, mais aussi des organes du système reproducteur comme le testicule, l'ovaire, l'utérus et les glandes mammaires (Thomas et al., 2005). L'activation de voies de signalisation dépendantes de GPER peut être le résultat de la liaison d'agoniste ou d'antagoniste. GPER se lie avec une forte affinité à l'œstradiol, contrairement à l'œstrone ou l'œstriol. Des PE comme le bisphénol A (BPA), la génistéine ou encore les nonylphénols (NP) sont également des agonistes de ce récepteur, tout comme le tamoxifène (Thomas and Dong, 2006). GPER est aussi la cible d'agoniste et antagoniste spécifiques : G-1 dans le premier cas et G-15 dans le deuxième (Figure 26) (Prossnitz and Barton, 2011; Qian et al., 2016).



**Figure 27 : Isoformes du récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes**

Le récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$  possède 2 isoformes d'une taille de 46 et 36 kDa. ER $\alpha$ 46 et ER $\alpha$ 36 sont dépourvus du domaine A/B. ER $\alpha$ 36 est également tronqué du domaine AF-2 et d'une partie du domaine de liaison au ligand LBD. Enfin ce dernier possède un domaine spécifique de 27 acides aminés à l'extrémité COOH-terminale (marron). (Adapté de Heldring et al., 2007)

Isoforme	Caractéristiques	AF-1	DBD	LBD	AF-2
ER $\alpha$ 66	- Forme WT - Voies génomiques et non génomiques des œstrogènes - Rôle dans la prolifération cellulaire	+	+	+	+
ER $\alpha$ 46	- Voies génomiques et non génomiques des œstrogènes - Rôle anti-prolifératif	-	+	+	+
ER $\alpha$ 36	- Activateur des voies non génomiques aux œstrogènes - Rôle dans la migration, l'invasion et la prolifération cellulaire	-	+	±	-

**Tableau 5 : Caractéristiques des isoformes du récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes**

À partir du gène ESR1, différentes isoformes du récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes peuvent être obtenues. Dans ce tableau, nous pouvons voir que chaque isoforme présente ses caractéristiques propres, que ce soit de par sa structure ou de par ses fonctions dans les voies de signalisation œstrogéniques. (Adapté de Sotoca et al., 2012)

Dans une revue récente, Qian et collègues expliquent que GPER est exprimé aussi bien dans les tumeurs mammaires ER+ ou ER-, mais son expression pourrait être inversement corrélée avec le statut ER (Qian et al., 2016). Il pourrait donc être une cible thérapeutique intéressante dans les tumeurs « triple-négatives ». Dans la glande mammaire saine, une expression du récepteur membranaire est également retrouvée (Scaling et al., 2014).

## 4.2 Variants du récepteur aux œstrogènes $\alpha$

*De multiples variants sont décrits pour le récepteur ER $\alpha$ 66 : ils sont obtenus soit par épissage, soit par l'activité de promoteurs alternatifs.*

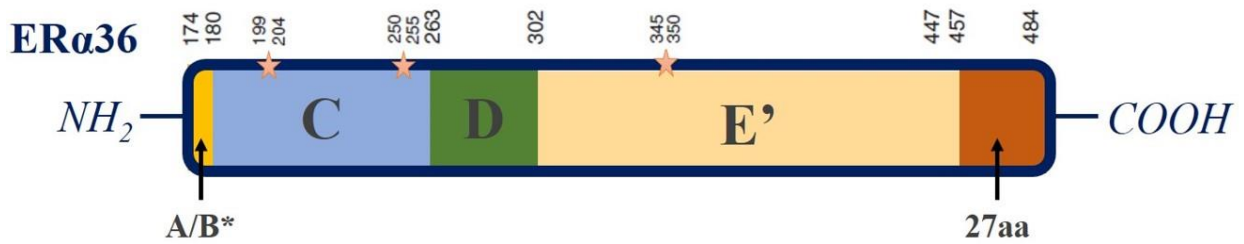
Une vingtaine de variants proviennent d'épissages dans la partie 5' non traduite. En conséquence, la plupart des ARNm produits diffèrent dans la 5'UTR (Townson and O'Connell, 2006).

En plus de ces variants, deux isoformes d'ER $\alpha$  sont issues de l'épissage alternatif d'une partie codante du gène : ER $\alpha$ 46 et ER $\alpha$ 36 (Figure 27). Ces deux récepteurs aux œstrogènes sont membranaires. Ils ont tous les deux la capacité de former des hétérodimères avec ER $\alpha$ 66 et de réprimer par ce biais l'activité médiée par le domaine AF-1 du récepteur canonique (Heldring et al., 2007). De par leur conformation spécifique, chaque isoforme du récepteur aux œstrogènes  $\alpha$  présente des caractéristiques spécifiques dans le contexte du cancer du sein (Tableau 5).

Identifiée en 2000, l'isoforme humaine **ER $\alpha$ 46** a subi un épissage entre l'exon E (promoteur d'ESR1) et l'exon 2, d'où la perte de la fonction de transactivation ligand-indépendante AF-1. Ceci se traduit par une protéine tronquée de 173 acides aminés en N-terminal. La protéine obtenue d'une taille de 46 kDa possède la fonction AF-2 de transactivation ligand-dépendante et agit donc comme facteur de transcription dans les cellules exprimant son promoteur (Flouriot et al., 2000). ER $\alpha$ 46 a notamment été identifié dans une lignée de cellules cancéreuses mammaires non métastatiques (MCF-7) comme étant un dominant négatif de l'activité d'ER $\alpha$ 66 et présente un rôle antiprolifératif (Flouriot et al., 2000; Klinge et al., 2010; Li et al., 2003).

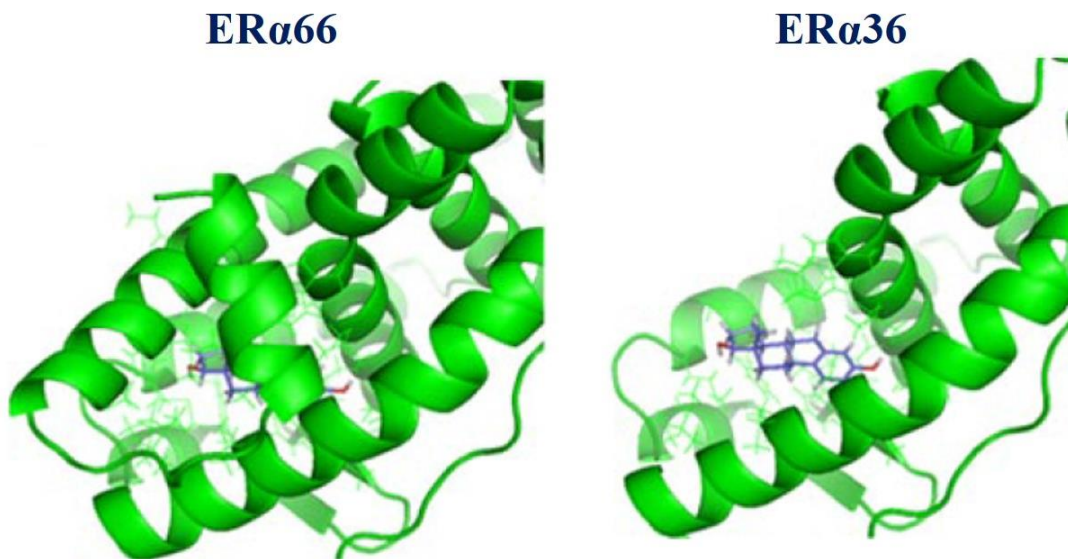
## 4.3 Le cas du variant ER $\alpha$ 36

En 2005, Wang et son équipe ont identifié une nouvelle isoforme fonctionnelle d'ER $\alpha$ 66 : ER $\alpha$ 36, soupçonnée d'intervenir dans la résistance aux traitements des cancers hormono-dépendants



**Figures 28 : Structure de la protéine ER36**

La protéine ER $\alpha$ 36 est déletée des domaines AF-1 et AF-2 de transactivation. Comparativement à ER $\alpha$ 66, elle présente un domaine E' qui est tronqué, lui conférant un potentiel de liaison au ligand différent du récepteur canonique ER $\alpha$ 66. Ce variant possède 27 acides aminés spécifiques en COOH-terminale dont la fonction reste inconnue. Enfin, 3 sites potentiels de myristoylation (étoiles) contribuent à sa localisation membranaire. (Adapté de Soltysik and Czekaj, 2015)



**Figure 29 : Poche de liaison au ligand d'ER $\alpha$ 66 et de son variant ER $\alpha$ 36**

Le modèle présenté pour ER $\alpha$ 36 est purement théorique et calqué sur les données expérimentales obtenues pour la structure tridimensionnelle d'ER $\alpha$ 66. Ces représentations des poches de liaison au ligand du récepteur aux œstrogènes  $\alpha$  et de son variant ER $\alpha$ 36 suggèrent des conformations différentes des deux récepteurs. L'absence des hélices 9 à 12 du variant conférerait à la poche d'ER $\alpha$ 36 une ouverture plus importante que celle du récepteur ER $\alpha$ 66, ce qui contribuerait à modifier le catalogue de ligands potentiels du variant. (Kang et al., 2010)

(Wang et al., 2005). Ce variant a une masse moléculaire de 36 kDa, d'où son nom d'ER $\alpha$ 36. Ce récepteur est issu de l'activité d'un promoteur alternatif localisé dans le premier intron du gène ESR1 humain et n'existe pas chez les non primates (en particulier chez les espèces modèles de rongeurs).

La caractéristique principale de ce variant est l'absence des deux domaines de transactivation AF-1 et AF-2 (Figure 28). Le domaine de fixation au ligand est présent mais de façon partielle (absence des hélices 9 à 12), ce qui confère à la poche de liaison au ligand une conformation très ouverte permettant ainsi de lier potentiellement un grand nombre de molécules (Figure 29) (Kang et al., 2010). E2, le tamoxifène, l'agoniste de GPER G-1, mais également des oestrogénomimétiques comme les perturbateurs endocriniens sont des ligands potentiels d'ER $\alpha$ 36 (Figure 26) (Barton, 2012).

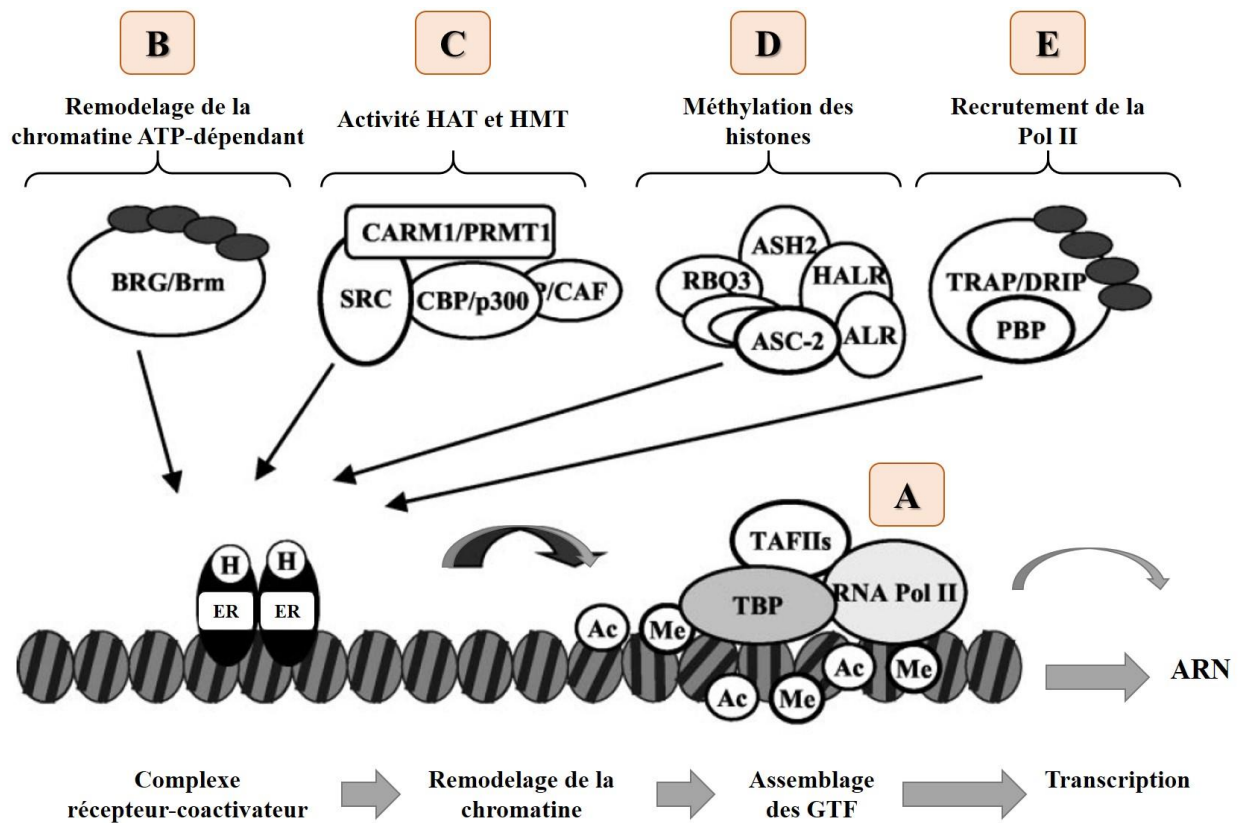
Ce récepteur comprend 310 acides aminés (100% des exons 2 à 6 codés par le gène ESR1). Les 138 acides aminés absents en C-terminal, codés par les exons 7 et 8 du gène ESR1, sont remplacés par un domaine unique de 27 acides aminés codés par l'exon 9, spécifique de ce variant (Wang et al., 2005).

Ce récepteur possède 3 sites potentiels de myristoylation et peut ainsi, de par sa localisation sur la face interne de la membrane plasmique et/ou dans le cytoplasme, jouer un rôle dans la signalisation non génomique des œstrogènes (Lee et al., 2008; Rao et al., 2011; Wang et al., 2005). Ainsi comme il est décrit dans les cellules de tumeur mammaire ER+ MCF-7 et ER- HCC38, ER $\alpha$ 36 est présent à la membrane plasmique dans les cellules cancéreuses mammaires (Chaudhri et al., 2012).

## **5. Mécanismes d'action des récepteurs aux œstrogènes**

En absence de ligand, les récepteurs tels qu'ER sont séquestrés dans le cytoplasme par une association avec des protéines : les heat shock proteins HSP ou protéines de chocs thermiques. Dans le cas d'ER $\alpha$ , ces protéines qualifiées de chaperonnes sont HSP70 et HSP90. Elles sont chargées de retenir le récepteur non lié monomérique dans le cytoplasme en formant des complexes stables (Reid et al., 2002). Dans cet état inactif, ils ne sont pas dans la capacité d'influencer le programme transcriptionnel de la cellule (McKenna et al., 1999).





**Figure 30 : Coactivateurs du récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes**

Le récepteur nucléaire ER $\alpha$  induit la transcription de gènes cibles mais nécessite, pour ce faire, une interaction directe et/ou indirecte avec des partenaires protéiques, qui sont appelés corégulateurs. Sur cette figure sont décrits les coactivateurs de l'activité transcriptionnelle du récepteur.

*Abréviations:* Ac, acétylation; ALR, Lysine Methyltransferase 2D; ASC2, Nuclear Receptor Coactivator 6; ASH2, ASH2 like histone lysine methyltransferase; BRG, Brahma-Related Gene; Brm, Brahma; CARM1/PRMT1, Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1/ Protein Arginine Methyltransferase 1; CBP/p300, CREB binding protein/E1A binding protein; ER, récepteur aux œstrogènes  $\alpha$ ; H, hormone (E2); HALR, Lysine Methyltransferase 2C; Me, methylation; P/CAF, P300/CBP-associated factor; PBP, (PPAR)-binding protein; RBO3, Retinoblastoma-Binding Protein 3; RNA Pol II, RNA polymérase II; SRC, Steroid Receptor Coactivator; TAFIIs, facteurs associés aux TATA binding protein; TBP, TATA binding protein; TRAP/DRIP, thyroid hormone receptor/vitamin D3 receptor. (Adapté de Xu and Li, 2003)

En présence de ligand, après diffusion à travers la membrane plasmique et fixation sur le récepteur, une modification de la conformation du récepteur avec un basculement de l'hélice H12 entraîne le relargage de la protéine chaperonne et la dimérisation du récepteur. Ce mécanisme permet également au récepteur de rendre accessible ses séquences de relocalisation nucléaire NLS. Il est alors importé dans le noyau où sont initiées les voies génomiques (Pratt and Welsh, 1994).

Les voies génomiques peuvent être de 3 types et impliquent des changements transcriptionnels en quelques heures ou jours. La **voie classique des œstrogènes** est dépendante de la fixation d'un ligand sur son récepteur. Le complexe ainsi formé initie la transcription de gènes cibles après liaison aux séquences ERE. Il existe par ailleurs une **voie dite ERE-indépendante** où le complexe récepteur-ligand a une action indirecte sur la transcription grâce à sa liaison avec des facteurs de transcription. Enfin une dernière voie transcriptionnelle est induite par des mécanismes de phosphorylation du récepteur ER $\alpha$  déclenchée par des facteurs de croissance. Cette **voie alterne** est indépendante du ligand.

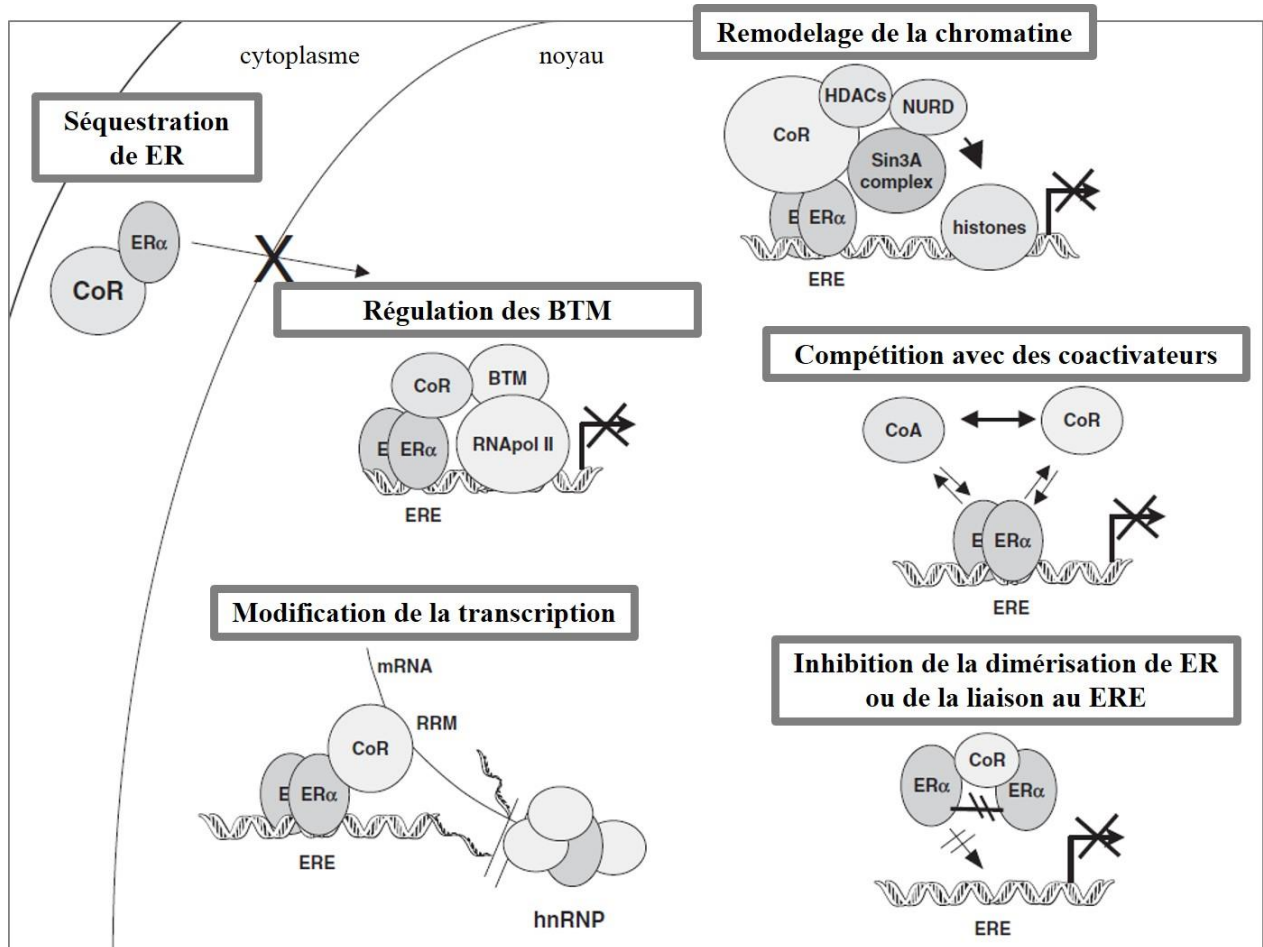
Comme tous les récepteurs nucléaires, la fixation du ligand déclenche la répression ou l'activation de l'expression de gènes cibles. Cette dualité de fonctionnement nécessite une association avec des corégulateurs transcriptionnels. Ces corégulateurs peuvent agir de deux manières en réprimant la transcription (corépresseurs) de ces gènes cibles ou encore en la stimulant (coactivateurs).

## 5.1 Corégulateurs transcriptionnels

### a. Coactivateurs

La régulation transcriptionnelle des gènes cibles du complexe œstrogènes-ER $\alpha$  est permise par la fixation de TATA binding protein (TBP) et de facteurs associés (TAF) sur des séquences cibles en amont des gènes (Figure 30A). Ces protéines peuvent être des coactivateurs transcriptionnels après la fixation du complexe récepteur nucléaire-ligand (McKenna et al., 1999; Métivier et al., 2003; Xu and Li, 2003).

Par ailleurs, l'organisation des nucléosomes est modifiée de manière ATP-dépendante par des complexes SWI/SNF avec BRG (Brahma-Related Gene), ces complexes recrutés par le récepteur nucléaire vont intervenir par le biais d'une activité HAT (Histone AcétylTransférase). Ces



**Figure 31 : Corépresseurs d'ER $\alpha$**

En parallèle des coactivateurs d'ER $\alpha$ , ce dernier peut également interagir avec des corépresseurs. Cette interaction aboutit à une régulation négative de la transcription des gènes cibles d'ER $\alpha$  (voir texte).

*Abréviations:* BTM, basal transcription machine; CoA, coactivateurs; CoR, corépresseur; HDACs, histone désacétylases; hnRNP, heterogenous nuclear ribonucleoprotein; NURD, nucleosome remodeling and histone deacetylation; RNAPol II, RNA polymérase II; RRM, RNA recognition motif; Sin3A, SIN3 Transcription Regulator Family Member A. (Adapté de Dobrzycka et al., 2003)

protéines participent ainsi au remodelage de la chromatine *via* des modifications directes et indirectes des queues des histones (Figure 30B).

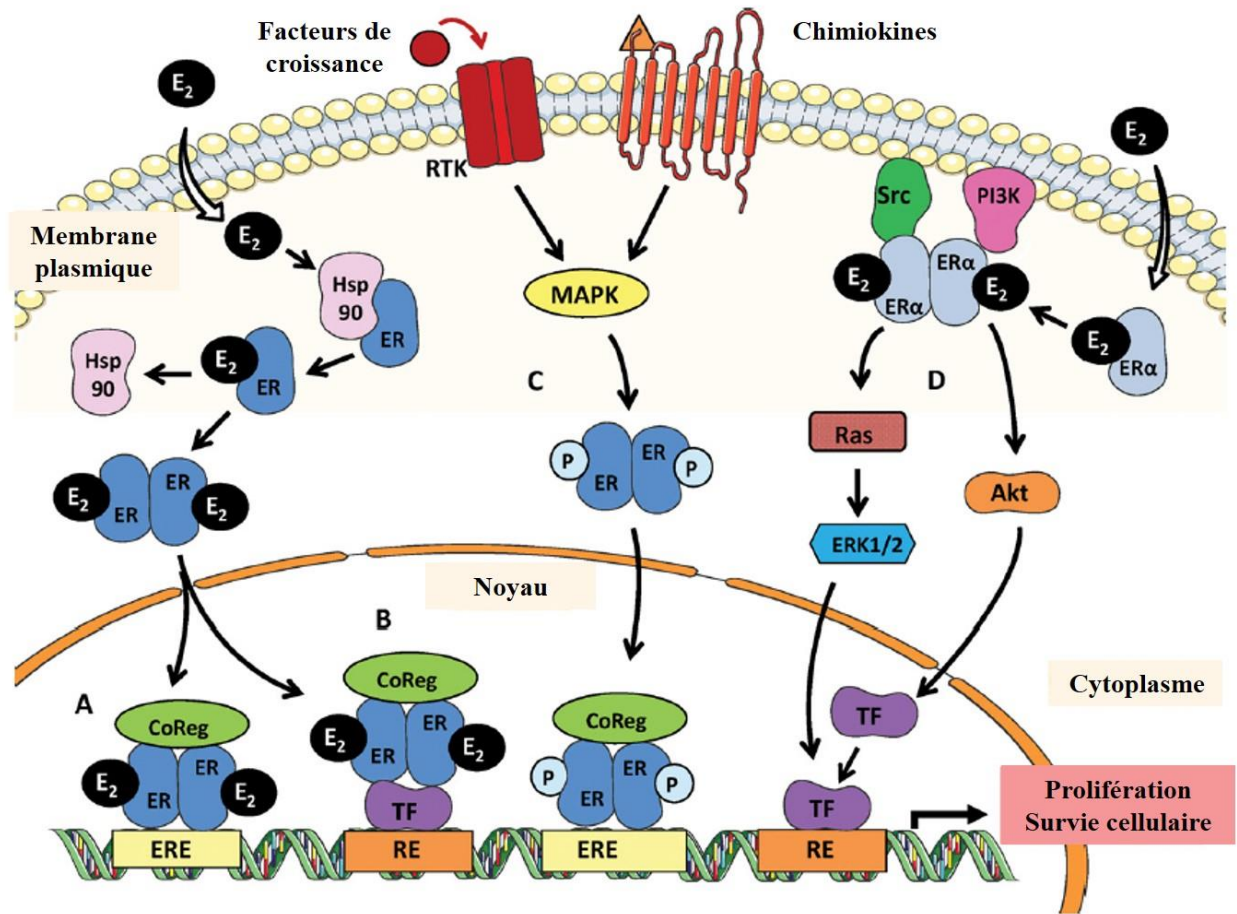
En parallèle, d'autres complexes protéiques peuvent se lier au récepteur lié et amener une activité HAT sur ce complexe (Figure 30C). C'est le cas d'une famille d'enzymes : la super famille p160. Parmi ces enzymes présentant une faible activité HAT, nous pouvons citer SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator 1), SRC-2 (TIF2) ou SRC-3. La fixation de ces complexes protéiques peut entraîner également le recrutement des Histones MéthylTransférases HMT (CARM1 ou encore PRMT1) et l'activation de facteurs de transcription partenaires (Métivier et al., 2003; Xu and Li, 2003; Xu et al., 2009). Ainsi, CBP (CREB binding protein) mais aussi p300, des HAT, peuvent former des complexes ternaires avec le récepteur lié au ligand et des membres de la famille SRC afin d'activer des facteurs transcriptionnels tels que AP-1 (Activator protein 1), SP-1 ou encore NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B) (leurs rôles seront décrits dans le paragraphe 5.2.b) (Dobrzycka et al., 2003; Kushner et al., 2000). Comme expliqué précédemment, le motif conservé LxxLL dans le domaine C terminal du récepteur permet la liaison de ces coactivateurs avec le récepteur lié. Ce motif est appelé la boîte « NR » (« Nuclear Receptor » box) (McKenna et al., 1999).

Des complexes protéiques peuvent jouer le rôle d'activateurs transcriptionnels directs du récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes lié par le biais d'une méthylation des histones (Figure 30D).

Enfin le recrutement des protéines du complexe de préinitiation de la transcription et de la RNA polymérase II est nécessaire pour déclencher la transcription des gènes cibles d'ER (Figure 30E) (Xu and Li, 2003).

## **b. Corépresseurs**

En parallèle de ces coactivateurs, nous pouvons distinguer également des corépresseurs, qui pour leur part répriment la transcription des gènes cibles: SMRT (Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors) et son paralogue, le corépresseur nucléaire (N-CoR) (Figure 31). Ces deux régulateurs semblent jouer un rôle inhibiteur de la transcription lors de la liaison d'un antagoniste sur le récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes, comme il a été décrit avec le tamoxifène dans des cellules mammaires cancéreuses (Varlakhanova et al., 2010). D'autres répresseurs transcriptionnels peuvent être cités comme BRCA1, p53 ou encore MTA1 (Dobrzycka et al., 2003).



**Figure 32 : Mode d'actions des œstrogènes**

Les œstrogènes agissent selon 2 voies principales : une voie génomique et une voie non génomique. La voie génomique comprend 3 mécanismes différents : A, la voie classique où, après liaison au ligand E<sub>2</sub>, la transcription est induite par la fixation du récepteur aux œstrogènes dimérisé sur les séquences ERE, B, la voie ERE indépendante, où la transcription est induite par des facteurs de transcription (TF) partenaires d'ER, et C, la voie alterne indépendante du ligand, où ER est activé par des cascades de phosphorylation dépendante de facteurs de croissance. La voie non génomique (D) est initiée à la membrane et met en jeu des cascades de kinases aboutissant à l'activité de facteurs de transcription pour induire la transcription de gènes cibles. L'activation de toutes ces voies conduise à la prolifération et la survie cellulaire.

*Abréviations:* CoReg, corégulateurs. (Adapté de Le Romancer et al., 2011)

La majorité des répresseurs agissent *via* le recrutement de complexes protéiques HDAC qui condensent la chromatine. Ce mécanisme aboutit donc *in fine* par une régulation négative de la transcription (Jepsen and Rosenfeld, 2002).

## **5.2 Voies génomiques des œstrogènes**

### **a. Voie génomique classique des œstrogènes : ligand- et ERE-dépendante**

Dans le cas de la voie classique des œstrogènes dépendante du ligand (Figure 32 A), le récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$  dimérisé se fixe sur des séquences palindromiques « ERE » pour Estrogen Response Element (Gruber et al., 2004). Ces séquences consensus sont situés à proximité du promoteur d'un gène cible du côté 5'. Les interactions avec des coactivateurs, décrits précédemment, stabilisent la formation du complexe de préinitiation de la transcription, ainsi que le remodelage de la chromatine. Ces processus influencent l'expression des gènes cibles en aval de manière positive ou négative (Hall et al., 2001).

Cette voie nécessite une collaboration des deux domaines de transactivation AF-1 et AF-2. En effet, la poche de liaison au ligand en C-terminal est la région qui fixe des coactivateurs tels que la famille SRC. De plus, l'hélice H12, qui bascule et verrouille la poche de fixation au ligand, a un impact sur la conformation de la protéine et donc sur le fonctionnement de l'activité transcriptionnelle. En parallèle de ce domaine en C-terminal, le domaine AF-1 conduit une action synergique avec AF-2 grâce au repliement de la protéine et à l'interaction des deux domaines et des corégulateurs.

Ainsi, ER $\alpha$  peut réguler de façon directe, l'expression de multiples gènes impliqués notamment dans l'angiogenèse (par exemple : vascular endothelial growth factor VEGF), la survie cellulaire (par exemple : Bcl2), la prolifération cellulaire (par exemple : cyclines D) (Kalaitzidis; O'Lone et al., 2004).

### **b. Voie génomique ERE-indépendante**

ER $\alpha$  peut également induire une voie ERE-indépendante après liaison avec son ligand (Figure 32 B). Il est toujours importé dans le noyau mais dans ce cas, il va interagir avec des facteurs de

transcription. Ce sont les facteurs de transcription qui, *via* la fixation à des gènes cibles, induiront leurs transcriptions indépendamment des séquences ERE (Kalaitzidis; Nilsson et al., 2001).

La protéine Sp1 (Stimulating protein) est le médiateur principal de cette voie indépendante des ERE. Sp1 activée par ER $\alpha$  se lie à des séquences promotrices riches en GC et induit par exemple la transcription du récepteur  $\alpha$ 1 de l'acide rétinoïque (RAR $\alpha$ 1), de c-fos et de l'insuline like growth factor binding protein 4 (IGF4) (Marino et al., 2006; Saville et al., 2000).

ER $\alpha$  peut également interagir avec la sous-unité c-rel de NF $\kappa$ B, et par ce biais, aurait une activité de répresseur E2-dépendante de l'interleukine 6 (Kalaitzidis; Marino et al., 2006; Nilsson et al., 2001). Ce mécanisme a été décrit dans une lignée de cellules cancéreuses mammaires ER-surexprimant ER $\alpha$  et conduit à un ralentissement de la prolifération (Bhat-Nakshatri et al., 2004; Galien and Garcia, 1997).

Enfin, une liaison protéine-protéine entre les facteurs de transcription fos/jun et les sites AP-1 est décrite après activation par ER $\alpha$ . Pour cette activité, les domaines AF-1 et AF-2 sont indispensables au recrutement et à la fixation des corégulateurs de la famille p160. Les complexes ainsi formés conduisent à la transcription de gènes caractéristiques de la prolifération cellulaire (Hall et al., 2001; Marino et al., 2006).

### **c. Voie génomique indépendante du ligand**

Dans cette voie alterne, des signaux extracellulaires provenant de récepteurs membranaires peuvent activer le récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$  en absence de ligand (Figure 32 C). Ce mécanisme met en jeu des facteurs de croissance, tels que les polypeptides EGF (Epidermal Growth Factor) ou IGF1 (Insulin-like Growth Factor I) qui induisent l'activité de kinases intracellulaires. Ces phosphorylations conduisent à activer ER $\alpha$  et la transcription de ses gènes cibles (Smith, 1998).

Dans cette voie, le domaine AF-1 de transactivation indépendante du ligand est indispensable. En effet, c'est principalement à ce niveau que les kinases activent le récepteur et contribuent à la liaison avec des corégulateurs transcriptionnels. Ainsi, il est décrit, *in vivo* et *in vitro* que le résidu sérine 118 de l'AF-1 peut être phosphorylé par les ERK1/2 (MAPK), action qui contribue à terme à la transcription de gènes cibles (Coutts and Murphy, 1998; Kato, 2001; Kato et al., 1995).

#### **d. Voie non génomique initiée à la membrane**

En parallèle des voies génomiques décrites ci-dessus, **une signalisation non génomique initiée à la membrane** peut être déclenchée en quelques secondes ou minutes (Figure 32 D). Elle met en jeu uniquement des récepteurs membranaires.

Dès 1942, Hans Selye évoque une action rapide des stéroïdes (Moriarty et al., 2006). Pour ce qui est des œstrogènes, Szego et Davis, en 1967, montrent en premier une augmentation du second messenger AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) dans l'utérus de ratte environ 15 secondes après une injection d'E2 (Szego and Davis, 1967). Puis en 1975, l'existence de flux calciques dans des cellules de l'endomètre *in vitro* en présence d'E2 est aussi découverte (Pietras and Szego, 1975).

Dès lors de nombreuses équipes de recherche ont cherché à comprendre les mécanismes rapides de signalisation des œstrogènes. Et depuis ces 15 dernières années, de nombreuses découvertes ont eu lieu à ce sujet.

Ces mécanismes non génomiques sont initiés dans les cellules des tissus reproducteurs (glande mammaire, ovaire, utérus) mais également dans les tissus osseux et neuronal, ainsi que dans l'endothélium vasculaire. Dans ces différents compartiments sont exprimés les récepteurs membranaires à l'origine de cette signalisation : GPER, mais également le variant ER $\alpha$ 36 (Hall et al., 2001; Moriarty et al., 2006). Mais il est à noter qu'ER $\beta$ , ainsi qu'ER $\alpha$ 66 et ER $\alpha$ 46 peuvent également induire cette voie (Kelly and Levin, 2001; Wang et al., 2015). La localisation des récepteurs à la membrane est permise grâce à l'activité de palmitoylacyltransférases (DHHC7 et DHHC21), ainsi qu'à l'oligomérisation avec la protéine de choc thermique HSP27. Par ce processus, le récepteur membranaire peut être pris en charge par des cavéolines (cavéoline 1) et s'ancre alors dans la membrane plasmique sous forme de dimère (Edwards, 2005; Soltysik and Czekaj, 2013).

Aujourd'hui, nous savons que la voie non génomique initiée à la membrane regroupe différentes signalisations intracellulaires aboutissant à des effets physiologiques rapides, notamment l'activation des MAPK, l'activation de PI3K/Akt, l'induction des flux ioniques comme Ca<sup>2+</sup>, l'activation de seconds messagers comme l'AMPc, l'activation de récepteurs de facteurs de croissance. Ces mécanismes sont en lien avec ceux déclenchés par la voie génomique indépendante



du ligand (Moriarty et al., 2006; Soltysik and Czekaj, 2013). Afin de conduire à ces activations, les récepteurs membranaires des œstrogènes nécessitent de former des « signalosomes ». Pour cela ils s'associent avec des partenaires protéiques présentant une activité kinase (par exemple des métalloprotéinases matricielles MMP ou encore Src) (Moriarty et al., 2006).

Les effets en aval peuvent être variés et sont dépendants du tissu dans lequel ces voies sont induites. Dans le cas du cancer du sein, l'activation de cette voie contribue à la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire.

## **6. Cas particulier du mode d'action d'ER $\alpha$ 36 dans les tumeurs hormonosensibles**

### **6.1 Croissance et progression tumorale**

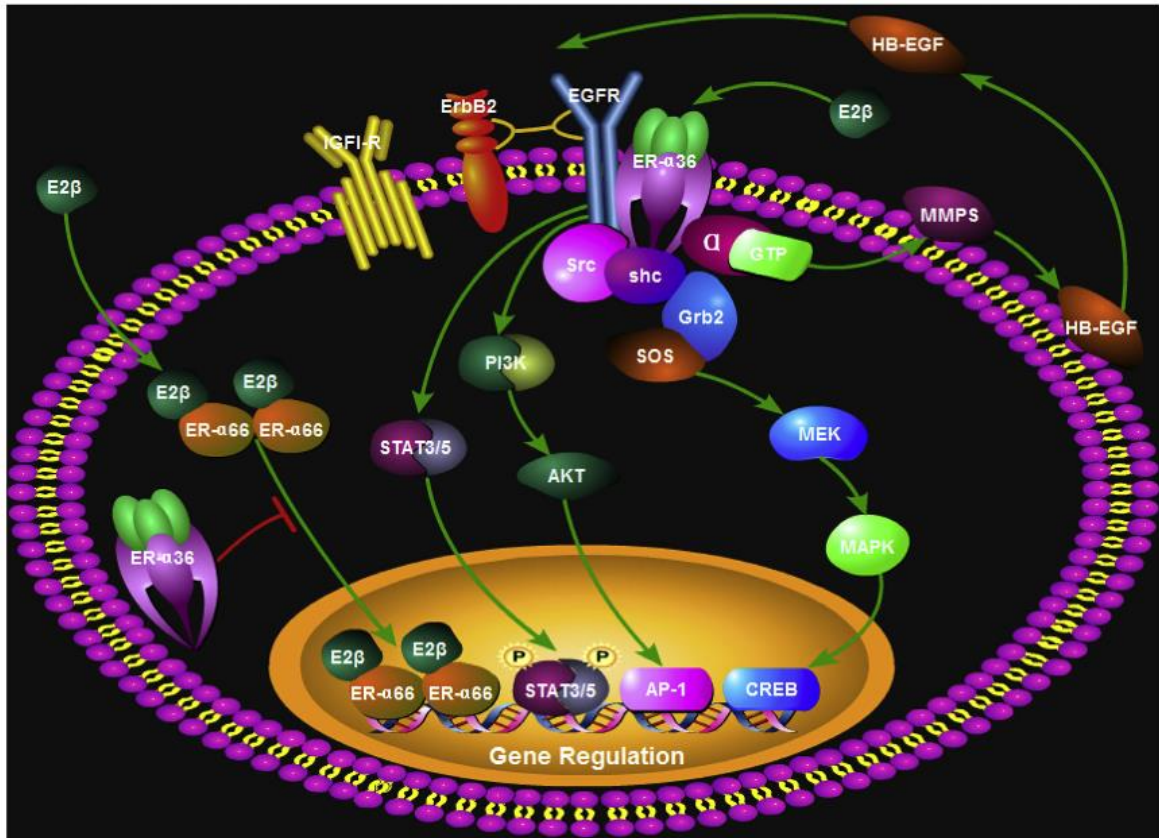
*La présence du récepteur ER $\alpha$ 36 est indépendante du statut ER des tumeurs mammaires: il est retrouvé dans environ 50% des tumeurs ER+ et ER- (Lee et al., 2008; Shi et al., 2009). ER $\alpha$ 36 est impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire, la prolifération et la différenciation comme nous le développerons par la suite, d'où son rôle important dans la carcinogénèse et la progression tumorale. In vitro dans une lignée de cellules épithéliales mammaires immortalisées (MCF-10A) l'expression de ce récepteur n'est pas détectée (Rao et al., 2011).*

Au début de ma thèse, peu de données étaient disponibles sur les mécanismes amont qui contribuent à la régulation de l'expression de l'activité d'ER $\alpha$ 36. *In vitro*, la surexpression de ER $\alpha$ 66 et/ou ER $\alpha$ 36 après transfection de cellules HEK293, montre que le domaine AF-1 d'ER $\alpha$ 66 agit comme un régulateur négatif sur l'activité du promoteur d'ER $\alpha$ 36, et ce, même en absence d'œstrogènes (Zou et al., 2009). De même, d'après Wang et collègues (2006), ER $\alpha$ 36 serait un régulateur négatif de la signalisation des œstrogènes médiées par les domaines AF-1 et AF-2 d'ER $\alpha$ 66 et ER $\beta$  (Wang et al., 2006). Il apparaît également que les niveaux d'expression d'ER $\alpha$ 66 et ER $\alpha$ 36 sont inversement proportionnels dans plusieurs lignées cancéreuses mammaires : les cellules MCF-7 expriment fortement ER $\alpha$ 66 et peu ER $\alpha$ 36 alors que la lignée MDA-MB-231 n'exprime pas ER $\alpha$ 66 mais seulement ER $\alpha$ 36 (Hevir et al., 2011; Rao et al., 2011). Ainsi il y aurait un antagonisme entre les expressions d'ER $\alpha$ 66 et ER $\alpha$ 36 dans les cellules cancéreuses mammaires. Les mécanismes en jeu ne sont, pour l'heure, pas clairement définis, néanmoins il semblerait que le variant ER $\alpha$ 36

bloque l'activité d'ER $\alpha$ 66 en se liant à lui et en le séquestrant dans le cytoplasme (Wang et al., 2015).

Le récepteur ER $\alpha$ 36 est présenté comme étant un régulateur phare de la voie non génomique des œstrogènes, néanmoins il est décrit qu'il agirait en collaboration avec d'autres médiateurs cellulaires (Schwartz et al., 2016) : par exemple, le récepteur membranaire GPER qui, tout comme ER $\alpha$ 36, n'est pas pris en compte dans le diagnostic clinique des tumeurs mammaires. Sa présence dans environ la moitié des cancers du sein ER- pourrait en partie expliquer les mécanismes déclenchés lors de la résistance aux traitements antinéoplasiques (voir dans le 6.2) (Filardo et al., 2006). Kang et collègues ont montré en 2010 que GPER agirait comme partenaire d'ER $\alpha$ 36 afin de médier l'activité non génomique du récepteur. De plus, GPER est aussi inducteur de l'expression d'ER $\alpha$ 36 en réponse à l'E2 (Kang et al., 2010). Au laboratoire, il a été décrit dans un modèle de cellules séminomateuses traitées à l'E2 que l'expression d'ER $\alpha$ 36 était modulée par le récepteur GPER et avait dans ce contexte un effet positif sur la prolifération cellulaire (Wallacides et al., 2012).

Pour ce qui est des voies de signalisation non génomiques activées par ER $\alpha$ 36, il est décrit qu'en présence d'œstradiol, le variant de récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes active différentes voies de signalisation *via* des interactions protéines/protéines, ce qui conduit à des effets physiologiques rapides. Ainsi, dans les cellules « triple-négatives » de cancer du sein HCC38, l'activation de la voie PI3K/AKT/PKC provoque (i) grâce à une libération de Ca<sup>2+</sup> depuis le réticulum endoplasmique lisse, une inhibition de JNK et par conséquent une inactivation de la cascade apoptotique, (ii) une phosphorylation des MAPK ERK1/2 et (iii) la stimulation de l'expression des facteurs métastatiques SNAIL1, CXCR4, RANKL concomitante de la perte d'expression de l'E-cadhérine conduisant à une augmentation de la survie, de la prolifération et du potentiel métastatique (Chaudhri et al., 2012; Heldring et al., 2007; Schwartz et al., 2016). Zhang et collègues ont montré en 2011 dans les cellules ER- MDA-MB-231 et MDA-MB-436 que le complexe EGFR/Src/Shc était aussi impliqué dans cette voie non génomique médiée par ER $\alpha$ 36 avec un effet positif sur la croissance tumorale (Rao et al., 2011; Zhang et al., 2011). EGFR est spécifiquement phosphorylé par Src au niveau du résidu Y845 en présence d'œstrogènes. De plus, Src change d'état en fonction du résidu tyrosine phosphorylé : cette protéine est activée lorsqu'elle est phosphorylée sur le résidu Y416, et inactivée par phosphorylation du résidu Y527. Cette voie



**Figure 33 : Signalisation déclenchée par le variant ERα36**

Le complexe ligand-récepteur ERα36 induit la signalisation non génomique dépendante des œstrogènes en partenariat avec EGFR et HER2. La transduction du signal passe par différents médiateurs décrits plus précisément dans le texte, ce qui aboutit à la transcription de gènes cibles caractéristiques de la prolifération, de la migration et de l'invasion cellulaire(Wang and Yin, 2015)

passé aussi par une induction de STAT5 qui agit comme facteur de transcription en se fixant sur une séquence consensus GAS du promoteur de la cycline D1 (Zhang et al., 2012b). Ces observations ont été complétées en 2014 par la même équipe, qui décrit en parallèle d'une activation des ERK, une induction de l'expression d'ER $\alpha$ 36, en présence d'œstradiol dans des cellules ER $\alpha$ 66+ de haut passage (MCF-7) (Zhang et al., 2014). Le variant ER $\alpha$ 36 est présenté comme étant le récepteur aux œstrogènes responsable de la médiation de la signalisation MAPK/ERK. Chaudhri et collègues expliquent par ailleurs que le phénomène de migration et d'invasion œstradiol-dépendant est bloqué en présence d'un inhibiteur de MEK (U0126) (Chaudhri et al., 2012). L'activité des ERK serait donc bien un mécanisme phare de cette voie non génomique activée par les œstrogènes sous le contrôle d'ER $\alpha$ 36 (Schwartz et al., 2016).

Ainsi, par cette voie (Figure 33), ER $\alpha$ 36 induit des effets anti-apoptotiques, métastatiques et mitogènes *in vivo* et *in vitro*, ce qui contribuerait à la progression tumorale comme le décrit Zhang et collègues pour le cas de tumeurs mammaires ER- (Zhang et al., 2011). Les voies induites par cette signalisation pourraient être utilisées comme cibles thérapeutiques : par exemple une forte concentration d'anti-œstrogènes (5  $\mu$ M) inhiberait la prolifération des cellules ER- en bloquant la voie EGFR/Src/STAT5 (Zhang et al., 2012b). Cibler le variant ER $\alpha$ 36 dans les tumeurs « triple-négatives » pourrait augmenter la sensibilité aux chimiothérapies classiques (par exemple le paclitaxel, une molécule couramment utilisée dans les chimiothérapies des tumeurs « triple négatives ») et ainsi réduire la migration et l'invasion des cellules (Pelekanou et al., 2012; Zhang et al., 2012b).

De plus, il est à noter qu'ER $\alpha$ 36 serait également un médiateur majeur dans d'autres cancers dans l'espèce humaine (Sołtysik and Czekaj, 2015). Ainsi, ER $\alpha$ 36 est fortement exprimé dans les cellules de cancer gastrique et est en lien avec une croissance maligne des tumeurs (Deng et al., 2010). Fu et collègues, en 2013 et 2014 montrent sur des échantillons de tumeurs humaines et murines que la forte expression du variant ER $\alpha$ 36 est corrélée avec l'expression d'une protéine chaperonne GRP94 (Glucose-regulated protein 94) dont le lien est établi avec de nombreux cancers, ainsi qu'une activation d'Akt (Fu et al., 2013, 2014). De même dans le cancer colorectal, ER $\alpha$ 36 serait en lien avec la progression tumorale, tout comme le variant ER $\alpha$ 46, d'après l'analyse d'échantillons humains tumoraux et sains. La progression tumorale du cancer colorectal serait corrélée à une diminution de l'expression d'ER $\alpha$ 36 (Jiang et al., 2008). Enfin, Schwartz et

collègues décrivent en 2014 l'implication du variant de récepteur dans la progression et l'agressivité des cancers laryngés *in vitro* et *in vivo* (Schwartz et al., 2014). La présence d'ER $\alpha$ 36 est encore décrite à d'autres localisations de cancers chez l'Homme et son rôle est évalué à l'heure actuelle (Sołtysik and Czekaj, 2015).

## 6.2 Résistance aux traitements anti-tumoraux

Il a été montré dans diverses études que le récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$ 36 est impliqué dans l'acquisition de la résistance au traitement par l'anti-œstrogène tamoxifène (TAM). Environ 70 % des cancers mammaires sont hormono-dépendants dont 25% ne répondent pas au traitement (Lappano et al., 2012). Chez les patientes ER+, 40% sont également ER $\alpha$ 36+ et présentent une survie, à 10 ans post-traitement, inférieure à celle des patientes ER $\alpha$ 36- (DFS à 76% contre 88%) (Shi et al., 2009). Une insensibilité au TAM est développée chez ces patientes, majoritairement ménopausées, avec augmentation de l'expression d'ER $\alpha$ 36 mais également d'EGFR tandis que l'expression du récepteur nucléaire ER $\alpha$ 66 diminue (Li et al., 2013a; Zhang and Wang, 2013). En effet, le tamoxifène agit comme un agoniste d'ER $\alpha$ 36 qui médie des effets mitogènes en présence de cette molécule, initialement prescrite pour détruire les cellules tumorales. L'augmentation de l'expression du récepteur HER2 en présence de tamoxifène est discutée en fonction des auteurs (Li et al., 2013a). Néanmoins, Shi et collègues indiquent dans leur étude de cohortes (896 femmes au total) que les patientes ER $\alpha$ 36+ sont souvent HER2+ ce qui suggère une boucle de régulation positive entre HER2 et ER $\alpha$ 36 (Shi et al., 2009). Ils mettent en avant également que les patientes ER $\alpha$ 36+/HER2+ présentent un taux de survie moindre par rapport aux ER $\alpha$ 36+/HER2-. Vranic et collègues en 2011 dans une étude de 30 cas de tumeurs mammaires ER- complètent ces observations en suggérant également un lien entre ER $\alpha$ 36 et EGFR (Vranic et al., 2011). De plus, une corrélation d'expression est retrouvée chez des patientes présentant un autre cancer hormonosensible, le cancer de l'endomètre (Tu et al., 2011). *In vitro*, le lien entre ER $\alpha$ 36 et HER2 est également mis en exergue dans des lignées de cellules tumorales ER- : ER $\alpha$ 36 interagit physiquement avec EGFR et HER2 (Kang et al., 2011; Zhang et al., 2011). Une boucle de régulation entre ces 3 partenaires est observée grâce à un site Ap1 dans la région 5' d'ER $\alpha$ 36 et les rôles de cette boucle dans les mécanismes de résistance au TAM sont aujourd'hui sources de nombreuses études (Yin and Wang, 2016).

L'acquisition de cette résistance au TAM induit l'activation de la voie EGFR avec une phosphorylation des MAPK ERK1/2, ainsi qu'une activation de la voie PI3K/AKT (Li et al., 2013a; Zhang and Wang, 2013). L'activation de la voie PI3K/AKT se traduit alors par une augmentation de la phosphorylation de P21 et P27 qui se relocalisent dans le cytoplasme et ne jouent donc pas leur rôle d'inhibiteurs de CDK au niveau de la transition G1/S (Zhang and Wang, 2013).

En 2013, Li et collègues ont avancé qu'ER $\alpha$ 36 serait impliqué dans la résistance au TAM en raison d'une hypersensibilité aux œstrogènes circulants dans les tumeurs ER $\alpha$ 66+ ER $\alpha$ 36+ (Li et al., 2013a). L'augmentation de l'expression d'ER $\alpha$ 36, ainsi que celle d'EGFR et de HER2, résulteraient de l'adaptation des cellules mammaires à la carence en œstrogènes, naturelle chez les patientes ménopausées (Zhang and Wang, 2013). De plus, dans les cellules MCF-7 dont l'expression d'ER $\alpha$ 36 est inhibée, ils observent une absence d'augmentation de l'expression d'EGFR et HER2 (Yin et al., 2014). Dans les cellules MCF-7 (ER $\alpha$ 66+, GPER+, ER $\alpha$ 36+), ils ont ainsi démontré qu'ER $\alpha$ 36 stabilise et transactive EGFR en présence de TAM, ce qui conduit au clivage de la cycline E. La cycline E est une protéine importante dans la transition G1/S, sa surexpression étant associée à la progression tumorale et à un mauvais pronostic à long terme (Wingate et al., 2009). L'expression d'ER $\alpha$ 36 dans les cellules de cancer mammaire ER+ est donc corrélée à une prolifération, une migration et une invasion supérieures à celles des cellules ER $\alpha$ 36- et cela même en présence de concentration très faibles (nM circulant) d'œstrogènes (Li et al., 2013a). La perturbation de la boucle ER $\alpha$ 36-EGFR-HER2 qui semble majeure dans la résistance au TAM *in vitro* serait donc une piste à envisager pour restaurer la sensibilité des cellules tumorales ER+ au traitement.

En 2014 et 2015, Yin et collègues mettent en évidence une restauration de la sensibilité au TAM après traitement de cellules MCF-7 *in vitro* avec un inhibiteur de tyrosine kinase (lapatinib) ou un down-régulateur d'ER $\alpha$ 36 (Brousoflavonol B, issu de l'écorce du mûrier de Chine) (Yin et al., 2014, 2015). Ces deux agents agiraient en bloquant l'axe ER $\alpha$ 36/EGFR/HER2, critique pour l'échappement à la thérapie anti-œstrogénique.

Les modalités moléculaires de résistance au tamoxifène, médiées par ER $\alpha$ 36, ont été explorées et seront présentées dans la première partie des résultats.

## IV. Les perturbateurs endocriniens et leurs effets sur la santé humaine

### 1. Perturbateurs endocriniens : généralités

*Durant le XXème siècle, un nombre croissant de pathologies s'est développé dans l'espèce humaine ainsi que dans la faune sauvage. Ces pathologies, notamment en lien avec la fonction reproductrice, ont peu à peu été mises en lien avec le développement d'activités ayant un impact négatif sur la santé mais également sur l'environnement. C'est au début des années 1990, que le concept de « perturbateurs endocriniens » est apparu et que les travaux portant sur ce sujet ont commencé à susciter l'intérêt de l'opinion publique.*

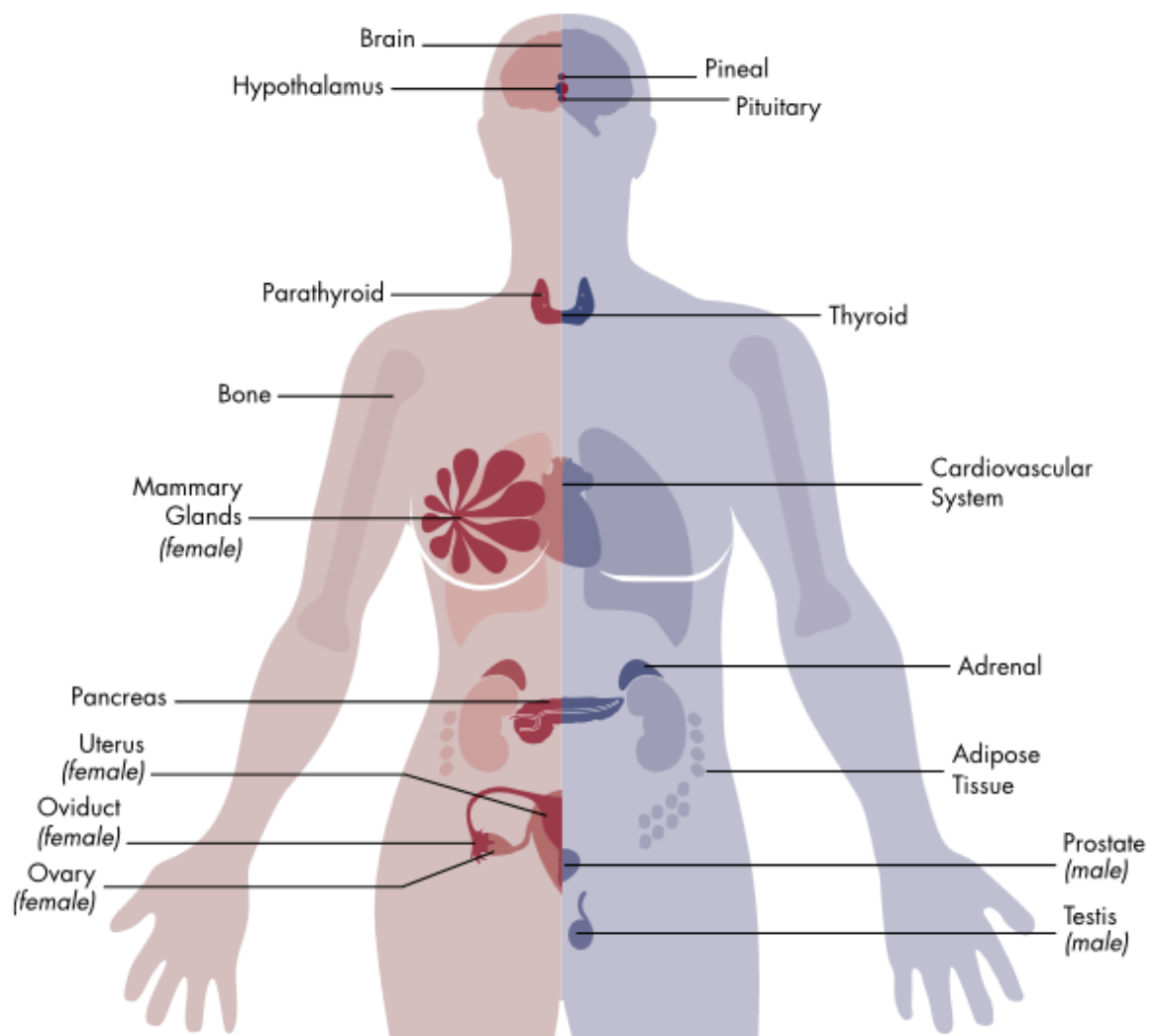
En 1996, l'Agence de Protection de l'Environnement (EPA) aux Etats-Unis définit un peu plus précisément ce qu'est un perturbateur endocrinien comme étant :

*« Des substances exogènes qui interfèrent avec la production, la sécrétion, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles, responsables de la maintenance de l'homéostasie et de la régulation de processus liés au développement »*

(Kavlock et al., 1996).

Ainsi, les perturbateurs endocriniens (PE), présents dans l'environnement, peuvent être des analogues ou antagonistes des hormones stéroïdiennes sexuelles, d'origine naturelle ou artificielle, et présentent des effets pouvant interférer avec le fonctionnement du système endocrinien (WHO, 2002). La majorité des PE ont un effet œstrogénique en mimant le 17  $\beta$ -œstradiol (E<sub>2</sub>), ils sont aussi appelés oestrogénomimétiques, ou anti-androgénique (Cravedi et al., 2007). Aujourd'hui, nous savons que l'activité des hormones stéroïdiennes non sexuelles mais également celles des hormones non stéroïdiennes peuvent être la cible de ces PE (Multigner et al., 2007).

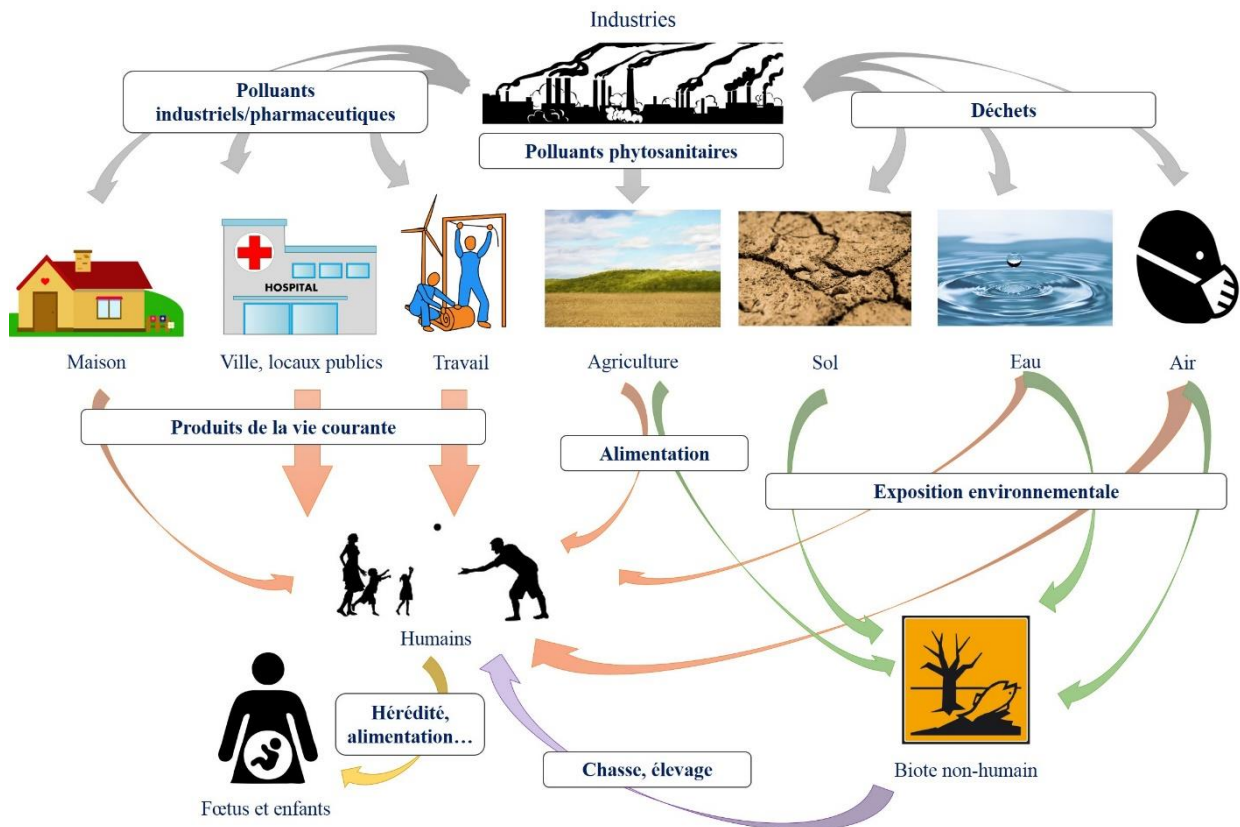
La plupart des PE ayant un effet délétère sur la reproduction peuvent se lier aux récepteurs aux œstrogènes nucléaires et membranaires (Inoue et al., 2000). Outre leur impact sur les fonctions reproductrices, ces polluants en ont également un sur la croissance, le développement, le



**Figure 34 : Organes cibles des perturbateurs endocriniens**

Les organes touchés par les effets d'une exposition aux PE chez l'homme et chez la femme ne sont pas les mêmes. Chez la femme, les PE interfèrent avec la réponse hormonale de la thyroïde, du pancréas et des ovaires. Chez l'homme, les organes cibles sont les testicules, les glandes surrénales, parathyroïdes. Il est également décrit que les PE peuvent cibler les fonctions cérébrales et d'autres systèmes hormono-dépendants, dont la glande mammaire. (Adapté de Gore et al., 2015)





**Figure 35 : Les perturbateurs endocriniens, contaminants ubiquitaires dans l'environnement**

Sur cette figure sont décrites les différentes sources de perturbateurs endocriniens. Ce sont des substances majoritairement produites par l'industrie et qui sont : (i) utilisées dans les produits de la vie courante (détergent, contenants alimentaire ou non...), (ii) des contaminants de l'alimentation, (iii) transformées en déchets, contaminant ainsi l'environnement. Ces différentes voies de contaminations aboutissent à l'exposition aussi bien de l'environnement, que des espèces animales dont l'Homme. L'âge le plus sensible est la période de la périnatalité : les fœtus et jeunes enfants.

comportement et le développement de maladies métaboliques telles que le diabète. De ce fait, de multiples organes peuvent être touchés (Figure 34) (Schug et al., 2011).

Parmi les PE, on retrouve des polluants de l'industrie chimique (alkylphénols, bisphénol A...), des polluants phytosanitaires (herbicides, fongicides, pesticides...), des polluants pharmaceutiques (comme le DES) mais aussi des substances d'origine naturelle comme les phyto-œstrogènes.

Ces contaminants de notre vie quotidienne sont présents dans les plastiques et conserves, les aliments, les tickets de caisse ou encore dans les pesticides. Certains PE sont des composés solubles dans les corps gras (lipophiles). Ils se fixent dans le tissu adipeux, et peuvent facilement s'accumuler dans les graisses de différentes espèces et ainsi contaminer une grande partie de la chaîne alimentaire. Ainsi, ils sont retrouvés dans le sang, le tissu adipeux, le lait maternel, le liquide amniotique, le sang du cordon ou les urines.

Ce sont également des contaminants de l'air et de l'eau, l'exposition à ces perturbateurs se fait donc sur le long terme (Raecker et al., 2011; Zlatnik, 2016). De ce fait, les PE sont néfastes pour la santé humaine mais pas uniquement, la faune est également touchée par les effets de ces polluants. La faune aquatique est un exemple caractéristique d'une pollution de l'eau par des PE (Sharma et al., 2009; Watanabe et al., 2007) (Figure 35). Enfin il a été démontré que les effets délétères développés à la suite d'une exposition à des PE pouvaient être transmissibles à la descendance.

Ces différents aspects seront décrits dans cette quatrième partie de l'analyse bibliographique.

## **1.1 Législation en France**

C'est en 2002 que l'Organisation Mondiale de la Santé (ou encore WHO pour World Health Organization) a défini plus précisément les PE comme étant

*« Une substance exogène ou un mélange de substances exogènes dont les effets altèrent le fonctionnement du système endocrinien et par conséquent, causent des effets néfastes pour la santé d'un organisme sain, de ses descendants ou sous-populations ».*

En France, en 2005, a été créé le Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens (PNRPE) dans le but de soutenir la recherche fondamentale et d'approfondir les connaissances sur ce sujet. À la suite de cette initiative, des projets financés par ce programme ont

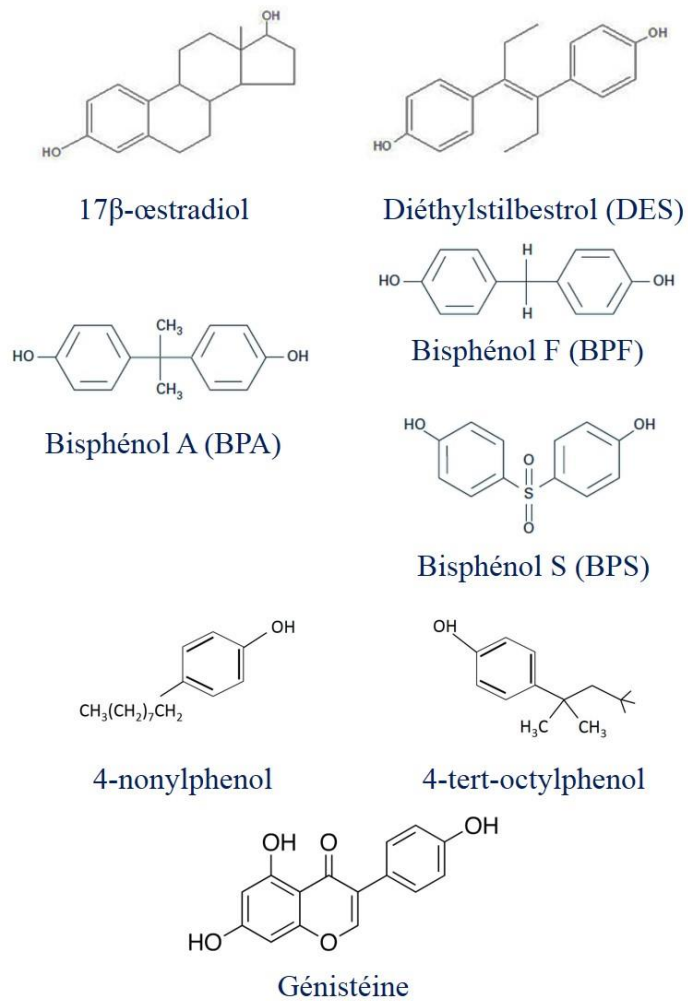
permis notamment de préciser les critères d'identification des PE et/ou des mélanges de PE, d'explorer et d'avancer dans la compréhension de leurs mécanismes, dans la mesure des expositions, ainsi que dans la surveillance et l'évaluation des risques pour les milieux et les organismes et dans la réglementation.

Par exemple, après l'établissement de deux rapports sur les effets sanitaires et sur l'usage du bisphénol A (BPA) le 27 septembre 2011, l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a recommandé de « réduire les expositions au bisphénol A, notamment par sa substitution dans les matériaux au contact des denrées alimentaires », source principale d'exposition au BPA. De plus, les experts ont réclamé un étiquetage permettant de signaler de manière claire les informations relatives à ce sujet. Auparavant, la commercialisation de biberons contenant du BPA avait été interdite en France puis dans l'Union Européenne. Fin 2012, une loi a été adoptée en France quant à l'interdiction du BPA dans les contenants alimentaires. Il a été décidé l'éviction en 2013 du BPA dans les contenants alimentaires pour jeunes enfants et en 2015 pour tous les contenants alimentaires.

Depuis lors, de nombreux engagements ont été pris pour évaluer les risques liés aux PE et notamment pour la famille des bisphénols (BPA et substitutifs comme le bisphénol F ou S, décrits plus loin). Des groupes de travail évaluent actuellement ces risques dans le but d'élaborer des stratégies contre ces polluants et leurs effets nocifs pour l'Homme mais également pour l'environnement. En avril 2014, une stratégie nationale contre les PE a été mise en place.

## **1.2 Types de perturbateurs endocriniens**

Nombreux sont les PE qui sont classés par l'OMS *via* le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC) comme étant des substances cancérigènes ou potentiellement cancérigènes. Cette classification a débuté dans les années 1970 et recense aujourd'hui plus de 900 substances cancérigènes ou potentiellement cancérigènes pour l'espèce humaine. Certaines de ces substances ont été citées dans le chapitre II de l'analyse bibliographique relatif aux facteurs de risque du cancer, comme appartenant au premier groupe.



**Figure 36 : Formules chimiques du 17β-œstradiol et de perturbateurs endocriniens majeurs**

Les perturbateurs endocriniens, qu'ils soient d'origine industrielle, phytosanitaire ou naturelle, ont tous la même caractéristique. (Adapté de Rochester and Bolden, 2015)

Les PE sont usuellement classés en fonction de leur origine (Figure 36), ainsi différentes classes sont décrites :

- ***Les polluants pharmaceutiques***

Historiquement, le diéthylstilbestrol (DES, Distilbène®, CAS : 56-53-1) est le premier PE majeur à avoir été mis en lumière. Prescrit aux femmes enceintes afin de prévenir les fausses couches dans les années 1950, il a été par la suite montré comme étant responsable de pathologies chez les filles des patientes (troubles de la fertilité, cancer) (Multigner et al., 2007). En France, sa prescription aux femmes enceintes fut contre-indiquée en 1977. Le DES appartient à cette catégorie des polluants pharmaceutique, c'est un œstrogène de synthèse, tout comme le sont les pilules contraceptives ou les THS.

- ***Polluants industriels***

Dans cette catégorie sont retrouvées les molécules présentant des groupements phénols : ceux à chaîne aliphatique courte comme les bisphénols et ceux à chaîne longue comme les alkylphénols.

Dans la littérature, les **bisphénols** sont régulièrement cités pour leurs effets néfastes sur la santé humaine *via* une exposition orale et/ou dermique principalement. Ce sont des œstrogènes de synthèse développés pour l'industrie chimique. Produits en très grande quantité, le plus connu d'entre eux, le bisphénol A (BPA ; 2,2-bis[4-hydroxyphényl]propane ; C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>, CAS : 80-05-7) est utilisé pour la polymérisation des plastiques, ses caractéristiques antioxydantes ou encore la révélation des papiers thermiques (tickets de caisse). Depuis de nombreuses années, le BPA fait l'objet d'expérimentations (*in vivo* et *in vitro*) et d'études épidémiologiques. Les conclusions de ces recherches laissent à penser qu'une exposition fœtale à ce composé est corrélée avec de nombreuses pathologies à plus ou moins long terme. C'est pourquoi la commercialisation de produits contenant du BPA est aujourd'hui limitée en France et dans l'Union Européenne. Malgré l'interdiction de l'utilisation du BPA en France dans les contenants alimentaires, des produits manufacturés dans d'autres pays y sont importés. De plus, l'existence d'autres bisphénols est également une problématique pour la santé publique aujourd'hui. En effet, des premières études sur les bisphénols F (BPF ; 2,2-bis[4-hydroxyphenol]methane ; C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>, CAS : 620-92-8) et S (BPS ; 2,2-bis[4-hydroxyphenol]sulfone ; C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>S, CAS : 80-09-1) notamment, qui sont utilisés

en remplacement du BPA, suggèrent l'existence d'effets similaires à ceux du BPA (Eladak et al., 2015; Rochester and Bolden, 2015).

D'autres PE proches en structure et utilisés dans l'industrie sont également recensés : les **alkylphénols**. Contrairement aux précédents, le groupe phénol qui compose leur structure est suivi d'une longue chaîne aliphatique. Dans cette famille sont retrouvés le 4-nonylphénol (NP) et le 4-tert-octylphénol (OP). Ma thèse étant basée sur l'étude de leurs effets en mélange, je présenterai leurs caractéristiques plus en détails dans une prochaine partie.

- ***Polluants phytosanitaires***

Dans cette catégorie sont retrouvés les différents biocides : herbicides, fongicides et pesticides qui servent à contrôler les espèces végétales, fongiques et animales respectivement, et ceci dans le but principal d'améliorer la productivité agricole. L'utilisation de ces substances a débuté vers le milieu du XX<sup>ème</sup> siècle avec le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane, CAS : 50-29-3) et s'est fortement amplifiée durant ce siècle. L'emploi de ces biocides ne fut remis en question qu'après l'étude de Rachel Carson en 1962. Elle décrivit alors les premiers effets néfastes de ces polluants sur l'environnement, plus précisément les oiseaux, et la santé humaine. Depuis lors, l'utilisation de ces PE est plus contrôlée et des modifications de mode de productions sont envisagées. Parmi ces modifications, l'utilisation de pesticides dits « naturels » (issus de plantes, d'organismes microbiologiques/biologiques ou encore de minéraux inorganiques) est discutée, notamment les pyréthrinoïdes. En effet, la combinaison d'un rendement moindre avec des effets délétères plus faibles mais néanmoins réels sur la santé humaine sont une problématique étudiée actuellement en agronomie (Alavanja et al., 2004; Mnif et al., 2011).

- ***Polluants « naturels »***

Comme décrit avec les pyréthrinoïdes, des substances naturelles peuvent également être des perturbateurs endocriniens. Ces produits non stéroïdiens, capables de se lier aux récepteurs aux œstrogènes de par leur similarité de structure avec l'E2, sont principalement des phytoestrogènes : des flavonoïdes, des coumestanes et des lignanes. Présents dans les végétaux, la voie d'exposition

à ces PE se fait par l'alimentation. Par ailleurs certains organismes microbiologiques peuvent également produire des mycoœstrogènes ou mycotoxines.

La génistéine (CAS : 446-72-0) est un composé flavonoïde. Contenue dans le soja et dans les fèves, ce phytoestrogène fait l'objet de nombreuses études pour ses effets sur la santé humaine. Il est présenté comme ayant une forte affinité avec le LBD d'ER $\beta$  (Kuiper et al., 1998; Nilsson et al., 2001; Sotoca et al., 2012).

Il est toutefois à noter qu'il faut distinguer les substances reprotoxiques et les perturbateurs endocriniens. Même si ces derniers sont notamment connus pour leurs conséquences sur la reproduction, d'autres substances qui ne sont pas des PE peuvent affecter les capacités reproductives (Aubard and Magne, 2000).

## **2. Les PE et leurs effets sur l'Homme**

Si on recense les observations réalisées chez l'Homme et qui pourraient être mises en lien avec l'essor de l'industrie et la pollution environnementale qui en découle, l'induction de nombreuses pathologies et phénotypes délétères est décrite :

- ⇒ maladies métaboliques : l'obésité, le diabète (**Casals-Casas and Desvergne, 2011**),
- ⇒ malformations congénitales dont certaines en lien avec des troubles de la fertilité, voire le développement de cancer : syndrome de dysgénésie testiculaire, endométriose, cancer du col de l'utérus (**Hardell et al., 2006; Sharpe, 2006; Skakkebaek, 2002; Sultan et al., 2001**),
- ⇒ troubles neurologiques (autisme, trouble déficitaire de l'attention, hyperactivité) (**Kim et al., 2009; Miodovnik et al., 2011**),
- ⇒ maladies respiratoires (bronchite, sinusite, asthme) et désordres immunologiques (allergies, maladies auto-immunes) (**Ahmed, 2000**),
- ⇒ pathologies thyroïdiennes (**Boas et al., 2012**),

⇒ cancer (notamment du sein), également chez l'enfant (**Birnbaum and Fenton, 2003**).

Ces maladies sont multifactorielles, néanmoins l'exposition à des polluants environnementaux joue probablement un rôle significatif depuis ces 30 à 40 dernières années (**Zlatnik, 2016**).

### **3. Effets sur la santé humaine : dose, période et effets cocktail**

Les effets sur la santé humaine sont la conséquence d'un ensemble de paramètres d'exposition à ces PE. En effet, il existe différents cadres de sensibilité, amenant à une fragilité de l'organisme et donc aux effets délétères sur la santé d'une exposition à ces PE.

Nous pouvons distinguer 3 paramètres modulant les conséquences d'une exposition aux PE : la dose d'exposition, la période, et la notion d'effet cocktail des PE.

#### **2.1 Notion de dose**

L'alchimiste Paracelse au XVIème siècle avançait que :

*« Toutes les choses sont poison, et rien n'est sans poison ; seule la dose détermine ce qui n'est pas un poison. »*

Ce qui signifie qu'à petite dose, les effets d'une substance chimique seraient minimes, alors qu'à forte dose, les effets seraient majeurs. Cette phrase fut à la base de la toxicologie. Or, depuis de nombreuses années maintenant, on sait que les PE ont les mêmes caractéristiques que les hormones et peuvent exercer leur activité à faible dose (Schug et al., 2011). De très petites concentrations peuvent ainsi affecter des points clés du développement comme la prolifération, la différenciation cellulaire et l'organogénèse.

Si on étudie le cas du BPA, 90 à 99% de la voie d'exposition chez les adultes et enfants se fait par l'alimentation. De plus, dans les pays industrialisés, des quantités mesurables sont retrouvées dans l'urine chez 90% des individus (Del Pup et al., 2016; Teeguarden and Hanson-Drury, 2013). De « faibles doses » qualifiées de NOAEL ou « No Observable Adverse Effect Level » (dose maximale sans effet toxique observable, inférieures ou égales à 5mg/kg/jour) sont considérées comme étant l'exposition réelle à laquelle nous sommes soumis dans notre vie de tous les jours (Vandenberg et



al., 2012a). L'exposition totale humaine au BPA serait en moyenne inférieure à 1 à 2 µg/kg/ jour (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011). Les études *in vivo* sont souvent menées avec des doses en rapport avec la NOAEL, mais également avec de « très faibles doses » relatives à l'exposition humaine.

Les effets dose-réponse des PE sont décrits dans la littérature comme ne décrivant pas une courbe linéaire mais plutôt une courbe non monotone en U ou U inversé (Bouskine et al., 2009; Schug et al., 2011; Vandenberg et al., 2012b). Dans le contexte du cancer testiculaire, il avait été montré au laboratoire que l'exposition à un mélange d'alkylphénols (décrit ultérieurement) entraînait une courbe dose-réponse de la prolifération cellulaire biphasique ou non monotone aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Ajj et al., 2013).

La dose ne ferait donc pas le poison pour les perturbateurs endocriniens, alors que la période d'exposition pourrait y contribuer.

## **2.2 Notion de fenêtre d'exposition et de transmission à la descendance**

*L'organisme animal présente une sensibilité accrue à ces PE à certaines périodes de sa vie. Ces périodes critiques sont principalement la périnatalité (gestation et petite enfance).*

*In utero*, l'organisme subit une croissance rapide avec une prolifération et une différenciation cellulaire intenses. Pendant le développement du fœtus et la petite enfance, de nombreux gènes sont activés ou réprimés de manière séquentielle, ce qui constitue des cibles pour les perturbateurs endocriniens (Schug et al., 2011). C'est à ce moment-là que ces cellules peuvent subir des événements mutagènes et/ou des modifications épigénétiques, responsables d'une altération de l'expression génique qui peut être irréversible. Pendant leurs divisions successives, les cellules fœtales sont vulnérables, un contact indirect avec des agents toxiques (carcinogènes, tératogènes...) *via* la mère pourrait amener à une initiation de lésions. Cette vulnérabilité cellulaire est possible de par la nature des barrières protectives telles que le placenta et la barrière hématoencéphalique, qui ne sont pas complètement imperméables aux PE fortement lipophiles (Birnbaum and Fenton, 2003). De plus, le placenta exprime fortement les récepteurs aux œstrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$  ce qui contribue à sa sensibilité vis-à-vis des PE (Mannelli et al., 2015). Zalko et collègues montrent que 4% d'une dose de 20 µg/kg de BPA passent à travers le placenta

chez la souris CD-1 (Zalko et al., 2003). De nombreuses études de cohortes montrent par ailleurs la présence de PE dans différents compartiments chez des femmes pendant leur grossesse et à la parturition : urine, sang de cordon (Herbstman et al., 2010; Wolff et al., 2008; Zeman et al., 2013).

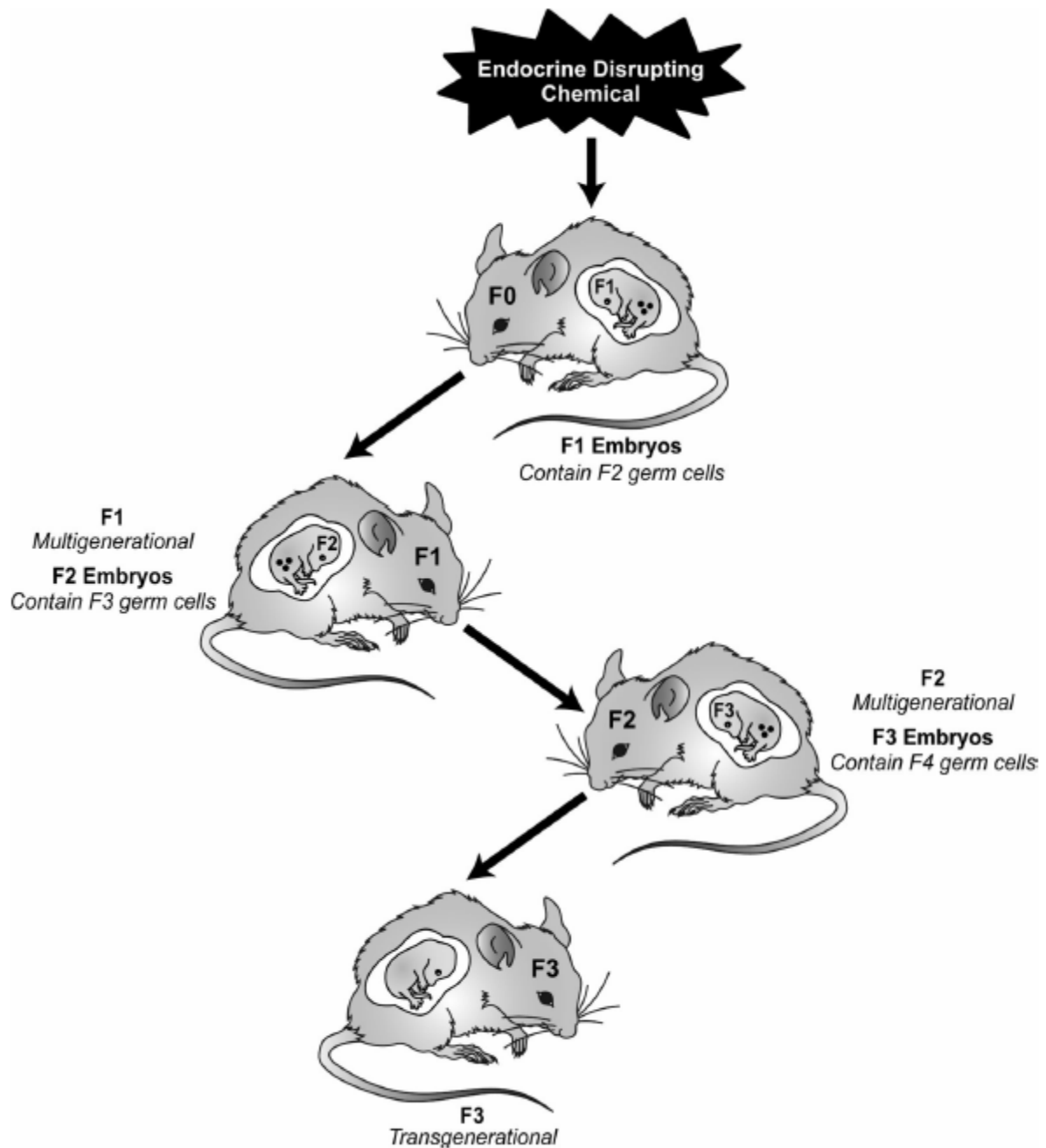
De ce fait, le fœtus serait exposé par le biais de sa mère aux mêmes agents toxiques qu'elle. C'est le cas pour certains agents infectieux par exemple. Mais dans le cadre de cette thèse, je me suis plus particulièrement intéressée aux perturbateurs endocriniens, polluants pouvant aussi être néfastes au développement du fœtus à plus ou moins long terme.

*Les effets délétères des PE peuvent être visibles à court terme mais ils peuvent également l'être à long terme à l'âge adulte.*

La fenêtre de sensibilité vis-à-vis de l'exposition aux PE paraît centrée sur une période restreinte qu'est la périnatalité. Or, le stade précis de l'exposition, tout comme sa durée peuvent moduler les conséquences sur la santé de l'enfant à plus ou moins long terme, en affectant plus particulièrement les organes hormonosensibles. Il est ainsi décrit qu'une exposition à un stade précoce de la gestation peut influencer la santé à court terme de la mère et de son enfant comme le temps de gestation ou le poids du nouveau-né (Wolff et al., 2008) alors qu'une exposition en fin de grossesse et durant les premiers mois du nouveau-né peut entraîner des effets à long terme sur le développement cognitif. De même, l'initiation d'un processus de carcinogénèse ou l'altération des fonctions reproductrices peuvent être les conséquences à très long terme d'une exposition périnatale (Schug et al., 2011; Skakkebaek, 2002).

*L'exposition aux PE conduit à des effets multigénérationnels, la question peut aussi se poser à partir des observations chez les modèles animaux sur l'existence d'effets transgénérationnels.*

Un exemple concret et historique de cette vulnérabilité lors de la période gestationnelle est l'exposition au DES lors de la grossesse. Comme décrit dans la partie précédente, la descendance dite « Distilbène® » des femmes ayant reçu ce traitement durant leur grossesse présente des effets à long terme. Pour la descendance féminine, il est exposé dans la littérature qu'elle présente une

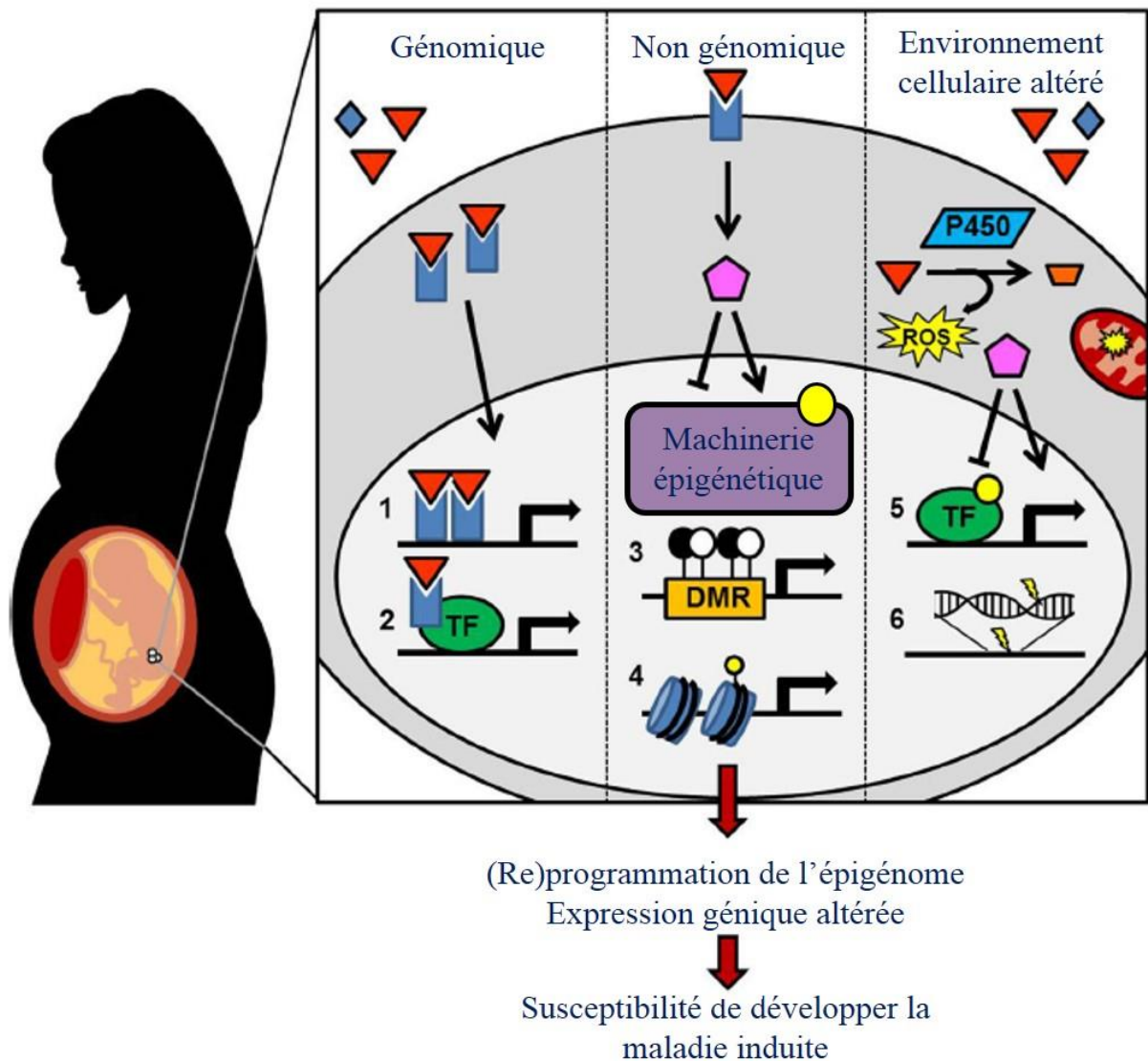


**Figure 37 : Effets multigénérationnels et transgénérationnels des PE chez le modèle murin**

La femelle F0 gestante est exposée aux PE, ainsi que sa descendance F1 et la lignée germinale de cette descendance à l'origine de la génération F2. Les générations F0, F1 et F2 sont donc exposées directement aux PE pendant la gestation de la femelle F0. Dans ce cas, les effets des PE sur ces organismes sont dits « multigénérationnels ». La génération F3 formée à partir de la F2 n'a pas été exposée directement aux PE, les effets sur cette descendance sont appelés « transgénérationnels ». (Adapté de Schug et al., 2011)

augmentation du risque de développer un cancer du col de l'utérus ou un cancer du sein, pour ce dernier de l'ordre de 2 fois (Hilakivi-Clarke, 2014). De même, chez la descendance masculine, le lien entre le développement d'un syndrome de dysgénésie testiculaire avec l'exposition des mères durant la grossesse est envisagé (Skakkebaek, 2002; Strohsnitter et al., 2001). Ces données indiquent que l'exposition aux perturbateurs endocriniens revêt un caractère multigénérationnel en touchant plusieurs générations en même temps. Lors de l'exposition de l'individu femelle F0 gestante, les générations F1 et F2 sont exposées indirectement : l'organisme F1, en cours de développement, porte les cellules germinales à l'origine de la génération F2 (Figure 37). Il est ainsi montré des modifications du comportement avec baisse d'interaction social entre les deux sexes chez la souris C57BL/6J pour la génération F1 après exposition au BPA, alors que le contraire est observé pour les générations suivantes (Wolstenholme et al., 2012). Tandis que chez la souris CD-1 une exposition *in utero* à une dose environnementale de BPA (250ng/kg/jour) de E8 à E18 conduit à une altération de la morphogénèse de la glande mammaire (Vandenberg et al., 2007). Nilsson et collègues décrivent par ailleurs que des rattes F2 descendantes d'une F0 exposée à la vinclozoline durant la gestation présentent des gestations pathologiques pouvant entraîner leur mort (Nilsson et al., 2008). Ces observations ont aussi été relevées pour la génération femelle F3, ce qui nous amène à envisager de possibles effets transgénérationnels suite à l'exposition de la femelle F0.

Dans la population humaine, la question d'effets transgénérationnels, sous-tendant des conséquences sur la génération F3 non exposée issue de la descendance « Distilbène® », est aujourd'hui en suspens. Des études *in vivo* d'exposition à différents PE de modèles rongeurs ou poissons laisseraient aujourd'hui à penser que ces effets pourraient être réels (Birnbaum and Fenton, 2003; McLachlan, 2016; Newbold et al., 2000). Les conséquences d'une exposition à différents PE sur plusieurs générations ont été étudiées par des équipes de chercheurs grâce aux modèles rongeurs (rats et souris) et poissons (médaka). De par leur temps de génération assez court (3 mois), l'obtention d'une descendance F3 non exposée aux PE peut permettre d'observer facilement de possibles effets transgénérationnels. C'est ainsi qu'il est décrit pour le BPA et un œstrogène de synthèse composant de pilules contraceptives (éthinyloestradiol ou EE2), chez le médaka, des effets transgénérationnels à la génération F4 non exposée aux PE : une baisse de la fertilité et une hausse de la mortalité des jeunes (Bhandari et al., 2015). Chez le modèle murin, une exposition au BPA pendant la gestation semble entraîner des modifications transgénérationnelles



**Figure 38 : Mécanismes conduisant à une reprogrammation fœtale PE-dépendante**

Ces mécanismes sont de 3 types : génomiques, non génomiques et dépendants de l'environnement cellulaire. D'un point de vue génomique, les PE (triangle rouge) miment l'action des œstrogènes endogènes (losange bleu) en se fixant sur leurs récepteurs cibles (rectangle bleu) ce qui peut contribuer en collaboration possible avec des facteurs de transcription (TF) à déclencher l'expression de gènes cibles critiques dans la survenue de pathologies (voir chapitre 3). Les mécanismes non génomiques font suite à une cascade de transduction du signal (pentagone rose) et conduisent à modifier la machinerie épigénétique (rond jaune) tel que décrit dans le texte. Enfin, une modification de l'environnement cellulaire avec génération d'espèces oxygénées réactives (ROS) contribue à altérer les fonctions mitochondriales, ainsi que le métabolisme des PE. Ces différentes altérations peuvent être à l'origine d'une reprogrammation épigénétique fœtale et peuvent augmenter la susceptibilité de développer une pathologie à très long terme. (Adapté de Xin et al., 2015)

sur le comportement des descendants, ainsi que des modifications épigénétiques de la méthylation de certains gènes (Jorgensen et al., 2016; Wolstenholme et al., 2012). Ces modifications épigénétiques font partie d'un événement de reprogrammation fœtale.

La reprogrammation fœtale induite par l'exposition aux PE peut être notamment la conséquence d'un mécanisme non génomique avec une altération potentielle de la programmation épigénétique, (Schug et al., 2011; Xin et al., 2015) (Figure 38). Ces modifications non génomiques peuvent être de plusieurs ordres : méthylation du promoteur des gènes, modifications des histones (méthylation, acétylation), expression de microRNA. Ces modifications de l'épigénome ne sont transmissibles aux générations suivantes que si elles touchent la lignée germinale (Xin et al., 2015). Il a été observé que l'expression de DNMTs (protéines impliquées dans le silencing des gènes par méthylation de promoteurs) était modifiée après exposition à des PE durant la gestation (Hilakivi-Clarke, 2014). Par exemple, l'exposition au EE2 pendant la gestation entraîne une augmentation de l'expression de DNMT1 dans la glande mammaire chez le rat, ainsi que l'hyperméthylation de régions promotrices de gènes impliqués dans la différenciation de cellules souches, région souvent méthylées dans les cellules cancéreuses (de Assis et al., 2012). Ces modifications de l'expression génique au sein de la glande mammaire peuvent avoir un rôle dans la susceptibilité de développer un cancer du sein à long terme et cela sur plusieurs générations, ce qui tendrait à montrer des effets transgénérationnels à la suite de l'exposition *in utero*. Skinner et collègues décrivent notamment des événements transgénérationnels d'épimutations dans la lignée germinale mâle à la suite d'une exposition à la vinclozoline pendant la période embryonnaire E8-14 chez des rats Harlan Sprague-Dawley. Ces effets se traduisent dans la génération F3 à une altération de la différenciation des cellules de Sertoli, pouvant conduire au développement de pathologies à long terme (Skinner et al., 2015).

Toutefois, une partie de ces études sont réalisées à des doses souvent supérieures à l'exposition réelle humaine et le mode d'exposition peut être différent entre l'espèce humaine (majoritairement oral) et les modèles rongeurs (Birnbaum and Fenton, 2003). Actuellement des études épidémiologiques tentent d'éclaircir ces points et de faire le lien entre les effets constatés chez l'Homme et le rôle de l'exposition aux PE.

Il peut être noté que les périodes de l'enfance et de l'adolescence pendant lesquelles la maturation du système endocrinien se réalise peuvent présenter une sensibilité moindre mais néanmoins réelle aux polluants environnementaux (Schug et al., 2011).

### **2.3 Notion d'effets cocktail**

Les sources de perturbateurs endocriniens sont donc multiples et présentes dans notre vie quotidienne. Rarement individualisés, les PE sembleraient interagir entre eux et présenter des effets cocktail : leurs effets sur la santé humaine sont variés et différents en fonction des combinaisons. (Mnif et al., 2011). Dans une revue de 2016, Rizzati et collègues décrivent que les mélanges de pesticides *in vivo* chez les mammifères et *in vitro* aboutissent le plus souvent à des effets additifs ou synergiques (Rizzati et al., 2016). Néanmoins ces effets peuvent être très variables en fonction des mélanges, de la dose de chaque composant et de leurs cibles physiologiques (communes ou non).

Ces différents points ont permis d'établir les protocoles expérimentaux durant ma thèse.

## **4. Le contexte de la thèse : les alkylphénols à longue chaîne en mélange**

Durant ma thèse, j'ai travaillé avec un mélange d'alkylphénols nommé M4. Les alkylphénols ont été soupçonnés de présenter des activités œstrogéniques à la fin des années 1930, mais c'est bien après que ces mécanismes ont été mis en évidence de manière plus précise (Dodds, 1938; Soares et al., 2008).

Les alkylphénols, tout comme le BPA, sont utilisés comme antioxydant et sont présents dans les produits manufacturés comme les emballages alimentaires, domestiques et cosmétiques. Ils sont également utilisés comme agents émulsifiants et détergents dans les produits d'entretien. Les voies d'exposition peuvent être multiples : par inhalation, par voie dermique et principalement par ingestion d'eau ou de nourriture contaminées. Dans notre étude *in vivo*, nous avons fait le choix d'exposer les souris gestantes en administrant les produits en mélange *per os*, cette méthode se veut moins stressante que le gavage par sonde, de plus l'absorption par les muqueuses buccales peut jouer un rôle dans l'exposition humaine (Vandenberg et al., 2014).

La contamination par les alkylphénols concerne la moitié des individus, quel que soit leur âge. Le constat d'une pollution environnementale avec une rémanence de ces polluants dans l'eau et dans les sédiments a incité à établir une directive-cadre sur l'eau (DCE). Cette directive a classé en 2000 le 4-nonylphénol (NP) et le 4-tert-octylphénol (OP) comme étant une substance prioritaire et dangereuse pour le NP, prioritaire pour le OP pour l'environnement. Une modification de cette directive en 2008 a établi des normes de qualité environnementale (2000/60/CE, 2008/105/CE).

Le mélange M4 est composé de 4-onylphénol (NP) et de 4-tert-octylphénol (OP) à un ratio de 30 pour 1. Cette composition se veut réaliste et est similaire à l'exposition environnementale à ces 2 molécules comme décrit dans une étude de 2011 (Raecker et al., 2011).

- ***Le 4-nonylphénol (NP)***

Le 4-nonylphénol (NP) ou para-NP ( $C_{15}H_{24}O$ , CAS : 104-40-5) est un polluant synthétique de la famille des alkylphénols utilisé depuis les années 1940. Cette molécule, composant majoritaire du mélange M4, est utilisée dans l'industrie après ajout de groupements éthoxyles (ou éthoxylates), ce qui forme des composés appelés « nonylphénols polyéthoxylés » (NPE). Ces NPE possèdent alors des propriétés tensioactives. Dans l'environnement, le NP provient de la dégradation de ces NPE.

Dès les années 1980, la toxicité de cette molécule pour l'environnement aquatique a été mise en lumière (Giger et al., 1984). Cet impact recense aujourd'hui : la féminisation des organismes aquatiques, une baisse de la fertilité mâle et une baisse de la survie des jeunes à une concentration inférieure à 8,2  $\mu\text{g/L}$  (Soares et al., 2008). Les activités œstrogéniques de ce polluant ont par la suite été découvertes en 1991 (Soto et al., 1991). Il était décrit à ce moment-là, dans la lignée de cellules cancéreuses mammaires MCF-7, qu'une exposition à ce composant induit la prolifération cellulaire. Depuis lors, des études *in vitro* et *in vivo* ont exploré le rôle de cette molécule dans l'apparition de pathologies chez l'Homme et chez les principaux modèles animaux (Mannelli et al., 2015). Il est à noter que le NP peut se fixer sur  $ER\alpha$ , même si son effet agoniste est environ 5000 fois inférieur à l'E2 (Acevedo et al., 2005). Les études menées ont notamment relevé que la dose NOAEL (15 mg/kg/jour) est bien plus élevée que la dose environnementale (WHO/IPCS/IRA/12/04). Néanmoins la possibilité d'effets synergiques ou additifs avec d'autres



contaminants, ainsi que la courbe dose-réponse non monotone peut amener le NP à faible dose à perturber le système endocrinien (Silva et al., 2002; Soares et al., 2008).

Le NP, tout comme le BPA, a été montré par la suite comme présentant également des activités anti-androgéniques *in vitro* (Lee et al., 2003).

- ***Le 4 tert-octylphénol (OP)***

Ce composé, autrement appelé 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol (C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O, CAS : 140-66-9), possède des propriétés analogues au NP. Le 4-tert-octylphénol (OP) possède aussi une action œstrogéno-mimétique.

De même que pour le NP, il est décrit qu'une exposition aux OP *in vivo* et *in vitro* est à l'origine de modifications physiologiques et phénotypiques majeures. Par exemple, dans la lignée de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 un traitement avec des OP conduit à une induction de l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  (Andersen et al., 1999). *In vivo*, une exposition périnatale est à l'origine d'une diminution de la taille des testicules, à l'initiation de la transcription de gènes cibles d'ER $\alpha$  et à une modification des cycles œstrales chez le modèle rat (Bøgh et al., 2001).

Une revue des connaissances sur l'exposition à de tels composés et le lien avec le cancer sera présentée plus en détails lors de la discussion.

# **Contexte et objectifs de la thèse**

## *Contexte et objectifs de la thèse*

Avant ma thèse, l'équipe travaillait sur les effets d'un mélange d'alkylphénols, appelé M4, dans le contexte du cancer testiculaire. Il avait été montré qu'en présence de ces PE, le variant de récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes, ER $\alpha$ 36, médiait la prolifération des cellules cancéreuses *in vivo* et *in vitro* (Ajj et al., 2013; Wallacides et al., 2012).

Dans la littérature, ce récepteur était décrit *in vitro* comme régulant les voies non génomiques aux œstrogènes aboutissant, dans les cellules cancéreuses mammaires, à des processus de prolifération, migration, invasion (Schwartz et al., 2016; Zhang et al., 2011). Des études de cohortes montraient qu'une expression d'ER $\alpha$ 36 était corrélée à un mauvais pronostic quel que soit le statut ER des patientes (Shi et al., 2009).

Dans le but d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patientes et de prédire l'avancement de la maladie, la question s'est alors posée de savoir si le mauvais pronostic des tumeurs mammaires, en lien avec une expression d'ER $\alpha$ 36, pouvait être lié avec un phénotype migratoire des cellules cancéreuses.

Pour répondre à cette première interrogation, nous avons réalisé une étude rétrospective d'échantillons de tumeurs mammaires humaines en collaboration avec des cliniciens du centre Paul Strauss de Strasbourg. Dans cette étude ont été inclus 60 échantillons de tumeurs mammaires ER+ et 58 échantillons ER-. J'ai mesuré l'expression génique de marqueurs caractéristiques du phénotype migratoire des cellules mammaires dans chaque tumeur. Afin de déterminer si l'acquisition d'un phénotype métastatique pouvait être prédite en reliant l'expression d'ER $\alpha$ 36 à l'expression d'autres gènes marqueurs de progression tumorale, nous avons développé des outils informatiques en réalisant (i) de l'inférence de réseaux de gènes ou d'interaction de gènes et (ii) en classifiant les échantillons selon le niveau d'expression des gènes étudiés. À partir de l'expression statique des gènes étudiés obtenue dans chaque échantillon de tumeur, nous avons évalué les différentes dépendances entre les expressions en utilisant des méthodes statistiques basées sur le calcul de corrélations linéaire et non linéaire, des calculs d'information mutuelle ainsi que des techniques de classification supervisée standard. Ces méthodes ont abouti à l'inférence de réseaux de gènes décrivant la dépendance de leurs expressions dans l'absolu ou par rapport à un contexte donc dans une sous-classe particulière d'échantillons.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article présenté dans la première partie des résultats (Chamard-Jovenin et al., 2015). Ce travail se poursuivant actuellement, je vous présenterai les résultats complémentaires à la suite dans ce chapitre.

Dans cette première partie de ma thèse, nous avons donc cherché à comprendre le rôle d'ER $\alpha$ 36 dans la progression tumorale. À la suite de ce travail, nous nous sommes demandé si l'induction de son expression dans des cellules épithéliales mammaires saines était nécessaire et/ou suffisante pour l'initiation du cancer *in vivo* et *in vitro*. Au cours de sa thèse au sein de l'équipe, Hussein Ajj avait montré que l'expression d'ER $\alpha$ 36 était induite dans des cellules séminomateuses après exposition au mélange d'alkylphénols (Ajj et al., 2013). Nous avons donc testé les conséquences d'une exposition aux alkylphénols et d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36, séparément ou en combinaison, sur le processus de cancérogénèse dans la glande mammaire. Pour cela, des études *in vitro*, *in silico* et *in vivo* ont été menées de manière parallèle.

Des analyses transcriptomiques ont été réalisées dans une lignée de cellules épithéliales immortalisées (MCF-10A). Une étude bioinformatique a été menée pour extraire de ces données diverses informations qui, combinées à une étude de la littérature, nous ont permis de cibler les fonctions à étudier *in vitro*. De plus, nous avons traduit nos résultats sous forme de modèles graphiques de réseaux dont nous avons exploité les matrices d'adjacence et des bases de données telles que GSEA ou KEGG afin de déterminer les régulateurs maîtres, cibles des effets du mélange d'alkylphénols dans les cellules non tumorales.

En parallèle, le travail *in vivo* a été réalisé avec des souris C57BL/6 exposées ou non aux alkylphénols et/ou exprimant ou non ER $\alpha$ 36 spécifiquement dans la glande mammaire. Au sevrage et à l'âge adulte, des prélèvements histologiques de la glande mammaire chez les femelles ont été étudiés dans le but d'analyser l'architecture de la glande mammaire et de possibles effets multigénérationnels voire transgénérationnels, à la suite de l'exposition de la femelle F0 au mélange M4 durant la gestation.

Ce travail soumis à publication dans deux articles est présenté dans la deuxième et troisième partie des résultats et est complété avec des données obtenues ultérieurement.

La dernière partie de ce manuscrit est consacrée à la discussion des résultats obtenus, ainsi qu'aux perspectives de travail.

# Résultats

## **I. Le variant ER $\alpha$ 36 : lien avec la progression tumorale du cancer du sein ?**

Ce travail est le fruit d'un projet (Predictherm) réalisé en collaboration avec une équipe de cliniciens du centre Paul Strauss à Strasbourg et financé par le Cancéropôle Grand Est et la Région Lorraine. Nous avons travaillé à partir des cDNA de patientes présentant divers types moléculaires de tumeurs mammaires. À partir de l'étude des expressions de différents gènes, j'ai pu analyser le lien entre l'expression d'ER $\alpha$ 36 et l'expression de marqueurs caractéristiques de la progression tumorale dans le cancer du sein. Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans BMC Systems Biology en juin 2015 : **BMC Systems Biology 2015 9:28**.

Dans cette première partie des résultats, je vais commencer par une présentation de l'article puis je développerai les perspectives de travail quant à la validation d'ER $\alpha$ 36 comme marqueur moléculaire pronostique potentiel de la progression tumorale dans les cancers du sein.

### **1. Introduction**

Parmi tous les cancers féminins, le cancer du sein reste encore aujourd'hui le cancer présentant la plus forte incidence et mortalité dans le monde (GLOBOCAN 2012). Il n'existe pas un mais plusieurs types de cancers du sein du point de vue moléculaire. Une classification basée sur le statut du récepteur aux œstrogènes  $\alpha$ , du récepteur à la progestérone et du récepteur du facteur de croissance épidermique 2 humain (ER/PR/HER2) permet de distinguer ces types de tumeurs et, à l'aide de marqueurs de prolifération ou de jonctions intercellulaires, le pronostic de chaque tumeur peut être en partie « prédit » (Eroles et al., 2012). Ainsi, la réponse thérapeutique à apporter pour contrer la progression tumorale peut être personnalisée. Or, le constat est fait depuis quelques années de l'existence d'échappements thérapeutiques. Il est notamment montré une résistance au tamoxifène des tumeurs hormonosensibles (exprimant ER/PR/HER2) dans 25% des thérapies (Lappano et al., 2012). C'est pourquoi la recherche de nouveaux marqueurs capables de prédire le comportement tumoral et/ou le comportement face aux traitements antinéoplasiques est d'actualité.

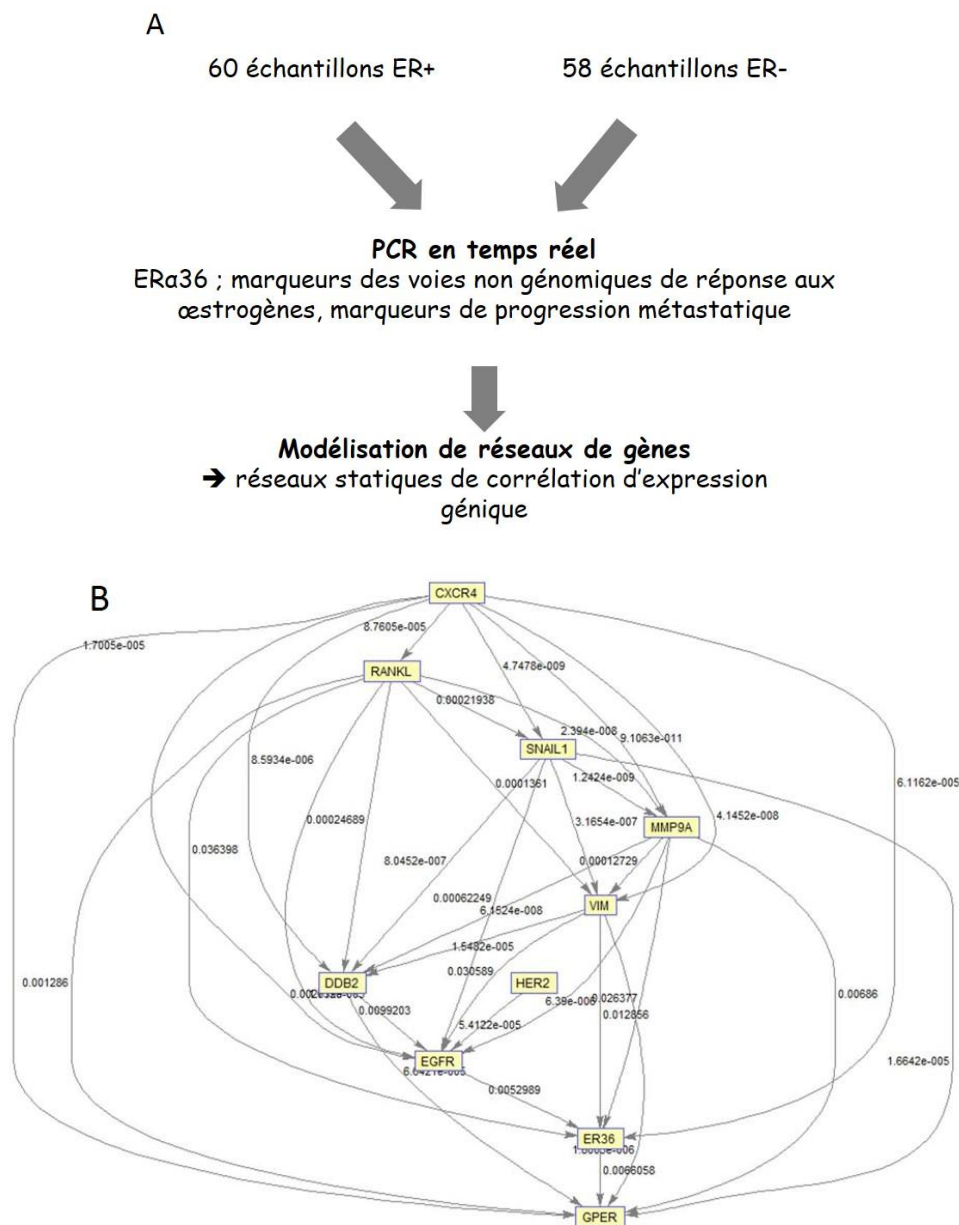
Au laboratoire, nous nous intéressons au rôle d'un variant du récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes identifié par Wang et collègues en 2005: ER $\alpha$ 36, qui est transcrit à partir d'un promoteur alternatif situé dans l'intron 1 du gène d'ER $\alpha$ 66 (Wang et al., 2005). Ce récepteur membranaire de 36 kDa est dépourvu des domaines de transactivation AF-1 et AF-2 et possède un domaine de liaison au ligand tronqué. De ce fait, il peut présenter un spectre de ligands potentiels différent du récepteur canonique ER $\alpha$ 66. Grâce à un domaine spécifique de 27 acides aminés à l'extrémité COOH terminale, nous pouvons identifier précisément l'expression génique de ce variant de récepteur.

Préalablement à cette étude, l'expression d'ER $\alpha$ 36 en lien avec le cancer du sein avait déjà été explorée. Il était alors décrit que l'expression du variant était indépendante du statut moléculaire de la tumeur : environ 40% des tumeurs ER+ et ER- l'expriment (Lee et al., 2008). Des études *in vitro* révèlent qu'ER $\alpha$ 36 est à l'origine de l'activation de la voie non génomique aux œstrogènes, dans le cancer du sein mais également dans d'autres types de cancer. Dans une lignée de cellules hormonosensibles (MCF-7), la surexpression de ce récepteur conduit à une résistance au tamoxifène et à la progression des cellules avec augmentation des potentiels prolifératif, migratoire et invasif (Zhang and Wang, 2013). Ces mécanismes ER $\alpha$ 36-dépendants pourraient expliquer les échappements thérapeutiques relevés chez certaines patientes sous tamoxifène. De plus, Shi et collègues en 2009 dans une étude de cohorte comprenant 896 femmes ER+ montrent qu'une forte expression d'ER $\alpha$ 36 est corrélée à une survie moindre à 10 ans post-traitement (DFS à 76% contre 88%) (Shi et al., 2009).

Dans ce contexte, nous avons voulu étudier des échantillons de tumeurs mammaires : (i) des tumeurs dites hormonosensibles, généralement de bon pronostic mais qui peuvent parfois présenter des résistances aux traitements hormonaux et (ii) des tumeurs dites « triple négatives », plutôt de mauvais pronostic et qui présentent des caractéristiques de progression tumorale. Cette étude rétrospective est construite sur l'analyse de l'expression de 11 gènes dans 118 échantillons : 60 échantillons ER+ et 58 échantillons ER-.

## 2. Méthodes et résultats

Les expressions géniques dans les 118 cDNA ont été déterminées par PCR en temps réel, en normalisant les valeurs par rapport à l'expression du gène contrôle RPLPO avec le calcul du  $\Delta C(t)$



**Figure 39 : Étude rétrospective de tumeurs mammaires humaines : évaluation du potentiel prédictif de l'expression d'ERα36**

A. À partir des échantillons de tumeurs ER+ et ER- obtenus par une collaboration avec des chercheurs du Centre Paul Strauss, des PCR en temps réel ont été réalisées. Les résultats ont permis d'analyser l'expression d'ERα36, ainsi que celles de marqueurs des voies non génomiques de réponse aux œstrogènes ou de progression métastatique, référencés dans des études antérieures comme étant lié à ERα36 (Zhang et al, 2011 ; Chaudhri et al, 2012 ; Ajj et al, 2013). Les relations d'expression entre les différents gènes ont été modélisées à partir de calculs de corrélations de rang adossées à des tests d'hypothèses classiques et ont permis d'obtenir des réseaux statiques de corrélation d'expressions géniques (B).



(Figure 39). L'expression de chaque gène a été analysée en triplicat dans chaque échantillon, afin d'établir une valeur moyenne de l'expression génique.

La liste des marqueurs étudiés a été établie à partir de ce qui était connu dans la bibliographie du cancer du sein :

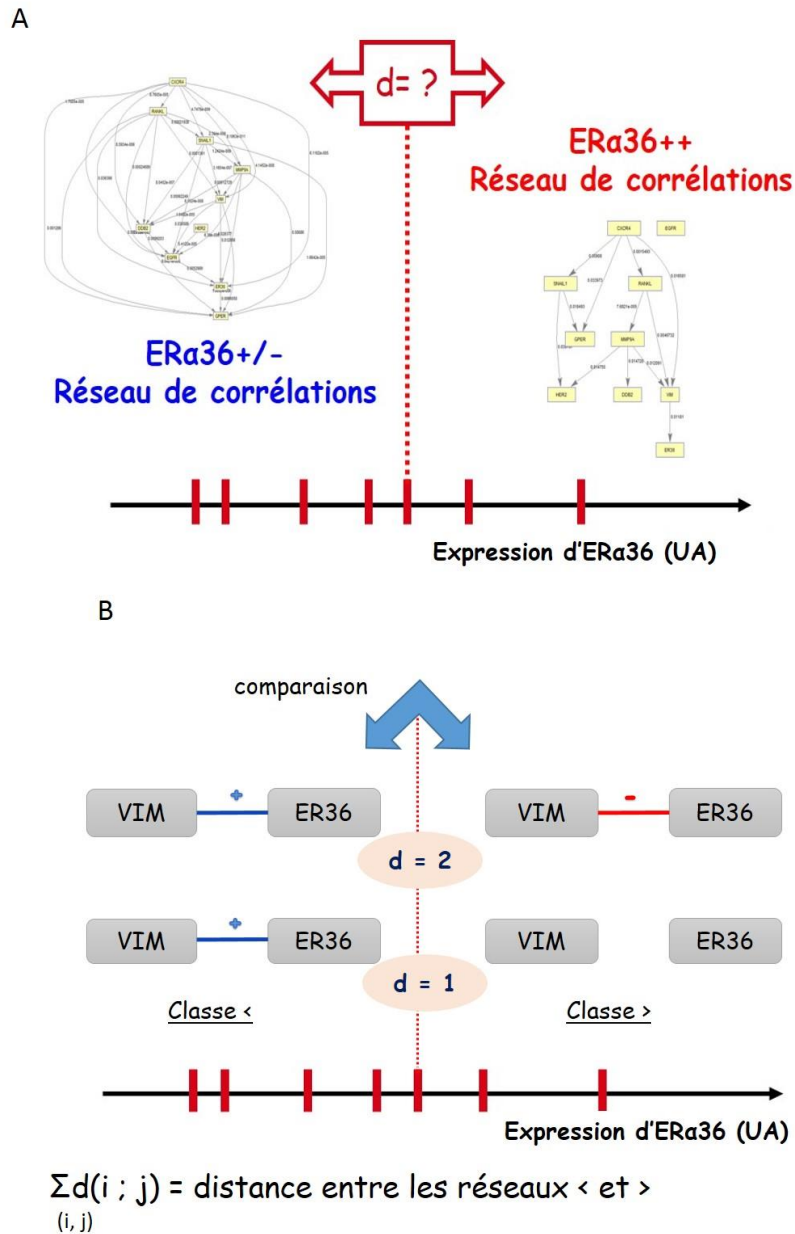
- ⇒ ER $\alpha$ 66, ER $\alpha$ 36, GPER, HER2, EGFR et DDB2 sont impliqués dans la signalisation aux œstrogènes.
- ⇒ CXCR4, MMP9, RANKL, SNAIL1 et VIM ont été décrits pour avoir un rôle dans la progression tumorale. Ce sont des marqueurs caractéristiques des processus migratoires ou invasifs.

À partir des résultats des expressions géniques dans chaque tumeur et dans l'objectif d'évaluer les dépendances entre les gènes, nous avons élaboré un programme à façon sur Matlab permettant de calculer des coefficients de corrélation, des informations mutuelle totales et partielles. Aussi, différents outils statistiques et tests d'hypothèses ont été utilisés pour évaluer l'existence ou pas de liens entre les gènes :

- Évaluation des corrélations linéaires et non linéaires (de rang),
- Évaluation de l'information mutuelle entre gènes,
- Évaluation de l'entropie conjointe ou conditionnelle quand le nombre de données était jugé suffisant,
- Introduction de changements dans les données en utilisant des tests de Monte-Carlo (permutations de valeur) pour évaluer la significativité des résultats de dépendance obtenus.

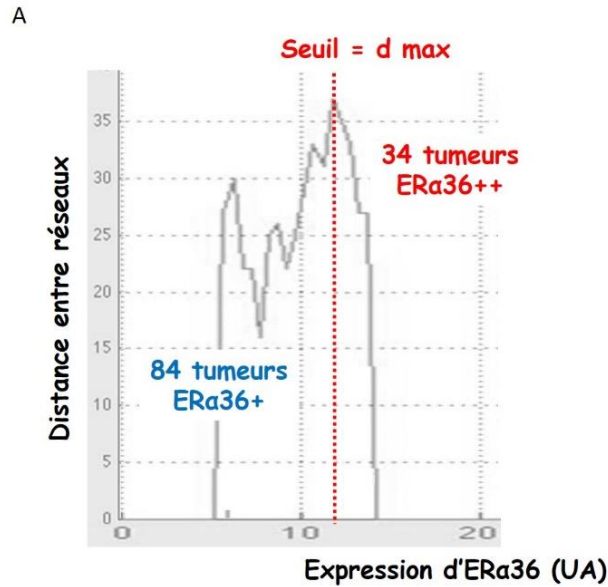
Suivant le nombre d'échantillons, nous avons croisé les résultats obtenus et utilisé divers tests d'hypothèse. Les résultats de dépendance obtenus ont permis la construction d'une nouvelle classification de tumeurs mammaires basée sur les relations d'expressions entre les gènes.

Afin de discriminer au mieux les nouvelles classes, un calcul de distance est réalisé. Pour chaque niveau d'expression du gène étudié, un réseau inférieur à ce seuil et un réseau supérieur à ce seuil

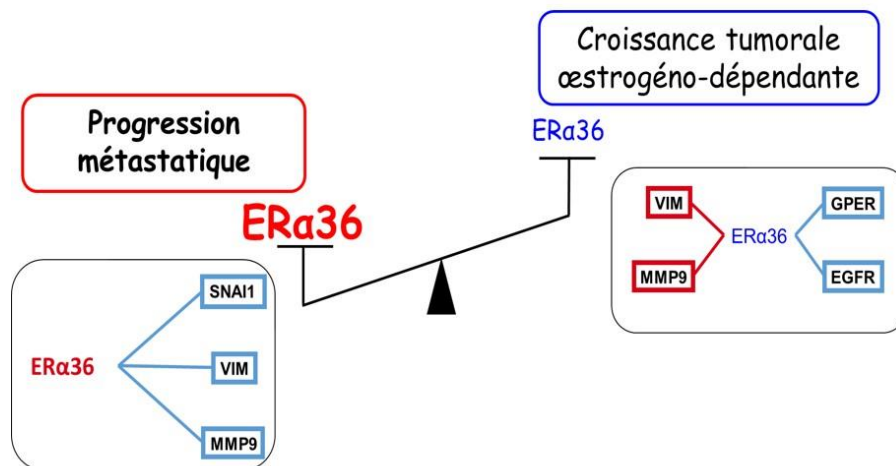


**Figure 40 : Calcul du seuil d'expression optimal d'ER $\alpha$ 36 permettant de discriminer de nouvelles populations tumorales**

A. Construction de réseaux de corrélation. De nouvelles populations de tumeurs ont été définies d'après les résultats de PCR en temps réel en fonction de la valeur d'expression de chaque marqueur de l'étude. Dans le cas d'ER $\alpha$ 36, pour chaque valeur d'expression du marqueur, nous avons obtenu deux populations de tumeurs : une classe inférieure qui regroupe des tumeurs présentant une expression d'ER $\alpha$ 36 inférieure au niveau d'expression choisi et une classe supérieure avec un niveau d'expression plus élevé. À chaque valeur d'expression d'ER $\alpha$ 36, les réseaux de corrélation d'expression génique dans les deux populations tumorales ont été construits. B. Calcul de la distance entre les réseaux de corrélation. Pour chaque valeur d'expression d'ER $\alpha$ 36, nous avons calculé la distance entre les réseaux obtenus dans la classe inférieure et la classe supérieure à cette valeur. Nous comparons la corrélation d'expression pour chaque couple de marqueurs en commun dans les deux réseaux. La somme de ces distances est calculée.



B



**Figure 41 : Détermination et validation du seuil d'expression obtenu**

A. Ce graphique permet de visualiser le seuil d'expression optimal qui discriminera au mieux les 2 populations de tumeurs, afin de potentiellement séparer 2 comportements physiopathologiques distincts. À ce seuil, la valeur d'expression d'ERα36 montre la distance maximale entre les réseaux de chaque population tumorale. Nous distinguons au mieux 84 tumeurs exprimant faiblement ERα36 et 34 tumeurs exprimant fortement ERα36. B. Dans les tumeurs exprimant faiblement ERα36, nous observons une corrélation d'expression négative entre ERα36 et la vimentine ou MMP9 et positive avec GPER et EGFR. Une expression forte d'ERα36 est corrélée positivement à l'expression de SNAI1, VIM et MMP9. Ce travail nous mène à la conclusion qu'une forte expression d'ERα36 semble liée à une progression métastatique des tumeurs mammaires, c'est-à-dire à des processus de migration cellulaire. En revanche, une plus faible expression d'ERα36 serait en lien avec l'expression de marqueurs de voies non génomiques de réponse des œstrogènes, ce qui semblerait montrer une croissance tumorale œstrogéno-dépendante, sans migration.

sont construits. Le calcul de distance se fait alors par comparaison entre ces deux réseaux et cela pour chaque niveau d'expression du gène d'intérêt (Figure 40A). Les sommets des réseaux représentent les gènes et les arcs, les corrélations d'expression entre les 2 gènes reliés entre eux. Les gènes qui ne sont pas corrélés à l'expression d'un autre gène sont exclus du calcul de distance.

Le calcul de distance entre le réseau « inférieur » et le réseau « supérieur » au seuil d'expression du gène étudié se fait par le calcul de distance entre les deux graphes les représentant en comparant le lien entre chaque couple de gènes dans les deux graphes et ainsi l'existence et le signe de chaque arc composant ces deux graphes. Pour une classification basée sur l'expression d'ER $\alpha$ 36 par exemple, nous avons pour chaque niveau d'expression calculé cette distance comme suit (Figure 40B).

On initialise la distance entre les deux graphes à zéro. Pour chaque couple de gènes :

- ⇒ Si la dépendance d'expression n'est pas dans le même sens pour les 2 réseaux (arcs existants mais de signes opposés), la distance entre les deux réseaux est incrémentée d'une valeur de 2.
- ⇒ Si la corrélation d'expression existe pour un réseau et pas pour l'autre réseau, une valeur (distance) de 1 est incrémentée.

Ce calcul est réalisé pour chaque couple de marqueurs à chaque niveau d'expression du gène étudié pour la classification. On obtient donc un graphique représentant la distance calculée entre les réseaux pour chaque niveau d'expression d'un gène classificateur (Figure 41A). C'est à partir de ce graphique que l'on peut établir le seuil optimal qui s'obtient quand on a une distance maximale entre les réseaux de gènes. Dans le cas d'ER $\alpha$ 36 comme classificateur de tumeurs mammaires, le seuil de 8,35 permet de séparer 2 réseaux très différents regroupant pour le réseau inférieur (ayant la plus faible expression du variant) 84 tumeurs et dans le réseau supérieur (ayant la plus forte expression) 34 tumeurs. Nous avons appliqué cette méthode pour tous les gènes étudiés. Certains marqueurs comme ER $\alpha$ 36 sont de bons classificateurs, permettant de séparer deux profils de corrélations d'expression très différents, mais il est à noter que ce n'était pas le cas de tous les marqueurs étudiés.

À partir de ces 2 familles de tumeurs mammaires discriminées vis-à-vis de leur expression du variant de récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes, nous avons étudié les relations d'expression des marqueurs

entre eux. Nous avons pu constater qu'une faible expression d'ER $\alpha$ 36 était corrélée avec l'expression forte des récepteurs GPER, EGFR, ainsi que le marqueur DDB2, et inversement corrélée aux marqueurs métastatiques MMP9 et VIM. Tandis que dans les tumeurs présentant une forte expression d'ER $\alpha$ 36, une corrélation positive d'expression est visible avec les marqueurs métastatiques SNAIL1, MMP9 et VIM, indépendamment des récepteurs étudiés (Figure 41B).

### 3. Discussion

Tout comme la classification usuelle, nos échantillons de tumeurs mammaires étaient classés en fonction de l'expression d'ER $\alpha$ 66. Nous avons pu constater que la majorité des tumeurs ER+ dans cette étude sont également ER $\alpha$ 36++.

À l'aide des calculs effectués sur Matlab, nous avons pu élaborer une nouvelle classification basée sur certains des marqueurs étudiés, comme ER $\alpha$ 36. Cette méthode a ainsi permis de distinguer deux populations de tumeurs en fonction de l'expression d'ER $\alpha$ 36 au seuil de 8,35. En effet, en établissant les réseaux de gènes de chaque population (ER $\alpha$ 36<8,35 et ER $\alpha$ 36>8,35), nous avons obtenu une distance maximale entre les 2 réseaux. Les graphiques ainsi construits nous ont montré un comportement très différent des groupes de tumeurs (84 ER $\alpha$ 36+ et 34 ER $\alpha$ 36++). Les tumeurs exprimant fortement ER $\alpha$ 36 présentent une corrélation d'expression du récepteur avec des marqueurs caractéristiques de la progression métastatique, tandis que les tumeurs de l'autre profil ont une expression d'ER $\alpha$ 36 corrélée à une croissance tumorale oestrogéno-dépendante (Figure 41B). Ces résultats sont à rapprocher de ceux d'une étude de cohorte de 2009 où il était montré qu'une forte expression d'ER $\alpha$ 36 était de mauvais pronostic (Shi et al., 2009). L'expression d'ER $\alpha$ 36 indépendamment du statut ER serait donc un facteur défavorable pour la survie des patientes. De plus, les résultats obtenus dans notre étude vont dans le même sens que des études *in vitro* dans des lignées de cellules cancéreuses mammaires ER+ et ER-, ainsi que dans d'autres types de cancers hormonosensibles comme le cancer de l'endomètre (Chaudhri et al., 2012; Lin et al., 2010; Zhang and Wang, 2013) pour lequel le traitement des tumeurs ER $\alpha$ 36++ par le tamoxifène semblerait conduire à une progression métastatique.

De ce fait, connaître le niveau d'expression du variant de récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes ER $\alpha$ 36 peut permettre de cibler plus précisément la thérapeutique à utiliser contre la tumeur. En effet, pour les

tumeurs exprimant fortement ER $\alpha$ 36, dont la progression métastatique est prédite dans notre étude, l'emploi d'une thérapie hormonale pourrait se solder par un échec. Il serait préférable dans ce cas d'envisager une autre forme de traitement comme la chimiothérapie.

Enfin, ce type de méthode se veut générique et peut être adapté à tout type de marqueur en vue d'établir une classification, et cela pour tous les cancers. Néanmoins, tous les gènes ne sont pas de bons classificateurs. Dans notre étude, certains gènes ne parvenaient pas à distinguer 2 populations très différentes de par leur profil d'interaction entre les gènes, quel que soit leur niveau d'expression.

*From ER $\alpha$ 66 to ER $\alpha$ 36: a generic method for validating a prognosis marker of breast tumor progression*

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access



# From ER $\alpha$ 66 to ER $\alpha$ 36: a generic method for validating a prognosis marker of breast tumor progression

Clémence Chamard-Jovenin<sup>1</sup>, Alain C. Jung<sup>2</sup>, Amand Chesnel<sup>1</sup>, Joseph Abecassis<sup>2</sup>, Stéphane Flament<sup>1</sup>, Sonia Ledrappier<sup>2</sup>, Christine Macabre<sup>2</sup>, Taha Boukhobza<sup>1†</sup> and Hélène Dumond<sup>1\*†</sup>

## Abstract

**Background:** Estrogen receptor alpha36 (ERalpha36), a variant of estrogen receptor alpha (ER) is expressed in about half of breast tumors, independently of the [ER+]/[ER-] status. *In vitro*, ERalpha36 triggers mitogenic non-genomic signaling and migration ability in response to 17beta-estradiol and tamoxifen. *In vivo*, highly ERalpha36 expressing tumors are of poor outcome especially as [ER+] tumors are submitted to tamoxifen treatment which, in turn, enhances ERalpha36 expression.

**Results:** Our study aimed to validate ERalpha36 expression as a reliable prognostic factor for cancer progression from an estrogen dependent proliferative tumor toward an estrogen dispensable metastatic disease. In a retrospective study, we tried to decipher underlying mechanisms of cancer progression by using an original modeling of the relationships between ERalpha36, other estrogen and growth factor receptors and metastatic marker expression. Nonlinear correlation analyses and mutual information computations led to characterize a complex network connecting ERalpha36 to either non-genomic estrogen signaling or to metastatic process.

**Conclusions:** This study identifies ERalpha36 expression level as a relevant classifier which should be taken into account for breast tumors clinical characterization and [ER+] tumor treatment orientation, using a generic approach for the rapid, cheap and relevant evaluation of any candidate gene expression as a predictor of a complex biological process.

**Keywords:** ERalpha36, Breast tumor, Retrospective study, Gene network identification, Metastatic potential, Nonlinear correlation, Distance based tumor classification

## Background

Worldwide, breast cancer remains one of the main causes of cancer-induced morbidity and mortality in women. Breast tumors are usually classified according to clinical parameters (size, grade, lymph node extension) and molecular expression status (ER, PR, HER2, Claudin) [1]. Such a classification allows clinicians ordering the appropriate treatment. For instance, ER-positive/negative ([ER+]/[ER-]) status refers to the expression of the 66kDa nuclear estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ 66) in tumors, which are consequently cured by endocrine therapeutic

agents such as tamoxifen. Nevertheless, about 30 % therapeutic failure is observed due to unclear resistance mechanisms [2].

Until the recent identification of new membrane bound estrogen receptors, ER $\alpha$ 66 has been considered as the sole functional estrogen receptor in hormone sensitive breast tumor. In 2005, Wang and colleagues [3] cloned a 36-kDa variant of ER-alpha (ER $\alpha$ 36) which lacks both AF-1 and AF-2 transcription activation domains but retains a truncated ligand-binding domain, suggesting that ER $\alpha$ 36 may have a spectrum of ligand selectivity different from ER $\alpha$ 66.

ER $\alpha$ 36 is generated from a promoter located in the first intron of the ESR1 gene, indicating that ER $\alpha$ 36 expression is regulated independently from ER $\alpha$ 66. This is

\* Correspondence: helene.dumond@univ-lorraine.fr

†Equal contributors

<sup>1</sup>CNRS-Université de Lorraine, UMR 7039, Centre de Recherche en Automatique de Nancy, BP70239, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France  
Full list of author information is available at the end of the article



consistent with the finding that ER $\alpha$ 36 protein is present in about 40 % of [ER+] and [ER-] breast tumors.

ER $\alpha$ 36 triggers membrane-initiated mitogenic estrogen signaling through non-genomic pathways not only in breast, but also in gastric and laryngeal cancer cells both *in vitro* and *in vivo* [4–7]. In the [ER+] MCF-7 breast tumor cell line, ER $\alpha$ 36 overexpression leads to tamoxifen resistance and enhances metastatic potential [8, 9]. Thus, tamoxifen does not act as a drug for cancer treatment but serves as an ER $\alpha$ 36 agonist, triggering proliferation, migration and invasion. The adverse effect of tamoxifen in ER $\alpha$ 36 highly expressing [ER+] breast tumors may explain why the affected patients display poor outcome and require chemotherapy but not endocrine therapy [10].

These findings raise the possibility that, *in vivo*, enhanced ER $\alpha$ 36 expression could drive the growth status switch from estrogen dependent mitogenic signaling to estrogen dispensable migration/invasion ability and consequently stimulates cancer progression. Therefore, we designed a generic method to validate the hypothesis that ER $\alpha$ 36 expression may serve as a reliable therapeutic response prognosis marker for breast cancer patients.

A retrospective study was performed on 118 breast tumor samples in which the expression of genes involved in non-genomic estrogen response as well as metastatic process was analyzed. Potential relationship between these genes was modeled by using nonlinear correlation analyses, mutual information associated to significance analysis [11, 12], which are proven to be more accurate than linear statics techniques even if the latter are simpler to implement [13–17]. These models are represented by so-called “gene co-regulation graphs” which can be drawn for any consistent subclass of the considered 118 samples. Then, we used a metric comparing two gene co-regulation graphs to search the optimal value of ER $\alpha$ 36 expression providing two distinct populations from a gene network point of view. The two obtained graphs were compared and the differences appeared to be of biological significance.

## Results

### [ER+] versus [ER-] gene networks

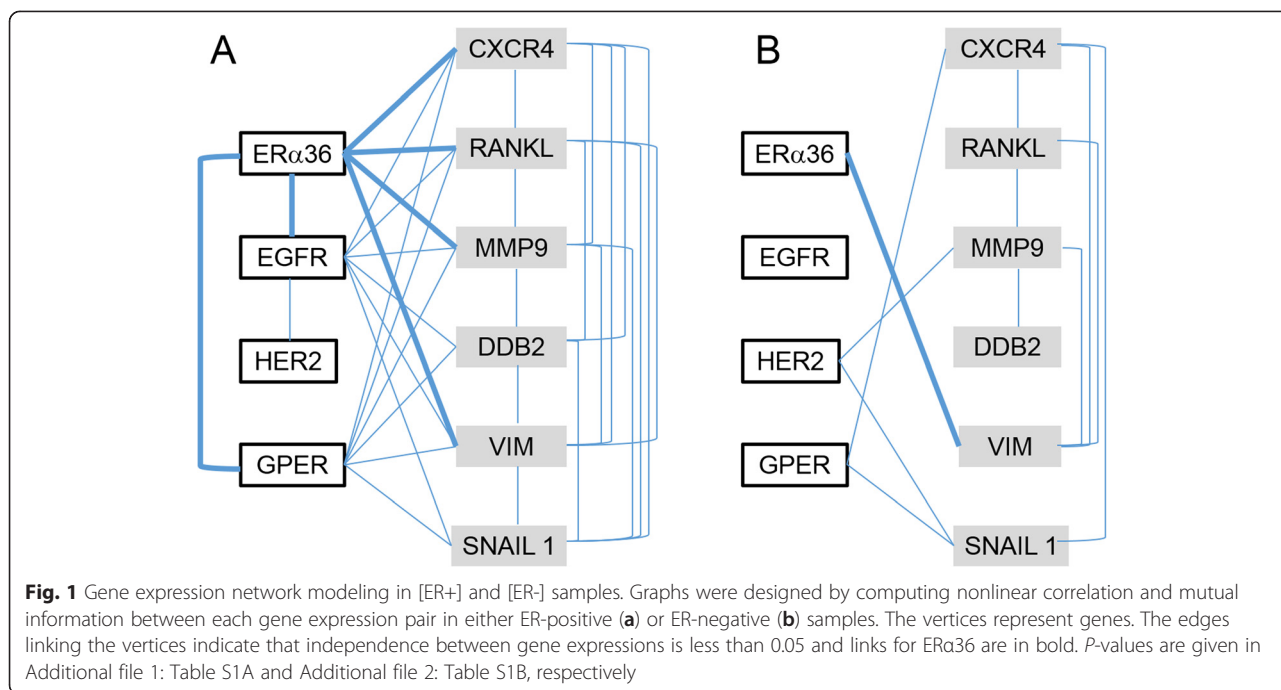
Since breast tumors are usually classified according to their hormone receptor status, tumor samples were first split into two classes according to their respective [ER] status, thus defining a first group of 60 ER $\alpha$ 66 expressing samples ([ER+]), and a second group of 58 samples devoid of ER $\alpha$ 66 expression ([ER-]). [ER+] breast cancer cell lines such as MCF-7 are considered non metastatic and weakly express ER $\alpha$ 36 whereas [ER-] cell lines such as MDA-MB-231 or MDA-MB-235 are highly metastatic and display higher levels of ER $\alpha$ 36 expression. In order

to assess if such a link between ER $\alpha$ 36 expression level and metastatic ability may be observed *in vivo*, nuclear (ER $\alpha$ 66) or membrane-associated estrogen receptors (ER $\alpha$ 36, GPER), their counterparts in non-genomic estrogen signaling (EGFR, HER2) as well as metastatic marker (SNAIL1, CXCR4, RANKL, VIM and MMP9) mRNA expression levels were determined by real-time PCR analyses. Among the growing amount of biomarkers related to the ER status (DDB2), the migration/invasion process (MMP9, VIM, CXCR4, RANKL, SNAIL) or the estrogen-response pathways (GPR30, EGFR), those listed above were picked up because they were previously shown to be related to ER $\alpha$ 36 [18–20]. Then, we identified the gene networks for each class of tumors by using nonlinear correlation analyses and transfer entropy computation (see Additional file 1: Table S1A and Additional file 2: Table S1B). The processed data obtained from [ER+] samples indicated that ER $\alpha$ 36 was a key node of a complex gene network, which involves other steroid and growth factor receptors as well as metastatic markers as a whole (Fig. 1a). On the other hand, ER $\alpha$ 36 was connected to the single metastatic marker VIM in the [ER-] network (Fig. 1b). These huge differences displayed by the two networks implied different functioning modes according to the tumor [ER] status and suggested that there could be a quantifiable link between ER $\alpha$ 36 position into the network and/or its expression level and tumor metastatic progression.

### ER $\alpha$ 36 based classification of breast tumor samples

To check if ER $\alpha$ 36 mRNA expression level could be a relevant classifier of a particular breast tumor phenotype, we drew a gene network for each ER $\alpha$ 36 expression value. Then, we quantified the differences between the networks as a function of ER $\alpha$ 36 relative expression, and designed a metric playing the role of a distance between graphs. The metric is an integer number standing for the structural differences between two graphs. More precisely, we compared the edges in the two graphs: when an edge existed in a graph and not in the other the distance was incremented with 1, if the edge existed in both graphs but did not represent the same linking way, the distance was incremented with 2. The obtained distance is then a metric.

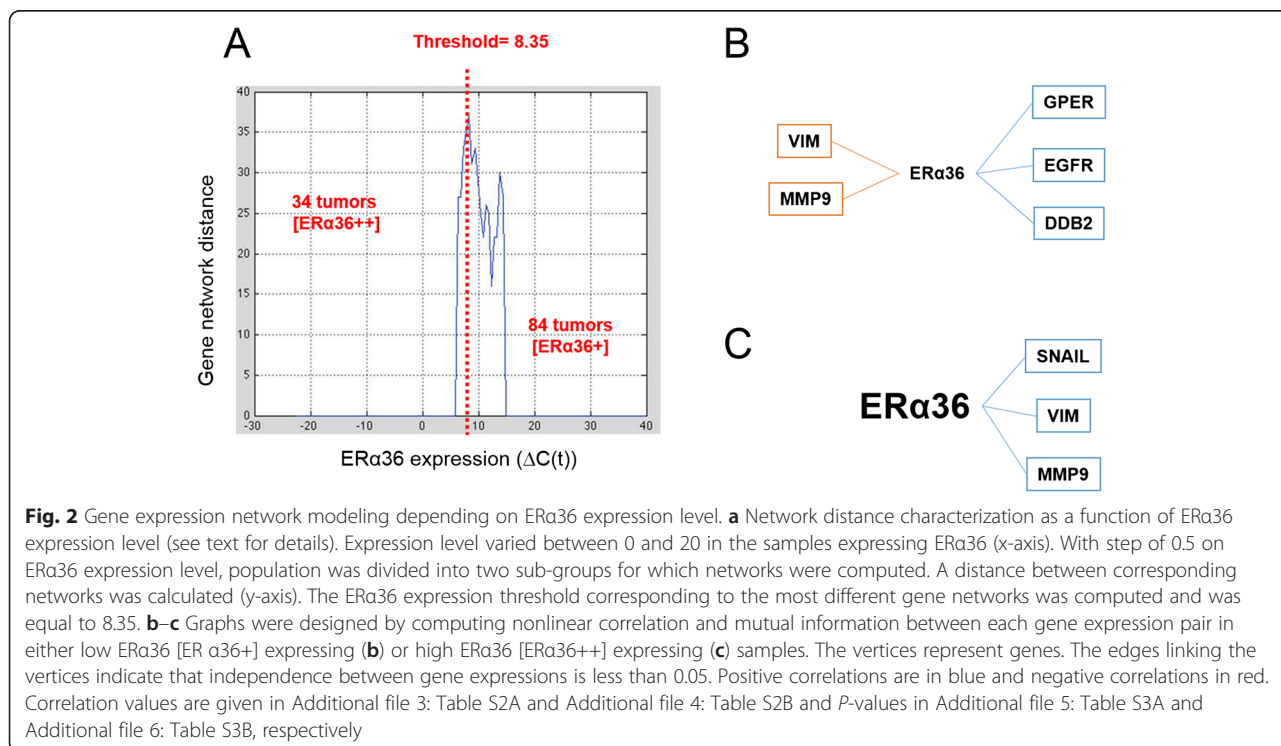
According to this metric, we determined the best threshold for ER $\alpha$ 36 to subdivide the samples into two populations, in order to obtain the most different networks probably defining the most different tumor phenotypes related to ER $\alpha$ 36 expression (Fig. 2a). Among ER $\alpha$ 36 expressing samples, the “best” threshold (which leads to the highest network difference score) was  $\Delta C(t) = 8.35$  and allowed to segregate a high ER $\alpha$ 36 expressing class ([ER $\alpha$ 36++]) of 24 tumors and a low ER $\alpha$ 36 expressing class ([ER $\alpha$ 36+]) of 84 tumors.



**ERα36 and metastatic progression**

In a last step, the previous modeling procedure was applied to either [ERα36+] or [ERα36++] subgroups. When ERα36 expression was low (Fig. 2b), it was clearly related to other receptors (GPER, EGFR) and DDB2 as well as inversely correlated to metastatic markers (MMP9, VIM)

(see Additional file 3: Table S2A and Additional file 4: Table S2B). Conversely, in the context of a high ERα36 expression (Fig. 2c), the network indicated a positive relationship to metastatic markers (SNAIL1, VIM and MMP9) independent from other receptors (see Additional file 5: Table S3A and Additional file 6: Table S3B).



## Discussion

In the present study, we examined ER $\alpha$ 36 expression in breast tumor specimens from 118 patients. We report that the majority of [ER+] tumors also express high levels of ER $\alpha$ 36.

In a previous clinical study, ER $\alpha$ 36 expression was shown to correlate with poor outcome in patients with [ER+] tumors treated by tamoxifen and the same tendency was observed in patients with [ER-] tumors [10]. Therefore, a high level of ER $\alpha$ 36 expression seemed to be an unfavorable factor of survival in breast cancer patients, independently of ER status. Besides, recent *in vitro* data indicate that ER $\alpha$ 36 expression (i) controls metastatic potential in [ER-] HCC38 cells and (ii) confers estrogen-hypersensitivity to [ER+] MCF-7 cells [9, 18]. In order to confirm that ER $\alpha$ 36 can trigger the progression of breast cancer in the primary tumor as well as during metastasis and to characterize the underlying mechanisms of high ER $\alpha$ 36-dependent phenotypes, we developed modeling tools. Expression analyses and network modeling of estrogen and growth factor receptor encoding genes, well known markers involved in tumor cell migration or invasion, and selected ER $\alpha$ 36 target genes [18] suggest that ER $\alpha$ 36 could be a key node of estrogen responsive pro-metastatic gene network in [ER+] tumors. These results are in line with recent *in vitro* analyses in MCF-7 cells, which show that the activation of ER $\alpha$ 36 expression triggers adaptive changes characterized by enhanced survival and migration during acquired tamoxifen resistance process [8, 21]. Similar data were obtained from endometrial cancer cells wherein ER $\alpha$ 36 was shown to promote tamoxifen agonist action *via* the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways [22–24]. Taken together, our results and others clearly suggest that [ER+] tumors highly expressing ER $\alpha$ 36 should not be cured by tamoxifen because the treatment could drive metastatic progression.

The developed approach to validate ER $\alpha$ 36 as relevant prognostic marker is quite generic and can be applied to other genes as well as to a subset of genes  $G_0$ . Indeed, the only modification, in this case, is to consider that we search for the maxima of multivariable function. Then, a classification can be done according to the expression of each gene to obtain  $2^n$  classes, where  $n$  is the cardinality of the considered subset  $G_0$ . Moreover, the robustness of the proposed method is attested by the fact that we proceed as described in [25], by using a shuffling method which generates more than 20 000 data for each of the dependency computation done between each pair of the studied genes.

Among the genes tested in this study, ER $\alpha$ 36 was identified as the best classifier candidate based on its ability to discriminate between two separate networks: one connecting ER $\alpha$ 36 to membrane receptors and the

second relating ER $\alpha$ 36 expression to those of metastatic markers. Therefore, comprehensive analysis and modeling of gene expression combined to colocalization analysis of ER $\alpha$ 36 and ER $\alpha$ 66 in breast tumors will contribute to characterize the cascade and timing of events that trigger ER $\alpha$ 36 expression during [ER+] metastatic tumor progression.

## Conclusions

In conclusion, this study (i) identifies ER $\alpha$ 36 as a relevant classifier whose expression level should be taken into account for breast tumors clinical characterization and [ER+] tumor treatment orientation, (ii) confirms *ex vivo* previous *in vitro* data connecting high ER $\alpha$ 36 expression to enhanced expression of migration/invasion markers and (iii) generates a novel approach for the rapid, cheap and relevant evaluation of any candidate gene expression as a predictor of a complex biological process.

## Methods

### Patients

Tumor specimen from 118 women with primary breast cancer expressing the canonical long form of ER $\alpha$  (ER $\alpha$ 66) [ER+] or not [ER-] were collected between 1980 and 1998, stored in the Paul Strauss Cancer Center biobank and used with the patients' verbal informed consent with the approval of the hospital ethic committee. Since the tumor pieces used in this study were regarded as post-operative waste materials, verbal consent was recorded by the surgeon during the preoperative examination. The Hospital Ethic Committee for Clinical Research localized into the Paul Strauss Center for Anticancer Research, 3 rue Porte de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France, approved the procedure. 60 [ER+] as well as 58 [ER-] tumor samples were included in the retrospective study. Immediately after resection, one half of each tumor was cryogenized into liquid nitrogen whereas the other part was fixed in 4 % formalin and further used for immunohistological analyses. [ER] status was assayed by standard ligand binding assay. In short, snap frozen tumor samples were pulverized and cytosols were extracted by ultracentrifugation. Human serum albumin was used as a standard control for protein normalization. Cytosol (10  $\mu$ L) was incubated with 5 nmol/L [H<sup>3</sup>] estradiol. After incubation, 100  $\mu$ L supernatant were transferred to an isoelectric focusing gel, in order to separate bound, unbound and unspecifically bound hormone. Samples with >10 fmol/mg bound ER were considered to be [ER+].

### RT-QPCR analysis

ER $\alpha$ 66, ER $\alpha$ 36, GPER, EGFR and HER2, as well as SNAIL1, CXCR4, RANKL, DDB2, VIM and MMP9

expression levels were determined by real-time PCR analyses. Large ribosomal protein (RPLPO) encoding gene was used as a control to obtain normalized values. Primers are listed in [see Additional file 7: Table S4]. Assays were performed at least in triplicate, and the mean values were used to calculate expression levels, using the  $\Delta C(t)$  method referring to RPLPO housekeeping gene expression. Briefly, total RNA was extracted using RNeasy Plus Universal tissue Mini (Qiagen, Courtabœuf, France) and reverse transcribed (GoScript Reverse Transcription System, Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Real-time PCR analyses were then performed by using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, France) in Opticon2 thermocycler (Bio-Rad) as described elsewhere [26].

### Statistical analysis and modeling

Mathematical modeling of biological processes has recently emerged and developed as an essential tool to help cancer biologists and clinician pathologists improving personalized diagnosis, therapy and prognosis. Mainly, the first step in many gene regulation network-modeling task is the identification of the co-regulated or co-expressed genes. To this purpose, most of the works are based on a linear correlation computation and statistical hypothesis tests. Nevertheless, these tools do not detect nonlinear relationship between gene expressions, which is generally the case [13, 14]. That is why we propose to use nonlinear correlation and conditional mutual information techniques on the gene expressions in order to detect more accurately and exhaustively the co-regulated genes. More precisely, to confirm that there exists a relationship between two gene expressions, we cross two hypothesis tests. The first one is based on a nonlinear correlation computation based on the Spearman's rank correlation coefficient. We associate to this number a hypothesis test on the dependence of the considered gene expressions. When the  $p$ -value of this test is less or equal to a fixed threshold (0.05 or 0.01 for our study), we conclude on the possible link between these genes that must be confirmed by a second computation based on the mutual information value associated to a significance analysis.

We consider statistical significance testing for the mutual information measurement  $M(X, Y)$ , where  $X$  and  $Y$  represent the random variables associated to the considered two gene expressions. The null hypothesis  $H_0$  of this test is that  $X$  and  $Y$  are independent. The Mutual Information is a measure of the variables' mutual dependence. Here we use it to measure this dependence for every pair of genes. In this context, we consider two random variables  $X$  and  $Y$  associated to the expression of two genes among the target genes.

The expression of  $M(X, Y)$  is given by:

$M(X, Y) = H(X) + H(Y) - H(X, Y)$ , where  $H(X)$  and  $H(Y)$  are the marginal entropies and  $H(X, Y)$  is the joint entropy (or the Shannon entropy) of  $X$  and  $Y$ .

Here, the computation of marginal entropy is given by, for the samples  $(x_i)_{i=1, \dots, n}$

$$H(X) = - \sum_i^n P(x_i) \log_2(P(x_i))$$

and the joint entropy is computed by

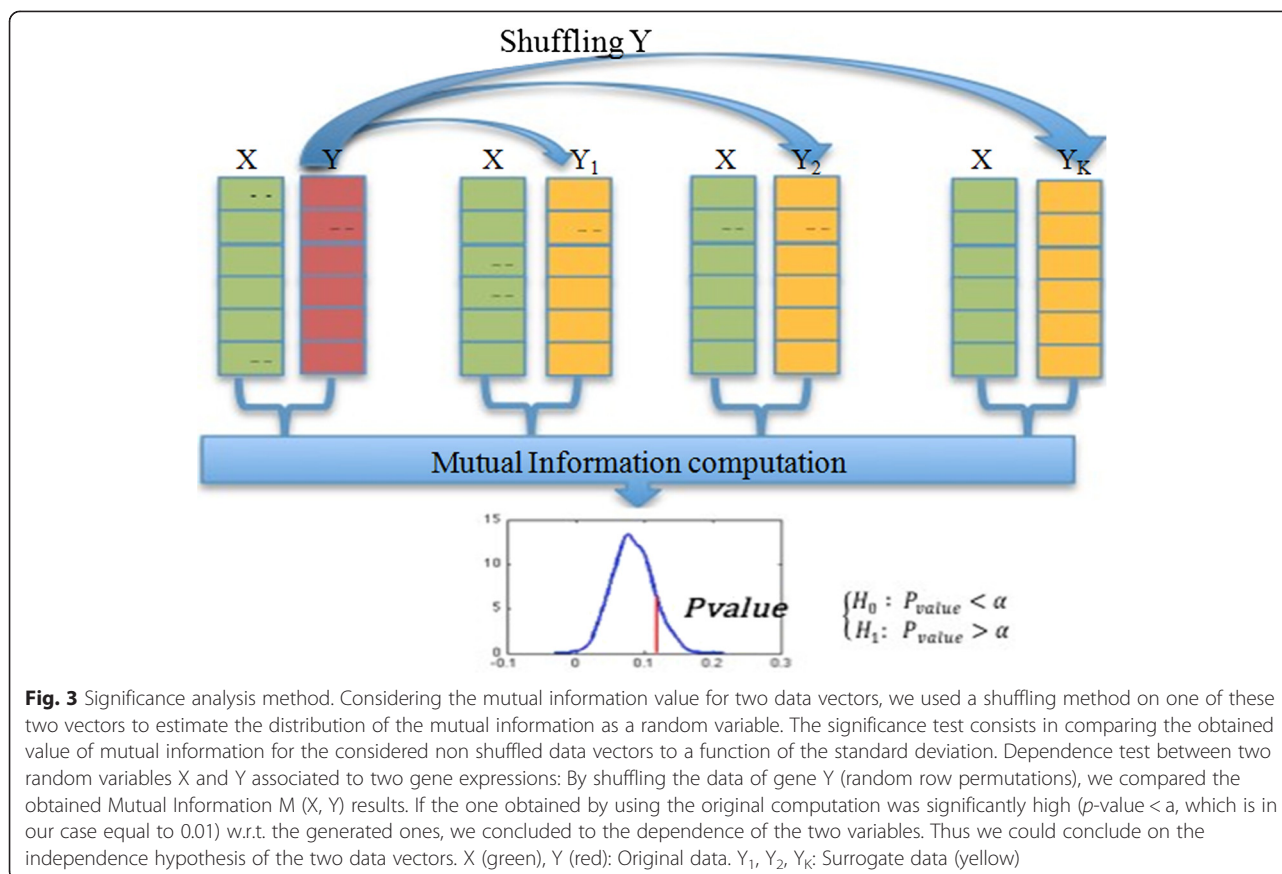
$$H(X, Y) = - \sum_i^n P(x_i, y_j) \log_2(P(x_i, y_j))$$

Intuitively, mutual information measures how much knowing one of these variables reduces the uncertainty about the other. For example, if  $X$  and  $Y$  are independent, then knowing  $X$  does not give any information about  $Y$  and *vice versa*. So their mutual information is zero. At the other extreme, if  $X$  is a deterministic function of  $Y$  and  $Y$  is a deterministic function of  $X$ , then all information conveyed by  $X$  is shared with  $Y$ : knowing  $X$  determines the value of  $Y$  and *vice versa*. As a result, in this case the mutual information is the same as the uncertainty contained in  $Y$  (or  $X$ ) alone, *i.e.* the entropy of  $Y$  (or  $X$ ).

First we estimate the distribution of the mutual information under  $H_0$ . The main problem using the mutual information measurement is that we do not have a "reference" to say that from a certain value (0.8 for example) the two variables are dependent. In order to decide whether or not the two variables are dependent, we have to make a hypothesis test using the experimental data compared to randomly generated data. These surrogate series of data are obtained by permuting the elements of one of the studied gene expression. Thus, we compare the obtained Mutual Information results: if the one obtained by using the original computation is significantly high w.r.t. the generated ones, we conclude to the dependence of the two variables (here: gene expressions).

Importantly, these surrogates are computed from the same number of observations, and the same distributions for  $X$  and  $Y$  (Fig. 3). We can then determine a one-sided  $p$ -value of the likelihood of our observation of the mutual information *i.e.* the probability of observing a greater mutual information value than that actually measured assuming  $H_0$ . This can be done either by directly counting the proportion of surrogates or assuming a normal distribution of the mutual information and computing the  $p$ -value under a  $z$ -test.

For a given  $p$ -value, which is often 0.05 or 0.01, indicating that the observed results would be highly unlikely under the null hypothesis  $H_0$ , we reject the latter



hypothesis concluding then that a significant relationship between the two gene expressions does exist.

From these networks, we evaluate the pertinence for a unique gene to be assimilated to a breast tumor classifier in three steps. First, after choosing the gene and a classification threshold to separate the samples into two categories, we identify two networks connecting the gene to separate markers by using nonlinear correlation and mutual information techniques. Then, we define and compute the distance between the two networks, which takes into account both the structural differences between the networks (existence or not of relations between the markers, sense of the linking when it exists) and the compartmental differences (behavioral differences in the relationship between genes). Therefore, the distance between both networks represents the classification performance of the classifier gene and allows us finding the more pertinent classifiers.

### Additional files

**Additional file 1: Table S1A.**  $P$ -values given for each gene pair in the [ER+] tumor gene network.

**Additional file 2: Table S1B.**  $P$ -values given for each gene pair in the [ER-] tumor gene network.

**Additional file 3: Table S2A.**  $P$ -values given for each gene pair in the [ER $\alpha$ 36+] tumor gene network.

**Additional file 4: Table S2B.** Correlation values given for each gene pair in the [ER $\alpha$ 36+] tumor gene network.

**Additional file 5: Table S3A.**  $P$ -values given for each gene pair in the [ER $\alpha$ 36++] tumor gene network.

**Additional file 6: Table S3B.** Correlation values given for each gene pair in the [ER $\alpha$ 36++] tumor gene network.

**Additional file 7: Table S4.** Primer list.

### Abbreviations

CXCR4: Chemokine (C-X-C motif) receptor 4; DDB2: Damage-specific DNA binding protein 2; EGFR: Epidermal growth factor receptor; ER: Estrogen receptor alpha; ER $\alpha$ 36: Estrogen receptor alpha 36; [ER $\alpha$ 36++]: High estrogen receptor alpha 36 expression; [ER $\alpha$ 36+]: Low estrogen receptor alpha 36 expression; ER $\alpha$ 66: Estrogen receptor alpha 66; [ER+]: Estrogen receptor alpha 66 positive status; [ER-]: Estrogen receptor alpha 66 negative status; ERK: Extracellular signal-regulated kinases; ESR1: Estrogen receptor 1; GPER: G protein-coupled estrogen receptor 1; HER2: Human epidermal growth factor receptor 2; MAPK: Mitogen-activated protein kinases; MMP9: Matrix metalloproteinase 9; PI3K: Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase; PR: Progesterone receptor; RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; RPLPO: Large ribosomal protein; SNAIL1: Snail family zinc finger 1; VIM: Vimentin.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

**Authors' contributions**

CCJ and AC performed data acquisition, analysis and interpretation. CM, SL collected the tumor samples. SF performed a critical reading of the manuscript. ACJ and JA performed clinical collection and analysis of tumor samples. HD and TB designed and conducted the study. All authors read and approved the final manuscript.

**Acknowledgements**

Clémence Chamard-Jovenin is the recipient of a PhD fellowship from the Conseil Régional de Lorraine. We thank Lucie Moitrier for great technical support. This work was funded by the Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), INSERM ITMO Cancer (partnerships EST-2012/2/014 ; ENV201304, respectively). We also thank the Conseil Régional de Lorraine and the Conseil Régional d'Alsace, both of which granted our project "émergence en recherche translationnelle en oncologie" validated by the Cancéropôle Grand Est.

**Author details**

<sup>1</sup>CNRS-Université de Lorraine, UMR 7039, Centre de Recherche en Automatique de Nancy, BP70239, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France. <sup>2</sup>EA 3430, Centre Paul Strauss, 3 rue Porte de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France.

Received: 17 December 2014 Accepted: 8 June 2015

Published online: 17 June 2015

**References**

- Eroles P, Bosch A, Perez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*. 2012;38:698–707.
- Ramaswamy B, Lu Y, Teng KY, Nuovo G, Li X, Shapiro CL, et al. Hedgehog signaling is a novel therapeutic target in tamoxifen-resistant breast cancer aberrantly activated by PI3K/AKT pathway. *Cancer Res*. 2012;72(19):5048–59.
- Wang ZY, Zhang XT, Shen P, Loggie BW, Chang YC, Deuel TF. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- $\alpha$ 36, a novel variant of human estrogen receptor- $\alpha$ 66. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336:1023–7.
- Zhang XT, Kang L, Ding L, Vranic S, Gatalica Z, Wang ZY. A positive feedback loop of ER- $\alpha$ 36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene*. 2011;30:770–80.
- Zhang XT, Ding L, Kang LG, Wang ZY. Estrogen receptor- $\alpha$  36 mediates mitogenic antiestrogen signaling in ER-negative breast cancer cells. *PLoS One*. 2012;7:e30174.
- Wang X, Deng H, Zou F, Fu Z, Chen Y, Wang Z, et al. ER- $\alpha$ 36-mediated gastric cancer cell proliferation via the c-Src pathway. *Oncol Lett*. 2013;6(2):329–35.
- Schwartz N, Chaudhri RA, Hadadi A, Schwartz Z, Boyan BD. 17 $\beta$ -estradiol promotes aggressive laryngeal cancer through membrane-associated estrogen receptor- $\alpha$  36. *Horm Cancer*. 2014;5(1):22–32.
- Li G, Zhang J, Jin K, He K, Zheng Y, Xu X, et al. Estrogen receptor- $\alpha$ 36 is involved in development of acquired tamoxifen resistance via regulating the growth status switch in breast cancer cells. *Mol Oncol*. 2013;7:611–24.
- Zhang XT, Wang ZY. Estrogen receptor- $\alpha$  variant, ER- $\alpha$ 36, is involved in tamoxifen resistance and estrogen hypersensitivity. *Endocrinology*. 2013;154(6):1990–8.
- Shi L, Dong B, Li Z, Lu Y, Ouyang T, Li J, et al. Expression of ER- $\alpha$ 36, a novel variant of estrogen receptor  $\alpha$  and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:3423–9.
- Zang S, Guo R, Zhang L, Lu Y. Integration of statistical inference methods and a novel control measure to improve sensitivity and specificity of data analysis in expression profiling studies. *J Biomed Inform*. 2007;40(5):552–60.
- Jeffery IB, Higgins DG, Culhane AC. Comparison and evaluation of methods for generating differentially expressed gene lists from microarray data. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:359.
- Soranzo N, Bianconi G, Altafini C. Linear and nonlinear methods for gene regulatory network inference. In: IFAC symposium on Nonlinear Control Systems. 2007, 7. p. 533–538.
- Liang KC, Wang X. Gene regulatory network reconstruction using conditional mutual information. *EURASIP J Bioinform Syst Biol*. 2008: 253894. doi: 10.1155/2008/253894.
- Zare H, Kaveh M, Khodursky A. Inferring a transcriptional regulatory network from gene expression data using nonlinear manifold embedding. *PLoS One*. 2011;6(8):e21969.
- Noor A, Serpedin E, Nounou M, Nounou H, Mohamed N, Chouchane L. Information theoretic methods for modeling of gene regulatory networks. In: IEEE Symposium on Computational Intelligence in Bioinformatics and Computational Biology (CIBCB). 2012. p. 418–423.
- Zhang X, Zhao XM, He K, Lu L, Cao Y, Liu J, et al. Inferring gene regulatory networks from gene expression data by path consistency algorithm based on conditional mutual information. *Bioinformatics*. 2012;28:98–104.
- Chaudhri RA, Olivares-Navarrete R, Cuenca N, Hadadi A, Boyan BD, Schwartz Z. Membrane estrogen signaling enhances tumorigenesis and metastatic potential of breast cancer cells via estrogen receptor- $\alpha$ 36 (ER $\alpha$ 36). *J Biol Chem*. 2012;287:7169–81.
- Ennen M, Klotz R, Touche N, Pinel S, Barbieux C, Besancenot V, et al. DDB2: a novel regulator of NF- $\kappa$ B and breast tumor invasion. *Cancer Res*. 2013;73(16):5040–52.
- Yin L, Zhang XT, Bian XW, Guo YM, Wang ZY. Disruption of the ER- $\alpha$ 36-EGFR/HER2 positive regulatory loops restores tamoxifen sensitivity in tamoxifen resistance breast cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(9):e107369.
- Zhou C, Zhong Q, Rhodes LV, Townley I, Bratton MR, Zhang Q, et al. Proteomic analysis of acquired tamoxifen resistance in MCF-7 cells reveals expression signatures associated with enhanced migration. *Breast Cancer Res*. 2012;14:R45.
- Lin SL, Yan LY, Zhang XT, Yuan J, Li M, Qiao J, et al. ER- $\alpha$ 36, a variant of ER- $\alpha$ , promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways. *PLoS One*. 2010;5:e9013.
- Tong JS, Zhang QH, Wang ZB, Li S, Yang CR, Fu XQ, et al. ER- $\alpha$ 36, a novel variant of ER- $\alpha$ , mediates estrogen-stimulated proliferation of endometrial carcinoma cells via the PKC $\delta$ /ERK pathway. *PLoS One*. 2010;5:e15408.
- Tu BB, Lin SL, Yan LY, Wang ZY, Sun QY, Qiao J. ER- $\alpha$ 36, a novel variant of estrogen receptor  $\alpha$ , is involved in EGFR-related carcinogenesis in endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;205:227. e1–6.
- Li J, Lenferink AEG, Deng Y, Collins C, Cui Q, Purisima EO, et al. Identification of high-quality cancer prognostic markers and metastasis network modules. *Nat Commun*. 2010;1:34.
- Aji H, Chesnel A, Pinel S, Plénat F, Flament S, Dumond H. An alkylphenol mix promotes seminoma derived cell proliferation through an ER $\alpha$ 36-mediated mechanism. *PLoS One*. 2013;8:e61758.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



**Additional table 1A: P-values given for each gene pair in the [ER+] tumor gene network.**

GPER	#####	6,61E-03	6,53E-02	4,73E-01	6,64E-05	1,80E-06	6,86E-03	1,66E-05	1,29E-03	1,70E-05
ER36	6,61E-03	#####	5,30E-03	7,98E-02	1,95E-01	1,29E-02	2,64E-02	6,75E-02	3,64E-02	6,12E-05
EGFR	6,53E-02	5,30E-03	#####	5,41E-05	9,92E-03	3,06E-02	6,39E-06	6,22E-04	1,71E-05	2,64E-03
HER2	4,73E-01	7,98E-02	5,41E-05	#####	4,79E-01	3,70E-01	2,24E-01	1,28E-01	4,63E-01	4,13E-01
DDB2	6,64E-05	1,95E-01	9,92E-03	4,79E-01	#####	1,55E-05	6,15E-08	8,05E-07	2,47E-04	8,59E-06
VIM	1,80E-06	1,29E-02	3,06E-02	3,70E-01	1,55E-05	#####	1,27E-04	3,17E-07	1,36E-04	4,15E-08
MMP9	6,86E-03	2,64E-02	6,39E-06	2,24E-01	6,15E-08	1,27E-04	#####	1,24E-09	2,39E-08	9,11E-11
SNAIL1	1,66E-05	6,75E-02	6,22E-04	1,28E-01	8,05E-07	3,17E-07	1,24E-09	#####	2,19E-04	4,75E-09
RANKL	1,29E-03	3,64E-02	1,71E-05	4,63E-01	2,47E-04	1,36E-04	2,39E-08	2,19E-04	#####	8,76E-05
CXCR4	1,70E-05	6,12E-05	2,64E-03	4,13E-01	8,59E-06	4,15E-08	9,11E-11	4,75E-09	8,76E-05	#####
	GPER	ER36	EGFR	HER2	DDB2	VIM	MMP9	SNAIL1	RANKL	CXCR4

**Additional table 1B : P-values given for each gene pair in the [ER-] tumor gene network.**

GPER	#####	1,79E-01	2,28E-01	3,85E-01	1,86E-01	3,53E-01	5,85E-02	1,85E-02	1,20E-01	3,40E-02
ER36	1,79E-01	#####	1,18E-01	2,06E-01	1,00E-01	1,18E-02	1,13E-01	2,15E-01	1,03E-01	1,67E-01
EGFR	2,28E-01	1,18E-01	#####	6,69E-02	1,72E-01	3,24E-01	1,79E-01	3,54E-01	3,92E-01	1,12E-01
HER2	3,85E-01	2,06E-01	6,69E-02	#####	1,06E-01	1,78E-01	1,48E-02	3,07E-02	4,70E-01	2,58E-01
DDB2	1,86E-01	1,00E-01	1,72E-01	1,06E-01	#####	4,85E-01	1,47E-02	9,02E-02	1,16E-01	2,69E-01
VIM	3,53E-01	1,18E-02	3,24E-01	1,78E-01	4,85E-01	#####	1,21E-02	1,86E-01	4,67E-03	1,66E-02
MMP9	5,85E-02	1,13E-01	1,79E-01	1,48E-02	1,47E-02	1,21E-02	0,00E+00	5,15E-01	7,68E-05	6,88E-02
SNAIL1	1,85E-02	2,15E-01	3,54E-01	3,07E-02	9,02E-02	1,86E-01	5,15E-01	#####	6,86E-02	9,08E-03
RANKL	1,20E-01	1,03E-01	3,92E-01	4,70E-01	1,16E-01	4,67E-03	7,68E-05	6,86E-02	#####	1,55E-03
CXCR4	3,40E-02	1,67E-01	1,12E-01	2,58E-01	2,69E-01	1,66E-02	6,88E-02	9,08E-03	1,55E-03	#####
	GPER	ER36	EGFR	HER2	DDB2	VIM	MMP9	SNAIL1	RANKL	CXCR4



**Additional table 2A: P-values given for each gene pair in the [ER $\alpha$ 36 $\pm$ ] tumor gene network.**

	GPER	ER36	EGFR	HER2	DDB2	VIM	MMP9	SNAIL1	RANKL	CXCR4
GPER	0	1,54E-09	6,95E-08	1,83E-12	2,62E-15	0,04848777	1,65E-05	1,86E-07	0,02060899	0,02513032
ER36	1,54E-09	0	1,28E-08	2,87E-08	1,69E-07	0,04646561	0,00062301	3,53E-07	0,16989209	0,11892408
EGFR	6,95E-08	1,28E-08	0	2,38E-06	2,87E-06	0,01562927	0,05362639	0,00037366	0,14769637	0,62684607
HER2	1,83E-12	2,87E-08	2,38E-06	0	3,26E-11	0,02527595	1,32E-06	3,03E-09	0,05707549	0,06870142
DDB2	2,62E-15	1,69E-07	2,87E-06	3,26E-11	0	0,04287579	3,70E-05	1,92E-09	0,21461675	0,46020571
VIM	0,04848777	0,04646561	0,01562927	0,02527595	0,04287579	0	1,37E-05	0,17285439	0,00010812	0,00024962
MMP9	1,65E-05	0,00062301	0,05362639	1,32E-06	3,70E-05	1,37E-05	0	0,04941448	2,97E-08	4,41E-05
SNAIL1	1,86E-07	3,53E-07	0,00037366	3,03E-09	1,92E-09	0,17285439	0,04941448	0	0,3167062	0,20551964
RANKL	0,02060899	0,16989209	0,14769637	0,05707549	0,21461675	0,00010812	2,97E-08	0,3167062	0	8,38E-05
CXCR4	0,02513032	0,11892408	0,62684607	0,06870142	0,46020571	0,00024962	4,41E-05	0,20551964	8,38E-05	0

**Additional table 2B: Correlation values given for each gene pair in the [ER $\alpha$ 36 $\pm$ ] tumor gene network.**

	GPER	ER36	EGFR	HER2	DDB2	VIM	MMP9	SNAIL1	RANKL	CXCR4
GPER	1	5,98E-01	5,45E-01	6,72E-01	7,29E-01	-0,21468564	-4,49E-01	5,30E-01	-0,25079077	-0,24284365
ER36	5,98E-01	1	5,70E-01	5,58E-01	5,31E-01	-0,21660517	-0,36369244	5,19E-01	-0,15025205	-0,17041394
EGFR	5,45E-01	5,70E-01	1	4,86E-01	4,83E-01	-0,2615021	-0,21008894	0,37715066	-0,15837893	-0,0534868
HER2	6,72E-01	5,58E-01	4,86E-01	1	6,43E-01	-0,24260861	-4,97E-01	5,89E-01	-0,20720247	-0,19841749
DDB2	7,29E-01	5,31E-01	4,83E-01	6,43E-01	1	-0,22018992	-4,32E-01	5,95E-01	-0,13598933	-0,081172
VIM	-0,21468564	-0,21660517	-0,2615021	-0,24260861	-0,22018992	1	4,53E-01	-0,14922799	0,4075815	0,38737559
MMP9	-4,49E-01	-0,36369244	-0,21008894	-4,97E-01	-4,32E-01	4,53E-01	1	-0,21382796	5,58E-01	4,28E-01
SNAIL1	5,30E-01	5,19E-01	0,37715066	5,89E-01	5,95E-01	-0,14922799	-0,21382796	1	-0,10989857	0,13870387
RANKL	-0,25079077	-0,15025205	-0,15837893	-0,20720247	-0,13598933	0,4075815	5,58E-01	-0,10989857	1	4,13E-01
CXCR4	-0,24284365	-0,17041394	-0,0534868	-0,19841749	-0,081172	0,38737559	4,28E-01	0,13870387	4,13E-01	1

**Additional table 3A: P-values given for each gene pair in the [ER $\alpha$ 36 $^{++}$ ] tumor gene network.**

	GPER	ER36	EGFR	HER2	DDB2	VIM	MMP9	SNAIL1	RANKL	CXCR4
GPER	0	0,36352182	0,01144367	0,33707455	0,01237978	0,00299757	0,16059654	0,00043182	0,01867911	0,00065272
ER36	0,36352182	0	0,2139266	0,56351817	0,22009208	0,1633535	0,00763146	0,00965977	0,54083112	0,00150671
EGFR	0,01144367	0,2139266	0	0,00197046	0,01020503	0,023913	0,01633891	0,00310106	0,00048023	0,00974353
HER2	0,33707455	0,56351817	0,00197046	0	0,2509961	0,59264499	0,56728554	0,06064497	0,16562948	0,20927151
DDB2	0,01237978	0,22009208	0,01020503	0,2509961	0	0,01953506	8,97E-06	0,00028555	0,00233294	0,00817395
VIM	0,00299757	0,1633535	0,023913	0,59264499	0,01953506	0	0,03223558	0,01036183	0,00910775	0,00039638
MMP9	0,16059654	0,00763146	0,01633891	0,56728554	8,97E-06	0,03223558	0	5,03E-06	0,00016097	0,00385614
SNAIL1	0,00043182	0,00965977	0,00310106	0,06064497	0,00028555	0,01036183	5,03E-06	0	0,0014231	9,14E-06
RANKL	0,01867911	0,54083112	0,00048023	0,16562948	0,00233294	0,00910775	0,00016097	0,0014231	0	0,01201398
CXCR4	0,00065272	0,00150671	0,00974353	0,20927151	0,00817395	0,00039638	0,00385614	9,14E-06	0,01201398	0

**Additional table 3B: Correlation values given for each gene pair in the [ER $\alpha$ 36++] tumor gene network.**

	GPER	ER36	EGFR	HER2	DDB2	VIM	MMP9	SNAIL1	RANKL	CXCR4
GPER	1	0,16896865	0,4516129	0,17782258	0,44383949	0,52137097	0,25806452	0,60282258	0,41992742	0,5784591
ER36	0,16896865	1	-0,22966025	0,10787378	0,22668146	0,2566791	0,47000706	0,4575058	-0,11417045	0,54543623
EGFR	0,4516129	-0,22966025	1	0,54072581	0,45452713	0,40685484	0,43064516	0,51975806	0,58975398	0,45703917
HER2	0,17782258	0,10787378	0,54072581	1	0,21254286	-0,09959677	0,10645161	0,34153226	0,25534492	0,23194839
DDB2	0,44383949	0,22668146	0,45452713	0,21254286	1	0,41722122	0,70639243	0,60798549	0,52672989	0,46641115
VIM	0,52137097	0,2566791	0,40685484	-0,09959677	0,41722122	1	0,38709677	0,45725806	0,46066966	0,59661159
MMP9	0,25806452	0,47000706	0,43064516	0,10645161	0,70639243	0,38709677	1	0,73669355	0,62687771	0,50383223
SNAIL1	0,60282258	0,4575058	0,51975806	0,34153226	0,60798549	0,45725806	0,73669355	1	0,54780158	0,70592987
RANKL	0,41992742	-0,11417045	0,58975398	0,25534492	0,52672989	0,46066966	0,62687771	0,54780158	1	0,44552058
CXCR4	0,5784591	0,54543623	0,45703917	0,23194839	0,46641115	0,59661159	0,50383223	0,70592987	0,44552058	1

**Additional table 4 : Primer list.**

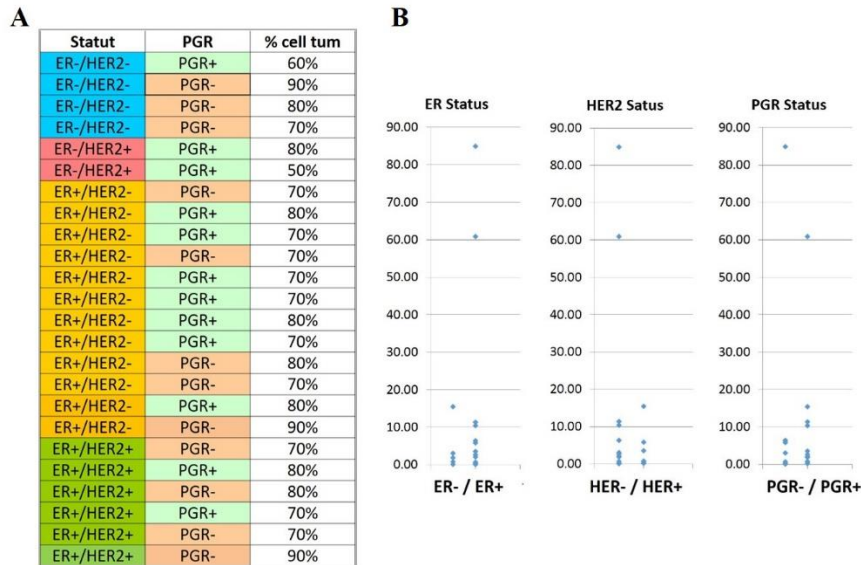
<b>Gene name</b>		<b>Primer sequence (5'-&gt;3')</b>	<b>Tm</b>
<b>RPLPO</b>	Direct Reverse	GGCGACCGTGAAGTCCA ACT CCA TCA GCA CCA CAG CCT TC	57°C
<b>ER<math>\alpha</math>36</b>	Direct Reverse	CAA GTG GTT TCC TCG TGT CTA AAG TGT TGA GTG TTG GTT GCC AGG	57°C
<b>GPER1</b>	Direct Reverse	CTG GGG AGT TTC CTG CTG A GCT TGG GAA GTC ACA CCA T	57°C
<b>EGFR</b>	Direct Reverse	CGT CCG CAA GTG TAA GAA AGC AAA AAC CCT GTG ATT	57°C
<b>ERBB2</b>	Direct Reverse	AGG GAG TAT GTG AAT GCC GGC CAC TGG AAT TTT CAC	57°C
<b>SNAI1</b>	Direct Reverse	TCT AGG CCC TGG CTG CTA CAA ACA TCT GAG TGG GTC TGG AGG TG	60°C
<b>RANKL</b>	Direct Reverse	TCG TTG GAT CAC AGC ACA TCA TAT GGG AAC CAG ATG GGA TGT C	60°C
<b>CXCR4</b>	Direct Reverse	ACT GAG AAG CAT GAC GGA CAA G GAA GGG AAG CGT GAT GAC AAA G	60°C
<b>DDB2</b>	Direct Reverse	ACC AGT TTT ACG CCT CCT CAA TGG TTT CCC TCT AAC CTG GCG CAG GTC	60°C
<b>MMP9</b>	Direct Reverse	GAG AAC TTT GCC GTT GAA GC TCC AGC AGC TTC CTG TAG GT	62°C
<b>VIM</b>	Direct Reverse	GGG ACG CAG ACA TCG TCA TC TCG TCA TCG TCG AAA TGG GC	67°C

#### 4. Perspectives à la suite de ce travail

Les échantillons analysés pour ce travail avaient été collectés entre 1980 et 1998. De plus, l'étude a été réalisée de manière rétrospective, ainsi nous ne possédons pas les informations du devenir des patientes, ni même les thérapeutiques mises en place. Il aurait été intéressant de pouvoir combiner cette méthode de travail avec les données cliniques des patientes.

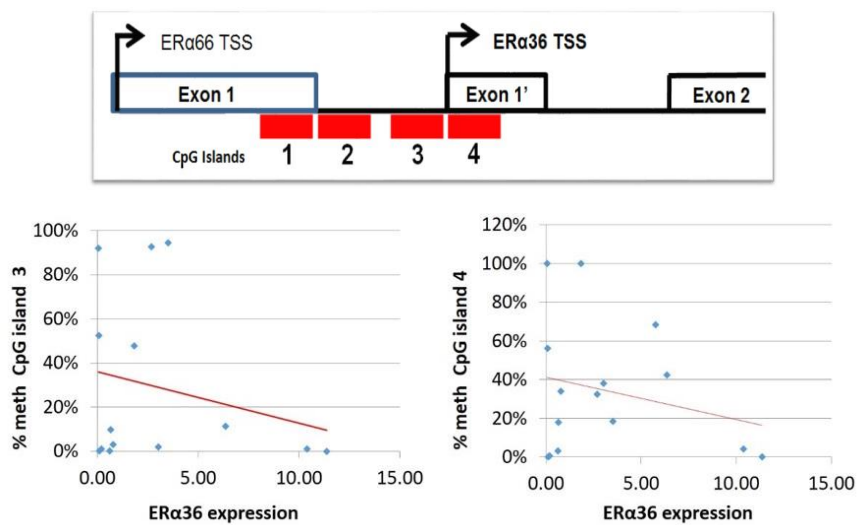
C'est pour cette raison, qu'une étude translationnelle prospective d'une cohorte de patientes atteintes de tumeurs mammaires a été mise en place en 2016 en collaboration avec l'Institut de Cancérologie de Lorraine (ICL), financée par la Ligue contre le Cancer. Ce projet rassemblant des biologistes, cliniciens et automaticiens du CRAN et de l'ICL s'intitule : « **Étude prospective de validation d'ER $\alpha$ 36, nouveau marqueur moléculaire pronostique de progression tumorale dans les cancers du sein** ». Il vise à comprendre les bases moléculaires des échecs thérapeutiques dans le traitement des tumeurs mammaires hormonosensibles en déterminant l'implication de certaines voies de signalisation et de réseaux de gènes dépendants d'ER $\alpha$ 36, les mécanismes potentiels de sa régulation et leurs relations avec les données cliniques.

La mise en œuvre de ce projet se fait par une collecte d'échantillons de tumeurs mammaires (environ 100) à l'Institut de Cancérologie de Lorraine (ICL). Ces échantillons, classés selon leur statut ER ou HER2, sont analysés après extraction des acides nucléiques et protéines d'une part et par coupes histologiques d'autre part. Comme dans l'étude rétrospective présentée précédemment, l'expression de différents marqueurs est étudiée par PCR en temps réel. De plus, le niveau de méthylation du promoteur d'ER $\alpha$ 36 est analysé à partir de l'ADN cellulaire extrait de chaque échantillon. Pour ce qui est des protéines, les voies prépondérantes de la signalisation oncogénique seront explorées : PI3K/AKT, MAPK. Avec les données obtenues, des évaluations des corrélations seront effectuées entre le niveau d'expression des marqueurs d'intérêt, l'état de méthylation du promoteur d'ER $\alpha$ 36, le niveau d'expression des phosphoprotéines et les paramètres histocliniques tels que le type de traitement, le grade, l'extension ganglionnaire. La localisation membranaire ou intracellulaire d'ER $\alpha$ 36 sera vérifiée après mise au point des conditions expérimentales par immunohistochimie dans quelques échantillons de tumeur de chaque groupe (ER+ ou ER-). La modélisation des résultats sera réalisée de la même manière que le travail précédemment présenté.



**Figure 42 : Premiers échantillons inclus dans l'étude prospective**

A. Les premiers échantillons inclus dans l'étude sont de multiples statuts moléculaires et contiennent au moins 50% de cellules tumorales pour l'inclusion dans l'étude. B. Le niveau d'expression d'ER $\alpha$ 36 ne semble pas varier en fonction du statut moléculaire des échantillons (ER-/+ , HER2-/+ , PR-/+)



**Figure 43 : Méthylation des îlots CpG 3 et 4 à proximité du TSS d'ER $\alpha$ 36**

L'étude de la méthylation de différents îlots CpG autour du TSS d'ER $\alpha$ 36 montrerait une expression du variant de récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes en lien avec une hypométhylation des îlots 3 et 4.

Ce travail vise à valider en situation clinique un marqueur prédictif de réponse (ER $\alpha$ 36) en apportant des données moléculaires sur la mécanistique des processus mis en jeu, contribuant à (i) une meilleure connaissance du développement tumoral, (ii) une orientation personnalisée des choix thérapeutiques, (iii) la mise en évidence de nouvelles combinaisons de cibles thérapeutiques.

Actuellement, une vingtaine d'échantillons ont déjà été collectés et inclus dans l'étude (Figure 42A). Les conditions du projet sont en cours de mise au point. L'expression d'ER $\alpha$ 36 dans ces échantillons ne semble pas être influencée par le statut des récepteurs ER, PR et HER2 (Figure 42B). De plus dans les tumeurs ER+, l'expression d'ER $\alpha$ 36 serait en lien avec une hypométhylation des îlots CpG 3 et 4 situés à proximité du TSS du variant de récepteur (Figure 43).

Ce projet sur un an est toujours en cours.

## **II. Modifications du phénotype des cellules épithéliales mammaires *in vivo* et *in vitro* en cas de surexpression d'ER $\alpha$ 36**

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que le niveau d'expression d'ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire pathologique semble être en lien avec l'expression de marqueurs caractéristiques de la progression tumorale. Afin de poursuivre l'exploration de l'implication de ce variant de récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes dans les processus de cancérogénèse mammaire, nous avons étudié *in vivo* et *in vitro* les modifications potentielles de cet organe suite à une surexpression d'ER $\alpha$ 36, spécifiquement dans la glande mammaire murine, ou dans une lignée de cellules épithéliales mammaires immortalisées non tumorales (MCF-10A).

Ce travail a fait l'objet d'un article « **Mammary epithelial cell phenotype disruption *in vitro* and *in vivo* through ER $\alpha$ 36 overexpression** » soumis dans Plos One.

De la même manière que dans le chapitre précédent, je présenterai un résumé de cet article, puis j'apporterai des précisions sur les perspectives envisagées à la suite de ce travail.



## 1. Introduction

Depuis la découverte en 2005 du variant de récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes ER $\alpha$ 36, il a été montré que ce dernier, localisé à la membrane plasmique médie les voies non génomiques des œstrogènes (Wang et al., 2005) et contrôle la prolifération, la survie et la migration.

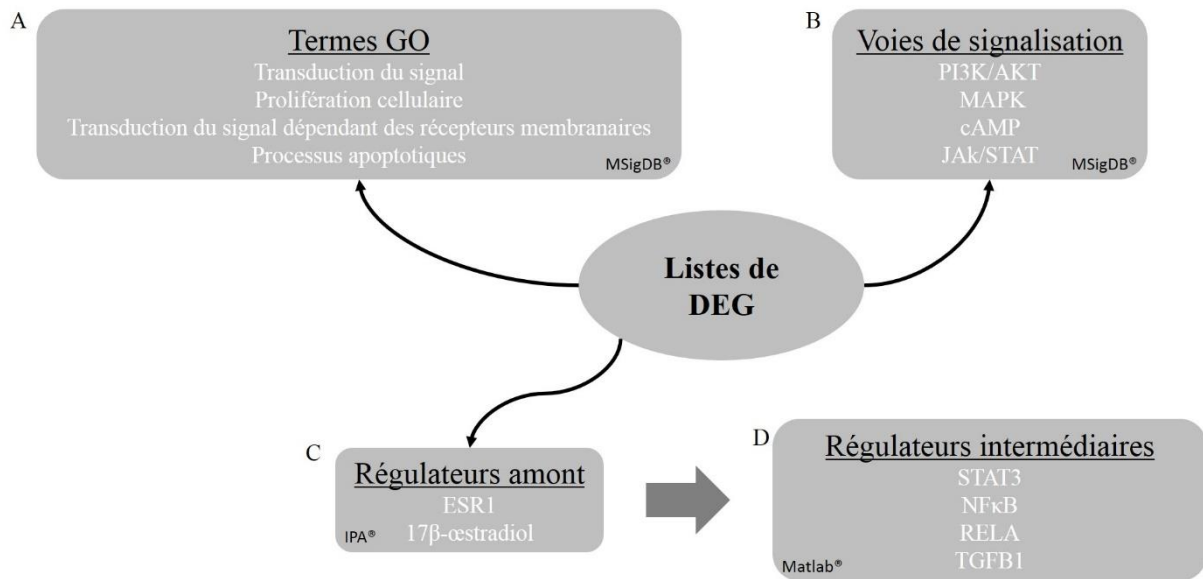
Dans une revue récente, il est décrit que l'ARNm d'ER $\alpha$ 36 a été trouvé dans différents tissus normaux tels que le tissu ovarien, utérin, mammaire, testiculaire, mais aussi rénal, osseux, pulmonaire, cardiaque et dans des cellules musculaires lisses peri-vasculaires (Sołtysik and Czekaj, 2015). En revanche, un dimorphisme sexuel de la localisation de la protéine est rapporté dans le système ostéo-articulaire, où ER $\alpha$ 36 serait associée à la membrane cellulaire exclusivement chez les femelles. Malgré ces observations, les rôles physiologiques d'ER $\alpha$ 36, de ses ligands et des mécanismes de transactivation associées dans ces tissus restent à déterminer (Elbaradie et al., 2013; Irsik et al., 2013). Malgré les articles relatifs à son lien avec la progression tumorale ou la résistance acquise aux thérapies anticancéreuses, les conséquences d'une expression d'ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire saine, son rôle dans le développement, ainsi que les conséquences moléculaires et cellulaires de sa transactivation sont toujours à explorer (Yu et al., 2014).

C'est pourquoi, nous avons fait le choix d'explorer les conséquences d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 dans des cellules épithéliales mammaires *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de souris KI dans lequel ER $\alpha$ 36 est spécifiquement exprimé dans la glande mammaire.

## 2. Résultats

### 2.1 Données des transcriptomes des lignées MCF-10A/ER $\alpha$ 36 et MCF-10A/Zeo

À partir de l'analyse des transcriptomes réalisés dans les lignées cellulaires MCF-10A/ER $\alpha$ 36 et MCF-10A/Zeo, nous avons déterminé les gènes différentiellement exprimés (DEG), ce qui correspond à 8022 transcrits régulés positivement ou négativement (facteur de variation absolue  $\geq 2,3$ , en triplicat et  $p$  corrigée  $< 0,05$  d'après la méthode Benjamini Hochberg). Cette liste de transcrits, correspondant aux DEG, nous a permis d'étudier les fonctions cellulaires modifiées à la suite de la surexpression d'ER $\alpha$ 36.



**Figure 44 : Enrichissements de données à partir des résultats de transcriptomes des lignées MCF-10A/Zeo et MCF-10A/ERα36**

À partir des listes de gènes modulés par la surexpression d'ERα36 dans la lignée MCF-10A (DEG), nous avons prédit les termes GO (A) et les voies de signalisation (B) enrichis par compilation avec les bases de données MSigDB®. De plus, nous avons identifié les régulateurs amont potentiels (C) de nos gènes cibles par analyse avec la base de données d'IPA®. Ces derniers résultats ont permis, à l'aide de programmes à façon d'analyses de graphes, de mettre en évidence des régulateurs intermédiaires (D) pouvant nous permettre de cibler au mieux nos expérimentations.

### **a. Termes GO prédits par enrichissement de termes GO**

Grâce à l'outil en ligne MSigDBv5.0 (Molecular Signature Database <http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/>), nous avons réalisé de l'enrichissement de termes GO (Mootha et al., 2003; Subramanian et al., 2005) (Figure 44A). Les quatre fonctions majoritairement enrichies à la suite de la surexpression du variant de récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes sont : transduction du signal (65,7%, GO:0007165), prolifération cellulaire (53,9%, GO:0008283), transduction du signal dépendant des récepteurs membranaires (53,3%, GO:0007166) et processus apoptotiques (38,3%, GO:0006915) ( $p < 1.10^{-14}$ ).

### **b. Voies de signalisation prédites par enrichissement de voies KEGG**

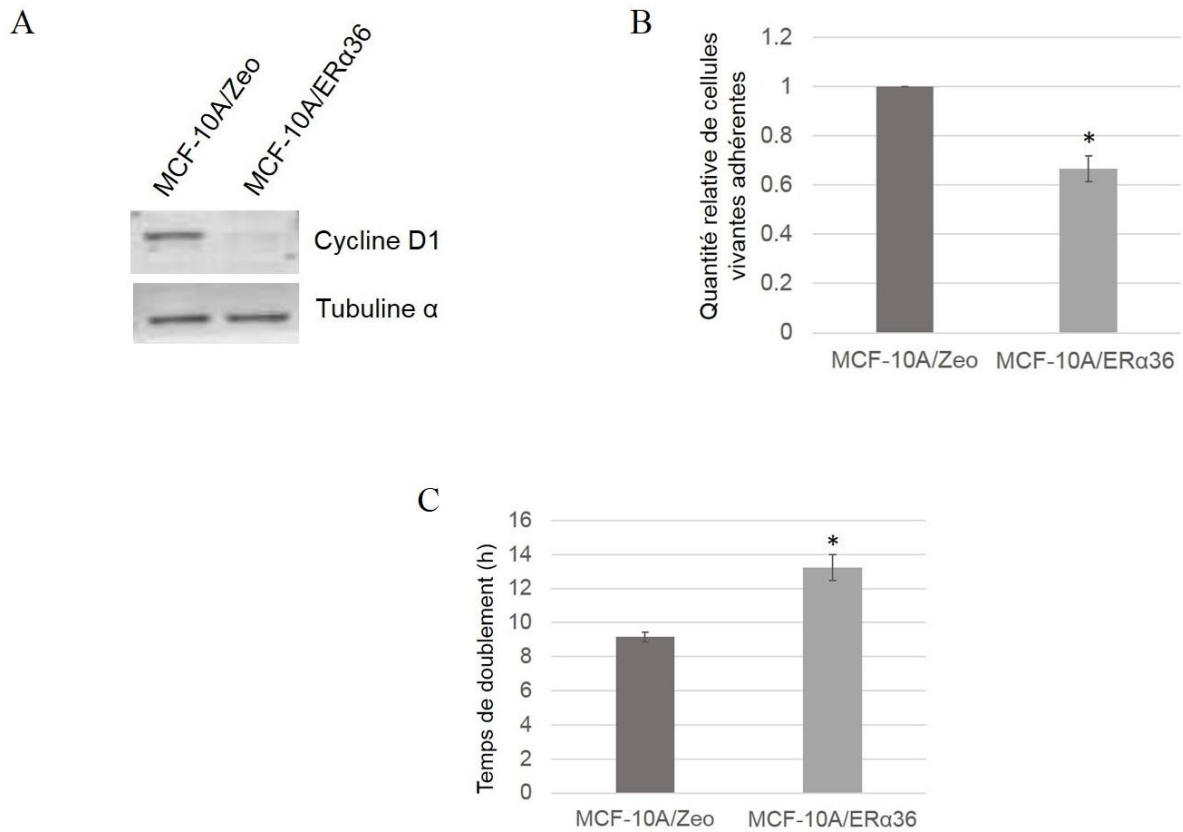
De la même façon, nous avons étudié l'enrichissement des voies KEGG sur l'outil MSigDBv5.0 (Figure 44B). Les 4 voies de signalisations prédites par croisement de nos listes de DEG avec la base de données KEGG sont : « PI3K/AKT », « MAPK », « cAMP » et « Jak/STAT » ( $p < 10^{-3}$ ).

### **c. Régulateurs prédits des DEG**

Enfin, nous avons cherché à identifier les facteurs intermédiaires contribuant à ces changements d'expressions géniques à la suite d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 dans les cellules MCF-10A. Pour cela, nous avons combiné l'utilisation du logiciel « Ingenuity Pathway Analysis » (IPA®) avec des programmes à façon sur Matlab®.

À partir de la liste des DEG soumise sur IPA®, nous avons identifié les régulateurs maîtres prédits : ESR1 (codant pour le variant) et E2 (un agoniste du variant) (Figure 44C). Nous avons obtenu des listes de liens fonctionnels directs et indirects entre les DEG et les régulateurs prédits, ce qui a permis d'élaborer 3 matrices d'adjacence en fonction des interactions géniques (gènes affectés, activés ou inhibés).

Dans le but d'extraire de ces résultats les régulateurs en amont des DEG, nous avons recoupé ces résultats avec les fonctions cellulaires identifiées par l'analyse des termes GO. Un graphique a été construit pour chaque fonction cellulaire étudiée et a permis l'élaboration de réseaux de régulation hiérarchiques des DEG considérés. Dans les réseaux, les DEG, les régulateurs intermédiaires et



**Figure 45 : Rôle d'ERα36 dans le contrôle de la prolifération des cellules épithéliales mammaires MCF-10A**

A. La cycline D1, une protéine caractéristique de l'avancement dans le cycle cellulaire, voit son expression diminuée de 60%.

B. Le nombre de cellules vivantes diminue de manière significative de l'ordre de 35% en cas de surexpression d'ERα36 dans les cellules MCF-10A, et le temps de doublement est allongé de 40% (C) ( $N \geq 4$  ; \* :  $p < 0,05$ ).

maîtres sont représentés par les nœuds. Tandis que les axes indiquent les liens de régulation entre les nœuds.

Les régulateurs intermédiaires en commun entre les 4 fonctions étudiées ont été déterminés par comparaison entre les 4 réseaux obtenus. Un système mathématique a permis l'identification de 24 régulateurs intermédiaires communs, qui pourraient médier la régulation génique dépendante d'ER $\alpha$ 36. Les régulateurs intermédiaires en lien avec les voies prédites par enrichissement de voies KEGG ont été sélectionnés (Figure 44D).

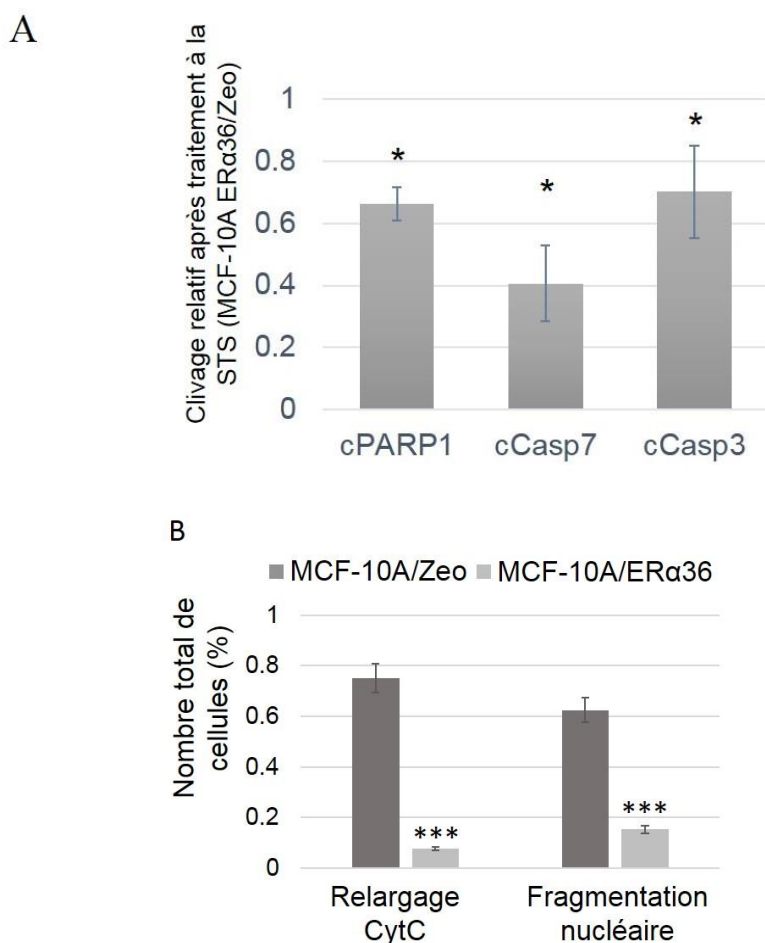
C'est ainsi que l'expression et la localisation des régulateurs en lien avec PI3K/AKT (PTEN, PI3K), MAPK/ERK (phosphoERK1/2), JAK/STAT (STAT3) ou NF $\kappa$ B ont été étudiés *in vitro* par immunofluorescence. Les résultats suggèrent que la surexpression d'ER $\alpha$ 36 ne modifie pas de manière significative l'expression de PTEN, mais entraîne une réduction significative de la phosphorylation d'ERK1/2 (22,7%) et une induction significative de NF $\kappa$ B (134,5%) et STAT3 (325,8%). De plus, NF $\kappa$ B et STAT3 sont relocalisés dans le noyau pour la lignée cellulaire MCF-10A/ER $\alpha$ 36, contrairement à la lignée MCF-10A/Zeo. Ces données indiqueraient une activation des voies NF $\kappa$ B et JAK2/STAT3.

En parallèle de ce travail *in silico*, nous avons validé expérimentalement les fonctions prédites comme affectées par la surexpression d'ER $\alpha$ 36: la prolifération cellulaire et l'apoptose prédites par enrichissement des termes GO et la migration/invasion cellulaire, du fait du rôle clé de TGFB1 comme régulateur intermédiaire prédit par IPA.

## **2.2 Validation des résultats *in silico* par l'expérimentation *in vitro***

### **a. Rôle de la surexpression d'ER $\alpha$ 36 sur la division cellulaire**

Nous avons exploré le rôle dans la division cellulaire d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 dans les cellules épithéliales mammaires MCF-10A par l'étude de l'expression de protéines caractéristiques : les cyclines. D'après les western blot obtenus, nous constatons une diminution de 2,4 fois de l'expression de la cycline D1 (Figure 45A) et une augmentation de 1,5 fois de l'expression de la cycline B1.

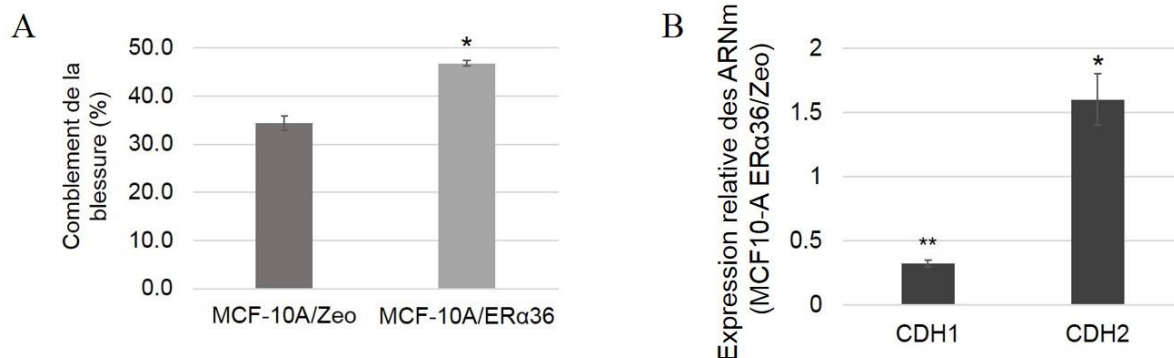


**Figure 46 : Rôle d'ERα36 dans la résistance à l'apoptose induite par la staurosporine des cellules épithéliales mammaires MCF-10A**

Nous avons induit la mort cellulaire dans la lignée MCF-10A/ERα36 et dans la lignée MCF-10A/Zeo avec un traitement à la staurosporine STS (0,25μM, 6h).

A. Nous avons observé le clivage de protéines caractéristiques d'un processus de mort cellulaire: PARP1 et les caspases 3 et 7. Le niveau de clivage de ces marqueurs apoptotiques est réduit de manière significative en cas de surexpression d'ERα36 (N≥4 ; \* : p<0,05).

B. Deux autres caractéristiques de l'apoptose sont le relargage dans le cytoplasme du cytochrome c (CytC) et la fragmentation nucléaire. Ces évènements, induits uniquement après traitement à la staurosporine, sont réduits de 75% pour le relargage du cytochrome C dans le cytoplasme et de 47% pour la fragmentation nucléaire en cas de surexpression d'ERα36 (N=3 ; \*\*\*<0,001).



**Figure 47 : Rôle d'ERα36 dans la migration des cellules épithéliales mammaires MCF-10A**

A. Par un test de blessure réalisé sur un tapis de cellules confluentes dans les lignées MCF-10A/Zeo et MCF-10A/ERα36, nous observons que la migration cellulaire est amplifiée de 30% par la surexpression d'ERα36, 6h après la blessure ( $N \geq 4$  ; \* :  $p < 0,05$ ).

B. L'étude de l'expression de marqueurs caractéristiques de la transition épithélio-mésenchymateuse a mis en avant une diminution significative de l'ordre de 67% de l'expression génique du marqueur épithélial CDH1 alors que le marqueur mésenchymateux CDH2 voit son expression augmenter de 50% en cas de surexpression d'ERα36 ( $N \geq 4$  ; \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ ).

En parallèle, la quantification de cellules viables adhérentes par coloration au crystal violet indique une diminution de l'ordre de 35% du nombre de cellules dans la lignée cellulaire MCF-10A/ER $\alpha$ 36 par rapport à la lignée MCF-10A/Zeo (Figure 45B). De plus, le temps de doublement évalué dans la lignée surexprimant ER $\alpha$ 36 est 40% supérieur à la lignée contrôle (Figure 45C), ce qui est probablement expliqué par un allongement de 31% de la phase S (mesuré par cytométrie en flux). La surexpression d'ER $\alpha$ 36 dans cette lignée de cellules épithéliales mammaires semblerait donc ralentir la division cellulaire ou le cycle cellulaire.

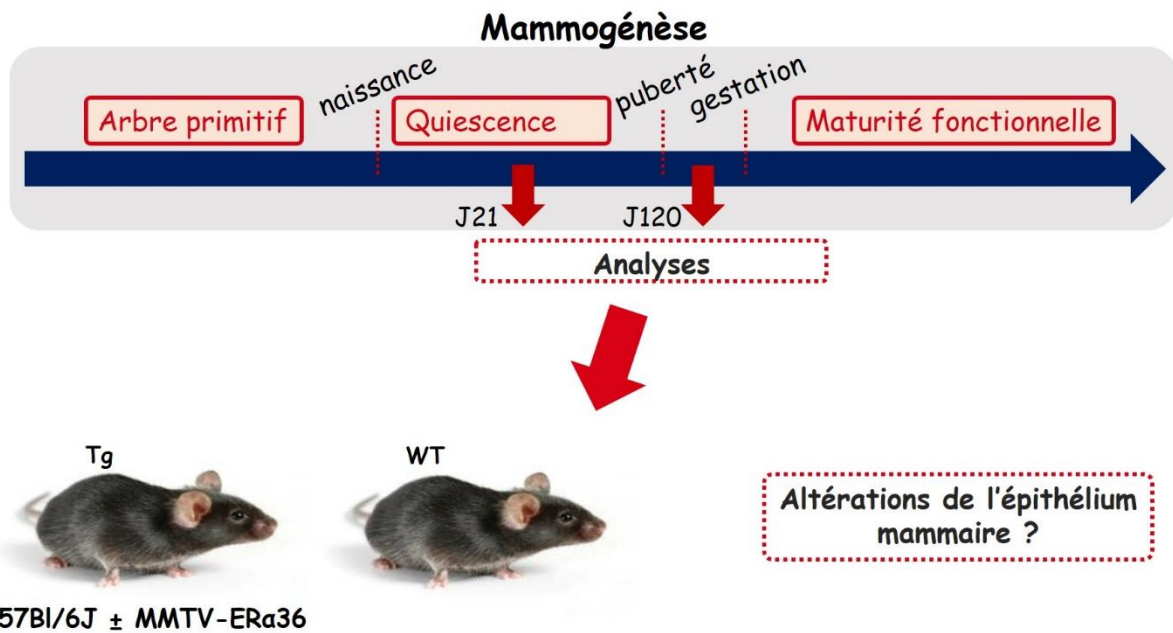
### **b. Rôle de la surexpression d'ER $\alpha$ 36 sur l'échappement à l'apoptose**

Le rôle d'ER $\alpha$ 36 dans ce mécanisme a été étudié après avoir induit l'apoptose avec un traitement à la staurosporine (ou DMSO comme contrôle) dans les 2 lignées considérées (Figure 46). La staurosporine (STS) induit l'expression de marqueurs caractéristiques de l'apoptose dans les 2 lignées. Dans la lignée surexprimant ER $\alpha$ 36, une réduction du clivage de ces marqueurs (PARP1, caspase 7 et caspase 3) est observée (34%, 60% et 30% respectivement) par comparaison avec la lignée MCF-10A/Zeo.

### **c. Rôle de la surexpression d'ER $\alpha$ 36 sur la migration cellulaire**

Après avoir identifié TGFB1 comme un régulateur maître des DEG, nous avons choisi d'étudier les capacités migratoires des cellules épithéliales surexprimant ER $\alpha$ 36 (Figure 47). Pour se faire, nous avons réalisé des tests de blessure sur les tapis cellulaires confluent des lignées MCF-10A/ER $\alpha$ 36 et MCF-10A/Zeo. Les résultats ont montré une fermeture de la blessure plus rapide dans la lignée surexprimant ER $\alpha$ 36 (Figure 47A). De plus, l'étude de marqueurs clés de la transition épithélio-mésenchymateuse montre par RT-PCR que l'expression de CDH1 est réduite de 3 fois, tandis que l'expression de CDH2 est induite de 1,5 fois dans la lignée MCF-10A/ER $\alpha$ 36 (Figure 47B). Enfin, la localisation et l'expression de ces marqueurs de jonctions entre cellules par immunofluorescence indique une diminution de l'expression de la  $\beta$ -caténine (29,8%) et de la E-cadhérine (codée par CDH1, 15%), ainsi qu'une localisation plus cytoplasmique, tandis que l'expression de la N-cadhérine (codée par CDH2) est augmentée de 35,9%.

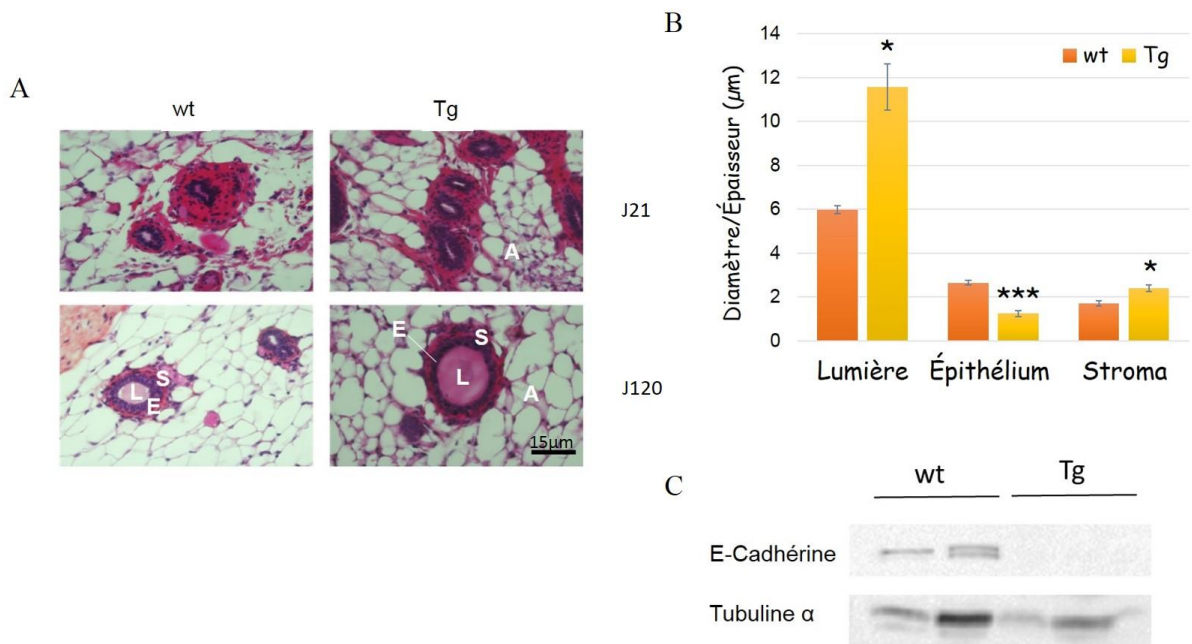




**Figure 48 : Approche expérimental *in vivo* de la surexpression d'ERα36 spécifique à la glande mammaire**

La mammogénèse se déroule de manière séquentielle. Une première étape pendant le développement fœtal permet d'obtenir un arbre primitif à la naissance, puis le développement de l'organe en quiescence reprend lors de la puberté et la glande atteint sa maturité fonctionnelle après gestation lors de l'allaitement de la descendance.

Nous avons travaillé avec le modèle murin qui n'exprime pas ERα36 naturellement. Une lignée de souris C57Bl/6J transgénique dans laquelle l'expression d'ERα36 a été placée sous le contrôle du promoteur MMTV, a été élaborée par l'institut clinique de la souris pour notre étude. Les effets sur le développement de la glande mammaire d'une surexpression d'ERα36 spécifique à cet organe ont été évalués par comparaison avec des souris C57Bl/6J sauvages à 2 moments clés : (i) le sevrage, avant la puberté (jour 21) et (ii) après la puberté, chez des souris adultes vierges, à l'âge de 4 mois (jour 120).



**Figure 49 : Effets d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 sur le développement de la glande mammaire**

A. Au sevrage (J21), aucun effet de la surexpression n'a été constaté : les canaux mammaires des individus sauvages et transgéniques semblent avoir le même aspect histologique. B. À l'âge adulte (J120), nous avons observé que les canaux mammaires des souris transgéniques sont plus dilatés, alors que l'épithélium qui borde la lumière est réduit et le stroma plus épais. (N=15/grp ; \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ). C. Les souris transgéniques, à l'âge adulte (J120), présentent une perte d'expression du marqueur épithélial E-cadhérine.

Abréviations : A : Adipocytes ; E : Epithélium ; L : Lumière ; S : Stroma

### 2.3 Conséquences d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire murine

L'hypothèse de départ de cette étude était que la surexpression d'ER $\alpha$ 36 pourrait être suffisante pour induire une altération de l'épithélium mammaire *in vivo*. Pour répondre à cette problématique, nous avons produit une souche de souris C57BL/6J KI pour ER $\alpha$ 36 et dont l'expression, dirigée par le promoteur MMTV, est spécifique à la glande mammaire.

Nous avons prélevé et examiné les glandes mammaires au sevrage et à l'âge adulte des individus sauvages (WT) et transgéniques (Tg) issus du croisement entre une femelle non transgénique et un mâle C57BL/6J KI Tg (Figure 48). Les glandes mammaires prélevées ont été notamment analysées par un logiciel dédié à cet effet qui crée un squelette de l'arbre mammaire et permet par traitement des images de connaître l'extension des canaux, le nombre de ramifications et de bourgeons terminaux (TEB). Nous avons également analysé des coupes histologiques de l'organe et l'expression de protéines par western blot.

Pour commencer, nous nous sommes demandé quel était le rôle d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 sur le développement fœtal de la glande mammaire. Nous avons étudié des prélèvements de glande mammaire chez des femelles WT et Tg des générations F2 et F4 au sevrage (PND21). Aucune modification de l'épithélium ou du stroma mammaire n'a été constaté par comparaison des animaux WT et Tg (Figure 49A).

*A contrario*, les prélèvements chez les animaux adultes (16 semaines) ont montré une augmentation significative du diamètre de la lumière ( $p=0,0036$ ) et de l'épaisseur du stroma ( $p=0,0029$ ), tandis que l'épithélium était réduit ( $p=9.10^{-7}$ ) pour les générations F2, F3 et F4 (Figure 49B). De plus, l'expression de la E-cadhérine n'est pas retrouvée dans les glandes mammaires des souris transgéniques adultes (Figure 49C).

Ces résultats suggèrent que l'expression d'ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire entraîne une altération de l'organe après la puberté, à une période où des ligands potentiels du variant du récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes sont produits de manière endogène, ce qui pourrait déclencher les modifications observées.

<i>In vitro</i> MCF-10A	Paramètres	<i>In vivo</i> C57Bl/6J	
		Sevrage F3	Adulte F3
+ migration - prolifération + survie	<b>Surexpression ER<math>\alpha</math>36</b>	Pas d'effet	Dilatation des canaux Epaissement du stroma Amincissement de l'épithélium

**Tableau 6 : Effets d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 sur le développement de la glande mammaire *in vivo* et *in vitro***

*In vitro*, les cellules épithéliales mammaires surexprimant ER $\alpha$ 36 présentent une induction de leur potentiel migratoire ainsi que de la survie cellulaire et une diminution de leur prolifération. La surexpression d'ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire murine n'induit pas de modifications des canaux mammaires au sevrage. Tandis qu'à l'âge adulte, des modifications de l'épithélium mammaire sont constatées.

### 3. Discussion

Dans cet article, nous avons cherché à évaluer le rôle d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 dans la modification de l'épithélium mammaire sain en mettant en parallèle des études *in silico*, *in vitro* et *in vivo* (Tableau 6).

Dans la lignée cellulaire MCF-10A, ER $\alpha$ 36 module l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la survie et la migration cellulaire. Ces résultats prédits *in silico* nous ont aiguillé pour l'exploration de différentes voies, comme la voie JAK2/STAT3 déjà décrite pour son rôle dans la réponse aux œstrogènes et antiœstrogènes dans le cancer du sein (Chaudhri et al., 2014; Fox et al., 2008; Zhang and Wang, 2013). Les résultats obtenus dans notre étude complètent ceux obtenus par d'autres précédemment sur le rôle de différentes voies dans la signalisation œstrogénique (Björnström and Sjöberg, 2005; Marino et al., 2006). De plus, le rôle d'ER $\alpha$ 36 dans le contrôle de la prolifération et de la résistance à l'apoptose *via* src/EGFR/STAT3/STAT5 avait déjà été décrit dans les cellules cancéreuses mammaires (Fox et al., 2008; Zhang and Wang, 2013).

Dans la littérature, la collaboration entre ER $\alpha$ 36 et différents récepteurs œstrogéniques ou de facteur de croissance avait déjà été avancée ; c'est notamment le cas pour GPER. Une interaction physique entre ER $\alpha$ 36 et GPER serait déclencheur de différentes voies de signalisations dans les cellules de cancer du sein et séminomateuses (Ajj et al., 2013; Albanito et al., 2007; Gao et al., 2011; Kang et al., 2010; Wallacides et al., 2012; Wang and Yin, 2015; Zhang et al., 2011). Dans nos résultats, nous pouvons relever que la surexpression d'ER $\alpha$ 36 entraîne l'induction de l'expression de GPER de l'ordre de 2 fois dans une lignée de cellules épithéliales non tumorales. Ainsi donc le niveau d'expression d'ER $\alpha$ 36 pourrait activer GPER ou la signalisation EGFR en amont. De plus, la voie de signalisation JAK2/STAT3 a été reportée comme étant impliquée dans la signalisation de GPER dans l'hypothalamus et dans la lignée tumorale mammaire SKBR-3 (Kwon et al., 2014).

Il est à noter que contrairement à ce qui est observée sur l'activation entre ER $\alpha$ 36 et EGFR dans les cellules séminomateuses et de cancer du sein (Wallacides et al., 2012; Wang and Yin, 2015; Zhang et al., 2011), dans notre étude, l'expression d'EGFR n'est pas affectée par le niveau d'expression d'ER $\alpha$ 36. Néanmoins, l'EGF étant un composant du milieu de culture des cellules, ER $\alpha$ 36 pourrait augmenter le niveau de base d'EGFR *via* les voies PI3K/AKT et STAT3/5. *In vivo*, dans des souris KO pour ER $\alpha$  des traitements à l'EGF et à la progestérone montrent le rôle de ces

deux ligands dans la croissance de l'arbre mammaire et dans les processus décrits dans nos résultats : interaction entre les cytokines et leurs récepteurs, adhésion cellulaire, signalisation de TGF $\beta$  et l'apoptose (Mehta et al., 2014).

*In vivo*, nous avons évalué le rôle d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 spécifique à la glande mammaire grâce à une lignée unique de souris C57BL/6K KI ER $\alpha$ 36. Au sevrage, nous n'avons pas constaté de différence entre les souris WT et Tg. En revanche, après la puberté, nous avons constaté chez les souris transgéniques de 16 semaines une modification des glandes mammaires avec dilatation de la lumière des canaux, un épaississement du stroma et un amincissement de l'épithélium. Un résultat similaire avait été montré après traitement exogène à l'œstradiol de souris WT (Bocchinfuso et al., 2000). L'interprétation de ces observations *in vivo* pourrait être que l'apport d'œstrogènes endogènes après la puberté pourrait représenter des ligands potentiels du récepteur ER $\alpha$ 36. De ce fait, l'induction de la signalisation du variant serait déclenchée et mimerait la réponse œstrogénique provoquée par une exposition à l'E2 chez la souris WT. De plus, ER $\alpha$ 36 est un régulateur négatif de l'expression et de l'activité d'ER $\alpha$ 66 (Zou et al., 2009). Les modifications des tissus (épithélium et stroma) pourraient être le résultat d'altérations de la signalisation œstrogénique, et appuieraient également les résultats *in vitro* relatifs à un ralentissement de la prolifération cellulaire et à une induction de la migration cellulaire des cellules surexprimant ER $\alpha$ 36. En effet, les différentes techniques utilisées pour étudier les conséquences d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 dans l'épithélium mammaire sembleraient indiquer une induction constitutive des voies œstrogéniques.

Pour le moment, la détection *in situ* d'ER $\alpha$ 36 ou de son expression grâce aux anticorps commerciaux dans les tissus normaux ou cancéreux n'amènent pas de résultats satisfaisants. Néanmoins les expressions de l'ARNm (et parfois de la protéine) ont été détectés dans différents organes (Wang and Yin, 2015). Du fait du lien entre le niveau d'expression d'ER $\alpha$ 36 et son implication dans la progression du cancer du sein, il serait intéressant d'explorer les modalités de l'initiation et de la régulation de l'expression d'ER $\alpha$ 36. Nos résultats dans les cellules épithéliales mammaires saines suggèrent qu'en absence de ligand la surexpression du variant est suffisante pour induire la migration cellulaire et partiellement la résistance à l'apoptose, deux caractéristiques majeures des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2000).

Au laboratoire, il avait préalablement été montré que des composés oestrogénomimétiques, les alkylphénols, stimulaient la signalisation GPER/ER $\alpha$ 36 dans des cellules humaines séminomateuses (Wallacides et al., 2012). De plus, le travail du laboratoire d'Ana M Soto a présenté à plusieurs reprises l'impact d'une exposition fœtale ou néonatale au BPA et au DES sur l'altération de la signalisation aux œstrogènes chez les rongeurs. Ils observent une prédisposition des animaux à développer des tumeurs mammaires à l'âge adulte (Paulose et al., 2015). L'étude des ligands potentiels d'ER $\alpha$ 36, que sont les alkylphénols, dans notre modèle de souris KI ER $\alpha$ 36 pourrait permettre d'explorer les mécanismes aboutissant à l'acquisition ER $\alpha$ 36-dépendante de propriétés relatives à une transformation néoplasique de l'épithélium mammaire.

# Mammary epithelial cell phenotype disruption in vitro and in vivo through ER $\alpha$ 36 overexpression

Charlène Thiebaut<sup>1a</sup>, Clémence Chamard-Jovenin<sup>1a</sup>, Amand Chesnel<sup>1</sup>, Emmanuel Bresso<sup>2</sup>, Chloé Morel<sup>1</sup>,  
Malika Smail-Tabbone<sup>2</sup>, El-Hadi Djermoune<sup>1</sup>, Marie-Dominique Devignes<sup>2</sup>, Taha Boukhobza<sup>1</sup> and  
Hélène Dumond<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>CNRS-Université de Lorraine, UMR 7039, Centre de Recherche en Automatique de Nancy, BP70239,  
Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France.

<sup>2</sup>LORIA, CNRS UMR 7503, INRIA, Villers les Nancy, France.

<sup>a</sup> CCJ and CT equally contributed to the work and should be considered as co-first authors.

***Abbreviated title*** : ER $\alpha$ 36-dependent disruption of mammary epithelium

***Key terms*** : mammary gland, development, ER $\alpha$ 36 overexpression, knocked-in mouse

***Word count***: 6404

***Number of figures and tables*** : 6



#### **4. Perspectives à la suite de ce travail**

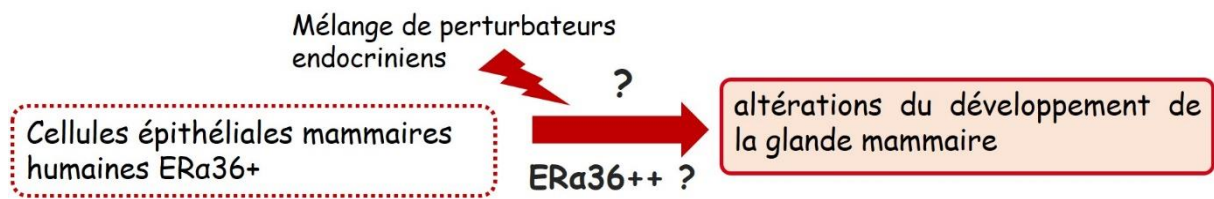
Avec ce travail, nous avons pu mettre en avant le rôle potentiel d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 dans l'épithélium mammaire normal (Tableau 6). Ainsi, nos études *in silico*, validées *in vitro*, montrent que cette surexpression déclenche des modifications du phénotype cellulaire, avec un ralentissement de la prolifération mais une migration cellulaire induite. De plus, *in vivo*, les résultats montrent qu'une surexpression du variant de récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes, corrélée à la présence d'œstrogènes endogènes au moment de la puberté entraînent une modification de l'épithélium mammaire. L'exposition à des perturbateurs endocriniens, qui sont des ligands exogènes potentiels d'ER $\alpha$ 36, a par ailleurs été décrite comme induisant des modifications de la glande mammaire de manière similaire à nos observations (Acevedo et al., 2013).

Il serait donc intéressant de poursuivre la recherche de ligands interagissant avec ER $\alpha$ 36, comprendre les modes d'actions de ces interactions dans les cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses. De plus, l'exposition durant la vie fœtale à ces ligands pourrait être exploré afin d'observer le développement de la glande mammaire et cela sous le contrôle d'ER $\alpha$ 36 ou non.

### **III. Effets transgénérationnels de l'exposition à des alkylphénols à faible dose sur l'acquisition d'un phénotype néoplasique-like de la glande mammaire**

ER $\alpha$ 36 jouerait donc un rôle dans la modification pathologique de la glande mammaire après la puberté, période où des œstrogènes endogènes, ligands potentiels du récepteur sont présents.

Comme décrit dans l'analyse bibliographique, certains perturbateurs endocriniens sont des ligands des récepteurs aux œstrogènes. De plus, il a été montré qu'une exposition à un mélange d'alkylphénols (M4), polluants présents dans notre environnement quotidien, induisait la prolifération cellulaire *in vivo* et *in vitro* dans le contexte du cancer testiculaire (Ajj et al., 2013) et modulait l'expression du facteur épigénétique DNMT3L.



**Figure 50 : Hypothèse de travail sur des effets potentiels de l'exposition aux perturbateurs endocriniens dans des cellules épithéliales mammaires saines**

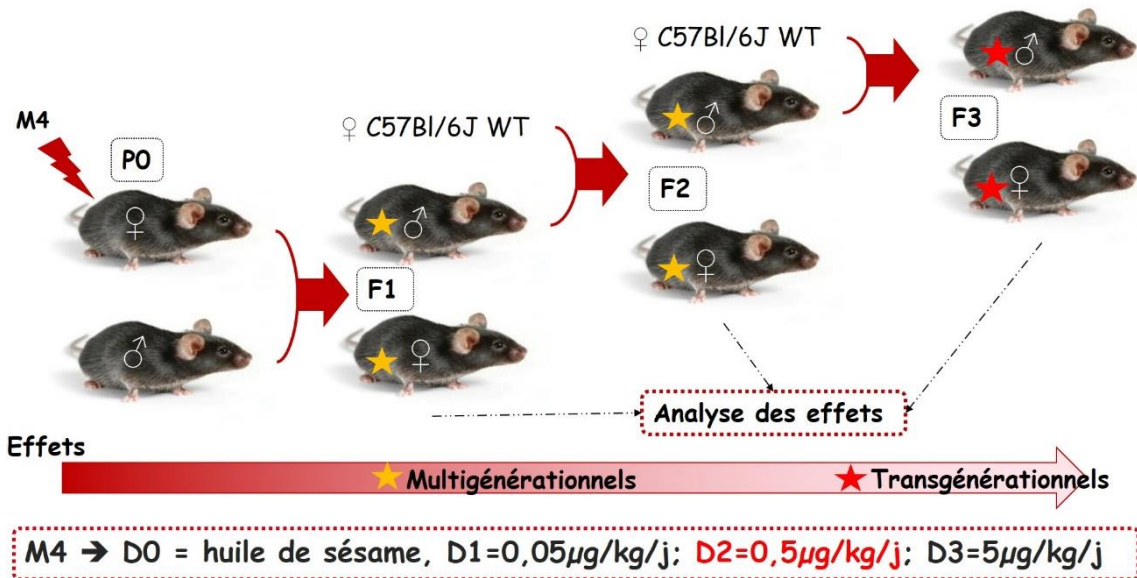
Les cellules saines de la glande mammaire expriment faiblement ERα36. Nous avons posé l'hypothèse que l'exposition à un mélange de perturbateurs endocriniens, les alkylphénols, ubiquitaires dans notre environnement et à une dose environnementale, pouvait induire l'expression d'ERα36 et altérer le développement de la glande mammaire et cela sous le contrôle d'ERα36.

Nous avons donc décidé d'étudier les possibles effets transgénérationnels sur l'épithélium mammaire sain *in vivo* et *in vitro* à la suite d'une exposition à un mélange d'alkylphénols à de faibles doses (Figure 50). Le M4 étant un bon candidat comme ligand et activateur transcriptionnel d'ER $\alpha$ 36, nous l'avons choisi pour explorer ces effets dans le contexte de l'épithélium mammaire sain. Le travail, présenté dans ce chapitre, a fait l'objet d'un article soumis à *Endocrinology* et qui s'intitule : « **Transgenerational low-dose alkylphenol exposure promotes mammary gland neoplastic-like phenotype** ».

## 1. Introduction

L'arbre mammaire est un organe qui se développe de manière séquentielle. Son développement qui débute lors de la vie fœtale ne sera complet qu'après la première lactation à l'âge adulte. Des observations sur les données cellulaires et moléculaires montrent le parallèle entre les processus de mammogénèse et d'initiation/progression du cancer du sein (Soto and Sonnenschein, 2010; Trichopoulos, 1990). De plus, différentes études mettent en avant le lien entre l'exposition à des xénoestrogènes comme le BPA et l'altération du développement de la glande mammaire, ce qui aboutit à long terme à augmenter le risque de développer un cancer du sein (Murray et al., 2007; Yang et al., 2015). Les alkylphénols, tout comme le BPA, sont connus pour lier GPER et comme ayant des activités mimant celles des œstrogènes (Thomas and Dong, 2006). Depuis la publication en 2004 de la NOAEL du nonylphénol à 15mg/kg/jour chez le rat exposé par voie orale, cette valeur a été extrapolée pour l'homme (WHO/UNEP/ILO 2004). Néanmoins, une absence de toxicité sur la reproduction a été montrée suite à une exposition au 4NP pendant la gestation tardive chez le rat Sprague-Dawley à des doses allant de 15 à 150mg/kg/jour (Chapin et al., 1999; Tyl et al., 2006). Par contre, une exposition fœtale à de fortes doses de ce composé (25mg/kg/jour chez la souris MMTVneu et 100mg/kg/jour chez le rat) altère le développement de la glande mammaire chez la génération F1 (Acevedo et al., 2005; Moon et al., 2007). De plus, *in vitro*, une exposition à 1 $\mu$ M de 4NP stimule la prolifération de cellules cancéreuses mammaires ER+ MCF7 (Soto et al., 1991).

Récemment, une étude allemande indique qu'un mélange d'alkylphénols composé de 4NP et 4tOP est ubiquitaire dans l'alimentation infantile et est présent à une dose 1000 fois inférieure aux expérimentations précédentes (Raecker et al., 2011).



**Figure 51 : Modèle transgénérationnel d'exposition aux alkylphénols**

Deux individus sauvages de la lignée C57Bl/6J sont croisés puis la femelle P0 est exposée durant toute la gestation au M4, selon 4 conditions (D0, D1, D2, D3). La dose 2 correspond à la dose environnementale.

À partir du croisement des individus sauvages, on obtient une génération F1, mâle et femelle. Les mâles sont conservés afin d'obtenir la génération F2 par croisement avec une femelle sauvage. Les glandes mammaires des femelles des générations F1 et F2 sont analysées pour visualiser les effets multigénérationnels. Les individus F1 étaient en cours de développement et portaient les cellules germinales à l'origine des F2 au moment de l'exposition de la femelle P0 au M4. Ces deux générations ont donc été exposées directement au mélange d'alkylphénols.

Les mâles F2, croisés à des femelles sauvages vont nous permettre d'obtenir une génération F3 qui sera la première à présenter de potentiels effets transgénérationnels. Cette génération n'a pas été exposée au mélange.

Au laboratoire, dans le contexte du cancer testiculaire, ce mélange d'alkylphénols, nommé M4, a été identifié comme stimulant la prolifération des cellules et modulant le statut épigénétique dépendant de DNMT3L (Ajj et al., 2013). C'est pourquoi, nous avons étudié les effets d'une exposition fœtale à de faibles doses d'alkylphénols en envisageant une potentielle perturbation de l'empreinte épigénétique mâle. Nous avons donc établi notre protocole en transmettant les effets transgénérationnels potentiels de cette exposition par les mâles. Des effets similaires ont d'ailleurs déjà été observés à la suite à des expositions fœtales et/ou néonatales à des composés environnementaux comme le BPA ou la vinclozoline (Manikkam et al., 2012).

Les effets observés au laboratoire dans le contexte du cancer testiculaire étaient également modulés par des voies de signalisations aux œstrogènes non génomiques dépendantes d'ER $\alpha$ 36 (Ajj et al., 2013).

Comprendre les conséquences de l'activation potentielle d'ER $\alpha$ 36 dans les cellules épithéliales normales de la glande mammaire est un élément qui pourrait permettre d'avancer sur la compréhension du rôle de ce variant de récepteur dans la modification pathologique de l'organe.

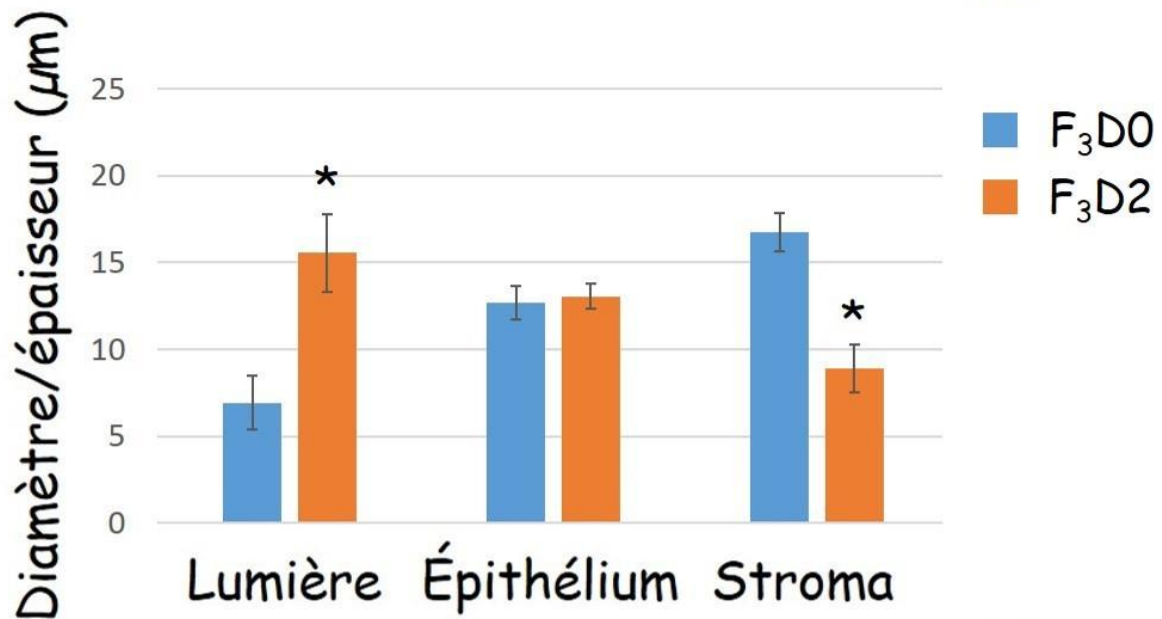
Afin d'explorer les effets d'une exposition à de faibles doses d'alkylphénols sur le phénotype de la glande mammaire, nous avons mené en parallèle des projets *in vivo* et *in vitro*. *In vivo*, un modèle transgénérationnel d'expositions au mélange M4 de souris gestantes C57BL/6J a été construit. La transmission de l'exposition se faisant par les mâles pour obtenir les générations F2 et F3. *In vitro*, l'analyse *in silico* des résultats de transcriptome a permis d'approfondir des fonctions cellulaires et voies de signalisations modulées par l'exposition au mélange M4 de cellules épithéliales saines MCF-10A.

## **2. Résultats**

### **2.1 Effets transgénérationnels sur le développement de la glande mammaire murine d'une exposition fœtale au mélange M4**

Durant cette étude, nous avons évalué les effets d'une exposition de la mère pendant la gestation sur le développement de la glande mammaire de la descendance (Figure 51). Nous avons donc exposé les femelles P0 durant toute la gestation au mélange M4 composé de 4NP et 4tOP (ratio de 30 pour 1) à la dose environnementale (D2), une dose 10 fois supérieure (D3) et une dose 10 fois

J21



**Figure 52 : Effets transgénérationnels d'une exposition au mélange M4 à la dose environnementale**

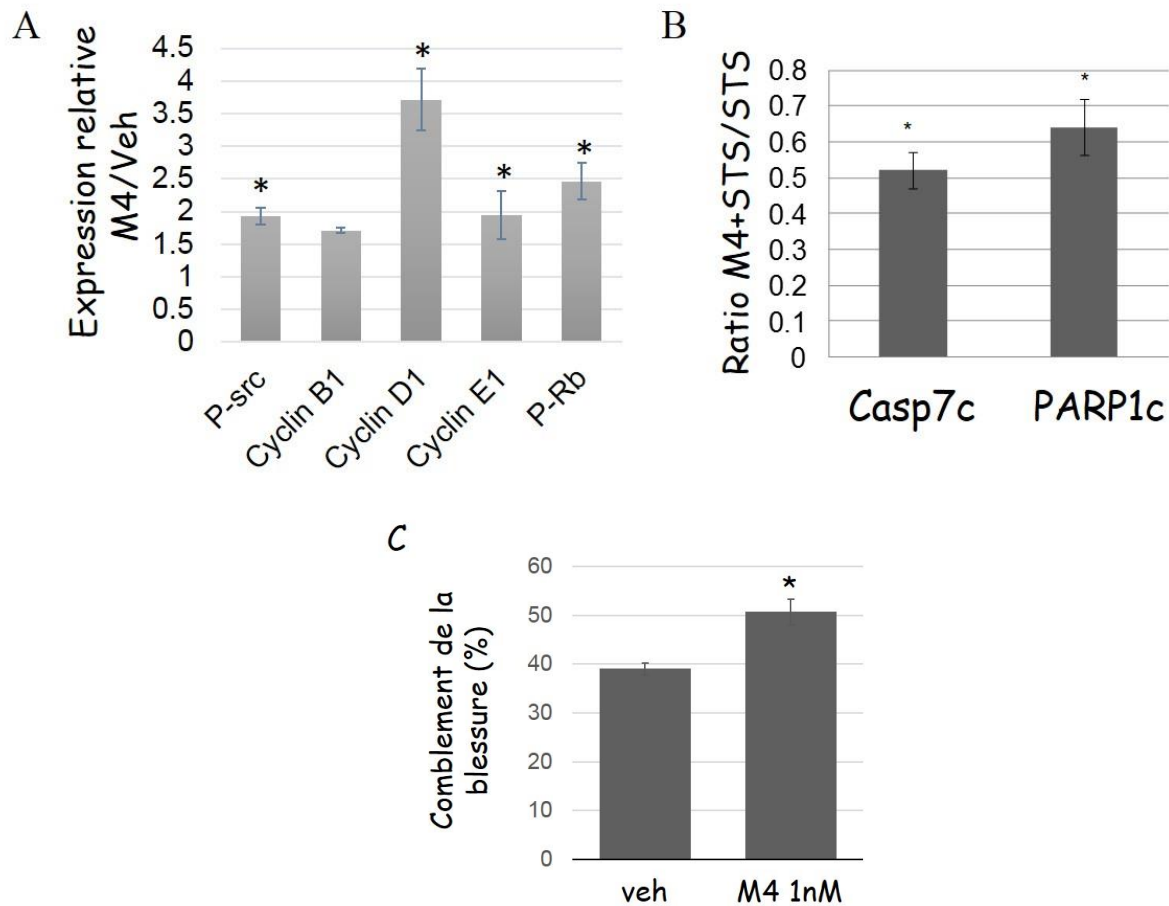
Le graphique présente les mesures réalisées sur des coupes histologiques de femelles F3 au sevrage, dose témoin (D0) et dose environnementale (D2). Une augmentation significative de l'ordre de 220% du diamètre luminal et une réduction de l'épaisseur du stroma (50%) chez les descendantes issues de la femelle exposée au M4 est constatée (N=15/grp \* : p<0,05).

inférieure (D1). Une exposition à l'huile de sésame (D0, diluant du M4) nous a permis de comparer les résultats obtenus. Les glandes mammaires abdominales (position 4) ont été prélevées au moment du sevrage (PND21) pour l'évaluation des effets du mélange sur le développement fœtal de la glande mammaire.

Nous avons observé grâce à un logiciel à façon que l'extension de l'arbre n'était pas significativement modifiée, tout comme le nombre de ramifications pour la première génération exposée au M4 *via* leur mère, par comparaison aux témoins. Cependant, une ouverture prématurée de la lumière (D1, D2), un épaissement de l'épithélium (D1, D2) ainsi que du matériel cellulaire dans la lumière (D3) a été observée en F1.

Nous nous sommes également demandé si les gonades mâles présentaient une altération de leur développement à la suite de cette exposition. Nous avons constaté que 20 à 50% des tubes séminifères des mâles F1 exposés au M4 présentaient une déplétion en cellules germinales par comparaison avec les D0. De plus, les espaces interstitiels montrent de larges espaces entre les tubes. Malgré ces anomalies, les mâles F1 exposés au mélange n'ont pas présenté de baisse de fertilité.

Par la suite, nous avons établi un modèle transgénérationnel d'exposition au mélange M4 en croisant les mâles F1 exposés au M4 avec des femelles C57BL/6J non exposées. De même pour obtenir une génération F3, nous avons croisé les mâles F2 avec des femelles non exposées. C'est avec la descendance F3 que nous évaluons si l'exposition au mélange M4 de l'animal P0 induit des effets transgénérationnels sur le développement de la glande mammaire. Au sevrage, nous avons constaté chez les femelles F3D2 une augmentation de 224% du diamètre de la lumière, ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur du stroma de l'ordre de 53% (Figure 52). De plus, 80% des canaux présentent un épithélium non cohésif avec du matériel cellulaire ou encore des cellules cribriformes. De plus, l'analyse de l'arbre mammaire *in toto* au sevrage indique une augmentation de l'extension de l'arbre (F3D0  $4515 \pm 108$   $\mu\text{m}$ , F3D2  $5272 \pm 83$   $\mu\text{m}$ ;  $p=0.073$ ;  $N=9$ ), tandis que le nombre de TEB est réduit de 21% ( $p=0.005$ ;  $N=9$ ). Tout comme pour les mâles F1, nous avons observé des tubes séminifères vides et un tissu interstitiel non cohésif chez les mâles F3D2.



**Figure 54 : Résultats *in vitro* des effets du mélange d'alkylphénols sur les cellules épithéliales mammaires MCF-10A**

A. L'exposition au M4 (1nM, 24h) entraîne dans les cellules MCF-10A une induction de différents marqueurs de prolifération cellulaire, tels que les cyclines D1 et E1, ainsi que la phosphorylation de src et de Rb ( $N \geq 4$  ; \* :  $p < 0,05$ ).

B. L'exposition préalable (1nM, 24h) au mélange d'alkylphénols induit la survie cellulaire chez les MCF-10A traitées à la staurosporine (0,25  $\mu$ M, 6h). Le clivage de la caspase 7 et de PARP 1 est respectivement réduit de 50 et 35% ( $N \geq 4$  ; \* :  $p < 0,05$ ).

C. Une augmentation de la migration des cellules MCF-10A de l'ordre de 40% après un test de blessure en présence de M4 (1nM, 6h) a également été observée ( $N \geq 4$  ; \* :  $p < 0,05$ ).



## 2.2 Effets du mélange M4 dans la lignée de cellules épithéliales mammaires saines MCF-10A

### a. Analyse du transcriptome des cellules MCF-10A exposées au M4

De la même manière que dans le chapitre II précédent, nous avons réalisé le transcriptome des cellules afin d'étudier les effets cette fois d'une cinétique d'exposition au M4 sur l'expression des gènes dans la lignée cellulaire MCF-10A. Pour cela, les cellules ont été exposées pendant 3 temps différents (1h, 8h et 24h). Au total, nous obtenons une liste de 3 362 gènes exprimés différemment après traitement par rapport au t=0. Un Volcano Plot nous indique également le nombre de transcrits significativement régulés positivement ou négativement pour chaque temps (soit 278, 76 et 2743 au temps 1h, 8h et 24h respectivement).

Afin d'analyser *in silico* ces résultats, j'ai constitué pour les différents temps, des listes de ces gènes différentiellement exprimés (DEG) après exposition au M4. De la même manière que dans le chapitre précédent, nous avons extrait de nos résultats de transcriptomes les termes GO prédits pour les DEGs. Les DEGs obtenus appartiennent aux termes : cycle cellulaire (4,9% des DEG, GO:0007049), prolifération cellulaire (5,2% des DEG, GO:0008283) et apoptose (2,75% des DEG, GO:0006915) ( $p\text{-value} < 1 \times 10^{-14}$ ). Nous obtenons 28,8%, 18,7% et 11,8% des listes de termes GO, respectivement.

Par la suite, j'ai constaté en croisant nos listes de DEGs avec les données KEGG que la voie de signalisation prédite quelques soit le temps était principalement une voie relative au cancer : « Pathways in Cancer » ( $p\text{-value} < 10^{-3}$ ). De plus, cette information appuie les résultats de l'enrichissement de termes GO présentés précédemment. Les fonctions « prolifération, échappement à l'apoptose et migration/invasion » sont les fonctions majeures de cette voie.

Nous avons donc choisi d'explorer et de valider *in vitro* les résultats prédits *in silico* dans la lignée MCF-10A exposée aux alkylphénols.

### b. Validation *in vitro*

L'étude du cycle cellulaire et de sa régulation a été explorée avec le niveau d'expression ou d'activation de protéines caractéristiques (Figure 54A). Ainsi nous avons relevé une induction

significative de la phosphorylation de Src, et des niveaux d'expression de la cycline D1 et E1 ainsi que de la protéine Rb. De plus, une quantification de la viabilité cellulaire par crystal violet nous indique une hausse de  $23\pm 0.5\%$  ( $p<0.05$ ,  $N=3$ ) après 24h d'exposition au M4.

Nous avons poursuivi notre analyse avec l'étude de la stabilité génomique des MCF-10A après exposition aux alkylphénols. En effet, dans les résultats de transcriptome, de nombreux gènes de la famille MCM, mais également MSH2 et MSH6 impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN, étaient régulés positivement dans les cellules exposées. Par une technique de RAPD, nous avons observé qu'en effet, l'exposition au M4 semblait altérer la stabilité génomique des cellules. Ainsi le mélange de perturbateurs endocriniens pourrait influencer le cycle cellulaire en altérant notamment la stabilité génomique des cellules MCF-10A.

De la même manière que dans le chapitre II, nous avons évalué la résistance à l'apoptose des cellules en les exposant à la STS avant l'exposition au M4 (Figure 54B). Nous avons constaté une réduction de l'apoptose en cas de co-traitement, par rapport au traitement STS unique : réduction de  $17\pm 2\%$  pour la Caspase 3,  $48\pm 6\%$  pour la Caspase 7 et  $36\pm 5\%$  pour le clivage de PARP1 ( $p<0.05$ ,  $N=4$ ). De plus, une quantification du relargage du cytochrome C et de la fragmentation nucléaire par immunofluorescence montrent une réduction de  $55\pm 3\%$ ; ( $p<0.05$ ).

Enfin, nous avons constaté une augmentation de la capacité des cellules épithéliales MCF-10A exposées au M4 à migrer avec le comblement d'une blessure sur tapis cellulaire confluent (Figure 54C). De plus, par RT-PCR nous avons observé l'induction de l'expression de marqueurs mésenchymateux (MMP9, SNAI2, VIM et CDH2). L'observation de l'expression et de la localisation de la  $\beta$ -caténine, de la E-cadhérine et de la N-Cadhérine appuie également l'idée d'une perte des caractères épithéliaux pour un gain de caractères mésenchymateux.

### **2.3 Expression d'ER $\alpha$ 36, méthylation du promoteur et exposition au M4**

L'expression protéique du variant de récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes est induite de 8 fois après exposition au M4 pendant 24h de cellules MCF-10A et aucune modification de l'expression de GPER n'est mise en avant dans nos données de transcriptome. De plus, l'analyse de la méthylation du promoteur d'ER $\alpha$ 36 montre que l'induction de son expression est corrélée à une altération de la

<i>In vitro</i> MCF-10A	Paramètres	<i>In vivo</i> C57Bl/6J	
		Sevrage F3	Adulte F3
+ migration - prolifération + survie	<b>Surexpression ERα36</b>	Pas d'effet	Dilatation des canaux Epaissement du stroma Amincissement de l'épithélium
+ migration + prolifération + survie	<b>Exposition M4</b>	Dilatation des canaux Matériel cellulaire dans les canaux	En cours

**Tableau 7 : Effets d'une exposition au M4 sur le développement de la glande mammaire *in vivo* et *in vitro***

*In vitro*, les cellules épithéliales mammaires exposées au mélange M4 présentent une induction de leur potentiel migratoire ainsi que de la survie cellulaire, et contrairement aux cellules surexprimant ERα36, une augmentation de leur prolifération. L'exposition au mélange de perturbateurs endocriniens pendant la gestation de la femelle P0 induit en 3<sup>ème</sup> génération des altérations du développement de l'épithélium mammaire. Les analyses des glandes mammaires de 3<sup>ème</sup> génération post-exposition chez l'adulte sont en cours de réalisation.

méthylation des ilots CpG. Les ilots se situant à proximité du TSS sont déméthylés après traitement au M4.

Ainsi, la surexpression d'ER $\alpha$ 36 pourrait être suffisante pour entraîner des effets carcinogènes en cas d'exposition au M4, conduisant à une induction de la prolifération cellulaire, de la migration cellulaire et de la résistance à l'apoptose induite par la STS. Ce phénotype avait été relevé dans notre étude de la lignée cellulaire MCF-10A/ER $\alpha$ 36 vs MCF-10A/Zeo. De plus, une co-exposition au M4 et à la STS de la lignée MCF-10A conduit à augmenter le niveau d'expression d'ER $\alpha$ 36 (19%). Ce variant pourrait être impliqué dans la résistance à la mort cellulaire M4-dépendante. De même, les marqueurs d'apoptose (clivage de la caspase 3, caspase 7 et PARP1) montrent que la surexpression d'ER $\alpha$ 36 conduit à une réduction significative du clivage de PARP1 et une tendance à la réduction du taux de clivage des deux autres facteurs.

Ces données indiqueraient alors qu'ER $\alpha$ 36 pourrait être un régulateur maître des voies déclenchées par le M4 dans les cellules MCF-10A, mais il ne serait pas le seul.

### **3. Discussion**

#### **3.1 Effets de l'exposition au M4 sur le développement de la glande mammaire murine**

Le modèle que nous avons développé avait pour but d'observer de possibles effets transgénérationnels de l'exposition fœtale au M4 après avoir exposé la mère P0 et par transmission sur 2 générations par les mâles (Tableau 7).

Au sevrage pour la génération F1 des différentes doses, nous avons observé des altérations de l'épithélium mammaire mais pas d'extension plus importante de l'arbre contrairement à Moon et collègues (Moon et al., 2007). Par contre, nous avons observé en 3<sup>ème</sup> génération, notamment pour la dose médiane correspondant à l'exposition humaine, des effets comparables à ce qui est décrit dans la littérature pour une altération du développement de la glande mammaire qualifiée d'hyperplasie atypique. Nous avons observé un allongement de la glande mammaire avec réduction du stroma et du nombre de TEB, épaissement de l'épithélium, tout comme décrit chez la souris CD-1 exposée au M4 dans la littérature (Vandenberg et al., 2008). Le développement de la glande mammaire chez les mâles ne semble pas affecté, néanmoins nous avons constaté une atteinte significative des gonades mâles avec déplétion des cellules germinales dans certains tubes

séminifères au sevrage, quel que soit la dose ou la génération considérée. Néanmoins, nous avons obtenu des descendance de ces souris mâles. Dans la littérature, le nonylphénol était déjà décrit pour ses effets délétères sur les différents tissus testiculaires (Dalgaard et al., 2002; McClusky et al., 2007). De plus, au laboratoire, l'exposition au M4 de lignées séminomateuses (TCam-2 et NT2/D1) entraînait des modifications épigénétiques des cellules, ce qui est souvent en lien avec une transmission transgénérationnelle des effets des PE (Ajj et al., 2013; Crews et al., 2014).

Nous n'avons pas retrouvé d'effets caractéristiques sur la reproduction chez les individus adultes, tout comme Chapin et collègues et Tyl et collègues l'envisageaient (Chapin et al., 1999; Tyl et al., 2006). En revanche, il serait intéressant d'étudier les effets de l'exposition au M4 chez les souris âgées afin de répondre à l'hypothèse du développement de cancer du sein chez l'adulte après un remodelage des caractéristiques fœtales dépendant des alkylphénols.

*In silico* et après confirmation *in vitro*, nous avons constaté que l'exposition à 1 nM de M4 des cellules épithéliales non tumorales MCF-10A était corrélée à une induction de la prolifération et de la migration cellulaire, ainsi qu'à une résistance à l'apoptose (Tableau 7). Pour cette dernière caractéristique, cette observation avait déjà été observée après exposition au BPA ou au NP dans des cellules neuronales et de l'hippocampe (Negishi et al., 2003). De plus, la stabilité génomique des cellules MCF-10A exposée au M4 semble altérer comme le montre les résultats de transcriptome et les analyses de RAPD. De faibles doses d'alkylphénols pourraient donc induire des modifications mutagènes des cellules, entraînant une transformation vers un phénotype néoplasique, sans pour autant suffire à initier la mort cellulaire (Dobrzycka et al., 2003; Frassinetti et al., 2011).

De plus, les cellules semblent passer d'un phénotype épithélial à un aspect mésenchymateux en présence de M4 à une dose environnementale. Ces résultats *in vitro* appuient les observations *in vivo* et des résultats similaires avaient été obtenus chez des souris exposées au BPA (Wadia et al., 2013).

### **3.2 ER $\alpha$ 36 : régulation par les alkylphénols et médiateur de la transformation néoplasique**

Les alkylphénols sont des ligands potentiels d'ER $\alpha$ 36 et ce duo peut conduire à moduler les voies non génomiques dans les cellules cancéreuses testiculaires, tout comme dans la lignée de cellules épithéliales non tumorales MCF-10A (Ajj et al., 2013). En effet, l'exposition au mélange d'alkylphénols induit l'expression du variant, tout comme elle suffit à induire deux des caractéristiques corrélées à ER $\alpha$ 36 dans un contexte normal : l'échappement à l'apoptose et la migration cellulaire. Jusque-là, le rôle d'ER $\alpha$ 36 n'avait été relié qu'à la progression tumorale et à la résistance aux thérapies anti-œstrogéniques et chimiothérapies *in vivo* (Gu et al., 2014; Shi et al., 2009). Les phénotypes observés dans notre étude sont, également, similaires aux observations réalisées dans des cellules cancéreuses ER+ ou TN (Wang and Yin, 2015). De plus, d'après nos résultats, ER $\alpha$ 36 pourrait moduler dans les cellules épithéliales mammaires saines les voies non génomiques aux œstrogènes. Explorer le rôle potentiel des alkylphénols dans le contrôle de ce phénomène relatif à une transformation tumorale pourrait être un apport important pour compléter le champ de nos données.

# Transgenerational low-dose alkylphenol exposure promotes mammary gland neoplastic-like phenotype

Clémence Chamard-Jovenin<sup>1a</sup>, Charlène Thiebaut<sup>1a</sup>, Amand Chesnel<sup>1</sup>, Emmanuel Bresso<sup>2</sup>, Chloé Morel<sup>1</sup>, Malika Smail-Tabbone<sup>2</sup>, El-Hadi Djermoune<sup>1</sup>, Marie-Dominique Devignes<sup>2</sup>, Taha Boukhobza<sup>1</sup> and Hélène Dumond<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>CNRS-Université de Lorraine, UMR 7039, Centre de Recherche en Automatique de Nancy, BP70239, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France.

<sup>2</sup>LORIA, CNRS UMR 7503, INRIA, Villers les Nancy, France.

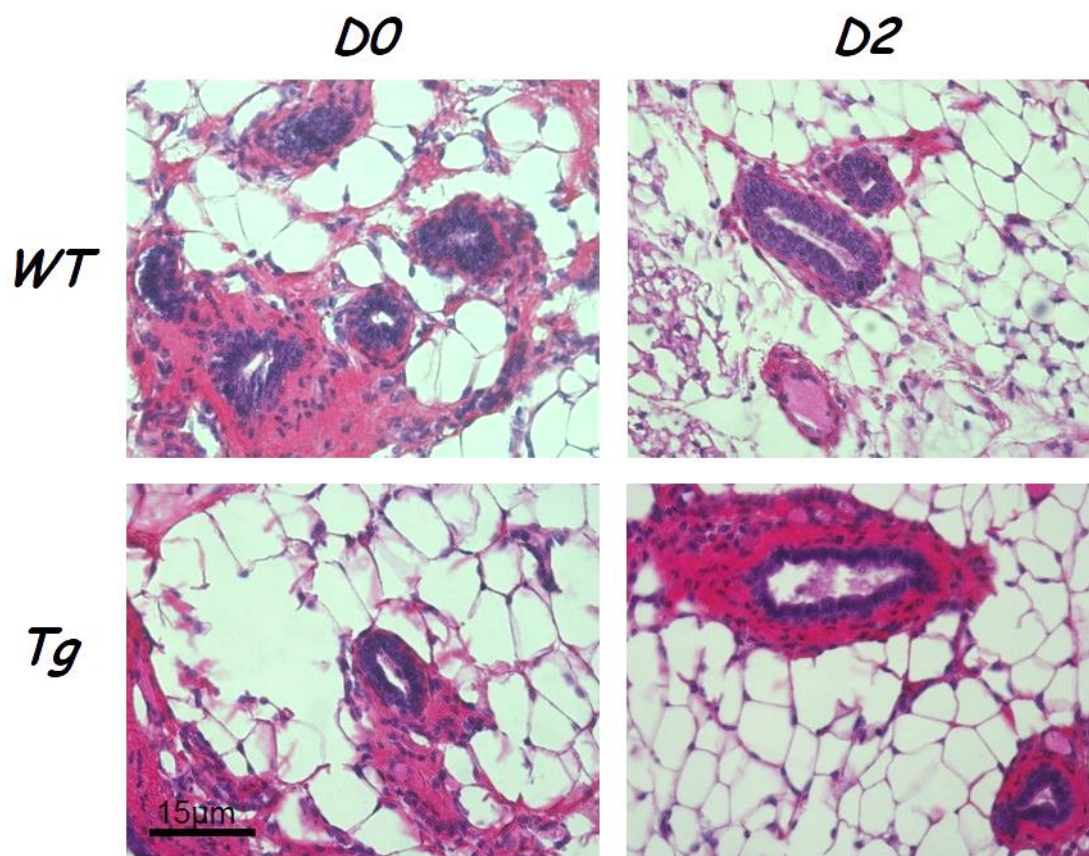
<sup>a</sup> CCJ and CT equally contributed to the work and should be considered as co-first authors.

***Abbreviated title :*** Alkylphenols promote mammary gland dysplasia

***Key terms :*** mammary gland, alkylphenol mix, cancer, development, ER $\alpha$ 36

***Word count:*** 6662

***Number of figures and tables :***5



**Figure 55 : Effets transgénérationnels des alkylphénols sur l'épithélium mammaire de souris sauvages ou transgéniques**

Chez les souris MMTV-ER $\alpha$ 36 de la génération F3 issues de la femelle P0 exposée à la dose environnementale D2 du mélange d'alkylphénols (0,5  $\mu$ g/kg/jour de M4), on observe une modification de l'aspect de la glande mammaire, avec une dilatation de la lumière des canaux, un amincissement de l'épithélium et un épaissement du stroma, en comparaison avec les souris issues de la femelle P0 exposée à la dose contrôle (huile de sésame).



<i>In vitro</i> MCF-10A	Paramètres	<i>In vivo</i> C57Bl/6J	
		Sevrage F3	Adulte F3
+ migration - prolifération + survie	<b>Surexpression ERα36</b>	Pas d'effet	Dilatation des canaux Epaissement du stroma Amincissement de l'épithélium
+ migration + prolifération + survie	<b>Exposition M4</b>	Dilatation des canaux Matériel cellulaire dans les canaux	En cours
En cours	<b>M4 + ERα36</b>	Dilatation des canaux Epaissement du stroma Amincissement de l'épithélium	En cours

**Tableau 8 : Bilan des effets de la surexpression d'ERα36 et/ou de l'exposition au M4 *in vitro* et *in vivo***

L'aspect histologique des canaux mammaires (i) à l'âge adulte en cas de surexpression d'ERα36 et (ii) au sevrage pour les animaux transgéniques exposés au M4 est similaire. L'analyse des résultats obtenus à l'âge adulte suite à l'exposition au M4 en cas de surexpression ou non du variant dans la glande mammaire permettra de compléter nos données et d'appréhender le rôle potentiel des alkylphénols comme ligand d'ERα36. De même, l'étude des effets d'une exposition au M4 sur le phénotype cellulaire des MCF-10A en cas de surexpression d'ERα36 est en cours de réalisation.

#### **4. Résultats complémentaires**

Afin d'explorer plus en détails les effets des alkylphénols sous le contrôle de l'expression d'ER $\alpha$ 36, nous avons repris notre modèle transgénérationnel de souris C57BL/6J KI ER $\alpha$ 36 et nous l'avons exposé aux 3 doses du mélange d'alkylphénols (ainsi qu'une D0 pour comparer les résultats obtenus).

Au sevrage, nous avons prélevé les glandes mammaires des femelles issues de l'exposition des différentes générations aux différentes doses de mélange M4. Nous avons comparé l'aspect des glandes mammaires avec celui des femelles D0 et avons évalué les modifications transgénérationnelles potentielles de l'épithélium mammaire grâce à la génération F3, comme décrit dans la partie précédente. Sur la figure 55, nous constatons qu'il n'y a pas de différence entre l'aspect histologique de l'organe chez les individus D0 WT et Tg au sevrage. Ce résultat est cohérent avec nos observations chez les souris KI ER $\alpha$ 36 au même stade. Par contre, chez les souris D2 Tg, nous pouvons noter une dilatation de la lumière des canaux avec un épaississement du stroma et un amincissement de l'épithélium. Ce résultat est très similaire aux résultats obtenus chez les individus adultes KI ER $\alpha$ 36 (Tableau 8). Nous pouvons alors proposer que les alkylphénols joueraient le rôle de ligand du variant de récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes, capables de compenser l'absence d'œstrogènes endogènes avant la puberté. Une exposition précoce à ces composés pourrait mimer, en partie, une présence précoce de stéroïdes endogènes.

#### **5. Perspectives à la suite de ce travail**

Il serait intéressant de poursuivre cette exploration des effets combinés d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire avec la présence des alkylphénols à l'âge adulte, ainsi que d'étudier les effets sur le développement de la glande mammaire après la puberté chez les souris exposées au M4, indépendamment de l'expression d'ER $\alpha$ 36. Ainsi, nous pourrions évaluer si les effets induits par cette exposition sont corrigés ou aggravés en présence des œstrogènes endogènes, et si les altérations de l'épithélium mammaire sont également dépendantes d'autres récepteurs œstrogéniques.

De plus, nous avons commencé à mettre au point de la culture organotypique de cet organe. L'exposition *in vitro* des glandes prélevées pourrait nous permettre d'évaluer l'impact de différents ligands potentiels.

# **Discussion générale et Perspectives**

Le travail de thèse portait sur l'étude du rôle d'un variant du récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes, nommé ER $\alpha$ 36, dans un contexte normal ou pathologique du développement de la glande mammaire. Depuis son identification en 2005, l'expression d'ER $\alpha$ 36 a été mise en lien avec l'expression de marqueurs caractéristiques (EGFR, HER2) de progression tumorale dans différents organes hormonosensibles, ainsi que dans la résistance aux thérapies anti-œstrogéniques (Tu et al., 2011; Yin et al., 2014; Zhang et al., 2011).

Ce récepteur, qui joue un rôle majeur dans les voies non génomiques de réponse aux œstrogènes, avait été présenté au laboratoire dans le contexte du cancer testiculaire comme ayant une activité promotrice de cancer *in vivo* et *in vitro* en présence de polluants environnementaux. Ainsi, une exposition à un mélange de perturbateurs endocriniens ubiquitaires dans l'environnement quotidien humain, à doses environnementales, serait critique dans la progression tumorale dépendante d'ER $\alpha$ 36 dans les séminomes (Ajj et al., 2013).

Cette thèse était donc scindée en deux parties :

- D'une part, évaluer si une expression d'ER $\alpha$ 36 dans des échantillons de tumeurs mammaires (ER+ et ER-) pouvait conduire à une meilleure caractérisation du comportement tumoral et à améliorer la prise en charge thérapeutique des patientes,
- Et d'autre part, analyser si l'expression d'ER $\alpha$ 36 et/ou l'exposition à un mélange de PE pouvait conduire à une modification des caractéristiques épithéliales des cellules mammaires (*in vitro*) ou de la glande mammaire (*in vivo*), vers un profil pathologique.

## **I. L'expression et l'activité d'ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire peut-elle être caractéristique d'une progression tumorale ?**

### **1. Expression d'ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire pathologique**

Dans leur étude de cohorte, Shi et collègues avaient mis en évidence que l'expression d'ER $\alpha$ 36 pourrait être un facteur de mauvais pronostic pour les patientes, quel que soit leur statut moléculaire (Shi et al., 2009). Durant l'étude rétrospective d'échantillons de tumeurs mammaires (60 patientes dites « ER+ » et 58 patientes dites « ER- »), nous avons effectivement constaté qu'une forte

expression du variant de récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes, ER $\alpha$ 36, était corrélée avec l'expression de marqueurs caractéristiques de progression tumorale, et cela indépendamment du statut ER des patientes. Nous avons choisi d'étudier différents marqueurs de progression tumorale dont l'activité avait été mise en lien avec celle d'ER $\alpha$ 36 *in vitro*. Dans cette étude, il était alors décrit dans une lignée cellulaire ER- (HCC38) que l'expression du variant de récepteur aux œstrogènes était à l'origine de l'acquisition de caractéristiques pathologiques telles que l'augmentation de la migration, la résistance à l'apoptose, ainsi que l'induction de l'expression de différents marqueurs métastatiques, comme CXCR4, RANKL, SNAIL (Chaudhri et al., 2012).

Dans notre travail, nous avons ainsi observé qu'une forte expression d'ER $\alpha$ 36 dans les échantillons de tumeurs mammaires était corrélée à l'expression de SNAIL, VIM et MMP9.

SNAIL ou SNAI1 est un marqueur dont l'expression est caractéristique d'un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et cette expression est mise en lien avec un risque augmenté de rechute du cancer (Moody et al., 2005). Les altérations ayant lieu durant l'EMT avec une diminution de l'adhérence cellulaire sont notamment la conséquence d'une surexpression spontanée de *Snail* avec acquisition de propriétés migratoires des cellules, ce qui conduit à terme à une invasion tumorale. Ces mécanismes ont été décrits dans des lignées tumorales mammaires mais également *in vivo* chez une souris transgénique développant des tumeurs mammaires (Blick et al., 2008; Moody et al., 2005; Tomaskovic-Crook et al., 2009). En parallèle de *Snail*, la vimentine, une protéine du cytosquelette de la famille des filaments intermédiaires, est également un marqueur mésenchymateux surexprimé durant l'EMT (Korsching et al., 2005). Dans notre étude, une forte expression d'ER $\alpha$ 36 était aussi corrélée avec l'expression de ce marqueur de l'invasion cellulaire. Enfin, nous avons également mis en évidence dans nos échantillons de tumeurs mammaires la corrélation entre les expressions d'ER $\alpha$ 36 et MMP9, indépendamment du statut ER. MMP9 est une enzyme matricielle jouant un rôle clé dans l'invasion tumorale cellulaire. Depuis quelques années, cette protéine est donc considérée comme étant un biomarqueur fiable pour évaluer la progression tumorale suite au constat de sa surexpression dans des tumeurs de haut grade (Merdad et al., 2014; Ren et al., 2015).

Les corrélations d'expression entre ER $\alpha$ 36 et ces 3 marqueurs mésenchymateux (SNAIL, VIM et MMP9) pourraient donc laisser penser qu'une forte expression du variant de récepteur aux œstrogènes serait un bon marqueur pronostic de progression tumorale parce qu'elle est associée à

l'augmentation du potentiel métastatique des tumeurs (Tomaskovic-Crook et al., 2009; Wang et al., 2016)..

De plus, nous avons étudié le lien entre les niveaux d'expression d'ER $\alpha$ 36 et de DDB2, également analysée au sein de notre laboratoire. L'expression de cette protéine, initialement identifiée pour son rôle dans la réparation des dommages à l'ADN, est faible voire inexistante dans les cellules tumorales mammaires métastatiques (Kattan et al., 2008). De plus, sa surexpression *in vitro* et *in vivo* conduit à inhiber les capacités invasives des cellules tumorales mammaires, telles que les lignées MDA-MB-231 et SKBR3 (Ennen et al., 2013). Dans notre étude, les expressions d'ER $\alpha$ 36 et de DDB2 sont corrélées positivement, lorsqu'ER $\alpha$ 36 est faiblement exprimée, ce qui semblerait appuyer l'hypothèse précédente selon laquelle l'expression d'ER $\alpha$ 36, indépendamment du statut ER de la tumeur mammaire, pourrait conduire à une modification du comportement tumoral.

Il est toutefois à noter qu'une majorité des patientes ER+ exprimait également fortement le variant ER $\alpha$ 36. Ceci est probablement dû au fait que la grande majorité des patientes incluses dans notre étude étaient âgées de plus de 50 ans. Shi et collègues ont ainsi montré dans leur cohorte que l'expression d'ER $\alpha$ 36 était corrélée au statut ménopausique des patientes (Shi et al., 2009). Cette information relevée dans notre étude est néanmoins en contradiction avec des études *in vitro* des statuts ER $\alpha$ 66 et ER $\alpha$ 36 dans des lignées cellulaires classiques ER+ MCF-7 et également ER-MDA-MB-23, où un antagonisme entre ER $\alpha$ 66 et ER $\alpha$ 36 est retrouvé (Hevir et al., 2011; Rao et al., 2011; Wang and Yin, 2015).

À partir de ses résultats, nous pouvons alors nous demander si l'expression d'ER $\alpha$ 36, corrélée avec l'expression de marqueurs de progression tumorale, ne serait pas pertinente à quantifier, afin de prédire le comportement tumoral.

L'expression d'ER $\alpha$ 36 semblerait donc jouer un rôle dans la modification du comportement pathologique de la glande mammaire, mais quelles en sont les conséquences dans le devenir tumoral ?

## **2. Activité d'ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire pathologique**

En 2009, Shi et collègues décrivaient qu'une forte concentration du variant ER $\alpha$ 36 dans des tumeurs mammaires ER+ conféraient une survie moindre aux patientes traitées avec un

antiœstrogène, le tamoxifène (DFS à 5 ans : 71% vs 93% pour les patientes exprimant faiblement ER $\alpha$ 36). De plus, pour les patientes exprimant fortement ER $\alpha$ 36 et traitées uniquement par chimiothérapie, ils indiquent que ce traitement est de meilleure efficacité (+ 20% environ de survie par rapport aux patientes traitées par hormonothérapie) (Shi et al., 2009). Depuis lors, ER $\alpha$ 36 a été présenté comme régulant les voies MAPK, ERK et PI3K/Akt en réponse au tamoxifène et à un autre antagoniste d'ER, ICI 182,780 (Fulvestrant) (Zhang et al., 2012a). Tout comme Zhang et Wang, nous avons constaté qu'une exposition au long terme de cellules MCF-7 au tamoxifène est suivie de l'induction d'ER $\alpha$ 36 (Zhang and Wang, 2013). Cette observation a également été faite dans la lignée non tumorale MCF-10A, concomitante à une modification de l'aspect cellulaire avec allongement des cellules passant d'un aspect épithélial à un aspect fibroblastique.

De plus, il a été montré que la corrélation d'expression d'ER $\alpha$ 36 avec les mêmes marqueurs métastatiques mis en exergue dans notre analyse (SNAIL, VIM et MMP9) était reliée avec des mécanismes de chimiorésistance (Tomaskovic-Crook et al., 2009; Wang et al., 2016). L'expression de ce variant de récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes pourrait donc être à l'origine directement ou indirectement de mécanismes de chimiorésistance face aux thérapies anti-œstrogéniques du cancer du sein. Chaudhri et collègues mettent en avant dans une lignée de cellules tumorales mammaires triple-négatives (HCC38) que l'expression d'ER $\alpha$ 36 conduit à des effets anti-apoptotiques, ce qui pourrait également contribuer à une résistance vis-à-vis des chimiothérapies pour les tumeurs ER-/PR-/HER2-/ER $\alpha$ 36+ (Chaudhri et al., 2014).

L'expression d'ER $\alpha$ 36 est également retrouvée dans d'autres cancers hormono-dépendants, tels que l'endomètre où son expression serait parallèle à une activation de ERK1/2 dépendante d'EGF (Tu et al., 2011). Lin et collègues expliquent également que l'expression du variant dans l'endomètre est en lien avec des activités agonistes du tamoxifène, tout comme décrit précédemment, avec activation des voies MAPK, PI3K/Akt et ERK. Ainsi, des thérapies à long terme au tamoxifène chez certaines patientes augmentent le risque de développer un cancer de l'endomètre. L'expression d'ER $\alpha$ 36 pourrait avoir un rôle dans ce processus (Lin et al., 2010). Ceci appuie l'idée qu'une personnalisation de la classification prenant en compte le statut ER $\alpha$ 36 dans les organes hormonosensibles peut permettre la prédiction de mécanismes de chimiorésistance se développant à la suite de thérapies anti-œstrogéniques.



Néanmoins ER $\alpha$ 36 a également été localisé dans des tissus non pathologiques (Soltysik and Czekaj, 2013) même si son rôle physiologique reste inconnu. C'est pourquoi, il est envisageable que sa seule expression soit insuffisante pour expliquer tous les mécanismes de chimiorésistance et/ou de progression tumorale. ER $\alpha$ 36 serait un des médiateurs de ces processus, en collaboration avec d'autres partenaires tels qu'EGFR ou HER2, comme il a pu être décrit *in vivo* et *in vitro* par différentes équipes dans différents contextes de cancers hormonosensibles (Wang and Yin, 2015).

### **3. Apport de l'aspect pluridisciplinaire de cette étude**

Afin de valider ou non le variant ER $\alpha$ 36 comme un marqueur prédictif de la progression tumorale par la représentation mathématique des résultats, nous avons fait le choix d'allier techniques biologiques et techniques mathématiques.

Par la modélisation de réseaux d'interaction de gènes, nous avons pu identifier les gènes permettant de classer au mieux les échantillons de tumeurs en fonction des interactions géniques étudiées. Pour cela, et à l'aide de programmes à façon sur Matlab, nous avons suggéré qu'ER $\alpha$ 36 pouvait être un acteur clé dans la progression tumorale des tumeurs mammaires, ER+ et ER-. Ce résultat est en adéquation avec les recherches *in vitro* et *in vivo* réalisées par ailleurs (Shi et al., 2009; Wang and Yin, 2015).

Dans notre étude, nous obtenons une distance importante entre les réseaux d'interactions géniques des échantillons exprimant faiblement et fortement ER $\alpha$ 36. Il serait intéressant de reproduire cette analyse avec d'autres échantillons de différents statuts moléculaires afin d'affiner notre résultat et de confirmer si le niveau d'expression d'ER $\alpha$ 36 est réellement un critère à prendre en compte en clinique lors de l'établissement d'un pronostic et/ou au moment du choix de la thérapeutique. De plus, une limite de notre étude est d'avoir travaillé avec des échantillons récoltés dans les années 1990, puisque les informations, quant à la thérapeutique utilisée ou encore le devenir des patientes, n'avaient pas été renseignées. C'est pourquoi actuellement, un projet prospectif d'analyse de tumeurs mammaires a été initié en collaboration avec l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Il a pour but de comprendre les bases moléculaires des échecs thérapeutiques dans le traitement des tumeurs mammaires hormonosensibles en déterminant l'implication de certaines voies de

signalisation et de réseaux de gènes dépendants d'ER $\alpha$ 36, les mécanismes potentiels de sa régulation et leurs relations avec les données cliniques

Nous nous sommes intéressés principalement à classifier nos échantillons en fonction de l'expression d'ER $\alpha$ 36, mais il est à noter que d'autres gènes pourraient également être de bons classificateurs de tumeurs mammaires, afin, tout comme ER $\alpha$ 36, d'apporter des précisions sur le devenir tumoral. Ainsi d'autres marqueurs comme DDB2 peuvent permettre de discriminer des échantillons tumoraux en fonction de leurs interactions géniques. Cette méthode alliant l'analyse d'expression génique par PCR quantitative et la modélisation des interactions géniques par des programmes sur Matlab se veut générique du fait d'être adaptable à tout type de gène d'intérêt.

## **II. ER $\alpha$ 36 : acteur du développement anormal de la glande mammaire ?**

### **1. Discussion des résultats *in vivo* et *in vitro***

La glande mammaire est un organe dont la différenciation est notamment dépendante du récepteur aux œstrogènes  $\alpha$ . Par ailleurs, le niveau d'expression et l'activité d'ER $\alpha$ 36 sont des facteurs clés de la progression tumorale mammaire. De ce fait, nous nous sommes demandés si l'expression du variant ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire saine ou dans des cellules épithéliales mammaires était nécessaire et/ou suffisante pour modifier le développement ou le fonctionnement de l'épithélium mammaire.

Nous avons étudié cette question en confrontant des analyses *in vitro* (transcriptome, analyse des voies de signalisation) et des analyses *in vivo* où nous avons travaillé avec une lignée de souris transgéniques C57BL/6J KI ER $\alpha$ 36. La première génération F0 transgénique a été obtenue par injection de la construction chimérique MMTV/ER $\alpha$ 36 dans l'un des pronuclei d'une souris hybride B6SJLF2 (Hutchinson and Muller, 2000; Jones and Stern, 1999). Nous avons montré que cette construction confère aux souris obtenues une expression du variant spécifiquement dans la glande mammaire.

Les analyses bioinformatiques d'enrichissement de nos données nous ont permis de cibler plus précisément certains mécanismes dépendants d'ER $\alpha$ 36 souvent mis en lumière dans la littérature

concernant les cellules cancéreuses. Après surexpression d'ER $\alpha$ 36 dans des cellules épithéliales mammaires saines MCF-10A, nous avons ainsi observé que cette expression serait à l'origine de l'activation de voies conduisant à la prolifération, la survie et migration cellulaire. Cette observation s'appuie à la fois sur l'analyse bioinformatique, ainsi que l'étude de caractéristiques de ces voies telles que l'étude du cycle cellulaire ou encore l'échappement à l'apoptose. Ces résultats complètent ce qui était préalablement observé dans le contexte tumoral, ainsi que dans des revues parues récemment (Schwartz et al., 2016; Wang and Yin, 2015; Zhang and Wang, 2013).

La surexpression d'ER $\alpha$ 36 conduirait donc à l'activation des voies JAK/STAT, mais aussi MAPK, PI3K/Akt et ERK, également dans les cellules saines et en absence d'apport contrôlé de ligand supplémentaire, ce qui contribue à augmenter la survie et la migration. De plus, le phénotype observé est similaire à nos observations dans le premier chapitre de la discussion, à savoir un lien entre l'expression d'ER $\alpha$ 36 et l'expression de marqueurs caractéristiques de la migration cellulaire, et donc une augmentation du potentiel migratoire de cellules épithéliales mammaires saines.

Pour étudier le rôle de l'expression d'ER $\alpha$ 36 dans le développement de la glande mammaire, nous avons travaillé avec une espèce qui n'exprime pas naturellement ce variant. Nous avons élaboré une souche de souris C57BL/6J exprimant spécifiquement ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire comme décrit précédemment (Hutchinson and Muller, 2000). L'expression du variant au sevrage de la descendance C57BL/6J KI ER $\alpha$ 36 n'a pas montré de fuite du transgène dans d'autres organes, comme il avait été décrit dans la glande salivaire pour EGFR (Brandt et al., 2000). De plus, nous avons constaté l'absence de modifications entre les glandes mammaires WT et KI ER $\alpha$ 36 à ce stade, où la différenciation de la glande mammaire est partielle. Les prélèvements réalisés chez les souris femelles adultes ont permis d'observer des modifications de l'épithélium mammaire chez les KI ER $\alpha$ 36 par rapport aux souris WT. Ces observations relatives à une amplification du phénotype laisseraient donc penser que les hormones endogènes produites à partir de la puberté dans la glande mammaire participent à une désorganisation de l'organe en présence d'ER $\alpha$ 36. Ces hormones endogènes sont des ligands potentiels d'ER $\alpha$ 36, ce qui fait de notre modèle unique de souris C57BL/6J KI ER $\alpha$ 36 un modèle pertinent pour l'étude des effets de ligands potentiels du variant ou d'activateurs indirects des voies ER $\alpha$ 36-dépendantes *in vivo*.

Pour aller plus loin dans le projet, comprendre les liens entre l'expression d'ER $\alpha$ 36 *in vitro* et *in vivo* et les mécanismes identifiés durant la thèse, comme la résistance à l'apoptose ou encore

l'augmentation de la migration, seraient d'un grand intérêt, afin notamment de cibler plus spécifiquement les acteurs pouvant conduire à une différenciation pathologique de la glande mammaire. C'est pourquoi diverses approches peuvent être conduites, en étudiant notamment les marqueurs caractéristiques de la morphogénèse de la glande mammaire et le rôle d'ER $\alpha$ 36 dans la modulation de ces activités.

Ainsi, nous pouvons nous demander si les altérations de l'épithélium mammaire constatées pourraient nécessiter la présence et/ou l'activité d'autres récepteurs. En 2014, Sjöström et collègues ont étudié le niveau d'expression et la localisation du récepteur membranaire aux œstrogènes GPER dans des échantillons de tumeurs mammaires. Ils constatent qu'une surexpression de ce récepteur, ainsi qu'une localisation à la membrane plasmique sont de mauvais pronostic pour les patientes atteintes de tumeurs mammaires, entraînant des événements relatifs à la progression tumorale (taille de la tumeur, grade histologique...). Au contraire, une faible expression est corrélée à une amélioration du pronostic à long terme pour les patientes ER+/PR+ traitées au tamoxifène (Sjöström et al., 2014).

Par ailleurs, ERR $\alpha$  ne lie pas les œstrogènes malgré des homologies structurales de la protéine avec les ER, toutefois son expression a été préférentiellement associée avec les tissus néoplasiques et les tumeurs surexprimant ERR $\alpha$  sont plus invasives et présentent une récurrence plus importante. Néanmoins, une surexpression de ce récepteur réduit la progression métastatique dans les tissus osseux (Fradet et al., 2011; Misawa and Inoue, 2015).

Pour ce qui est d'EGFR, son expression est corrélée à un mauvais pronostic et serait à l'origine de la transition épithélio-mésenchymateuse. De plus, il est exprimé dans environ la moitié des cas de tumeurs TN surexprimant EGFR (Masuda et al., 2012). Enfin de nombreux modèles de rongeurs surexprimant HER2 dans la glande mammaire ont été élaborés depuis 20 ans. Le récepteur étant déjà reconnu comme un bon marqueur de la progression tumorale, les études *in vivo* ont permis d'identifier les partenaires de HER2 (Ursini-Siegel et al., 2007). De même, l'interaction physique entre HER2 et ER $\alpha$ 36 a été constaté *in vitro* dans la lignée cellulaire SK-BR3 (Kang et al., 2011).

Au vu des interactions entre plusieurs de ces récepteurs, il serait intéressant d'étudier la physiopathologie de la glande mammaire dépendante d'ER $\alpha$ 36 en évaluant le rôle de ces différents récepteurs sur ce processus multifactoriel (Tu et al., 2011; Yin and Wang, 2016; Zhang et al., 2011).

De plus, nous avons également prélevé les ovaires des femelles KI ER $\alpha$ 36, il pourrait être pertinent de comparer les aspects tissulaires, ainsi que moléculaires de ces organes pour voir s'il y aurait également un impact d'une expression spécifique à la glande mammaire sur d'autres organes reproducteurs. De même les testicules des mâles de cette lignée ont été prélevés au sevrage et à l'âge adulte, certains individus post-pubertaires présentaient des amas de cellules interstitielles entre les canaux séminifères. Or, nous n'avons pas retrouvé d'expression d'ER $\alpha$ 36 dans cet organe. L'expression de ce variant de récepteur aux œstrogènes  $\alpha$  spécifique de la glande mammaire est peut être responsable d'autres mécanismes hormono-dépendants dans des organes indépendants. Comprendre comment et avec qui interagit ER $\alpha$ 36 pour arriver à modifier l'organisation du tissu testiculaire peut permettre d'élucider le rôle fonctionnel du récepteur.

## **2. Apport de l'aspect pluridisciplinaire de cette étude**

Grâce aux analyses bioinformatiques réalisées avec les données du transcriptome des cellules MCF-10A/ER $\alpha$ 36, nous avons pu mettre en exergue les termes GO, les voies de signalisations et les régulateurs maîtres enrichis dans nos résultats. Ces analyses nous ont permis de prédire les régulateurs en amont des gènes différentiellement exprimés dans la lignée cellulaire surexprimant le variant de récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes. La combinaison de ces différentes techniques forme une étude complémentaire qui cible la voie de TGF $\beta$  comme étant modulée par une expression d'ER $\alpha$ 36 dans des cellules normales de la glande mammaire. C'est pourquoi, l'étude des différents acteurs de cette voie pourrait également apporter plus de connaissances dans l'initiation d'un processus tumoral de la glande mammaire en présence d'ER $\alpha$ 36.

### **III. Les PE jouent-ils un rôle dans le développement anormal de la glande mammaire sous le contrôle d'ER $\alpha$ 36 ?**

Avant ma thèse, Hussein Ajj avait montré qu'en présence d'un mélange de perturbateurs endocriniens la prolifération de cellules de séminomes *in vivo* et *in vitro* était induite, tout comme l'expression d'ER $\alpha$ 36 (Ajj et al., 2013).

Aussi durant ma thèse, j'ai étudié les effets du même mélange d'alkylphénols dans l'acquisition de caractéristiques typiques d'une initiation tumorale dans la glande mammaire *in vivo* et *in vitro* sous le contrôle ou non d'ER $\alpha$ 36.

#### **1. Conséquences d'une exposition aux alkylphénols *in vivo***

Dans la littérature, il était montré dès 1991 que le NP à 1 $\mu$ M stimulait la croissance de cellules tumorales mammaires ER+, les MCF-7 (Soto et al., 1991). En 1996 était décrit également chez des rattes Noble adultes qu'une exposition à des doses de 0,1 à 7,1 mg par jour de NP entraînait une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales mammaires (Colerangle and Roy, 1996). Durant ma thèse, nous avons constaté que l'exposition au M4 à une dose environnementale de cellules épithéliales mammaires saines était suivie d'une augmentation du nombre de cellules vivantes après 24h. La NOAEL du NP a été fixée à 15 mg/kg/jour (WHO 2004), or de nombreuses études étaient jusqu'alors réalisées avec des doses supérieures. *In vivo*, l'impact d'une exposition aux alkylphénols pendant la gestation a été étudiée chez les modèles rat et souris durant la gestation. Des études ont ainsi montré qu'une exposition en fin de gestation chez le rat Sprague-Dawley à des doses supérieures à la NOAEL n'entraînait pas d'effet reprotoxique dans la descendance (Chapin et al., 1999; Tyl et al., 2006). Par contre, l'exposition quotidienne à de fortes doses de NP chez la souris FVB/NJ MMTVNeu et le rat Long Evans amène cette fois à une modification du développement de la glande mammaire de la génération F1, ainsi qu'à une modification du métabolisme des stéroïdes (Acevedo et al., 2005; Moon et al., 2007).

Lors de notre étude, *in vivo*, nous avons exposé des femelles durant leur gestation à différentes doses environnementales, 3000 fois inférieures à la NOAEL du NP. Ces femelles avaient été

accouplées avec un mâle porteur ou non du transgène MMTV-ER $\alpha$ 36 spécifique et/ou descendant d'une femelle exposée aux PE.

Nous avons constaté des modifications de l'architecture de la glande mammaire au sevrage pour les différentes doses testées et cela pour les différentes générations après l'exposition aux perturbateurs endocriniens, indépendamment de l'expression d'ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire. La transmission de ces altérations aux générations non exposées directement ou indirectement semble être validée dans notre étude, comme ils avaient été décrits par d'autres précédemment. Ainsi en 3<sup>ème</sup> génération post-exposition, la glande mammaire au sevrage a un aspect relativement proche de l'hyperplasie atypique canalaire, présentée par Vandenberg et collègues chez la souris CD-1 ou encore par Acevedo et collègues chez le rat Sprague-Dawley exposés au BPA (Acevedo et al., 2013; Vandenberg et al., 2008). Chez le mâle, aucune modification du développement de la glande mammaire n'a été observée, néanmoins l'analyse de coupes de testicules montre une atteinte des cellules germinales qui sont, dans certains tubes séminifères, fortement déplétées au sevrage. Nous avons obtenu une descendance de ces mâles, donc cette altération ne semble pas jouer un rôle dans la fertilité des mâles exposés directement ou indirectement au mélange. Contrairement aux autres études, notre travail était basé sur l'évaluation des effets d'une exposition d'un mélange présent dans notre environnement à des doses comparables et administrée *per os* (voie relative à l'exposition humaine). Cette exposition cible spécifiquement la période critique qu'est la gestation, durant laquelle les effets néfastes des PE sur le développement ont déjà été relatés dans la littérature (Schug et al., 2011). Malgré les restrictions de notre travail (très faibles doses, mélange précis), nous avons retrouvé des phénotypes similaires à ce qui avait été observé par d'autres (Acevedo et al., 2013; Vandenberg et al., 2008). L'exposition par voie orale à un mélange d'alkylphénols à des doses environnementales durant la gestation pourrait suffire à perturber le développement de l'épithélium mammaire de la descendance F1.

La transmission des altérations à la descendance par la lignée mâle nous indique que l'exposition aux perturbateurs endocriniens cible notamment la reprogrammation épigénétique qui a lieu durant la gestation (Cantone and Fisher, 2013). Ceci est en accord avec les conclusions de précédentes recherches au sein de l'équipe. En effet, il avait été montré dans des lignées de cellules séminomateuses que l'exposition aux alkylphénols module l'expression de gènes cibles liés à l'épigénome : les DNMTs (Ajj et al., 2013). Ces protéines sont des éléments clés de la méthylation

de l'ADN et leur activité pourrait être également modifiée à la suite du traitement dans le contexte de la glande mammaire. Prusinski et collègues reprennent que l'exposition à des polluants environnementaux, altérant le système endocrinien, peut, à certaines périodes critiques de la vie, comme la gestation, entraîner des altérations de l'épigénome *via* les opérateurs HMTs et DNMTs (Prusinski et al., 2016). Ainsi, il a également été présenté récemment dans le modèle poisson zèbre qu'une exposition au BPA des ascendants mâles pendant la spermatogénèse était à l'origine de malformations transgénérationnelles du tissu cardiaque (Lombó et al., 2015). De plus, Guerrero-Bosagna et Skinner soulignent le fait que l'exposition à des polluants environnementaux serait à l'origine, entre autres, de l'infertilité masculine *via* des effets épigénétiques transgénérationnels (Guerrero-Bosagna and Skinner, 2014).

Les effets d'une exposition à des polluants environnementaux seraient différents en fonction du public exposé, de plus, l'étude des phénomènes engendrés est complexe de par la multitude de paramètres intervenant dans les processus (Crews et al., 2014). Les alkylphénols étant présents dans des plastiques de la vie courante (produits ménagers, alimentaires), tout un chacun y est exposé et cela, notamment à certaines périodes critiques du développement (périnatalité, puberté). Afin d'explorer cette thématique, il est envisageable de poursuivre la recherche de marqueurs de modifications épigénétiques dans le contexte d'une différenciation pathologique de la glande mammaire suite à une exposition à un mélange d'alkylphénols à faible dose. De plus, l'expression d'ER $\alpha$ 66 dans les cancers du sein est déjà décrite dans la littérature comme étant sous le contrôle de la méthylation de son promoteur. Ainsi, une hyperméthylation d'ilots CpG à proximité du promoteur d'ESR1 serait responsable de la répression de l'expression d'ER $\alpha$ , conduisant à un pronostic plus mauvais pour la patiente concernée. L'utilisation d'agents déméthylants ou d'inhibiteurs de HDAC est d'ailleurs envisager comme thérapies pour les tumeurs ER- (Giacinti et al., 2006). Pour compléter ce propos, d'autres équipes ont précisé qu'un traitement à la génistéine à une dose physiologique restaure l'expression d'ER $\alpha$ , rendant la tumeur sensible au tamoxifène *in vivo* et *in vitro* (Li et al., 2013b). De ce fait, les modifications épigénétiques du promoteur d'ER $\alpha$ , impliquées dans la différenciation pathologique de l'organe, pourraient être invalidées afin d'améliorer la prise en charge thérapeutiques des patientes.

Dans notre étude, nous avons utilisé le modèle murin et avons étudié les effets des PE au sevrage. Des animaux ont été gardés pour chaque dose et chaque génération, afin d'étudier les effets à l'âge



adulte, c'est-à-dire à un stade plus avancé du développement de la glande mammaire, en présence d'hormones endogènes. Toutefois, il est à noter que le développement de la glande mammaire ne peut être complet qu'après gestation et lactation. Notre étude *in vivo* vise donc principalement à observer des modifications du développement de la glande mammaire. En effet, l'exposition à certains xénobiotiques de la famille des alkylphénols peut amener à des altérations de la mammogénèse pouvant conduire à un risque accru de développement d'un cancer du sein. Sur ce point, le travail *in vivo* montre effectivement qu'une simple exposition à la dose environnementale de 0,5µg/kg/jour du mélange d'alkylphénols suffit, chez la souris, à provoquer des modifications anormales de l'épithélium de la glande mammaire et cela également de manière transgénérationnelle. Il serait intéressant d'observer si les individus adultes présentent également cette désorganisation. De même, nous pouvons nous demander si les résultats auraient été modifiés (comportement reproducteur inadéquat, lactation anormale, transmission d'anomalies du développement), si nous avions choisi de travailler avec la descendance femelle. Sachant que la reprogrammation épigénétique chez la femelle ne se déroule pas au moment de l'exposition fœtale de nos expériences, les effets multigénérationnels et transgénérationnels ne seraient peut-être pas les mêmes (Bourc'his and Proudhon, 2008). Dans une étude sur les effets du BPA et du DES, la transmission des effets de l'exposition par la descendance femelle a été observée. L'exposition de la femelle F0 avait été réalisée du stade E11 à la naissance. Ils ont constaté qu'une exposition au BPA altère les capacités reproductives de manière transgénérationnelle, ce qui tend à montrer l'établissement de modifications transmissibles à la descendance dues au BPA. Ces modifications de facteurs épigénétiques ont pu être la conséquence de l'altération du comportement maternel (Ziv-Gal et al., 2015). De même, des effets transgénérationnels d'altérations de l'appareil reproducteur sont aussi relevés après exposition néonatale de souris femelles à la génistéine (25mg/kg/jour). Cette période d'exposition correspond à la période de reprogrammation du génome chez la femelle, ce qui explique l'observation d'effets transgénérationnels après transmission par la descendance femelle (Jefferson et al., 2007).

Par ailleurs, nous avons observé au sevrage pour les souris KI ERα36 exposées au M4 *via* la femelle P0 que des altérations du développement de la glande mammaire (dilatation de la lumière, amincissement de l'épithélium, épaississement du stroma) étaient relevées pour la dose environnementale de 0,5µg/kg/jour en F3, par comparaison avec la D0. Ainsi donc, les alkylphénols en présence du récepteur ERα36 induiraient l'apparition d'un phénotype similaire aux

souris femelles KI ER $\alpha$ 36 adultes. Les alkylphénols pourraient donc être déclencheur, à une dose environnementale administrée *per os* pendant la gestation de la femelle P0, de modifications transgénérationnelles au sevrage de l'épithélium mammaire en présence d'ER $\alpha$ 36. Les résultats de l'exposition aux alkylphénols de la descendance adulte KI ER $\alpha$ 36 sont en cours d'obtention et permettront de visualiser l'impact d'une surexpression d'ER $\alpha$ 36 sur le développement de la glande mammaire en présence de PE et d'œstrogènes endogènes.

## **2. Conséquences d'une exposition aux alkylphénols *in vitro***

En parallèle du projet *in vivo*, nous avons également étudié les effets d'un traitement aux alkylphénols dans la lignée épithéliale mammaire MCF-10A. L'analyse bioinformatique des résultats du transcriptome a permis de mettre en avant l'enrichissement des termes GO : prolifération cellulaire, cycle cellulaire et apoptose. De même, après exposition des cellules au mélange, les gènes différentiellement exprimés appartenaient pour une majorité au réseau KEGG : « Pathways in cancer ». Ces résultats *in silico* indiquent une modification du comportement des cellules épithéliales à la suite de l'exposition aux alkylphénols. Nous avons par la suite confirmé par des méthodes *in vitro* une induction de l'expression de cyclines, ainsi que du nombre de cellules vivantes après traitement. De même, l'exposition aux alkylphénols semble conférer aux cellules MCF-10A une résistance à l'apoptose induite par la staurosporine. Cette résistance avait déjà été décrite après exposition au NP ou au BPA (10 $\mu$ M) de cellules neuronales prélevées chez des rats Sprague-Dawley à E18 (Negishi et al., 2003). Nous avons poursuivi l'analyse du comportement des cellules épithéliales en présence du M4 avec l'étude de la stabilité génomique par une technique d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD) et nous avons constaté une altération de cette stabilité. Enfin, en présence de PE, les cellules MCF-10A acquièrent un potentiel migratoire plus important et expriment des marqueurs caractéristiques de l'EMT tels que MMP9, SNAI2, VIM et CDH2. Ces différents résultats *in vitro*, combinés aux résultats *in vivo* pourraient indiquer un rôle des PE dans la modification pathologique de l'épithélium mammaire. Nous pouvons alors faire le parallèle avec une revue récente, décrivant les mêmes mécanismes après exposition au BPA ou phtalates de cellules hormonosensibles (mammaires, ovariennes) : EMT, prolifération, résistance à l'apoptose (Oral et al., 2016)

Del Pup et collègues décrivent également que le BPA peut interagir avec PXR et AR (Del Pup et al., 2016). Nous pouvons nous demander si les effets des alkylphénols médiés par ER $\alpha$ 36 voient également ces deux récepteurs intervenir dans cette signalisation. Il serait intéressant de pouvoir étudier d'autres éléments clés des voies en amont de la prolifération, migration cellulaire et résistance à l'apoptose constatées dans les cellules épithéliales mammaires MCF-10A.

Nous avons commencé à mettre au point de la culture organotypique de glande mammaire, ce qui pourrait permettre la mise en évidence d'interaction entre les différents types cellulaires de la glande mammaire : l'épithélium et le stroma (Pei et al., 2004). Les modalités de mise en place de la technique sont en cours de mises au point actuellement.

### **3. Apport de l'aspect pluridisciplinaire de cette étude**

Tout comme pour l'étude de l'expression d'ER $\alpha$ 36, nous avons, à partir de l'analyse bioinformatique du transcriptome des cellules exposées aux alkylphénols et/ou transfectées par ER $\alpha$ 36, réalisé de l'enrichissement de données (termes GO, voies KEGG). Nous avons ainsi pu apprendre les prédictions *in silico* de modifications moléculaires opérées dans nos cellules après une cinétique d'exposition au M4 (comme décrit précédemment dans le II). De plus, nous avons tenté de déterminer quels étaient les régulateurs prédits en amont de nos gènes différentiellement exprimés. Dans le cas des cellules MCF-10A exposées au M4, HER2 fait partie des premiers régulateurs maitres prédits aux différents temps d'exposition au PE (1h, 8h et 24h). Ce gène étant un marqueur clé dans le cancer du sein, nous avons identifié puis étudié quels étaient les régulateurs intermédiaires entre les gènes cibles des alkylphénols et le régulateur maitre HER2. Ces régulateurs intermédiaires pour les différents temps sont notamment IL6, ERK1/2, EGFR, des gènes clés décrits dans la littérature pour leur rôle dans la tumorigénèse mammaire (Casneuf et al., 2016; Zhang et al., 2011, 2012b). Il serait particulièrement intéressant de poursuivre l'analyse de ces résultats *in silico*. En effet, nous pourrions cibler encore plus précisément les analyses *in vitro* à réaliser pour la compréhension des mécanismes physiologiques activés en réponse à une exposition aux alkylphénols de cellules épithéliales mammaires. De même, l'analyse comparée des résultats des transcriptomes réalisées dans les cellules MCF-10A/ER $\alpha$ 36, ainsi que dans les cellules séminomateuses pendant la thèse d'Hussein Ajj, pourrait également apporter un plus à la compréhension des mécanismes dépendants du variant (Ajj et al., 2013).

# **Conclusion**

En conclusion, ce travail de thèse aura permis d'étudier un peu plus précisément le rôle d'ER $\alpha$ 36 dans l'initiation et la progression du cancer du sein.

À la suite de l'analyse d'échantillons de tumeurs mammaires, il apparaît que le niveau d'expression de ce variant du récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes pourrait être pertinent à déterminer afin de personnaliser le statut moléculaire de chaque tumeur mammaire. En effet, dans le but de mieux orienter la thérapeutique à utiliser, plus particulièrement pour les tumeurs ER+ traitées par des anti-œstrogènes tels que le tamoxifène, connaître le niveau d'expression d'ER $\alpha$ 36 peut permettre d'améliorer la prise en charge thérapeutique et donc à terme d'améliorer la survie de la patiente. De plus, notre étude est basée sur une technique générique, facilement adaptable à l'étude d'autres marqueurs prédictifs, dans le but d'améliorer la compréhension des mécanismes d'interaction génique.

L'acquisition ER $\alpha$ 36-dépendante de propriétés relatives à une désorganisation de la glande mammaire avec modification de l'épithélium *in vivo* chez la souris et acquisition de propriétés caractéristiques d'une transformation tumorale de cellules épithéliales mammaires *in vitro* tend à montrer que l'exposition à un mélange d'alkylphénols, ubiquitaires dans notre environnement et plus particulièrement à certaines périodes critiques du développement, est un facteur de risque de développer un cancer du sein à long terme.

Afin de poursuivre les recherches à la suite de cette thèse, l'exploration et la caractérisation plus précise de l'implication d'ER $\alpha$ 36 dans la différenciation normale et pathologique de la glande mammaire peuvent permettre d'étendre les connaissances sur le sujet. Et dans ce contexte, l'étude des ligands potentiels du récepteur dont font partie les PE peut permettre de comprendre le mode d'action du variant dans les cellules normales et tumorales mammaires. De même l'étude des régulateurs à l'origine de l'activité d'ER $\alpha$ 36 ou qui amplifient son expression est envisagée.

# Références bibliographiques

## **A, B....**

Acevedo, N., Davis, B., Schaeberle, C.M., Sonnenschein, C., and Soto, A.M. (2013). Perinatally administered bisphenol a as a potential mammary gland carcinogen in rats. *Environ. Health Perspect.* 121, 1040–1046.

Acevedo, R., Parnell, P.G., Villanueva, H., Chapman, L.M., Gimenez, T., Gray, S.L., and Baldwin, W.S. (2005). The contribution of hepatic steroid metabolism to serum estradiol and estriol concentrations in nonylphenol treated MMTVneu mice and its potential effects on breast cancer incidence and latency. *J. Appl. Toxicol. JAT* 25, 339–353.

Ahmed, S.A. (2000). The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. *Toxicology* 150, 191–206.

Ajj, H., Chesnel, A., Pinel, S., Plenat, F., Flament, S., and Dumond, H. (2013). An alkylphenol mix promotes seminoma derived cell proliferation through an ERalpha36-mediated mechanism. *PloS One* 8, e61758.

Alavanja, M.C.R., Hoppin, J.A., and Kamel, F. (2004). Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health* 25, 155–197.

Albanito, L., Madeo, A., Lappano, R., Vivacqua, A., Rago, V., Carpino, A., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R., Musti, A.M., Andò, S., et al. (2007). G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 67, 1859–1866.

Alexander, C.M., Selvarajan, S., Mudgett, J., and Werb, Z. (2001). Stromelysin-1 regulates adipogenesis during mammary gland involution. *J. Cell Biol.* 152, 693–703.

Al-Sader, H., Abdul-Jabar, H., Allawi, Z., and Haba, Y. (2009). Alcohol and breast cancer: the mechanisms explained. *J. Clin. Med. Res.* 1, 125–131.

Andersen, H.R., Andersson, A.M., Arnold, S.F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N.A., Bjerregaard, P., Christiansen, L.B., Gissel, B., Hummel, R., et al. (1999). Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.* 107 Suppl 1, 89–108.

Andres, A.C., and Strange, R. (1999). Apoptosis in the estrous and menstrual cycles. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 4, 221–228.

Andrews, Z.B., Kokay, I.C., and Grattan, D.R. (2001). Dissociation of prolactin secretion from tuberoinfundibular dopamine activity in late pregnant rats. *Endocrinology* 142, 2719–2724.

Apostolou, P., and Fostira, F. (2013). Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *BioMed Res. Int.* 2013, 747318.

Aranda, A., and Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* 81, 1269–1304.

de Assis, S., Warri, A., Cruz, M.I., Laja, O., Tian, Y., Zhang, B., Wang, Y., Huang, T.H.-M., and Hilakivi-Clarke, L. (2012). High-fat or ethinyl-oestradiol intake during pregnancy increases mammary cancer risk in several generations of offspring. *Nat. Commun.* 3, 1053.

Aubard, Y., and Magne, I. (2000). Carbon monoxide poisoning in pregnancy. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 107, 833–838.

Autier P., Boffetta P., Boniol M., Boyle P., Ferlay J., Aurengo A., Masse R., de Thé G., Monier R., Tubiana M., Valleron A.J. and Hill C. (2007). Les causes du cancer en France. Rapport du CIRC, INCa et InVS.

Badve, S., Turbin, D., Thorat, M.A., Morimiya, A., Nielsen, T.O., Perou, C.M., Dunn, S., Huntsman, D.G., and Nakshatri, H. (2007). FOXA1 expression in breast cancer--correlation with luminal subtype A and survival. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 4415–4421.

Barton, M. (2012). Position paper: The membrane estrogen receptor GPER--Clues and questions. *Steroids* 77, 935–942.

Baxter, F.O., Neoh, K., and Tevendale, M.C. (2007). The beginning of the end: death signaling in early involution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 12, 3–13.

Berkey, C.S., Gardner, J.D., Frazier, A.L., and Colditz, G.A. (2000). Relation of childhood diet and body size to menarche and adolescent growth in girls. *Am. J. Epidemiol.* 152, 446–452.

Bhandari, R.K., Vom Saal, F.S., and Tillitt, D.E. (2015). Transgenerational effects from early developmental exposures to bisphenol A or 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in medaka, *Oryzias latipes*. *Sci. Rep.* 5, 9303.

Bhat-Nakshatri, P., Campbell, R.A., Patel, N.M., Newton, T.R., King, A.J., Marshall, M.S., Ali, S., and Nakshatri, H. (2004). Tumour necrosis factor and PI3-kinase control oestrogen receptor alpha protein level and its transrepression function. *Br. J. Cancer* 90, 853–859.

Binder-Foucard, F., Bossard, N., Delafosse, P., Belot, A., Woronoff, A.-S., Remontet, L., and the French network of cancer registries (Francim) (2014). Cancer incidence and mortality in France over the 1980-2012 period: Solid tumors. *Rev. Epidemiol. Sante Publique.*

Birnbaum, L.S., and Fenton, S.E. (2003). Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ. Health Perspect.* 111, 389–394.

Björnström, L., and Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 19, 833–842.

Blick, T., Widodo, E., Hugo, H., Waltham, M., Lenburg, M.E., Neve, R.M., and Thompson, E.W. (2008). Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines. *Clin. Exp. Metastasis* 25, 629–642.

Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., and Main, K.M. (2012). Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Mol. Cell. Endocrinol.* 355, 240–248.



- Bocchinfuso, W.P., Lindzey, J.K., Hewitt, S.C., Clark, J.A., Myers, P.H., Cooper, R., and Korach, K.S. (2000). Induction of mammary gland development in estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology* 141, 2982–2994.
- Bode, A.M., and Dong, Z. (2009). Cancer prevention research - then and now. *Nat. Rev. Cancer* 9, 508–516.
- Bøgh, I.B., Christensen, P., Dantzer, V., Groot, M., Thøfner, I.C., Rasmussen, R.K., Schmidt, M., and Greve, T. (2001). Endocrine disrupting compounds: effect of octylphenol on reproduction over three generations. *Theriogenology* 55, 131–150.
- Bourc'his, D., and Proudhon, C. (2008). Sexual dimorphism in parental imprint ontogeny and contribution to embryonic development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 282, 87–94.
- Bouskine, A., Nebout, M., Brücker-Davis, F., Benahmed, M., and Fenichel, P. (2009). Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ. Health Perspect.* 117, 1053–1058.
- Brady, N.J., Chuntova, P., and Schwertfeger, K.L. (2016). Macrophages: Regulators of the Inflammatory Microenvironment during Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Mediators Inflamm.* 2016, 4549676.
- Brandt, R., Eisenbrandt, R., Leenders, F., Zschesche, W., Binas, B., Juergensen, C., and Theuring, F. (2000). Mammary gland specific hEGF receptor transgene expression induces neoplasia and inhibits differentiation. *Oncogene* 19, 2129–2137.
- Brenner, D.R., Brockton, N.T., Kotsopoulos, J., Cotterchio, M., Boucher, B.A., Courneya, K.S., Knight, J.A., Olivotto, I.A., Quan, M.L., and Friedenreich, C.M. (2016). Breast cancer survival among young women: a review of the role of modifiable lifestyle factors. *Cancer Causes Control CCC* 27, 459–472.
- Brinton, L.A., Sherman, M.E., Carreon, J.D., and Anderson, W.F. (2008). Recent trends in breast cancer among younger women in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 1643–1648.
- Briskin, C., and Ataca, D. (2015). Endocrine hormones and local signals during the development of the mouse mammary gland. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 4, 181–195.
- Briskin, C., and O'Malley, B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003178.

## **C, D....**

- Camarillo, I.G., Thordarson, G., Moffat, J.G., Van Horn, K.M., Binart, N., Kelly, P.A., and Talamantes, F. (2001). Prolactin receptor expression in the epithelia and stroma of the rat mammary gland. *J. Endocrinol.* 171, 85–95.

- Cantone, I., and Fisher, A.G. (2013). Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 282–289.
- Capuco, A.V., and Akers, R.M. (2009). The origin and evolution of lactation. *J. Biol.* 8, 37.
- Carmichael, A., Sami, A.S., and Dixon, J.M. (2003). Breast cancer risk among the survivors of atomic bomb and patients exposed to therapeutic ionising radiation. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* 29, 475–479.
- Casals-Casas, C., and Desvergne, B. (2011). Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 135–162.
- Casneuf, T., Axel, A.E., King, P., Alvarez, J.D., Werbeck, J.L., Verhulst, T., Verstraeten, K., Hall, B.M., and Sasser, A.K. (2016). Interleukin-6 is a potential therapeutic target in interleukin-6 dependent, estrogen receptor- $\alpha$ -positive breast cancer. *Breast Cancer Dove Med. Press* 8, 13–27.
- Castells, X., Domingo, L., Corominas, J.M., Torá-Rocamora, I., Quintana, M.J., Baré, M., Vidal, C., Natal, C., Sánchez, M., Saladié, F., et al. (2015). Breast cancer risk after diagnosis by screening mammography of nonproliferative or proliferative benign breast disease: a study from a population-based screening program. *Breast Cancer Res. Treat.* 149, 237–244.
- Chamard-Jovenin, C., Jung, A.C., Chesnel, A., Abecassis, J., Flament, S., Ledrappier, S., Macabre, C., Boukhobza, T., and Dumond, H. (2015). From ER $\alpha$ 66 to ER $\alpha$ 36: a generic method for validating a prognosis marker of breast tumor progression. *BMC Syst. Biol.* 9, 28.
- Chamkasem, A., and Toniti, W. (2015). Sequence to structure approach of estrogen receptor alpha and ligand interactions. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 16, 2161–2166.
- Chapin, R.E., Delaney, J., Wang, Y., Lanning, L., Davis, B., Collins, B., Mintz, N., and Wolfe, G. (1999). The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 52, 80–91.
- Chaudhri, R.A., Olivares-Navarrete, R., Cuenca, N., Hadadi, A., Boyan, B.D., and Schwartz, Z. (2012). Membrane estrogen signaling enhances tumorigenesis and metastatic potential of breast cancer cells via estrogen receptor- $\alpha$ 36 (ER $\alpha$ 36). *J. Biol. Chem.* 287, 7169–7181.
- Chaudhri, R.A., Hadadi, A., Lobachev, K.S., Schwartz, Z., and Boyan, B.D. (2014). Estrogen receptor-alpha 36 mediates the anti-apoptotic effect of estradiol in triple negative breast cancer cells via a membrane-associated mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Chavez-Rueda, K., Hernández, J., Zenteno, E., Leños-Miranda, A., Legorreta-Haquet, M.V., and Blanco-Favela, F. (2005). Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 116, 182–191.
- Clarke, C.A., Glaser, S.L., Uratsu, C.S., Selby, J.V., Kushi, L.H., and Herrinton, L.J. (2006). Recent declines in hormone therapy utilization and breast cancer incidence: clinical and population-based evidence. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, e49-50.

Clavel-Chapelon, F., and E3N-EPIC Group (2002). Differential effects of reproductive factors on the risk of pre- and postmenopausal breast cancer. Results from a large cohort of French women. *Br. J. Cancer* 86, 723–727.

Cogliano, V., Grosse, Y., Baan, R., Straif, K., Secretan, B., El Ghissassi, F., and WHO International Agency for Research on Cancer (2005). Carcinogenicity of combined oestrogen-progestagen contraceptives and menopausal treatment. *Lancet Oncol.* 6, 552–553.

Colditz, G.A., and Frazier, A.L. (1995). Models of breast cancer show that risk is set by events of early life: prevention efforts must shift focus. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 4, 567–571.

Colditz, G.A., Bohlke, K., and Berkey, C.S. (2014). Breast cancer risk accumulation starts early: prevention must also. *Breast Cancer Res. Treat.* 145, 567–579.

Colerangle, J.B., and Roy, D. (1996). Exposure of environmental estrogenic compound nonlyphenol to noble rats alters cell-cycle kinetics in the mammary gland. *Endocrine* 4, 115–122.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1996). Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet Lond. Engl.* 347, 1713–1727.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2012). Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol.* 13, 1141–1151.

Couse, J.F., and Korach, K.S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr. Rev.* 20, 358–417.

Coutts, A.S., and Murphy, L.C. (1998). Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen-nonresponsive human breast cancer cells. *Cancer Res.* 58, 4071–4074.

Cowell, C.F., Weigelt, B., Sakr, R.A., Ng, C.K.Y., Hicks, J., King, T.A., and Reis-Filho, J.S. (2013). Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: revisited. *Mol. Oncol.* 7, 859–869.

Cravedi J.P., Zalko D., Savouret J.F., Menuet A., Jégou B. (2007). Le concept de perturbation endocrinienne et la santé humaine. *Médecine/Sciences* 23 : 198-204.

Crews, D., Gillette, R., Miller-Crews, I., Gore, A.C., and Skinner, M.K. (2014). Nature, Nurture and Epigenetics. *Mol. Cell. Endocrinol.* 398, 42–52.

Dagdemiir, A., Durif, J., Ngollo, M., Bignon, Y.-J., and Bernard-Gallon, D. (2013). Breast cancer: mechanisms involved in action of phytoestrogens and epigenetic changes. *Vivo Athens Greece* 27, 1–9.

Dai, X., Xiang, L., Li, T., and Bai, Z. (2016). Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J. Cancer* 7, 1281–1294.

Dall, G., Risbridger, G., and Britt, K. (2016). Mammary stem cells and parity-induced breast cancer protection- new insights. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*

Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A.D., Murray, C.J.L., Ezzati, M., and Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers) (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet Lond. Engl.* 366, 1784–1793.

Daniel, C.W., and Silberstein, G.B. (2000). Working with the Mouse Mammary End Bud. In *Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer Research*, M.M. Ip, and B.B. Asch, eds. (Springer US), pp. 155–162.

Daubisse-Marliac, L., Delafosse, P., Boitard, J.B., Poncet, F., Grosclaude, P., and Colonna, M. (2010). Breast cancer incidence and time trend in France from 1990 to 2007: a population-based study from two French cancer registries. *Ann. Oncol.* mdq396.

Del Pup, L., Mantovani, A., Cavaliere, C., Facchini, G., Luce, A., Sperlongano, P., Caraglia, M., and Berretta, M. (2016). Carcinogenetic mechanisms of endocrine disruptors in female cancers (Review). *Oncol. Rep.* 36, 603–612.

Deng, H., Huang, X., Fan, J., Wang, L., Xia, Q., Yang, X., Wang, Z., and Liu, L. (2010). A variant of estrogen receptor- $\alpha$ , ER- $\alpha$ 36 is expressed in human gastric cancer and is highly correlated with lymph node metastasis. *Oncol. Rep.* 24, 171–176.

Deome, K.B., Faulkin, L.J., Bern, H.A., and Blair, P.B. (1959). Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res.* 19, 515–520.

Deugnier, M.-A., Teulière, J., Faraldo, M.M., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2002). The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res.* 4, 224–230.

Dietel, M. (2010). Hormone replacement therapy (HRT), breast cancer and tumor pathology. *Maturitas* 65, 183–189.

Dobrzycka, K.M., Townson, S.M., Jiang, S., and Oesterreich, S. (2003). Estrogen receptor corepressors -- a role in human breast cancer? *Endocr. Relat. Cancer* 10, 517–536.

Dodds, E. OEstrogenic Activity of Certain Synthetic Compounds : Abstract : *Nature*. N°3562. Feb. 5, 1938.

Dumalaon-Canaria, J.A., Hutchinson, A.D., Prichard, I., and Wilson, C. (2014). What causes breast cancer? A systematic review of causal attributions among breast cancer survivors and how these compare to expert-endorsed risk factors. *Cancer Causes Control CCC* 25, 771–785.

## **E, F....**

Edwards, D.P. (2005). Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 335–376.

Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M.-J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., and Habert, R. (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil. Steril.* 103, 11–21.

Elbaradie, K.B.Y., Wang, Y., Boyan, B.D., and Schwartz, Z. (2013). Sex-specific response of rat costochondral cartilage growth plate chondrocytes to 17 $\beta$ -estradiol involves differential regulation of plasma membrane associated estrogen receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 1165–1172.

Ennen, M., Klotz, R., Touche, N., Pinel, S., Barbieux, C., Besancenot, V., Brunner, E., Thiebaut, D., Jung, A.C., Ledrappier, S., et al. (2013). DDB2: a novel regulator of NF- $\kappa$ B and breast tumor invasion. *Cancer Res.* 73, 5040–5052.

Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J.A., and Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* 38, 698–707.

Faraldo, M.M., Teulière, J., Deugnier, M.-A., Taddei-De La Hossieraye, I., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2005). Myoepithelial cells in the control of mammary development and tumorigenesis: data from genetically modified mice. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 10, 211–219.

Fata, J.E., Chaudhary, V., and Khokha, R. (2001). Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17 $\beta$ -estradiol during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 65, 680–688.

Filardo, E.J., Graeber, C.T., Quinn, J.A., Resnick, M.B., Giri, D., DeLellis, R.A., Steinhoff, M.M., and Sabo, E. (2006). Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 6359–6366.

Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V., and Gannon, F. (2000). Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J.* 19, 4688–4700.

Fox, E.M., Bernaciak, T.M., Wen, J., Weaver, A.M., Shupnik, M.A., and Silva, C.M. (2008). Signal transducer and activator of transcription 5b, c-*Src*, and epidermal growth factor receptor signaling play integral roles in estrogen-stimulated proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 22, 1781–1796.

Fradet, A., Sorel, H., Bouazza, L., Goehrig, D., Dépalle, B., Bellahcène, A., Castronovo, V., Follet, H., Descotes, F., Aubin, J.E., et al. (2011). Dual function of ERR $\alpha$  in breast cancer and

bone metastasis formation: implication of VEGF and osteoprotegerin. *Cancer Res.* 71, 5728–5738.

Frassinetti, S., Barberio, C., Caltavuturo, L., Fava, F., and Di Gioia, D. (2011). Genotoxicity of 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate mixtures by the use of *Saccharomyces cerevisiae* D7 mutation assay and use of this text to evaluate the efficiency of biodegradation treatments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 253–258.

Fu, Z., Deng, H., Wang, X., Yang, X., Wang, Z., and Liu, L. (2013). Involvement of ER- $\alpha$ 36 in the malignant growth of gastric carcinoma cells is associated with GRP94 overexpression. *Histopathology* 63, 325–333.

Fu, Z., Zhen, H., Zou, F., Wang, X., Chen, Y., and Liu, L. (2014). Involvement of the Akt signaling pathway in ER- $\alpha$ 36/GRP94-mediated signaling in gastric cancer. *Oncol. Lett.* 8, 2077–2080.

## **G, H, I....**

Galien, R., and Garcia, T. (1997). Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic Acids Res.* 25, 2424–2429.

Gao, F., Ma, X., Ostmann, A.B., and Das, S.K. (2011). GPR30 activation opposes estrogen-dependent uterine growth via inhibition of stromal ERK1/2 and estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) phosphorylation signals. *Endocrinology* 152, 1434–1447.

Giacinti, L., Claudio, P.P., Lopez, M., and Giordano, A. (2006). Epigenetic information and estrogen receptor alpha expression in breast cancer. *The Oncologist* 11, 1–8.

Giger, W., Brunner, P.H., and Schaffner, C. (1984). 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* 225, 623–625.

Giguère, V. (2002). To ERR in the estrogen pathway. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 220–225.

Girgert, R., Emons, G., and Gründker, C. (2012). Inactivation of GPR30 reduces growth of triple-negative breast cancer cells: possible application in targeted therapy. *Breast Cancer Res. Treat.* 134, 199–205.

Glass, A.G., Lacey, J.V., Carreon, J.D., and Hoover, R.N. (2007). Breast cancer incidence, 1980–2006: combined roles of menopausal hormone therapy, screening mammography, and estrogen receptor status. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 1152–1161.

Gorski, J., Toft, D., Shyamala, G., Smith, D., and Notides, A. (1968). Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus1 A2 - ASTWOOD, E.B. In *Proceedings of the 1967 Laurentian Hormone Conference*, (Boston: Academic Press), pp. 45–80.

Gouon-Evans, V., Rothenberg, M.E., and Pollard, J.W. (2000). Postnatal mammary gland development requires macrophages and eosinophils. *Dev. Camb. Engl.* 127, 2269–2282.

- Gram, I.T., Braaten, T., Terry, P.D., Sasco, A.J., Adami, H.-O., Lund, E., and Weiderpass, E. (2005). Breast cancer risk among women who start smoking as teenagers. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 14, 61–66.
- Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., and Shine, J. (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1150–1154.
- Grossmann, M.E., and Cleary, M.P. (2012). The Balance between Leptin and Adiponectin in the Control of Carcinogenesis- Focus on Mammary Tumorigenesis. *Biochimie* 94, 2164–2171.
- Gruber, C.J., Gruber, D.M., Gruber, I.M.L., Wieser, F., and Huber, J.C. (2004). Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 15, 73–78.
- Gu, Y., Chen, T., López, E., Wu, W., Wang, X., Cao, J., and Teng, L. (2014). The therapeutic target of estrogen receptor- $\alpha$ 36 in estrogen-dependent tumors. *J. Transl. Med.* 12, 16.
- Guerrero-Bosagna, C., and Skinner, M.K. (2014). Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of male infertility. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 26, 79–88.
- Haldosén, L.-A., Zhao, C., and Dahlman-Wright, K. (2014). Estrogen receptor beta in breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382, 665–672.
- Hall, J.M., Couse, J.F., and Korach, K.S. (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 36869–36872.
- Hamajima, N., Hirose, K., Tajima, K., Rohan, T., Calle, E.E., Heath, C.W., Coates, R.J., Liff, J.M., Talamini, R., Chantarakul, N., et al. (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br. J. Cancer* 87, 1234–1245.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hardell, L., Bavel, B., Lindström, G., Eriksson, M., and Carlberg, M. (2006). In utero exposure to persistent organic pollutants in relation to testicular cancer risk. *Int. J. Androl.* 29, 228–234.
- Harris, C.C. (1991). Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.* 51, 5023s–5044s.
- Hartmann, L.C., Radisky, D.C., Frost, M.H., Santen, R.J., Vierkant, R.A., Benetti, L.L., Tarabishy, Y., Ghosh, K., Visscher, D.W., and Degnim, A.C. (2014). Understanding the premalignant potential of atypical hyperplasia through its natural history: a longitudinal cohort study. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 7, 211–217.
- Hecht, S.S. (2002). Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environ. Mol. Mutagen.* 39, 119–126.

- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., et al. (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.* 87, 905–931.
- Hens, J.R., Dann, P., Zhang, J.-P., Harris, S., Robinson, G.W., and Wysolmerski, J. (2007). BMP4 and PTHrP interact to stimulate ductal outgrowth during embryonic mammary development and to inhibit hair follicle induction. *Dev. Camb. Engl.* 134, 1221–1230.
- Herbstman, J.B., Sjödin, A., Kurzon, M., Lederman, S.A., Jones, R.S., Rauh, V., Needham, L.L., Tang, D., Niedzwiecki, M., Wang, R.Y., et al. (2010). Prenatal exposure to PBDEs and neurodevelopment. *Environ. Health Perspect.* 118, 712–719.
- Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., et al. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 8, R76.
- Hevir, N., Trošt, N., Debeljak, N., and Rižner, T.L. (2011). Expression of estrogen and progesterone receptors and estrogen metabolizing enzymes in different breast cancer cell lines. *Chem. Biol. Interact.* 191, 206–216.
- Hilakivi-Clarke, L. (2014). Maternal exposure to diethylstilbestrol during pregnancy and increased breast cancer risk in daughters. *Breast Cancer Res. BCR* 16, 208.
- Hill C., Doyon F. and Mousannif A. (2001). Évolution de la mortalité par cancer en France de 1950 à 2006. Institut de veille sanitaire.
- Hirata, S., Shoda, T., Kato, J., and Hoshi, K. (2001). The multiple untranslated first exons system of the human estrogen receptor beta (ER beta) gene. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 78, 33–40.
- Hoadley, K.A., Weigman, V.J., Fan, C., Sawyer, L.R., He, X., Troester, M.A., Sartor, C.I., Rieger-House, T., Bernard, P.S., Carey, L.A., et al. (2007). EGFR associated expression profiles vary with breast tumor subtype. *BMC Genomics* 8, 258.
- Hoadley K.A., Andre F., Ellis M.J. & Pero C.M. (2014). Breast cancer. Poster.
- Horard, B., and Vanacker, J.-M. (2003). Estrogen receptor-related receptors: orphan receptors desperately seeking a ligand. *J. Mol. Endocrinol.* 31, 349–357.
- Hou, N., Hong, S., Wang, W., Olopade, O.I., Dignam, J.J., and Huo, D. (2013). Hormone replacement therapy and breast cancer: heterogeneous risks by race, weight, and breast density. *J. Natl. Cancer Inst.* 105, 1365–1372.
- Hovey, R.C., and Aimo, L. (2010). Diverse and Active Roles for Adipocytes During Mammary Gland Growth and Function. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15, 279–290.
- Howell, A., Anderson, A.S., Clarke, R.B., Duffy, S.W., Evans, D.G., Garcia-Closas, M., Gescher, A.J., Key, T.J., Saxton, J.M., and Harvie, M.N. (2014). Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* 16, 446.



Huo, D., Ikpat, F., Khramtsov, A., Dangou, J.-M., Nanda, R., Dignam, J., Zhang, B., Grushko, T., Zhang, C., Oluwasola, O., et al. (2009). Population differences in breast cancer: survey in indigenous African women reveals over-representation of triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 4515–4521.

Hutchinson, J.N., and Muller, W.J. (2000). Transgenic mouse models of human breast cancer. *Oncogene* 19, 6130–6137.

Hynes, N.E., and Watson, C.J. (2010). Mammary gland growth factors: roles in normal development and in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003186.

Ingman, W.V., and Robertson, S.A. (2008). Mammary gland development in transforming growth factor beta1 null mutant mice: systemic and epithelial effects. *Biol. Reprod.* 79, 711–717.

Inman, J.L., Robertson, C., Mott, J.D., and Bissell, M.J. (2015). Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Dev. Camb. Engl.* 142, 1028–1042.

Inoue, K., Yoshimura, Y., Makino, T., and Nakazawa, H. (2000). Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human blood samples by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical coulometric-array detection. *The Analyst* 125, 1959–1961.

Irsik, D.L., Carmines, P.K., and Lane, P.H. (2013). Classical estrogen receptors and ER $\alpha$  splice variants in the mouse. *PLoS One* 8, e70926.

## **J, K, L....**

Javed, A., and Lteif, A. (2013). Development of the human breast. *Semin. Plast. Surg.* 27, 5–12.

Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E., and Newbold, R.R. (2007). Disruption of the developing female reproductive system by phytoestrogens: genistein as an example. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 832–844.

Jemal, A., Center, M.M., DeSantis, C., and Ward, E.M. (2010). Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 19, 1893–1907.

Jepsen, K., and Rosenfeld, M.G. (2002). Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *J. Cell Sci.* 115, 689–698.

Jiang, H., Teng, R., Wang, Q., Zhang, X., Wang, H., Wang, Z., Cao, J., and Teng, L. (2008). Transcriptional analysis of estrogen receptor alpha variant mRNAs in colorectal cancers and their matched normal colorectal tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 112, 20–24.

Johnson, K.C., Miller, A.B., Collishaw, N.E., Palmer, J.R., Hammond, S.K., Salmon, A.G., Cantor, K.P., Miller, M.D., Boyd, N.F., Millar, J., et al. (2011). Active smoking and secondhand

smoke increase breast cancer risk: the report of the Canadian Expert Panel on Tobacco Smoke and Breast Cancer Risk (2009). *Tob. Control* 20, e2.

Jones, F.E., and Stern, D.F. (1999). Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene* 18, 3481–3490.

Jorgensen, E.M., Alderman, M.H., and Taylor, H.S. (2016). Preferential epigenetic programming of estrogen response after in utero xenoestrogen (bisphenol-A) exposure. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*

Kalaitzidis Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF- $\kappa$ B.

Kampa, M., Pelekanou, V., Notas, G., Stathopoulos, E.N., and Castanas, E. (2013). The estrogen receptor: two or more molecules, multiple variants, diverse localizations, signaling and functions. Are we undergoing a paradigm-shift as regards their significance in breast cancer? *Horm. Athens Greece* 12, 69–85.

Kang, L., Zhang, X., Xie, Y., Tu, Y., Wang, D., Liu, Z., and Wang, Z.-Y. (2010). Involvement of estrogen receptor variant ER- $\alpha$ 36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 24, 709–721.

Kang, L., Guo, Y., Zhang, X., Meng, J., and Wang, Z.-Y. (2011). A positive cross-regulation of HER2 and ER- $\alpha$ 36 controls ALDH1 positive breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 262–268.

Karapanou, O., and Papadimitriou, A. (2010). Determinants of menarche. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 8, 115.

Kato, S. (2001). Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer Tokyo Jpn.* 8, 3–9.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., et al. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491–1494.

Kattan, Z., Marchal, S., Brunner, E., Ramacci, C., Leroux, A., Merlin, J.L., Domenjoud, L., Dauça, M., and Becuwe, P. (2008). Damaged DNA binding protein 2 plays a role in breast cancer cell growth. *PloS One* 3, e2002.

Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., et al. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 104, 715–740.

Kelley, S.T., and Thackray, V.G. (1999). Phylogenetic analyses reveal ancient duplication of estrogen receptor isoforms. *J. Mol. Evol.* 49, 609–614.

- Kelly, M.J., and Levin, E.R. (2001). Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 12, 152–156.
- Kelsey, J.L., Gammon, M.D., and John, E.M. (1993). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol. Rev.* 15, 36–47.
- Kendrick, H., Regan, J.L., Magnay, F.-A., Grigoriadis, A., Mitsopoulos, C., Zvelebil, M., and Smalley, M.J. (2008). Transcriptome analysis of mammary epithelial subpopulations identifies novel determinants of lineage commitment and cell fate. *BMC Genomics* 9, 591.
- Key, T.J., and Pike, M.C. (1988). The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 24, 29–43.
- Kim, B.-N., Cho, S.-C., Kim, Y., Shin, M.-S., Yoo, H.-J., Kim, J.-W., Yang, Y.H., Kim, H.-W., Bhang, S.-Y., and Hong, Y.-C. (2009). Phthalates exposure and attention-deficit/hyperactivity disorder in school-age children. *Biol. Psychiatry* 66, 958–963.
- Kimata, K., Sakakura, T., Inaguma, Y., Kato, M., and Nishizuka, Y. (1985). Participation of two different mesenchymes in the developing mouse mammary gland: synthesis of basement membrane components by fat pad precursor cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 89, 243–257.
- Klinge, C.M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* 29, 2905–2919.
- Klinge, C.M., Riggs, K.A., Wickramasinghe, N.S., Emberts, C.G., McConda, D.B., Barry, P.N., and Magnusen, J.E. (2010). Estrogen receptor alpha 46 is reduced in tamoxifen resistant breast cancer cells and re-expression inhibits cell proliferation and estrogen receptor alpha 66-regulated target gene transcription. *Mol. Cell. Endocrinol.* 323, 268–276.
- Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., and Kato, S. (2000). p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J. Biol. Chem.* 275, 15645–15651.
- Korsching, E., Packeisen, J., Liedtke, C., Hungermann, D., Wülfing, P., van Diest, P.J., Brandt, B., Boecker, W., and Buerger, H. (2005). The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J. Pathol.* 206, 451–457.
- Kos, M., Reid, G., Denger, S., and Gannon, F. (2001). Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 15, 2057–2063.
- Krege, J.H., Hodgins, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A., and Smithies, O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15677–15682.
- Kreuzaler, P.A., Staniszewska, A.D., Li, W., Omidvar, N., Kedjouar, B., Turkson, J., Poli, V., Flavell, R.A., Clarkson, R.W.E., and Watson, C.J. (2011). Stat3 controls lysosomal-mediated cell death in vivo. *Nat. Cell Biol.* 13, 303–309.

Krishnamurthy, A., Soundara, V., and Ramshankar, V. (2016). Preventive and Risk Reduction Strategies for Women at High Risk of Developing Breast Cancer: a Review. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 17, 895–904.

Kritikou, E.A., Sharkey, A., Abell, K., Came, P.J., Anderson, E., Clarkson, R.W.E., and Watson, C.J. (2003). A dual, non-redundant, role for LIF as a regulator of development and STAT3-mediated cell death in mammary gland. *Dev. Camb. Engl.* 130, 3459–3468.

Kuiper, G., Lemmen J., Carlsson B., Corton J., Safe S., Van der Saag P., Van der Burg B. and Gustafsson J-A. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor  $\beta$ : *Endocrinology: Vol 139, No 10*.

Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5925–5930.

Kumar, R., and Thompson, E.B. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64, 310–319.

Kumar, R., Zakharov, M.N., Khan, S.H., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., Singh, R., Bhasin, S., Jasuja, R., Kumar, R., et al. (2011). The Dynamic Structure of the Estrogen Receptor, The Dynamic Structure of the Estrogen Receptor. *J. Amino Acids J. Amino Acids* 2011, 2011, e812540.

Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L., Scanlan, T.S., Shiau, A.K., Uht, R.M., and Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74, 311–317.

Kwon, O., Kang, E.S., Kim, I., Shin, S., Kim, M., Kwon, S., Oh, S.R., Ahn, Y.S., and Kim, C.H. (2014). GPR30 mediates anorectic estrogen-induced STAT3 signaling in the hypothalamus. *Metabolism.* 63, 1455–1461.

Lappano, R., Santolla, M.F., Pupo, M., Sinicropi, M.S., Caruso, A., Rosano, C., and Maggiolini, M. (2012). MIBE acts as antagonist ligand of both estrogen receptor  $\alpha$  and GPER in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. BCR* 14, R12.

Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J.-M., and Corbo, L. (2011). Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr. Rev.* 32, 597–622.

Lee, H.J., Chattopadhyay, S., Gong, E.-Y., Ahn, R.S., and Lee, K. (2003). Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 75, 40–46.

Lee, L.M.J., Cao, J., Deng, H., Chen, P., Gatalica, Z., and Wang, Z.-Y. (2008). ER-alpha36, a novel variant of ER-alpha, is expressed in ER-positive and -negative human breast carcinomas. *Anticancer Res.* 28, 479–483.

- Leone N., Voirin N., Roche L., Binder-Foucard F., Woronoff A.S., Delafosse P., Remontet L., Bossard N. and Uhry Z. (2015). Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2015. Rapport technique. InVS et INCa.
- Leygue, E., and Murphy, L.C. (2013). A bi-faceted role of estrogen receptor  $\beta$  in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 20, R127-139.
- Li, C.I., Malone, K.E., Daling, J.R., Potter, J.D., Bernstein, L., Marchbanks, P.A., Strom, B.L., Simon, M.S., Press, M.F., Ursin, G., et al. (2008). Timing of menarche and first full-term birth in relation to breast cancer risk. *Am. J. Epidemiol.* 167, 230–239.
- Li, G., Zhang, J., Jin, K., He, K., Zheng, Y., Xu, X., Wang, H., Wang, H., Li, Z., Yu, X., et al. (2013a). Estrogen receptor- $\alpha 36$  is involved in development of acquired tamoxifen resistance via regulating the growth status switch in breast cancer cells. *Mol. Oncol.* 7, 611–624.
- Li, L., Haynes, M.P., and Bender, J.R. (2003). Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4807–4812.
- Li, Y., Meeran, S.M., Patel, S.N., Chen, H., Hardy, T.M., and Tollefsbol, T.O. (2013b). Epigenetic reactivation of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) by genistein enhances hormonal therapy sensitivity in ER $\alpha$ -negative breast cancer. *Mol. Cancer* 12, 9.
- Lin, S.-L., Yan, L.-Y., Zhang, X.-T., Yuan, J., Li, M., Qiao, J., Wang, Z.-Y., and Sun, Q.-Y. (2010). ER-alpha36, a variant of ER-alpha, promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *PloS One* 5, e9013.
- Lipworth, L., Bailey, L.R., and Trichopoulos, D. (2000). History of breast-feeding in relation to breast cancer risk: a review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 302–312.
- Liu, Y., Colditz, G.A., Rosner, B., Berkey, C.S., Collins, L.C., Schnitt, S.J., Connolly, J.L., Chen, W.Y., Willett, W.C., and Tamimi, R.M. (2013). Alcohol intake between menarche and first pregnancy: a prospective study of breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 105, 1571–1578.
- Lombó, M., Fernández-Díez, C., González-Rojo, S., Navarro, C., Robles, V., and Herráez, M.P. (2015). Transgenerational inheritance of heart disorders caused by paternal bisphenol A exposure. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 206, 667–678.

## **M, N, O....**

- Macias, H., and Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1, 533–557.
- MacMahon, B., and Cole, P. (2008). Is the incidence of breast cancer declining? *Epidemiol. Camb. Mass* 19, 268–269.

- Makarem, M., Spike, B.T., Dravis, C., Kannan, N., Wahl, G.M., and Eaves, C.J. (2013). Stem cells and the developing mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 18, 209–219.
- Manikkam, M., Guerrero-Bosagna, C., Tracey, R., Haque, M.M., and Skinner, M.K. (2012). Transgenerational actions of environmental compounds on reproductive disease and identification of epigenetic biomarkers of ancestral exposures. *PloS One* 7, e31901.
- Mannelli, C., Ietta, F., Avanzati, A.M., Skarzynski, D., and Paulesu, L. (2015). Biological Tools to Study the Effects of Environmental Contaminants at the Feto-Maternal Interface. *Dose-Response Publ. Int. Hormesis Soc.* 13, 1559325815611902.
- Marino, M., Galluzzo, P., and Ascenzi, P. (2006). Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription. *Curr. Genomics* 7, 497–508.
- Marti, A., Lazar, H., Ritter, P., and Jaggi, R. (1999). Transcription factor activities and gene expression during mouse mammary gland involution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 4, 145–152.
- Masuda, H., Zhang, D., Bartholomeusz, C., Doihara, H., Hortobagyi, G.N., and Ueno, N.T. (2012). Role of Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 136.
- McBryan, J., Howlin, J., Napoletano, S., and Martin, F. (2008). Amphiregulin: role in mammary gland development and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 13, 159–169.
- McEwan, I.J., Lavery, D., Fischer, K., and Watt, K. (2007). Natural disordered sequences in the amino terminal domain of nuclear receptors: lessons from the androgen and glucocorticoid receptors. *Nucl. Recept. Signal.* 5, e001.
- McKenna, N.J., Lanz, R.B., and O'Malley, B.W. (1999). Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology. *Endocr. Rev.* 20, 321–344.
- McLachlan, J.A. (2016). Environmental signaling: from environmental estrogens to endocrine-disrupting chemicals and beyond. *Andrology* 4, 684–694.
- McPherson, K., Steel, C.M., and Dixon, J.M. (2000). ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 321, 624–628.
- McVeigh, T.P., Choi, J.K., Miller, N.M., Green, A.J., and Kerin, M.J. (2014). Lobular breast cancer in a CDH1 splice site mutation carrier: case report and review of the literature. *Clin. Breast Cancer* 14, e47-51.
- Mehta, R.G., Hawthorne, M., Mehta, R.R., Torres, K.E.O., Peng, X., McCormick, D.L., and Kopelovich, L. (2014). Differential Roles of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in Normal and Neoplastic Development in the Mouse Mammary Gland. *PloS One* 9, e113175.
- Merdad, A., Karim, S., Schulten, H.-J., Dallol, A., Buhmeida, A., Al-Thubaity, F., Gari, M.A., Chaudhary, A.G., Abuzenadah, A.M., and Al-Qahtani, M.H. (2014). Expression of matrix

metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis. *Anticancer Res.* 34, 1355–1366.

Métivier, R., Penot, G., Hübner, M.R., Reid, G., Brand, H., Koš, M., and Gannon, F. (2003). Estrogen Receptor- $\alpha$  Directs Ordered, Cyclical, and Combinatorial Recruitment of Cofactors on a Natural Target Promoter. *Cell* 115, 751–763.

Miodovnik, A., Engel, S.M., Zhu, C., Ye, X., Soorya, L.V., Silva, M.J., Calafat, A.M., and Wolff, M.S. (2011). Endocrine disruptors and childhood social impairment. *Neurotoxicology* 32, 261–267.

Misawa, A., and Inoue, S. (2015). Estrogen-Related Receptors in Breast Cancer and Prostate Cancer. *Front. Endocrinol.* 6, 83.

Mnif, W., Hassine, A.I.H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., and Roig, B. (2011). Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 8, 2265–2303.

Molinié, F., Vanier, A., Woronoff, A.S., Guizard, A.V., Delafosse, P., Velten, M., Daubisse-Marliac, L., Arveux, P., and Tretarre, B. (2014). Trends in breast cancer incidence and mortality in France 1990-2008. *Breast Cancer Res. Treat.* 147, 167–175.

Moody, S.E., Perez, D., Pan, T., Sarkisian, C.J., Portocarrero, C.P., Sterner, C.J., Notorfrancesco, K.L., Cardiff, R.D., and Chodosh, L.A. (2005). The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell* 8, 197–209.

Moon, H.J., Han, S.Y., Shin, J.-H., Kang, I.H., Kim, T.S., Hong, J.H., Kim, S.-H., and Fenton, S.E. (2007). Gestational exposure to nonylphenol causes precocious mammary gland development in female rat offspring. *J. Reprod. Dev.* 53, 333–344.

Moore, M.M., Hargett, C.W., Hanks, J.B., Fajardo, L.L., Harvey, J.A., Frierson, H.F., and Slingluff, C.L. (1997). Association of breast cancer with the finding of atypical ductal hyperplasia at core breast biopsy. *Ann. Surg.* 225, 726–733.

Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., et al. (2003). PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34, 267–273.

Moriarty, K., Kim, K.H., and Bender, J.R. (2006). Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling. *Endocrinology* 147, 5557–5563.

Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 392, 49–53.

Mulac-Jericevic, B., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., and Conneely, O.M. (2003). Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9744–9749.

- Multigner L., Kadhel P. (2007). Perturbateurs endocriniens : d'où viennent-ils ? où va-t-on ? *Métabolismes Hormones Diabète et Nutrition (XI)*, n° 3, 93-98.
- Murray, T.J., Maffini, M.V., Ucci, A.A., Sonnenschein, C., and Soto, A.M. (2007). Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 23, 383–390.
- Nautiyal, J., Steel, J.H., Mane, M.R., Oduwole, O., Poliandri, A., Alexi, X., Wood, N., Poutanen, M., Zwart, W., Stingl, J., et al. (2013). The transcriptional co-factor RIP140 regulates mammary gland development by promoting the generation of key mitogenic signals. *Dev. Camb. Engl.* 140, 1079–1089.
- Need, E.F., Atashgaran, V., Ingman, W.V., and Dasari, P. (2014). Hormonal regulation of the immune microenvironment in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 19, 229–239.
- Negishi, T., Ishii, Y., Kyuwa, S., Kuroda, Y., and Yoshikawa, Y. (2003). Inhibition of staurosporine-induced neuronal cell death by bisphenol A and nonylphenol in primary cultured rat hippocampal and cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 353, 99–102.
- Neville, M.C., McFadden, T.B., and Forsyth, I. (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 49–66.
- Newbold, R.R., Hanson, R.B., Jefferson, W.N., Bullock, B.C., Haseman, J., and McLachlan, J.A. (2000). Proliferative lesions and reproductive tract tumors in male descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. *Carcinogenesis* 21, 1355–1363.
- Nielsen, T.O., Hsu, F.D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., et al. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 5367–5374.
- Nilsson, E.E., Anway, M.D., Stanfield, J., and Skinner, M.K. (2008). Transgenerational epigenetic effects of the endocrine disruptor vinclozolin on pregnancies and female adult onset disease. *Reprod. Camb. Engl.* 135, 713–721.
- Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J.A. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.* 81, 1535–1565.
- Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97, 161–163.
- Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., and Muramatsu, M. (1998). Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor beta: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res.* 26, 3505–3512.



Ohshiro, K., Schwartz, A.M., Levine, P.H., and Kumar, R. (2012). Alternate estrogen receptors promote invasion of inflammatory breast cancer cells via non-genomic signaling. *PLoS One* 7, e30725.

Oliver, C.H., and Watson, C.J. (2013). Making milk: A new link between STAT5 and Akt1. *JAK-STAT* 2, e23228.

O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K., and Hansen, U. (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 18, 1859–1875.

Oral, D., Erkekoglu, P., Kocer-Gumusel, B., and Chao, M.-W. (2016). Epithelial-Mesenchymal Transition: A Special Focus on Phthalates and Bisphenol A. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. Off. Organ Int. Soc. Environ. Toxicol. Cancer* 35, 43–58.

## **P, Q, R....**

Page, D.L., Dupont, W.D., Rogers, L.W., and Rados, M.S. (1985). Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study. *Cancer* 55, 2698–2708.

Parent, A.-S., Teilmann, G., Juul, A., Skakkebaek, N.E., Toppari, J., and Bourguignon, J.-P. (2003). The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr. Rev.* 24, 668–693.

Parkin, D.M. (2009). Is the recent fall in incidence of post-menopausal breast cancer in UK related to changes in use of hormone replacement therapy? *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 45, 1649–1653.

Parsa, P., and Parsa, B. (2009). Effects of reproductive factors on risk of breast cancer: a literature review. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 10, 545–550.

Paulose, T., Speroni, L., Sonnenschein, C., and Soto, A.M. (2015). Estrogens in the wrong place at the wrong time: Fetal BPA exposure and mammary cancer. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 54, 58–65.

Pei, X.F., Noble, M.S., Davoli, M.A., Rosfjord, E., Tilli, M.T., Furth, P.A., Russell, R., Johnson, M.D., and Dickson, R.B. (2004). Explant-cell culture of primary mammary tumors from MMTV-c-Myc transgenic mice. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 40, 14–21.

Pelekanou, V., Notas, G., Kampa, M., Tsenteliero, E., Radojicic, J., Leclercq, G., Castanas, E., and Stathopoulos, E.N. (2012). ER $\alpha$ 36, a new variant of the ER $\alpha$  is expressed in triple negative breast carcinomas and has a specific transcriptomic signature in breast cancer cell lines. *Steroids* 77, 928–934.

Pietras, R.J., and Szego, C.M. (1975). Endometrial cell calcium and oestrogen action. *Nature* 253, 357–359.

- Pimhanam, C., Sangrajrang, S., and Ekpanyaskul, C. (2014). Tobacco smoke exposure and breast cancer risk in Thai urban females. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 15, 7407–7411.
- Pizot, C., Boniol, M., Mullie, P., Koechlin, A., Boniol, M., Boyle, P., and Autier, P. (2016). Physical activity, hormone replacement therapy and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 52, 138–154.
- Pontén, J., Holmberg, L., Trichopoulos, D., Kallioniemi, O.P., Kvåle, G., Wallgren, A., and Taylor-Papadimitriou, J. (1990). Biology and natural history of breast cancer. *Int. J. Cancer Suppl. J. Int. Cancer Suppl.* 5, 5–21.
- Prat, A., and Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* 5, 5–23.
- Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* 12, R68.
- Pratt, W.B., and Welsh, M.J. (1994). Chaperone functions of the heat shock proteins associated with steroid receptors. *Semin. Cell Biol.* 5, 83–93.
- Press, D.J., and Pharoah, P. (2010). Risk factors for breast cancer: a reanalysis of two case-control studies from 1926 and 1931. *Epidemiol. Camb. Mass* 21, 566–572.
- Prossnitz, E.R., and Barton, M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 715–726.
- Prusinski, L., Al-Hendy, A., and Yang, Q. (2016). Developmental exposure to endocrine disrupting chemicals alters the epigenome: Identification of reprogrammed targets. *Gynecol. Obstet. Res. Open J.* 3, 1–6.
- Qian, H., Xuan, J., Liu, Y., and Shi, G. (2016). Function of G-Protein-Coupled Estrogen Receptor-1 in Reproductive System Tumors. *J. Immunol. Res.* 2016, 7128702.
- Qu, S., Rinehart, C., Wu, H.-H., Wang, S.E., Carter, B., Xin, H., Kotlikoff, M., and Arteaga, C.L. (2006). Gene targeting of ErbB3 using a Cre-mediated unidirectional DNA inversion strategy. *Genes. N. Y. N* 2000 44, 477–486.
- Radisky, D.C., and Hartmann, L.C. (2009). Mammary involution and breast cancer risk: transgenic models and clinical studies. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 14, 181–191.
- Raecker, T., Thiele, B., Boehme, R.M., and Guenther, K. (2011). Endocrine disrupting nonyl- and octylphenol in infant food in Germany: considerable daily intake of nonylphenol for babies. *Chemosphere* 82, 1533–1540.
- Ranhoira, H.S. (2010). The estrogen-related receptor alpha: the oldest, yet an energetic orphan with robust biological functions. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 30, 193–205.

- Rao, J., Jiang, X., Wang, Y., and Chen, B. (2011). Advances in the understanding of the structure and function of ER- $\alpha$ 36, a novel variant of human estrogen receptor- $\alpha$ . *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 231–237.
- Reid, G., Denger, S., Kos, M., and Gannon, F. (2002). Human estrogen receptor- $\alpha$ : regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 59, 821–831.
- Ren, F., Tang, R., Zhang, X., Madushi, W.M., Luo, D., Dang, Y., Li, Z., Wei, K., and Chen, G. (2015). Overexpression of MMP Family Members Functions as Prognostic Biomarker for Breast Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* 10, e0135544.
- Reynolds, P. (2013). Smoking and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 18, 15–23.
- Rezaei, R., Wu, Z., Hou, Y., Bazer, F.W., and Wu, G. (2016). Amino acids and mammary gland development: nutritional implications for milk production and neonatal growth. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 7, 20.
- Richert, M.M., Schwertfeger, K.L., Ryder, J.W., and Anderson, S.M. (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5, 227–241.
- Rizzati, V., Briand, O., Guillou, H., and Gamet-Payraastre, L. (2016). Effects of pesticide mixtures in human and animal models: An update of the recent literature. *Chem. Biol. Interact.* 254, 231–246.
- Robinson-Rechavi, M., Garcia, H.E., and Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *J. Cell Sci.* 116, 585–586.
- Rochester, J.R., and Bolden, A.L. (2015). Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ. Health Perspect.* 123, 643–650.
- Rochette-Egly, C. (2003). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell. Signal.* 15, 355–366.
- Ronckers, C.M., Erdmann, C.A., and Land, C.E. (2005). Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res. BCR* 7, 21–32.
- Roth M.Y., Lin K., Amory J.K., Matsumoto A.M., Anawalt B.D., Snyder C.N., Kalthorn T.F., Bremner W.J. and Page S.T. (2010). Serum LH Correlates Highly With Intratesticular Steroid Levels in Normal Men. *J. Androl.* 31, 138–145.
- Russo, I.H., and Russo, J. (2000). Hormonal approach to breast cancer prevention. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 34, 1–6.
- Russo, J., Ao, X., Grill, C., and Russo, I.H. (1999). Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor  $\alpha$  and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res. Treat.* 53, 217–227.

## **S, T....**

- Sakakura, T., Kusano, I., Kusakabe, M., Inaguma, Y., and Nishizuka, Y. (1987). Biology of mammary fat pad in fetal mouse: capacity to support development of various fetal epithelia in vivo. *Dev. Camb. Engl.* 100, 421–430.
- Sakakura, T., Suzuki, Y., and Shiurba, R. (2013). Mammary stroma in development and carcinogenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 18, 189–197.
- Samavat, H., and Kurzer, M.S. (2015). Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett.* 356, 231–243.
- Saville, B., Wormke, M., Wang, F., Nguyen, T., Enmark, E., Kuiper, G., Gustafsson, J.A., and Safe, S. (2000). Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J. Biol. Chem.* 275, 5379–5387.
- Scaling, A.L., Prossnitz, E.R., and Hathaway, H.J. (2014). GPER mediates estrogen-induced signaling and proliferations in human breast epithelial cells, and normal and malignant breast. *Horm. Cancer* 5, 146–160.
- Schug, T.T., Janesick, A., Blumberg, B., and Heindel, J.J. (2011). Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 204–215.
- Schwartz, N., Chaudhri, R.A., Hadadi, A., Schwartz, Z., and Boyan, B.D. (2014). 17Beta-estradiol promotes aggressive laryngeal cancer through membrane-associated estrogen receptor-alpha 36. *Horm. Cancer* 5, 22–32.
- Schwartz, N., Verma, A., Bivens, C.B., Schwartz, Z., and Boyan, B.D. (2016). Rapid steroid hormone actions via membrane receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 2289–2298.
- Sebastian, J., Richards, R.G., Walker, M.P., Wiesen, J.F., Werb, Z., Derynck, R., Hom, Y.K., Cunha, G.R., and DiAugustine, R.P. (1998). Activation and function of the epidermal growth factor receptor and erbB-2 during mammary gland morphogenesis. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 9, 777–785.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439, 84–88.
- Sharma, V.K., Anquandah, G.A.K., Yngard, R.A., Kim, H., Fekete, J., Bouzek, K., Ray, A.K., and Golovko, D. (2009). Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: A review on occurrence, fate, and treatment. *J. Environ. Sci. Health Part A* 44, 423–442.
- Sharpe, R.M. (2006). Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20, 91–110.
- Shi, L., Dong, B., Li, Z., Lu, Y., Ouyang, T., Li, J., Wang, T., Fan, Z., Fan, T., Lin, B., et al. (2009). Expression of ER- $\alpha$ 36, a novel variant of estrogen receptor  $\alpha$ , and resistance

to tamoxifen treatment in breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 3423–3429.

Shield, K.D., Soerjomataram, I., and Rehm, J. (2016). Alcohol Use and Breast Cancer: A Critical Review. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*

Shiovitz, S., and Korde, L.A. (2015). Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 26, 1291–1299.

Silberstein, G.B., Van Horn, K., Hrabeta-Robinson, E., and Compton, J. (2006). Estrogen-triggered delays in mammary gland gene expression during the estrous cycle: evidence for a novel timing system. *J. Endocrinol.* 190, 225–239.

Silva, E., Rajapakse, N., and Kortenkamp, A. (2002). Something from “nothing”--eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1751–1756.

Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., and Bissell, M.J. (2001). The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Dev. Camb. Engl.* 128, 3117–3131.

Skakkebaek, N.E. (2002). Endocrine disrupters and testicular dysgenesis syndrome. *Horm. Res.* 57 Suppl 2, 43.

Skinner, M.K., Bhandari, R.K., Haque, M.M., and Nilsson, E.E. (2015). Environmentally Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Altered SRY Genomic Binding During Gonadal Sex Determination. *Environ. Epigenetics* 1, dvv004.

Smith, C.L. (1998). Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol. Reprod.* 58, 627–632.

Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., and Lester, J.N. (2008). Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ. Int.* 34, 1033–1049.

Soltysik, K., and Czekaj, P. (2013). Membrane estrogen receptors - is it an alternative way of estrogen action? *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 64, 129–142.

Soltysik, K., and Czekaj, P. (2015). ER $\alpha$ 36 - Another piece of the estrogen puzzle. *Eur. J. Cell Biol.*

Soto, A.M., and Sonnenschein, C. (2010). Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 363–370.

Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W., and Sonnenschein, C. (1991). p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. *Environ. Health Perspect.* 92, 167–173.

Sotoca, A.M., Vervoort, Rietjens, and Gustafsson, J.A. (2012). Human ER $\alpha$  and ER $\beta$  Splice Variants: Understanding Their Domain Structure in Relation to Their Biological Roles in Breast Cancer Cell Proliferation | InTechOpen.

Spike, B.T., Engle, D.D., Lin, J.C., Cheung, S.K., La, J., and Wahl, G.M. (2012). A mammary stem cell population identified and characterized in late embryogenesis reveals similarities to human breast cancer. *Cell Stem Cell* 10, 183–197.

Sreekumar, A., Roarty, K., and Rosen, J.M. (2015). The mammary stem cell hierarchy: a looking glass into heterogeneous breast cancer landscapes. *Endocr. Relat. Cancer* 22, T161-176.

Srinivasan, K., Strickland, P., Valdes, A., Shin, G.C., and Hinck, L. (2003). Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev. Cell* 4, 371–382.

Sternlicht, M.D., Sunnarborg, S.W., Kouros-Mehr, H., Yu, Y., Lee, D.C., and Werb, Z. (2005). Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Dev. Camb. Engl.* 132, 3923–3933.

Stingl, J., Eaves, C.J., Zandieh, I., and Emerman, J.T. (2001). Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* 67, 93–109.

Stingl, J., Raouf, A., Eirew, P., and Eaves, C.J. (2006). Deciphering the mammary epithelial cell hierarchy. *Cell Cycle Georget. Tex* 5, 1519–1522.

Strohsnitter, W.C., Noller, K.L., Hoover, R.N., Robboy, S.J., Palmer, J.R., Titus-Ernstoff, L., Kaufman, R.H., Adam, E., Herbst, A.L., and Hatch, E.E. (2001). Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 545–551.

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15545–15550.

Sultan, C., Balaguer, P., Terouanne, B., Georget, V., Paris, F., Jeandel, C., Lumbroso, S., and Nicolas, J. (2001). Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 178, 99–105.

Szego, C.M., and Davis, J.S. (1967). Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 58, 1711–1718.

Tam, I.S., and Giguère, V. (2016). There and back again: The journey of the estrogen-related receptors in the cancer realm. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 157, 13–19.

Tamakoshi, K., Yatsuya, H., Wakai, K., Suzuki, S., Nishio, K., Lin, Y., Niwa, Y., Kondo, T., Yamamoto, A., Tokudome, S., et al. (2005). Impact of menstrual and reproductive factors on breast cancer risk in Japan: results of the JACC study. *Cancer Sci.* 96, 57–62.

Teeguarden, J.G., and Hanson-Drury, S. (2013). A systematic review of Bisphenol A “low dose” studies in the context of human exposure: A case for establishing standards for reporting “low-dose” effects of chemicals. *Food Chem. Toxicol.* 62, 935–948.

Thomas, M.P., and Potter, B.V.L. (2013). The structural biology of oestrogen metabolism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 137, 27–49.

Thomas, P., and Dong, J. (2006). Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102, 175–179.

Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., and Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624–632.

Thornton, J.W. (2001). Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5671–5676.

Thornton, J.W., Need, E., and Crews, D. (2003). Resurrecting the Ancestral Steroid Receptor: Ancient Origin of Estrogen Signaling. *Science* 301, 1714–1717.

Tomaskovic-Crook, E., Thompson, E.W., and Thiery, J.P. (2009). Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* 11, 213.

Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 87–108.

Townson, S.M., and O’Connell, P. (2006). Identification of estrogen receptor alpha variants in breast tumors: implications for predicting response to hormonal therapies. *J. Surg. Oncol.* 94, 271–273.

Trichopoulos, D. (1990). Is breast cancer initiated in utero? *Epidemiol. Camb. Mass* 1, 95–96.

Tu, B.-B., Lin, S.-L., Yan, L.-Y., Wang, Z.-Y., Sun, Q.-Y., and Qiao, J. (2011). ER- $\alpha$ 36, a novel variant of estrogen receptor  $\alpha$ , is involved in EGFR-related carcinogenesis in endometrial cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 205, 227.e1-6.

Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Castillo, N.P., Seely, J.C., Sloan, C.S., Veselica, M.M., Joiner, R.L., Van Miller, J.P., and Simon, G.S. (2006). Three-generation evaluation of dietary para-nonylphenol in CD (Sprague-Dawley) rats. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 92, 295–310.

## **U, V, W....**

Ursini-Siegel, J., Schade, B., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (2007). Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 389–397.

- Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Wadia, P.R., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., and Soto, A.M. (2007). Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* 148, 116–127.
- Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Schaeberle, C.M., Ucci, A.A., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., and Soto, A.M. (2008). Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 26, 210–219.
- Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F.J.R., and Schoenfelder, G. (2012a). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Ciênc. Saúde Coletiva* 17, 407–434.
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., et al. (2012b). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr. Rev.* 33, 378–455.
- Vandenberg, L.N., Welshons, W.V., Vom Saal, F.S., Toutain, P.-L., and Myers, J.P. (2014). Should oral gavage be abandoned in toxicity testing of endocrine disruptors? *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* 13, 46.
- Varlakhanova, N., Snyder, C., Jose, S., Hahm, J.B., and Privalsky, M.L. (2010). Estrogen receptors recruit SMRT and N-CoR corepressors through newly recognized contacts between the corepressor N terminus and the receptor DNA binding domain. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1434–1445.
- Veltmaat, J.M., Mailleux, A.A., Thiery, J.P., and Bellusci, S. (2003). Mouse embryonic mammaryogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differ. Res. Biol. Divers.* 71, 1–17.
- Visvader, J.E. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev.* 23, 2563–2577.
- Visvader, J.E., and Stingl, J. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev.* 28, 1143–1158.
- Vranic, S., Gatalica, Z., Deng, H., Frkovic-Grazio, S., Lee, L.M.J., Gurjeva, O., and Wang, Z.-Y. (2011). ER- $\alpha$ 36, a novel isoform of ER- $\alpha$ 66, is commonly over-expressed in apocrine and adenoid cystic carcinomas of the breast. *J. Clin. Pathol.* 64, 54–57.
- de Waard, F., and Trichopoulos, D. (1988). A unifying concept of the aetiology of breast cancer. *Int. J. Cancer* 41, 666–669.
- Wadia, P.R., Cabaton, N.J., Borrero, M.D., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Shioda, T., and Soto, A.M. (2013). Low-dose BPA exposure alters the mesenchymal and epithelial transcriptomes of the mouse fetal mammary gland. *PLoS One* 8, e63902.
- Wagner, K.-U., Krempler, A., Triplett, A.A., Qi, Y., George, N.M., Zhu, J., and Rui, H. (2004). Impaired alveologenesis and maintenance of secretory mammary epithelial cells in Jak2 conditional knockout mice. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5510–5520.



- Wallacides, A., Chesnel, A., Ajj, H., Chillet, M., Flament, S., and Dumond, H. (2012). Estrogens promote proliferation of the seminoma-like TCam-2 cell line through a GPER-dependent ER $\alpha$ 36 induction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 350, 61–71.
- Wang, Z.-Y., and Yin, L. (2015). Estrogen receptor alpha-36 (ER- $\alpha$ 36): a new player in human breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.*
- Wang, J., Wei, Q., Wang, X., Tang, S., Liu, H., Zhang, F., Mohammed, M.K., Huang, J., Guo, D., Lu, M., et al. (2016). Transition to resistance: An unexpected role of the EMT in cancer chemoresistance. *Genes Dis.* 3, 3–6.
- Wang, Q., Zhang, W., Yang, J., Liu, Y.-L., Yan, Z.-X., Guo, Z.-J., Li, Y.-J., and Bian, X.-W. (2015). High ER $\alpha$ 36 Expression Level and Membrane Location Predict Poor Prognosis in Renal Cell Carcinoma. *Medicine (Baltimore)* 94, e1048.
- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., and Deuel, T.F. (2005). Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 1023–1027.
- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., and Deuel, T.F. (2006). A variant of estrogen receptor- $\alpha$ , hER- $\alpha$ 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9063–9068.
- Watanabe, M., Takano, T., Nakamura, K., Watanabe, S., and Seino, K. (2007). Water quality and concentration of alkylphenols in rivers used as source of drinking water and flowing through urban areas. *Environ. Health Prev. Med.* 12, 17–24.
- Watson, C.J. (2006). Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res. BCR* 8, 203.
- Watson, C.J., and Neoh, K. (2008). The Stat family of transcription factors have diverse roles in mammary gland development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19, 401–406.
- White, R., and Parker, M.G. (1998). Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Endocr. Relat. Cancer* 5, 1–14.
- Williams, J.M., and Daniel, C.W. (1983). Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev. Biol.* 97, 274–290.
- Wingate, H., Puskas, A., Duong, M., Bui, T., Richardson, D., Liu, Y., Tucker, S.L., Van Pelt, C., Meijer, L., Hunt, K., et al. (2009). Low molecular weight cyclin E is specific in breast cancer and is associated with mechanisms of tumor progression. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 1062–1068.
- Wiseman, B.S., and Werb, Z. (2002). Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* 296, 1046–1049.
- Wolff, M.S., Engel, S.M., Berkowitz, G.S., Ye, X., Silva, M.J., Zhu, C., Wetmur, J., and Calafat, A.M. (2008). Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environ. Health Perspect.* 116, 1092–1097.

Wolstenholme, J.T., Edwards, M., Shetty, S.R.J., Gatewood, J.D., Taylor, J.A., Rissman, E.F., and Connelly, J.J. (2012). Gestational exposure to bisphenol a produces transgenerational changes in behaviors and gene expression. *Endocrinology* 153, 3828–3838.

## **X, Y, Z....**

Xin, F., Susiarjo, M., and Bartolomei, M.S. (2015). Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation? *Semin. Cell Dev. Biol.*

Xu, J., and Li, Q. (2003). Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 17, 1681–1692.

Xu, J., Wu, R.-C., and O'Malley, B.W. (2009). Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nat. Rev. Cancer* 9, 615–630.

Yang, O., Kim, H.L., Weon, J.-I., and Seo, Y.R. (2015). Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *J. Cancer Prev.* 20, 12–24.

Yin, L., and Wang, Z.-Y. (2016). Roles of the ER- $\alpha$ 36-EGFR/HER2 positive regulatory loops in tamoxifen resistance. *Steroids* 111, 95–99.

Yin, L., Zhang, X.-T., Bian, X.-W., Guo, Y.-M., and Wang, Z.-Y. (2014). Disruption of the ER- $\alpha$ 36-EGFR/HER2 positive regulatory loops restores tamoxifen sensitivity in tamoxifen resistance breast cancer cells. *PloS One* 9, e107369.

Yin, L., Pan, X., Zhang, X.-T., Guo, Y.-M., Wang, Z.-Y., Gong, Y., and Wang, M. (2015). Downregulation of ER- $\alpha$ 36 expression sensitizes HER2 overexpressing breast cancer cells to tamoxifen. *Am. J. Cancer Res.* 5, 530–544.

Younes, M., and Honma, N. (2011). Estrogen receptor  $\beta$ . *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135, 63–66.

Yu, L., Ke, W., Wang, Y., Ding, W., Wang, B., Huang, S., Chen, J., Wang, X., Wang, Z., and Shen, P. (2014). Predictive and prognostic value of ER- $\alpha$ 36 expression in breast cancer patients treated with chemotherapy. *Steroids* 84, 11–16.

Zalko, D., Soto, A.M., Dolo, L., Dorio, C., Rathahao, E., Debrauwer, L., Faure, R., and Cravedi, J.-P. (2003). Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ. Health Perspect.* 111, 309–319.

Zeman, F.A., Boudet, C., Tack, K., Floch Barneaud, A., Brochot, C., Péry, A.R.R., Oleko, A., and Vandentorren, S. (2013). Exposure assessment of phthalates in French pregnant women: results of the ELFE pilot study. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 216, 271–279.

- Zhang, X., and Wang, Z.-Y. (2013). Estrogen receptor- $\alpha$  variant, ER- $\alpha$ 36, is involved in tamoxifen resistance and estrogen hypersensitivity. *Endocrinology* 154, 1990–1998.
- Zhang M.H, Man H.T, Zhao X.D., Dong N., MA S.L (2014). Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials (Review). *Biomed. Rep.* 2, 41–52.
- Zhang, X., Ding, L., Kang, L., and Wang, Z.-Y. (2012a). Estrogen receptor-alpha 36 mediates mitogenic antiestrogen signaling in ER-negative breast cancer cells. *PloS One* 7, e30174.
- Zhang, X.T., Kang, L.G., Ding, L., Vranic, S., Gatalica, Z., and Wang, Z.-Y. (2011). A positive feedback loop of ER- $\alpha$ 36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene* 30, 770–780.
- Zhang, X.-T., Ding, L., Kang, L.-G., and Wang, Z.-Y. (2012b). Involvement of ER- $\alpha$ 36, Src, EGFR and STAT5 in the biphasic estrogen signaling of ER-negative breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 27, 2057–2065.
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K., and Gustafsson, J.-A. (2008). Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl. Recept. Signal.* 6, e003.
- Ziv-Gal, A., Wang, W., Zhou, C., and Flaws, J.A. (2015). The effects of in utero bisphenol A exposure on reproductive capacity in several generations of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 284, 354–362.
- Zlatnik, M.G. (2016). *Endocrine-Disrupting Chemicals and Reproductive Health. J. Midwifery Womens Health.*
- Zou, Y., Ding, L., Coleman, M., and Wang, Z. (2009). Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) suppresses expression of its variant ER-alpha 36. *FEBS Lett.* 583, 1368–1374.
- Zwart, W., de Leeuw, R., Rondaij, M., Neeffjes, J., Mancini, M.A., and Michalides, R. (2010). The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *J. Cell Sci.* 123, 1253–1261.



## Résumé

Durant ma thèse, j'ai étudié l'implication d'un variant du récepteur aux œstrogènes  $\alpha$ , ER $\alpha$ 36, dans l'initiation et la progression du cancer du sein. Au laboratoire, son expression dans les cancers testiculaires avait été montrée comme étant inductrice de la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* après une exposition à un mélange de polluants environnementaux, considérés comme perturbateurs endocriniens oestrogéno-mimétique : les alkylphénols.

Une analyse rétrospective d'échantillons de tumeurs mammaires a montré, par la modélisation de réseaux d'interactions géniques, que l'expression d'ER $\alpha$ 36 était corrélée avec l'expression de marqueurs de migration cellulaire, caractéristiques de la progression tumorale. La surexpression d'ER $\alpha$ 36 par transfection *in vitro* et dans un modèle unique de souris Knocked In exprimant ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire ont montré qu'ER $\alpha$ 36 est suffisant pour altérer le phénotype épithélial des cellules mammaires saines. Une exposition aux alkylphénols qui stimulent son expression endogène accentue les altérations cellulaires observées et contribue à l'acquisition transgénérationnelle de propriétés relatives à une transformation tumorale.

Les analyses de ce projet pluridisciplinaire se sont appuyées sur des expertises biologiques, mathématiques et bioinformatiques et ont permis de mettre en évidence pour la première fois le rôle potentiel d'ER $\alpha$ 36 dans l'initiation tumorale et de confirmer son implication dans la progression du cancer du sein. Enfin, nous avons montré que l'exposition à des doses environnementales d'alkylphénols lors de la période de périnatalité peut conduire à une modification transgénérationnelle de la différenciation de la glande mammaire sous le contrôle d'ER $\alpha$ 36 et ainsi augmenter le risque de cancer mammaire.

**Mots-clés :** cancer du sein, ER $\alpha$ 36, initiation, progression, perturbateurs endocriniens, effets transgénérationnels

## Summary

This work was dedicated to study how a variant of estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ 36, acts in initiation and progression of breast cancer. In the laboratory, his expression in testicular cancer was shown to stimulate cell proliferation *in vitro* and *in vivo* after environmental pollutant exposure. The compounds studied, the alkylphenols, are endocrine disruptors, interfering with normal estrogen signaling.

Gene interaction network modelling from retrospective analysis of breast cancer samples showed that ER $\alpha$ 36 expression was correlated with the expression of cell migration markers, typical of tumor progression. *In vitro* ER $\alpha$ 36 overexpression and in a unique mouse Knocked In model, expressing ER $\alpha$ 36 in the mammary gland, showed that ER $\alpha$ 36 is sufficient to alter epithelial phenotype of normal breast cells. Alkylphenols exposure, that stimulated ER $\alpha$ 36 endogenous expression, increased cellular alterations and contributed to transgenerational acquisition of properties related to neoplastic transformation.

Analysis of this multidisciplinary project were based on biological expertise, mathematics and bioinformatic tools. These results enabled to highlight for the first time the potential role of ER $\alpha$ 36 in tumor initiation and confirmed his involvement in breast cancer progression. Finally, we showed that exposure to environmental doses of alkylphenols during the perinatal period can lead to transgenerational modification of mammary gland differentiation under ER $\alpha$ 36 control and eventually may increase breast cancer risk.

**Keywords :** breast cancer, ER $\alpha$ 36, initiation, progression, endocrine disruptors, transgenerational effects