

TABLE DES MATIERES

<i>LISTE DES ABREVIATIONS</i>	10
<i>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....</i>	12
<i>PREAMBULE.....</i>	16
<i>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</i>	18
I. ANATOMIE DU SEIN	18
A. Organisation histologique et fonctionnelle de la glande mammaire	18
1) Développement de la glande mammaire.....	18
2) Histologie et cellules de la glande mammaire.....	19
a. <i>Cellules épithéliales luminales.....</i>	19
b. <i>Cellules myoépithéliales.....</i>	20
c. <i>Cellules souches et cellules progénitrices.....</i>	21
B. Tissu adipeux et stroma : un soutien anatomique et nutritif.....	23
II. PHYSIOLOGIE ET REGULATION HORMONALE DU SEIN.....	24
A. Hormones sexuelles : synthèse et mécanismes de signalisation	24
1) Hormones stéroïdiennes et cycle menstruel	24
2) Description fonctionnelle des récepteurs nucléaires.....	25
3) Le récepteur des estrogènes	26
a. <i>Isoformes</i>	26
b. <i>Modifications post-traductionnelles</i>	26
c. <i>Mécanismes de la signalisation du récepteur des estrogènes</i>	27
i. Fixation du ligand et trafic nucléo-cytoplasmique	27
ii. Mécanismes transcriptionnels ligand-dépendants	27
iii. Co-régulateurs.....	28
iv. Mécanismes transcriptionnels ligand-indépendants	29
4) Le récepteur de la progestérone	29
a. <i>Isoformes</i>	29
b. <i>Modifications post-traductionnelles</i>	31
c. <i>Mécanismes de la signalisation du récepteur de la progestérone</i>	32
i. Fixation du ligand et trafic nucléo-cytoplasmique	32
ii. Mécanismes transcriptionnels ligand-dépendants	32
iii. Co-régulateurs.....	33
iv. Mécanismes transcriptionnels non génomiques	34
5) Hormones sexuelles : les protagonistes du développement mammaire	34
a. <i>Données issues du sein humain</i>	35
b. <i>Données issues de la glande mammaire animale.....</i>	36
B. Les glucocorticoïdes dans le sein : un rôle en exploration.....	38
1) Le récepteur des glucocorticoïdes	38
2) Signalisation des glucocorticoïdes dans le sein	39
C. Autres facteurs de développement du sein	40
III. CANCER DU SEIN.....	40
A. Données épidémiologiques	40
B. Le cancer du sein : un cancer multifactoriel.....	41
1) Prédisposition familiale héréditaire.....	41
2) Facteurs environnementaux.....	42
3) Facteurs hormonaux endogènes et vie reproductive	43

4) Facteurs hormonaux exogènes	44
5) Implication des glucocorticoïdes dans le cancer du sein	44
C. Le cancer du sein : une maladie hétérogène.....	46
1) Classification des sous-types majeurs du cancer du sein.....	46
2) Une origine cellulaire en définition.....	47
IV. MUTATION DU GENE <i>BRCA1</i> ET CANCER DU SEIN.....	50
A. Présentation de <i>BRCA1</i> : une protéine multifonctionnelle	50
1) Découverte et localisation génomique.....	50
2) Structure protéique.....	51
3) Fonctions cellulaires de <i>BRCA1</i>	51
a. <i>Intégrité du génome, réparation de l'ADN, et cycle cellulaire</i>	52
b. <i>Régulation de la transcription</i>	54
c. <i>Facteur de différenciation</i>	54
d. <i>Autres fonctions régulatrices de <i>BRCA1</i></i>	54
B. Implication de <i>BRCA1</i> dans le développement du cancer du sein et influence des hormones.....	55
1) Tumeurs <i>BRCA1</i>	55
2) Spécificité tissulaire des cancers liés à la mutation de <i>BRCA1</i>	57
3) Relation entre <i>BRCA1</i> et les récepteurs hormonaux.....	58
a. <i>Récepteur des estrogènes</i>	58
b. <i>Récepteur de la progestérone</i>	61
c. <i>Récepteur des glucocorticoïdes</i>	63
4) Etapes et facteurs de transformation tumorale <i>BRCA1</i> : une chronologie à établir.....	64
V. ANTIPROGESTATIFS ET POTENTIEL CLINIQUE	67
A. Développement et mécanismes d'action des antiprogestatifs.....	67
B. Ulipristal Acétate.....	69
1) Structure et métabolisme de l'ulipristal acétate	69
2) Actions de l'UPA sur les récepteurs nucléaires.....	69
C. Applications thérapeutiques actuelles et potentielles de l'ulipristal acétate	71
1) Contraception.....	71
2) Fibromes de l'utérus	71
3) Cancers : traitement et prévention.....	72
<i>OBJECTIFS DU PROJET</i>	74
I. Utilisation au long cours de l'UPA : quels effets sur un tissu hormono-dépendant tel que le sein ?	75
II. Rôle des hormones stéroïdiennes dans le tissu mammaire muté pour <i>BRCA1</i> et potentiel préventif de l'ulipristal acétate.....	76
A. Caractérisation de la réceptivité hormonale du tissu mammaire normal muté pour <i>BRCA1</i> et positionnement de l'UPA	76
B. Influence des glucocorticoïdes dans la tumorigénèse <i>BRCA1</i>	77

MATERIELS ET METHODES..... 79

I. ETUDE IN VITRO.....	79
A. Modèles cellulaires.....	79
1) Cellules tumorales de sein	79
2) Culture primaires de cellules épithéliales de sein, les HBE.....	79
a. <i>Patientes</i>	79
b. <i>Culture des HBE</i>	80
3) Traitement des cellules par les stéroïdes	81
B. Techniques d'étude	81
1) Transfection des cellules.....	81
2) PCR quantitative en temps réel.....	82
3) Western blot.....	83
4) Immunocytachimie par technique de cytospin.....	83
5) Etude de prolifération par incorporation de thymidine tritiée	84
6) Analyse d'apoptose et du cycle cellulaire en cytométrie de flux	84
7) Analyses statistiques	84
II. ETUDE IN VIVO.....	85
A. Xénogreffes de tissu mammaire chez la souris	85
1) Patientes et xénogreffes	85
2) Traitements.....	85
3) Mesures des concentrations sériques des stéroïdes	86
4) Analyses immunohistochimiques des greffes de tissu mammaire	86
5) Analyses statistiques	87
B. Analyse du marquage GR et P-S211GR dans le tissu mammaire normal et dans les tumeurs triple négatives	87
1) Obtention des tissus.....	87
a. <i>Tissu normal</i>	87
b. <i>Tissu tumoral</i>	87
2) Analyses immunohistochimiques	88
3) Analyses statistiques	88
RESULTATS	90

I. PREMIERE PARTIE : INFLUENCE DE L'ULIPRISTAL ACETATE DANS LE SEIN.....	90
A. Caractérisation des modèles cellulaires	90
B. Action transcriptionnelle de l'UPA dans les cellules mammaires	92
1) UPA et récepteur de la progestérone	92
2) UPA et le récepteur des glucocorticoïdes.....	94
C. Action de l'UPA sur la prolifération et l'apoptose des cellules mammaires <i>in vitro</i>	95
D. Action de l'UPA sur la prolifération du tissu mammaire humain <i>in vivo</i> .	96
E. DISCUSSION	98
II. DEUXIEME PARTIE : REGULATIONS HORMONALES DU TISSU MAMMAIRE MUTE POUR BRCA1 ET POSITIONNEMENT DE L'ULIPRISTAL ACETATE	104

A. Caractérisation de la réceptivité hormonale du tissu mammaire normal muté par rapport au tissu non muté et positionnement de l'UPA	104
1) <i>In vitro</i>	104
2) <i>In vivo</i>	105
a. <i>Tissus avant greffes</i>	106
b. <i>Effet des traitements sur les tissus greffés</i>	107
3) DISCUSSION	111
B. Influence des glucocorticoïdes dans la tumorigenèse <i>BRCA1</i>	120
1) Expression des GR et P-S211GR dans le sein normal <i>BRCA1^{+/−}</i> et <i>BRCA1^{+/+}</i> .	120
a. <i>Expression du GR total</i>	120
b. <i>Expression de P-S211GR</i>	121
2) Expression des GR et P-S211GR dans les tumeurs triple négatives des femmes mutées et non mutées.....	122
3) DISCUSSION	122
<i>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES DU PROJET</i>	128
REFERENCES.....	134
ANNEXES	155

LISTE DES ABREVIATIONS

a.a : Acide aminé

ALDH1 : Aldéhyde déshydrogénase 1

AP-1 : Activator Protein 1

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

BARD1 : BRCA1 Associated RING Domain 1

BRCA1 : BRCA1

CARM : Coactivator-associated arginine methyltransferase

CK : Cytokératines

CSC : Cellule Souche Cancéreuse

DEX : Dexaméthasone

DSB : Cassure de l'ADN double brin

E2 : Estradiol

EGF : Epidermal Growth Factor

EpCam (ESA) : molécule d'adhésion cellulaire épithéliale (Epithelial Specific Antigen)

ER : Récepteur des estrogènes

ERE : Elément de réponse des estrogènes (Estrogen Responsive Element)

FSH : Hormone folliculo-stimulante

GC : Glucocorticoïdes

GR : Récepteur des glucocorticoïdes

HDAC : Histones déacetylase

HSP : Heat Shock Protein, ou protéine chaperonne

IGF-1 : Insulin Growth Factor 1

IGF-1R : Insulin Growth Factor 1 Receptor

K : Résidu lysine

LH : Hormone lutéinisante

LOH : perte d'hétérozygotie (Loss Of Heterozygosity)

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases

MMTV : Mouse Mammary Tumor Virus

MUC1 : glycoprotéine mucine 1

N-CoR : Nuclear Receptor CoRepressor

NES : Signal d'exportation nucléaire (Nuclear Exportation Signal)

NLS : Signal de localisation nucléaire (Nuclear Localisation Signal)

P : Progestérone

PR : Récepteur de la progestérone

PRE : Elément de réponse de la progestérone (Progesterone Responsive Element)

PRLR : Récepteur de la prolactine

PRMRT : Protéine arginine méthyltransférase

P-S211GR : Récepteur des glucocorticoïdes phosphorylé en position sérine 211

RANK : Tumor necrosis factor receptor, superfamily, member 11a, NF κ B activator

RANKL : Tumor necrosis factor ligand, superfamily, member 11

RH : Recombinaison Homologue

RU : Mifépristone (RU 486)

S : Résidu sérine

SCD : Séquences riches en résidus serines (S) et thréonine (Q) appelées SQ clusters Domain

SMRT : Silencing Mediator of Retinoic Acid

SP1 : Stimulating Protein 1

SRC-1, SRC-2, SRC-3 : Steroid Receptor Co-activators 1, 2, 3

UPA : Ulipristal acétate, aussi appelé VA2914 et CDB2914

WAP : Whey Acidic Protein

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Dessin de la glande mammaire vue par Sir Cooper après injection de cires colorées dans le mamelon	p18
Figure 2 : Coupe schématique du sein, de profil	p18
Figure 3 : Développement de la glande mammaire	p19
Figure 4 : Représentation schématique d'un acinus	p20
Figure 5 : Isolation des cellules souches par la technique des mammosphères	p22
Figure 6 : Hiérarchie cellulaire et marqueurs de la glande mammaire humaine	p23
Figure 7 : Illustration du cycle menstruel et des variations hormonales	p24
Figure 8 : Métabolisme des stéroïdes	p24
Figure 9 : Structure générale des récepteurs nucléaires	p25
Figure 10 : Structures des 2 isoformes du récepteur de l'estradiol, ER α et ER β	p26
Figure 11 : Sites des principales modifications post-traductionnelles de ER α	p26
Figure 12 : Conformation du LBD de ER α lié à un agoniste ou à un antagoniste	p27
Figure 13 : Mécanisme d'activation transcriptionnelle par ER via le site ERE et le recrutement de co-activateurs	p28
Figure 14 : Transcription et traduction des isoformes humaines PR-A et PR-B à partir de deux promoteurs distincts sur le même gène	p29
Figure 15 : gènes cibles des isoformes de PR-A et PR-B	p30
Figure 16 : Sites des principales modifications post-traductionnelles de PR	p31
Figure 17 : Mécanismes transcriptionnels de PR, dépendants des ligands	p33
Figure 18 : Hormones et facteurs de croissance impliqués dans les différentes étapes de développement du sein	p35

Figure 19 : Structure protéique du récepteur GR α et pourcentage d'homologie structurale avec PR-A	p38
Figure 20 : Incidence du cancer du sein à travers le monde	p40
Figure 21 : Incidence et mortalité du cancer du sein entre 1980 et 2005 en France	p41
Figure 22 : Classification moléculaire des six principaux sous-types de cancer du sein	p46
Figure 23 : Illustration de deux modèles d'hétérogénéité intertumorale	p48
Figure 24 : Modèle hypothétique de la hiérarchie cellulaire de la glande mammaire en relation avec les principaux sous-types tumoraux	p50
Figure 25 : Structure protéique et principaux domaines fonctionnels de BRCA1	p51
Figure 26 : Implication de BRCA1 dans les différents points de contrôle du cycle cellulaire en réponse à des dommages de l'ADN	p52
Figure 27 : Implication de BRCA1 dans la signalisation et la réparation de l'ADN	p53
Figure 28 : Illustration du rôle proposé de BRCA1 dans la différenciation des cellules progénitrices ER $^-$ en cellules progénitrices ER $^+$	p54
Figure 29 : Principales mutations de BRCA1 et implications démontrées sur ses actions cellulaires	p55
Figure 30 : Représentation des différentes voies de régulation mises en jeu entre BRCA1 et ER α	p58
Figure 31 : Représentation de la régulation des PR par BRCA1	p62
Figure 32 : Structures de la progestérone, de la mifépristone, de l'ulipristal acétate et de ses métabolites	p69
Figure 33 : Illustration des problématiques de l'étude	p74
Figure 34 : Profil des récepteurs nucléaires ER α , PR et GR α dans les T-47D, les MCF-7 et les HBE	p90
Figure 35 : Activité transcriptionnelle des PR et des GR dans les T-47D, les MCF-7 et les HBE	p91

Figure 36 : Effets de l'UPA sur la transactivation du gène rapporteur MMTV-Luc	p92
Figure 37 : Effets de l'UPA sur la transcription des gènes cibles de PR	p93
Figure 38 : Effets de l'UPA sur la transactivation du gène rapporteur GRE-Luc	p94
Figure 39 : Effets de l'UPA sur la transcription des gènes cibles de GR	p95
Figure 40 : Effets de l'UPA sur la prolifération cellulaire régulée par les hormones	p96
Figure 41 : Effets de l'UPA sur l'apoptose cellulaire régulée par les hormones	p96
Figure 42 : Expression de PR, ER α , et du Ki67 dans la glande mammaire xénogreffée chez la souris	p98
Figure 43 : Age des patientes prélevées pour l'étude de xénogreffes du tissu mammaire chez la souris	p105
Figure 44 : Expression de ER α , PR et du Ki67 dans le tissu avant greffes des patientes non mutées (<i>BRCA1</i> ^{+/+}) et mutées (<i>BRCA1</i> ⁺⁻)	p106
Figure 45 : Expression de ER α dans les lobules et les galactophores	p107
Figure 46 : Expression de PR dans les lobules	p108
Figure 47 : Expression de PR dans les galactophores	p109
Figure 48 : Expression du Ki67 dans les lobules	p110
Figure 49 : Expression du Ki67 dans les galactophores	p111
Figure 50 : Description du score d'Allred utilisé pour la quantification immunohistochimique du GR et du P-S211GR	p118
Figure 51 : Expression du GR total dans les tissus mammaires normaux non mutés <i>BRCA1</i> ^{+/+} et mutés <i>BRCA1</i> ⁺⁻	p120
Figure 52 : Expression du P-S211GR dans les tissus mammaires normaux non mutés <i>BRCA1</i> ^{+/+} et mutés <i>BRCA1</i> ⁺⁻	p121
Figure 53 : Expression du P-S211GR dans les cancers triple négatifs (TN) de patientes non mutées et de patientes mutées pour <i>BRCA1</i>	p122
Tableau 1 : Affinité du RU 486 et de l'UPA pour les récepteurs nucléaires PR, GR et AR	p70

Tableau 2 : Anticorps utilisés et dilution associées en fonction de la technique et des cellules	p83
Tableau 3 : Concentrations sériques des stéroïdes après 28 jours de traitement chez la souris	p97
Tableau 4 : Caractéristiques des patientes non mutées	p97
Tableau 5 : Caractéristiques des patientes mutées pour <i>BRCA1</i>	p105
Tableau 6 : Caractéristiques des patientes porteuses de mutations <i>BRCA1</i>	p119

PREAMBULE

L'étude des régulations hormonales du sein a constitué l'axe majeur de mon doctorat. Cette étude a concerné les hormones ovaraines, l'estradiol et la progestérone, de même que les hormones glucocorticoïdes. L'ensemble de ces stéroïdes est impliqué dans le développement de la glande mammaire mais également dans sa transformation tumorale. Cependant, les mécanismes et les conséquences biologiques des régulations mises en jeu par ces hormones sont complexes et sont encore mal définis. Il est donc d'une importance capitale d'aller plus loin dans leur compréhension afin de mieux définir les étapes de déclenchement de la tumorigénèse, notamment chez les femmes à haut risque de cancer du sein. La caractérisation de ces régulations hormonales et de leurs effets pourraient permettre d'établir des traitements préventifs chez les femmes à haut risque.

C'est cette perspective qui a motivé mon travail au sein du laboratoire durant quatre ans. Ce doctorat m'a permis de travailler sur le tissu mammaire normal de patientes à haut risque de cancer du sein lié à la présence d'une mutation héréditaire du gène *BRCA1*. Cet accès à ce tissu a été facilité par une collaboration INCa sur le projet BRACAPS avec l'équipe de recherche CNRS 8200 du Pr Jean Feunteun à l'institut Gustave Roussy, ainsi qu'avec plusieurs cliniciens français. Cette collaboration a permis d'établir une interface constante entre les aspects fondamentaux et cliniques de ce projet qui s'est donc montré extrêmement enrichissant pour moi. Par ailleurs, dans le cadre d'une bourse CIFRE de doctorat en collaboration avec le laboratoire HRA pharma, j'ai eu la chance d'avoir accès à un antiprogestatif, l'ulipristal acétate (UPA), dont j'ai pu évaluer les effets dans le sein, ainsi que son potentiel préventif chez les femmes mutées.

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

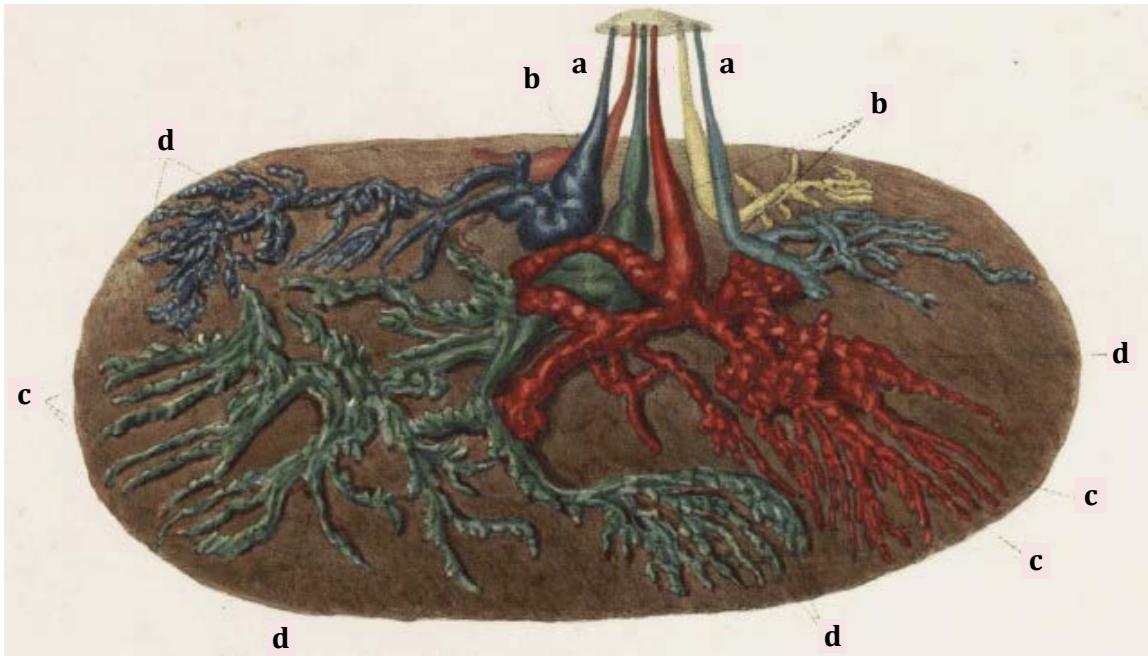


Figure 1 : Dessin de la glande mammaire vue par Sir Cooper après injection de cires colorées dans le mamelon. **a.** canaux lactifères excréteurs, **b.** sinus lactifères, **c.** galactophores, **d.** lobules (Cooper 1840).

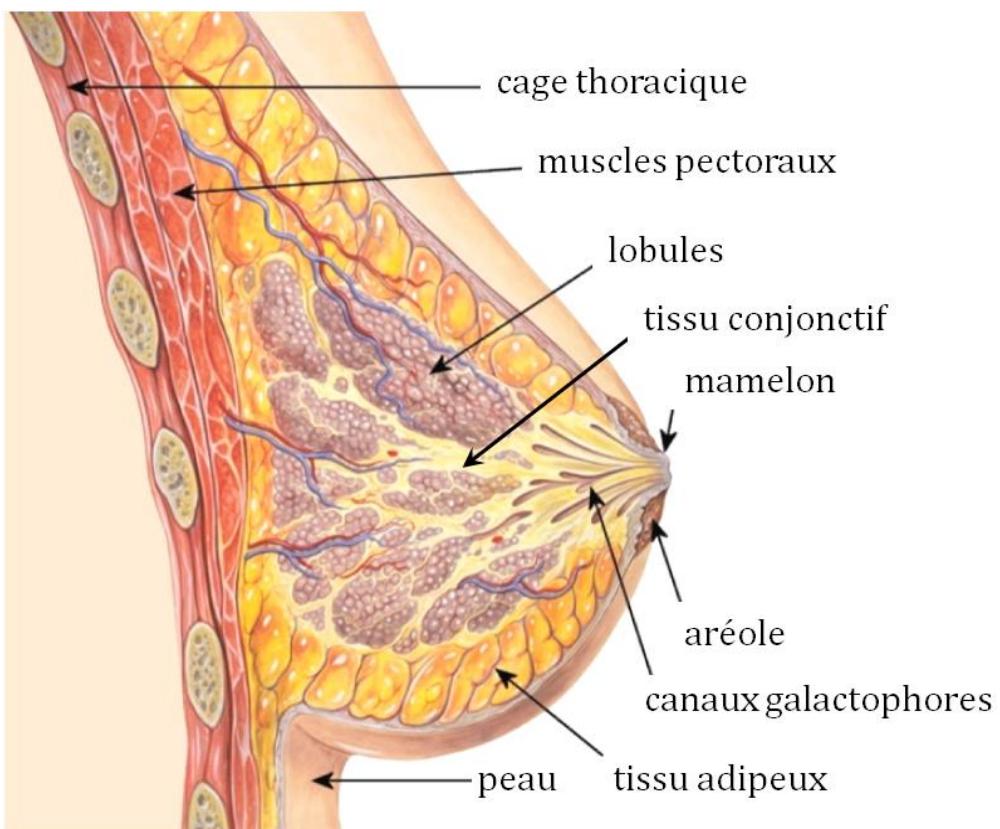


Figure 2 : Coupe schématique du sein, de profil. Les seins sont rattachés à la paroi thoracique au niveau des muscles pectoraux. Le sein est essentiellement composé de tissu adipeux qui entoure et maintient la glande mammaire. Celle-ci est constituée de lobules capables de produire le lait qui va être acheminé jusqu'au mamelon par les galactophores. Un réseau veineux et artériel permet l'apport de sang et de nutriments au réseau glandulaire.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. ANATOMIE DU SEIN

L'anatomie du sein humain fut décrite pour la première fois en 1840 par Sir Astley Paston Cooper, un chirurgien et anatomiste anglais. Des injections de cires de différentes couleurs dans le mamelon lui permirent de mettre en évidence un réseau glandulaire enchevêtré dans du tissu adipeux (**Figure 1**) (Cooper 1840). L'étude de seins prélevés sur des corps de femmes d'âge et de situations reproductives variables a ouvert la voie des connaissances actuelles portant sur le développement anatomique et physiologique du sein, et d'autres études ont depuis, apporté leur pierre à l'édifice.

A. Organisation histologique et fonctionnelle de la glande mammaire

La glande mammaire est dédiée à l'allaitement des nouveaux-nés chez les mammifères. Chez la femme, le sein est composé de 12 à 20 lobes de glande mammaire, séparés et maintenus par des tissus conjonctif et adipeux. Chaque lobe est constitué de lobules desservis par des canaux lactifères ou galactophores qui se rejoignent au niveau du mamelon (**Figures 1 et 2**). Sous l'influence des hormones ovaries et hypophysaires, le développement de la glande mammaire suit plusieurs stades de différentiation associés notamment à la puberté, la grossesse et la lactation, ainsi qu'à la ménopause. Cette évolution morphologique a été particulièrement bien décrite par plusieurs équipes, grâce à l'étude histologique et fonctionnelle de glandes mammaires prélevées à différents stades du développement et de la vie reproductive.

1) Développement de la glande mammaire

A la naissance, la glande mammaire est essentiellement formée de galactophores se terminant par des unités ducto-lobulaires simples ou TDLU (Terminal Ductal Lobular Unit) (**Figure 3 A**). Durant la croissance, des bourgeons alvéolaires se forment progressivement sur les terminaisons des galactophores. A la puberté, le sein subit des modifications importantes liées à une augmentation du volume de tissu adipeux et à une différentiation de la glande mammaire. Les galactophores se ramifient progressivement

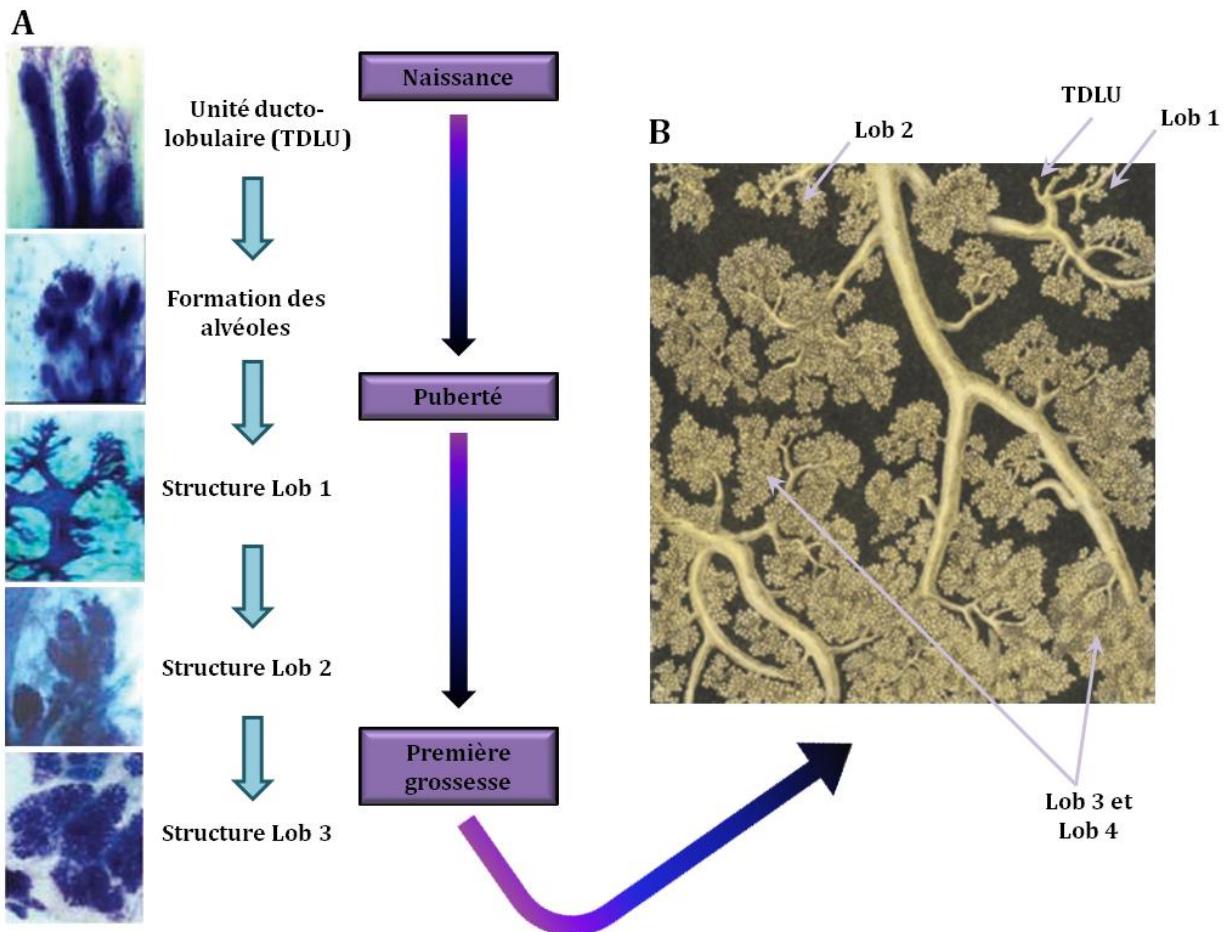


Figure 3 : Développement de la glande mammaire. **A.** Différenciation de la glande mammaire de la naissance à la première grossesse (adapté de Russo, Moral et al. 2005). **B.** Dessin de la glande mammaire en cours de lactation après injection de cire dans les canaux. Les lobules sont majoritairement de type Lob 3 et 4 (Cooper 1840).

et vont constituer des lobules plus différenciés appelés Lob 1 qui contiennent une dizaine de structures alvéolaires chacun. Certains Lob 1 vont également se développer en Lob 2 par extension du nombre de ramifications et d'alvéoles, mais cette différentiation n'ira pas plus loin chez les femmes nullipares. En revanche, lors de la première grossesse, les Lob 3 apparaissent et constituent des structures lobulaires beaucoup plus riches de plus de 80 alvéoles. Ces structures alvéolaires atteignent leur seuil maximal de différenciation lors du dernier trimestre de la grossesse, par l'acquisition d'une fonction sécrétoire propre aux Lob 4 ou acini, responsables de la production de lait (**Figure 3 A et B**). Ces structures Lob 4 restent actives tout au long de l'allaitement, mais à l'arrêt de celui-ci, les acini régressent en structures Lob 3 et 2 par apoptose massive des cellules épithéliales. Après la ménopause, les lobules se dédifférencient en structures morphologiquement semblables aux Lob 1 présents chez les femmes nullipares (Howard and Gusterson 2000; Naccarato, Viacava et al. 2000; Russo and Russo 2004; Russo, Mailo et al. 2005; Russo, Moral et al. 2005).

2) Histologie et cellules de la glande mammaire

Dès la vingt huitième semaine de vie intra-utérine, les structures canalaires et lobulaires de la glande mammaire humaine sont constituées d'un épithélium de deux types cellulaires répartis en deux ou plusieurs couches organisées autour d'une lumière. La couche interne est composée de cellules épithéliales luminales polarisées qui sont responsables de la production du lait pendant la lactation. Les cellules épithéliales basales, ou cellules myoépithéliales, constituent la couche externe et bordent la membrane basale qui sépare le compartiment épithéial de la matrice extracellulaire (MEC), du stroma ou tissu palléal, et du tissu adipeux présents autour des structures de la glande mammaire (**Figure 4**) (Anbazhagan, Osin et al. 1998; Howard and Gusterson 2000; Russo and Russo 2004).

a. *Cellules épithéliales luminales*

Les cellules luminales constituent la couche interne des structures de la glande mammaire (**Figure 4**). Sous l'influence d'hormones ou de facteurs de croissance, ces cellules sont responsables de la production du lait lors de la lactation. Les cellules luminales sont classiquement caractérisées par l'expression de la molécule d'adhésion EpCAM/ESA, la glycoprotéine mucine 1 (MUC-1), les cytokératines CK8 et CK18, les récepteurs hormonaux à l'estradiol (ER), à la progestérone (PR) et à la prolactine

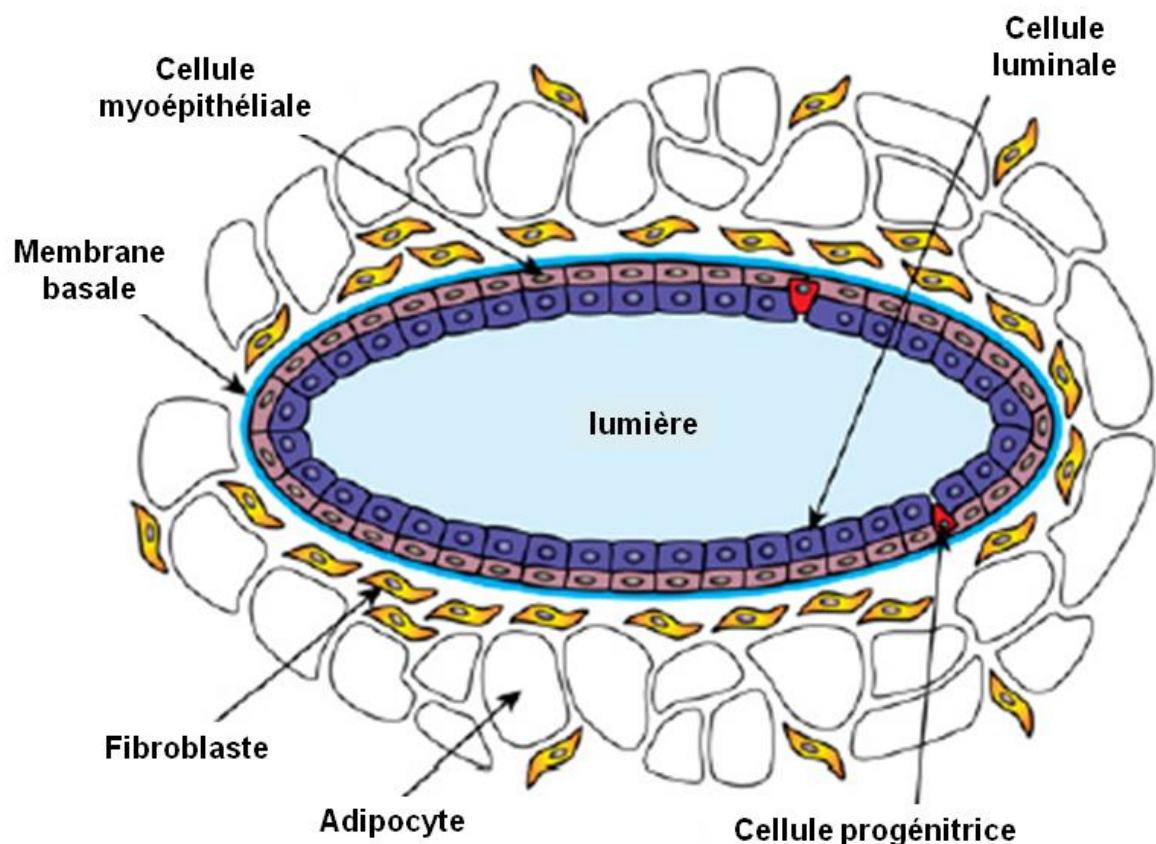


Figure 4 : Représentation schématique d'un acinus. Les cellules épithéliales luminales bordent la lumière et sont entourées par les cellules myoépithéliales en contact avec la membrane basale. Les cellules progénitrices sont peu nombreuses et sont nichées entre les cellules luminales et myoépithéliales. Les acini sont entourés de tissu stromal essentiellement composé de fibroblastes, et de tissu adipeux (adipocytes) (adapté de Visvader 2009).

(PRLR), ainsi que par la production de protéines du lait comme la caséine et la lactalbumine-alpha durant la lactation (Dulbecco, Henahan et al. 1982; Kao, Nomata et al. 1995; Stingl, Eaves et al. 1998). Il a également été démontré que certaines cellules luminales pouvaient exprimer les cytokératines 5/6 (CK5/6), 14 (CK14) et 17 (CK17) de façon significative (Page, Amess et al. 1999).

b. Cellules myoépithéliales

Les cellules myoépithéliales sont, comme leur nom l'indique, des cellules épithéliales présentant des caractéristiques de cellules musculaires lisses et dont le rôle est de favoriser le transport du lait à travers les galactophores, des acini jusqu'au mamelon (**Figure 4**). Ces cellules de forme allongée ou étoilée sont réparties en une couche plus ou moins discontinue en périphérie des cellules luminales, et possèdent de longs prolongements cytoplasmiques qui constituent un réseau contractile. Les cellules myoépithéliales expriment les CK5/6, CK14 et CK17, l'endopeptidase neutre (CD10/CALLA), la cadhérine P et le facteur de transcription p63, caractéristiques des cellules basales des épithéliums stratifiés. Elles sont également riches en protéines spécifiques des cellules musculaires lisses et responsables de leurs propriétés contractiles, telles que des myofilaments projetés dans le stroma dont notamment l'actine alpha du muscle lisse (SMA) ou la myosine (Kao, Nomata et al. 1995; Howard and Gusterson 2000; Gusterson, Ross et al. 2005; Dewar, Fadare et al. 2011). Par ailleurs il a été montré que les cellules myoépithéliales pouvaient agir comme des gardiennes de l'intégrité tissulaire de la glande mammaire en maintenant la polarité des structures (Gudjonsson, Ronnov-Jessen et al. 2002). Les cellules myoépithéliales contribuent à la formation et au maintien de la membrane basale par l'expression de fibronectine, de collagène IV et de laminines (Warburton, Ferns et al. 1982; Petersen and van Deurs 1988). Leur attachement à la membrane basale ainsi qu'aux autres cellules passe notamment par des intégrines telles que les intégrines beta 4 et alpha 1 (Gudjonsson, Ronnov-Jessen et al. 2002; Gudjonsson, Adriance et al. 2005). Certaines cellules myoépithéliales montrent cependant un profil moins différencié par l'absence d'expression de la protéine SMA ou des CK5, CK14 ou CK17. Cela suggère une hiérarchie dans la différentiation du lignage myoépithérial (Zhang, Man et al. 2003).

c. Cellules souches et cellules progénitrices

Cette partie est une mise à jour des connaissances existantes sur les cellules souches adultes multipotentes et les cellules progénitrices de la glande mammaire. Par opposition aux cellules souches totipotentes capables de générer un organisme complet, les cellules souches adultes multipotentes sont déjà engagées dans un programme de différentiation qui leur permet seulement de donner naissance à plusieurs types cellulaires, souvent au sein d'un même organe. Les propriétés de ces cellules souches adultes associent une longue durée de vie et une capacité à la fois à s'auto-renouveler et à produire des cellules filles capables de se différencier. Les cellules progénitrices issues des cellules souches sont d'autant plus spécialisées dans la formation d'un tissu et présentent une capacité d'auto-renouvellement plus limitée. Les données suivantes sont issues de nombreux travaux et sont essentielles à la compréhension des mécanismes du développement de la glande mammaire.

La capacité du sein à proliférer et se différencier intensivement en fonction des périodes de la vie génitale a rapidement suggéré la présence de cellules souches capables de se régénérer pour faire évoluer la morphologie de la glande mammaire. Des études réalisées sur les cellules de la glande mammaire humaine et murine ont permis de mettre en évidence l'existence de cellules souches multipotentes capables de régénérer une glande mammaire complète. Au départ, il a été suggéré que les terminaisons des TDLU pouvaient être des foyers de cellules souches puisqu'ils étaient à l'origine des transformations morphologiques et de la différenciation de la glande mammaire (Dulbecco, Henahan et al. 1982). Cependant, l'équipe de D. Medina a montré que des fragments prélevés à différents endroits de la glande mammaire murine puis implantés dans le coussin adipeux mammaire de la souris étaient capables de former des structures différencierées et fonctionnelles, indiquant que ces cellules souches étaient réparties dans l'ensemble du réseau de la glande mammaire (**Figure 4**) (Smith and Medina 1988). Le même type d'expérience a été réalisé à l'aide de cellules mammaires prélevées et digérées à partir de glande mammaire humaine, puis implantées chez la souris immunodéficiente NOD/SCID. Dans ces conditions, la reconstitution d'une glande mammaire humaine complète n'a pu être observée qu'avec l'injection préalable de fibroblastes mammaires humains immortalisés dans le coussin adipeux des souris, soulignant ici l'influence de l'environnement stromal dans développement de la glande mammaire (Kuperwasser, Chavarria et al. 2004).

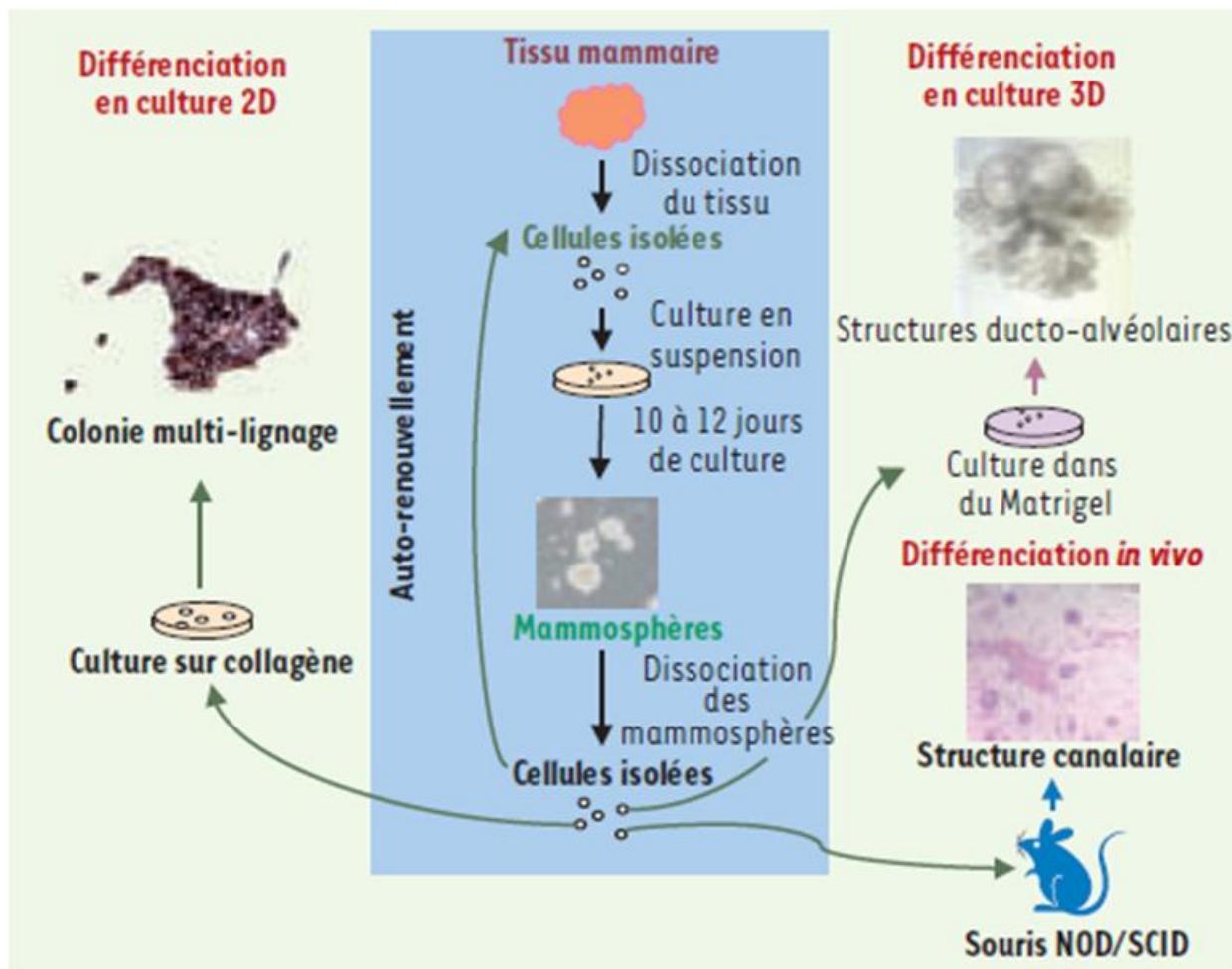


Figure 5 : Isolation des cellules souches par la technique des mammosphères. La croissance en suspension des cellules de la glande mammaire permet d'enrichir la fraction des cellules ayant des caractéristiques de cellules souches. Ces cellules s'auto-renouvellent et ont la capacité de former des structures différenciées en 2D et en 3D, et de reconstituer une structure mammaire humaine dans le coussin adipeux de souris immunodéficientes (Ginestier, Korkaya et al. 2007).

Par ailleurs, la technique de formation des « mammosphères » mise au point par le laboratoire de M. Wicha, a permis d'isoler des populations enrichies en cellules souches à partir de la glande mammaire humaine. Comme illustré en **Figure 5**, les cellules épithéliales dissociées par voie enzymatique sont mises en culture en suspension, dans un milieu sans sérum mais complété par des facteurs de croissance. Dans ces conditions, seul un petit nombre de cellules est capable de survivre et de proliférer pour former des sphéroïdes multicellulaires appelés mammosphères. Ces cellules présentent des propriétés de cellules souches et sont capables de s'auto-renouveler. Les cellules des mammosphères cultivées en 2D sur du collagène se différencient et donnent des colonies multi-lignages (cellules luminales et myoépithéliales). Lorsqu'elles sont cultivées en 3D dans du Matrigel elles donnent naissance à des structures lobulaires. Enfin, l'injection de ces cellules dans le coussin adipeux mammaire de souris immunodéficientes NOD/SCID permet de reconstituer des structures mammaires différenciées (Dontu, Abdallah et al. 2003).

La technique de cytométrie de flux servant à isoler les cellules exprimant un marqueur spécifique a permis de caractériser le phénotype des cellules constituant les mammosphères, et plus spécifiquement des cellules capables de régénérer une glande mammaire ou bien un type cellulaire particulier après réimplantation chez la souris. Les marqueurs des cellules souches et de ces cellules progénitrices ont pu être définis et l'idée d'une hiérarchie cellulaire au sein de la glande mammaire a ainsi été établie. Un modèle de cette hiérarchie a été proposé par J. Visvader, à partir des marqueurs humains identifiés (**Figure 6**) (Visvader 2009). Parmi les principaux marqueurs déterminés, l'aldéhyde déshydrogénase 1 (ALDH1) montre une activité exacerbée dans le compartiment cellulaire capable de générer des structures de glande mammaire une fois implantées chez la souris. Si des cellules positives pour ALDH1 sont capables de donner naissance à des colonies cellulaires composées de cellules épithéliales luminales EpCAM/ESA⁺ et myoépithéliales CALLA/CD10⁺, elles-mêmes ne présentent pas ces deux marqueurs, ni-même les marqueurs CK5/6, CK14, CK18 ou SMA. Cela indique qu'il s'agirait donc de cellules souches ou progénitrices bipotentes dédifférenciées, capables de se diviser en cellules plus différenciées de type épithéliales luminales ou myoépithéliales. Le faible pourcentage (4 à 10%) de cellules ALDH1⁺ capables de s'auto-renouveler en formant des mammosphères, laisse penser qu'il s'agirait plutôt d'un marqueur spécifique des progénitrices avec une capacité d'auto-renouvellement limitée.

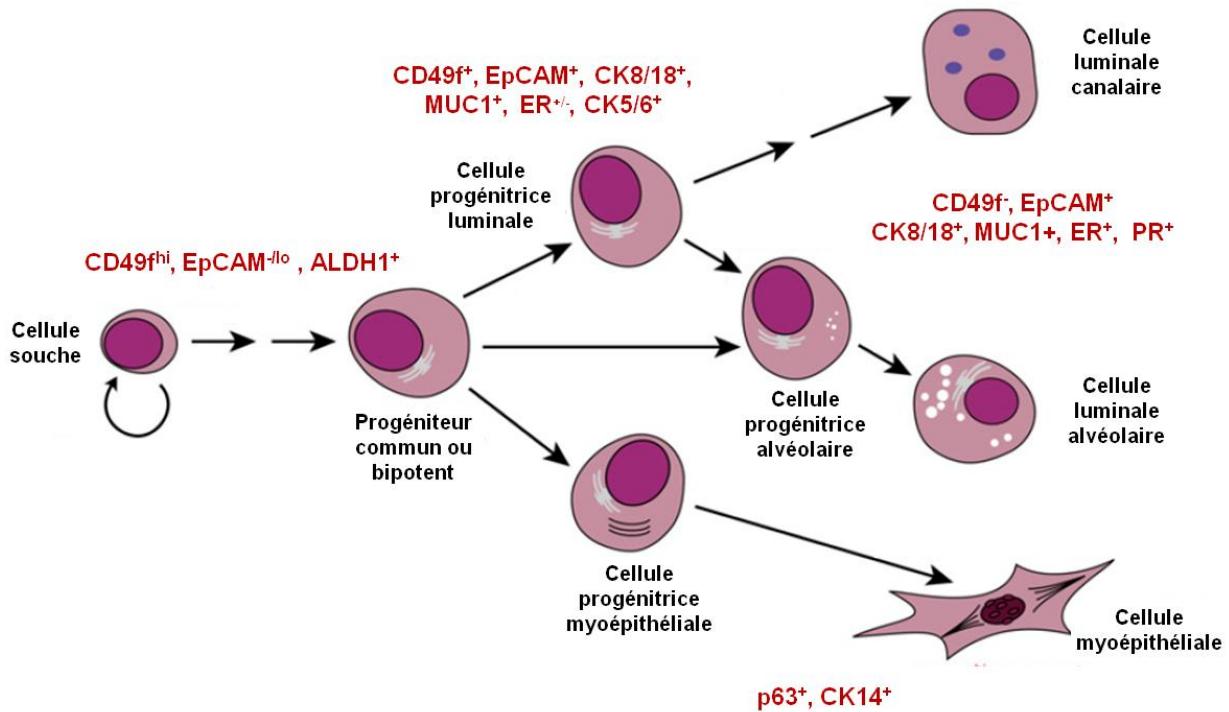


Figure 6 : Hiérarchie cellulaire et marqueurs de la glande mammaire humaine. Les cellules souches de la glande mammaire se différencient pour donner des progéniteurs bipotents avec une capacité d'auto-renouvellement limité. Ces progéniteurs vont à leur tour se différencier pour conduire à l'apparition de cellules myoépithéliales ou luminales matures. Ces processus de différenciation passent par l'expression de marqueurs spécifiques indiqués en rouge. L'expression du marqueur CD49f spécifique des cellules souches, diminue au cours de la différenciation vers le compartiment luminal mature, à l'inverse du marqueur épithélial luminal EpCAM (adapté de Visvader 2009).

Par ailleurs seules 67% des colonies cellulaires formées par les cellules ALDH1⁺ sont constituées d'un mélange de cellules luminales et myoépithéliales, indiquant que ce marqueur n'est pas totalement spécifique des cellules souches ou progénitrices de la glande mammaire (Ginestier, Hur et al. 2007).

Les sous-populations cellulaires exprimant fortement l'intégrine alpha 6 (CD49f) et très faiblement EpCAM (populations dites CD49f^{hi}/EpCAM^{lo/-}) sont également enrichies en cellules ayant des propriétés de cellules souches ou progénitrices bipotentes. Ces cellules sont capables de régénérer des structures de glande mammaire et présentent des capacités d'auto-renouvellement qui sont cependant limitées (Eirew, Stingl et al. 2008; Lim, Vaillant et al. 2009). Le niveau d'expression de ces deux marqueurs a aussi permis de caractériser des cellules progénitrices engagées dans une voie de différentiation. Les cellules CD49f^{hi}/EpCAM^{lo/-} expriment les marqueurs p63 et CK14 pour 76 et 60% d'entre elles respectivement, ce qui témoignerait d'une capacité à se différencier en cellules myoépithéliales, en plus de leur capacité de cellules bipotentes. Les populations CD49f⁺/EpCAM⁺ sont enrichies en cellules progénitrices luminales. En effet ces cellules expriment majoritairement les marqueurs MUC1, CK8, CK18, CK19 spécifiques des cellules luminales différenciées CD49f/EpCAM⁺ et seulement un tiers d'entre elles expriment ER α . Il s'agit aussi de la seule population qui exprime CD133, un marqueur de cellules progénitrices dans d'autres tissus. Néanmoins, cinquante pour cent d'entre elles expriment aussi les CK5/6, ce qui expliquerait pourquoi ce marqueur est retrouvé dans certaines cellules luminales différencierées (Stingl, Eaves et al. 2001; Eirew, Stingl et al. 2008; Raouf, Zhao et al. 2008; Lim, Vaillant et al. 2009). L'ensemble de ces études suggère donc fortement que les cellules luminales et myoépithéliales proviendraient d'un progéniteur commun et que le compartiment épithelial de la glande mammaire est étroitement hiérarchisé (**Figure 6**).

B. Tissu adipeux et stroma : un soutien anatomique et nutritif

Le tissu mammaire ne doit pas être considéré comme une glande mammaire active entourée de tissus environnants passifs. Il y a de plus en plus de démonstrations d'un rôle du stroma et du tissu adipeux dans la croissance, la différentiation, la lactation et la transformation tumorale de la glande mammaire. La vascularisation et le système lymphatique permettent également de fournir un apport nutritif mais aussi une

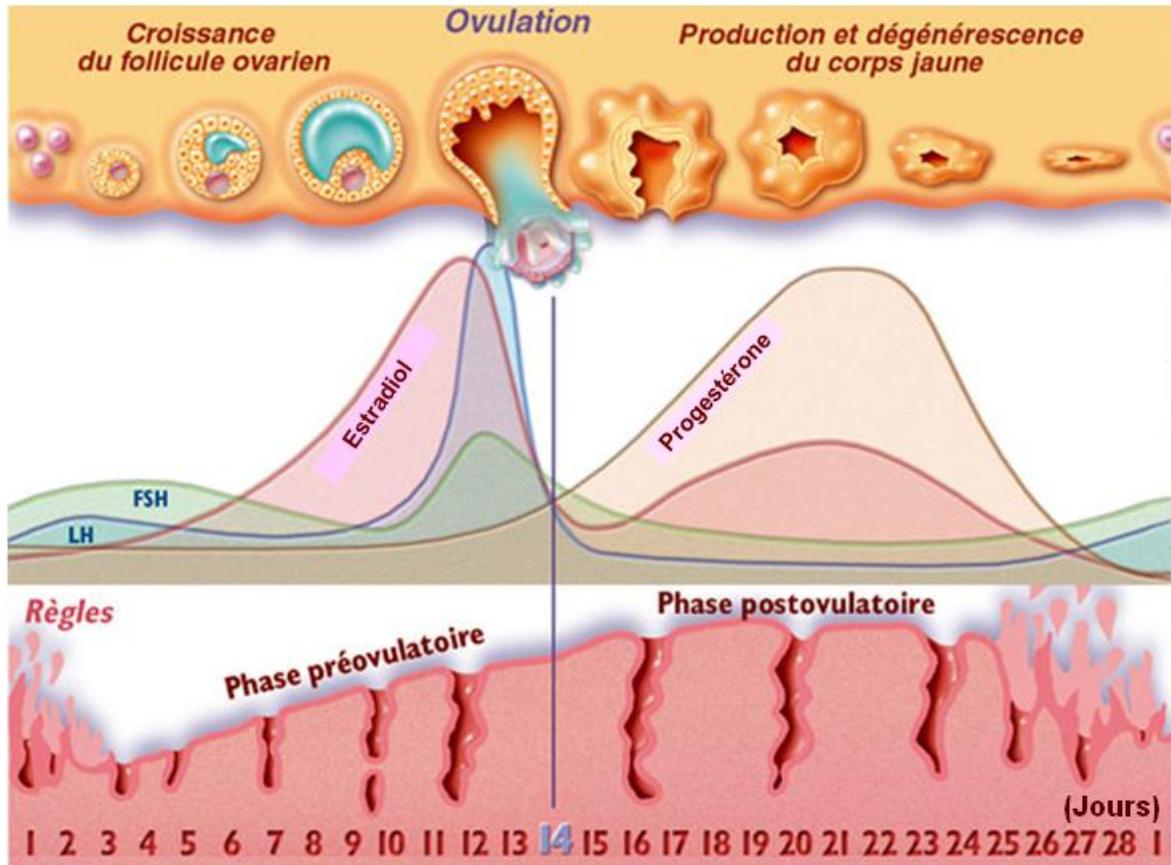


Figure 7 : Illustration du cycle menstruel et des variations hormonales. Sous l'influence de la LH et de la FSH, l'estradiol est sécrété par le follicule en développement jusqu'à l'ovulation. Suite à l'ovulation, la progesterone et l'estradiol sont synthétisés par le corps jaune ovarien.

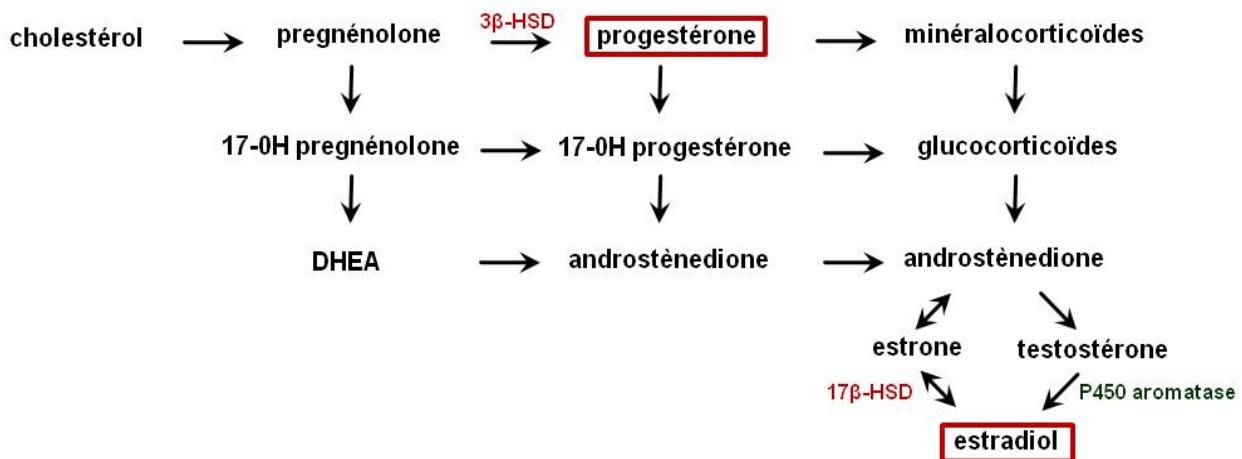


Figure 8 : Métabolisme des stéroïdes ; principales étapes du métabolisme de la progesterone et de l'estadiol à partir du cholestérol. L'enzyme 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD) catalyse la transformation de la prégnénolone en progesterone, tandis que la 17 β -HSD et la P450 aromatase catalysent les transformations respectives de l'estrone et de la testostérone en estradiol.

protection immunitaire à la glande mammaire. La plupart des études sur le microenvironnement mammaire ont cependant été réalisées chez la souris et ces connaissances nécessitent d'être confirmées chez la femme.

II. PHYSIOLOGIE ET REGULATION HORMONALE DU SEIN

La régulation développementale et physiologique du sein est majoritairement liée à l'action des hormones ovaries, l'estradiol et la progestérone, mais également à celle d'autres hormones comme la prolactine, les glucocorticoïdes, mais aussi l'hormone de croissance (GH), l'insuline et l'insuline-like growth factor (IGF1). Cette partie a donc pour objectif de rappeler l'effet de ces molécules, en insistant sur l'influence des hormones ovaries qui est prépondérante.

A. Hormones sexuelles : synthèse et mécanismes de signalisation

1) Hormones stéroïdiennes et cycle menstruel

Les deux principales hormones féminines sont l'estradiol (E2) et la progestérone (P). Ces hormones sont principalement sécrétées par les ovaires mais peuvent aussi être produites localement et minoritairement dans le tissu adipeux, l'hypothalamus, et les surrénales. La progestérone est également produite par le placenta lors de la grossesse. Leur sécrétion varie en fonction de l'âge : elle augmente à la puberté, diminue à la ménopause et présente des variations cycliques lors de chaque cycle menstruel. Ces régulations hormonales au cours du cycle menstruel sont illustrées en **Figure 7**. L'ovaire comporte un certain nombre de follicules dits primordiaux. A partir de la puberté, plusieurs follicules entrent chaque mois en développement sous l'influence des hormones hypophysaires, la FSH (Hormone folliculo-stimulante) et la LH (Hormone lutéinisante). Seulement l'un d'entre eux complètera sa maturation jusqu'à l'expulsion de l'ovule. Lors de la phase folliculaire qui précède l'ovulation, l'estradiol est produit par les cellules folliculaires en développement. En phase lutéale ou sécrétoire qui suit l'ovulation, la progestérone et l'estradiol sont produits par le corps jaune du follicule en régression. En absence de fécondation, la production d'estradiol et de progestérone commence à baisser à partir de 7 jours après l'ovulation (Mihm, Ganguly et al. 2011). Comme toutes les hormones stéroïdiennes, l'estradiol et la progestérone sont des

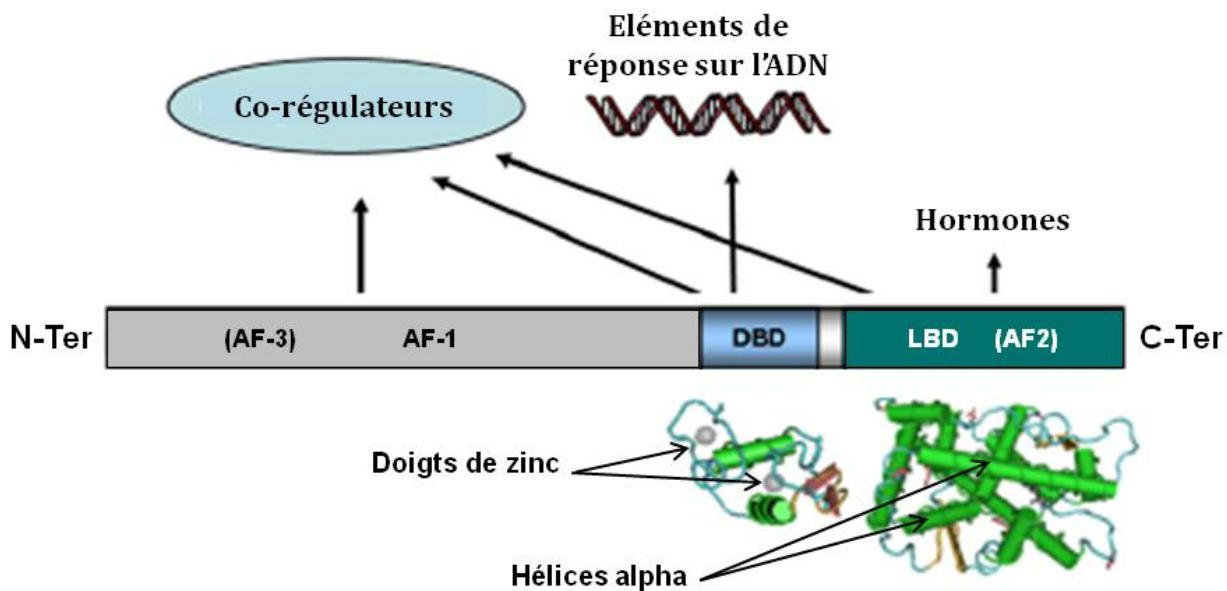


Figure 9 : Structure générale des récepteurs nucléaires. La région N-Terminale (N-Ter) contient la/les fonctions d'activation de la transcription AF-1 et AF-3 selon les récepteurs. Cette région peut interagir avec des co-régulateurs transcriptionnels. Les récepteurs nucléaires se lient à des éléments de réponse situés sur les promoteurs de leurs gènes cibles, via le domaine DBD. La structure cristallographique du domaine DBD représente les deux doigts de zinc qui le constituent. En région C-Terminale (C-Ter) se trouve le domaine d'interaction avec les ligands (LBD). Les ligands naturels des récepteurs nucléaires sont des hormones. Le LBD comporte la fonction d'activation AF-2 et est constitué de feuillets d'hélices α (adapté de McEwan and Nardulli 2009).

dérivés du cholestérol (**Figure 8**). En plus de leurs diverses actions sur l'endomètre, l'utérus, les ovaires et l'axe gonadotrope, l'estriadiol et la progestérone influent sur le développement du sein au cours des évènements de la vie génitale. Ces actions passent principalement par les récepteurs nucléaires spécifiques de ces hormones, le récepteur des estrogènes (ER) et le récepteur de la progestérone (PR).

2) Description fonctionnelle des récepteurs nucléaires

ER et PR font partie de la famille des récepteurs nucléaires, qui sont des facteurs de transcription activés par des ligands. Ces récepteurs ont des organisations structurales communes (Evans 1988; Whitfield, Jurutka et al. 1999; McEwan and Nardulli 2009).

Au niveau protéique, les récepteurs nucléaires se composent de plusieurs domaines fonctionnels (**Figure 9**) :

- La région N-Terminale du récepteur comporte une ou deux fonctions d'activation de la transcription, AF-1 et éventuellement AF-3 selon les récepteurs, qui agissent de façon indépendante du ligand.
- Le domaine DBD de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain) est bien conservé entre les espèces. Il est composé de deux doigts de zinc responsables d'une part de la fixation du récepteur à l'ADN et d'autre part de la capacité des récepteurs nucléaires à dimériser.
- Le domaine de liaison au ligand ou LBD (Ligand Binding Domain) se situe dans la partie C-Terminale de la protéine. Ce domaine partage une structure tridimensionnelle similaire pour tous les récepteurs nucléaires. La poche de liaison du LBD assure la spécificité entre le ligand et le récepteur et est composée de couches d'hélices α antiparallèles. Le LBD contient également une fonction d'activation de la transcription AF-2 dont l'activité va dépendre du ligand.

Les modifications conformationnelles des récepteurs peuvent différer selon la nature des ligands, et être ainsi responsables d'actions variables au sein de la cellule.

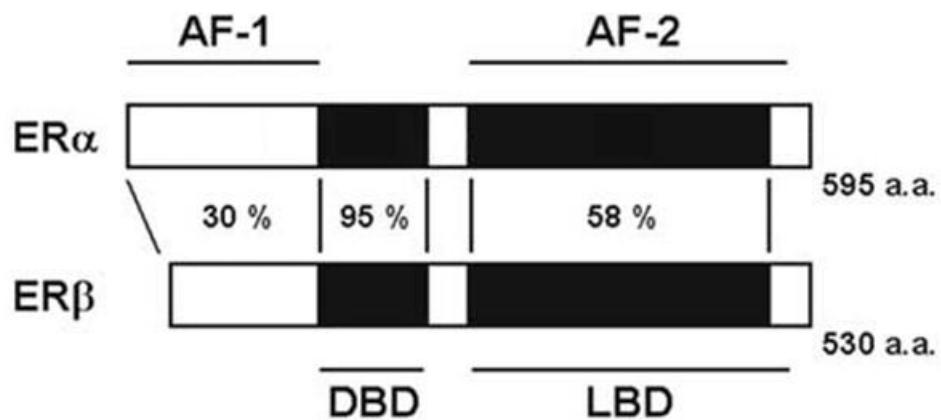


Figure 10 : Structures des 2 isoformes du récepteur de l'estradiol humain, ER α et ER β . Les pourcentages d'homologie entre les séquences de chaque domaine sont indiqués. La protéine ER β est moins longue que la protéine ER α , en raison de son domaine AF-1 plus court (adapté de Marino, Ascenzi et al. 2006).

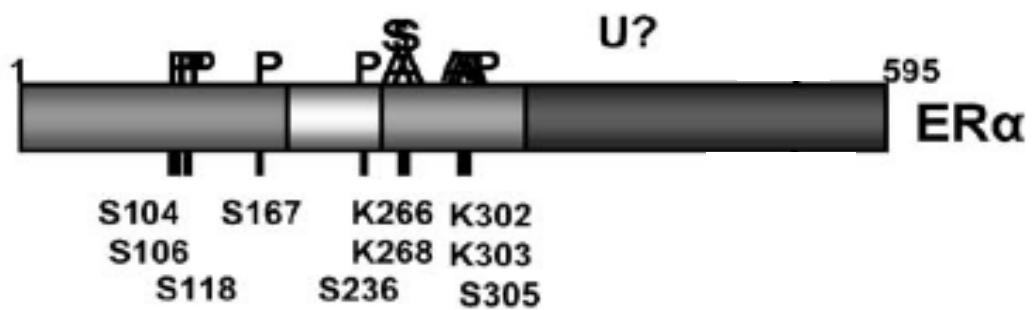


Figure 11 : Sites des principales modifications post-traductionnelles de ER α . P : phosphorylation, S : sumoylation, A : acétylation, U? : ubiquitination dont le site n'est pas connu (adapté de Faus and Haendler 2006).

3) Le récepteur des estrogènes

a. Isoformes

Il existe deux isoformes du récepteur des estrogènes, ER α et ER β , qui sont les produits de deux gènes (*ESR1* et *ESR2*) situés sur deux chromosomes distincts (loci 6q25.1 et 14q23.2). Ces deux gènes comportent 8 exons séparés par 7 régions introniques. Les protéines ER issues de ces gènes comportent deux fonctions de transactivation : AF-1 et AF-2, mais la fonction AF-1 de ER β est plus courte et ne partage que 30% d'homologie avec celle de ER α (**Figure 10**) (Ponglikitmongkol, Green et al. 1988; Hall and McDonnell 1999; Marino, Galluzzo et al. 2006). Au niveau de la glande mammaire, la majorité des effets de l'estradiol sont régulés par l'intermédiaire de ER α et les effets estrogéniques passant par ER β restent encore à approfondir. Il a par ailleurs été montré que l'invalidation de ER β n'empêchait pas le développement lobulaire et canalaire, ni même la lactation chez la souris, bien qu'il soit potentiellement impliqué dans la différentiation terminale des acini (Forster, Makela et al. 2002). Dans la suite de ce travail, nous focaliserons sur les effets liés à ER α .

b. Modifications post-traductionnelles

La protéine ER α peut être soumise à plusieurs types de modifications post-traductionnelles, qui jouent un rôle dans ses régulations fonctionnelles et dont les sites sont représentés en **Figure 11** :

- ER α est le siège de phosphorylations sur les séries 104 (S104), 106 (S106), 118 (S118) ou 167 (S167). Ces phosphorylations augmentent l'activité transcriptionnelle du récepteur, ainsi que sa capacité à se dimériser (Lannigan 2003; Ward and Weigel 2009). A l'inverse, la phosphorylation du site S236 résulte en une inhibition de la dimérisation du récepteur conduisant à une réduction de son activation par l'estradiol (Chen, Pace et al. 1999). Enfin la phosphorylation de la serine S305 faciliterait le recrutement de co-activateurs et de l'ARN polymérase II sur le site de transcription des gènes cibles (Ward and Weigel 2009).
- L'acétylation des résidus lysines 266 (K266) et 268 (K268) permet d'augmenter la capacité de fixation du récepteur ER à l'ADN tandis que les sites K302 et K303 acétylés réduisent la réponse du récepteur après fixation d'un ligand agoniste (Faus and Haendler 2006; Kim, Woo et al. 2006).

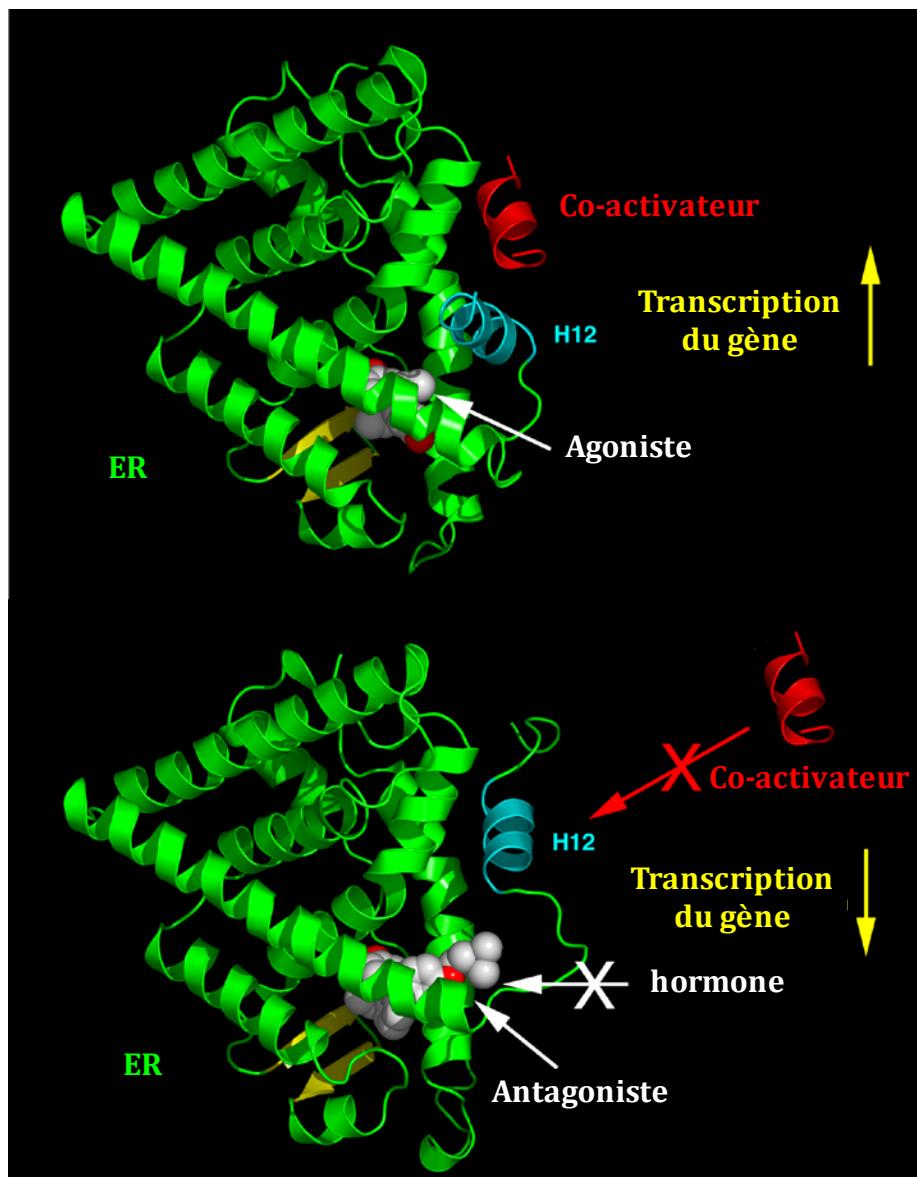


Figure 12 : Conformation du LBD de ER α lié à un agoniste ou à un antagoniste. La fixation d'un ligand agoniste dans la poche de liaison du LBD induit un positionnement de l'hélice H12 (en bleu) qui permet le recrutement d'un co-activateur (en rouge) et l'induction de la transcription du gène cible. Lorsqu'un antagoniste se fixe dans la poche de liaison du LBD, l'hélice H12 adopte une position qui empêche le recrutement d'un co-activateur et favorise celui d'un co-répresseur, ce qui inhibe la transcription du gène cible (adapté de Brzozowski, Pike et al. 1997).

- La sumoylation des résidus K266 et K268 est dépendante de la fixation du ligand et est responsable de la stimulation de l'activité du récepteur (Sentis, Le Romancer et al. 2005).
- L'ubiquitination de ER α induit sa dégradation par le protéasome mais le site de l'ubiquitination du récepteur n'est pas déterminé (Faus and Haendler 2006).

c. Mécanismes de la signalisation du récepteur des estrogènes

i. Fixation du ligand et trafic nucléo-cytoplasmique

En absence de ligand, les protéines ER se présentent sous forme monomérique dans le cytoplasme et le noyau, complexées au niveau du LBD avec des protéines chaperonnes HSP (Heat Shock Proteins), principalement HSP70 et HSP90. La liaison du ligand entraîne un changement conformationnel du récepteur, responsable de la dissociation des HSP. La fonction AF-2 s'étend sur plusieurs de ces hélices, et notamment sur l'hélice H12 qui joue un rôle discriminant dans la conformation induite par la fixation des différents types de ligands. Ainsi, en présence d'un agoniste, l'hélice H12 se referme sur la poche de liaison du ligand de façon à permettre le recrutement d'un co-activateur de transcription sur le domaine AF-2 (**Figure 12**). En revanche, lorsque ER est associé à un antagoniste, l'hélice H12 occupe une position différente qui empêche la fixation de co-activateurs mais est favorable au recrutement de co-répresseurs (**Figure 12**). Après fixation du ligand, ER se dimérisé avec un autre récepteur et le complexe est alors transféré vers le noyau (Kushner, Agard et al. 2000; Reid, Denger et al. 2002; Ascenzi, Bocedi et al. 2006).

ii. Mécanismes transcriptionnels ligand-dépendants

Ainsi dimérisé, le complexe ER-ligand développe une affinité pour une séquence ADN consensus en palindrome : 5'-GGTCAnnnTGACC-3'. Cette séquence ERE (Estrogen Responsive Element) est spécifique de ER, et est localisée sur les promoteurs de ses gènes cibles. Via les domaines AF-1 et AF-2, la fixation du complexe sur cette séquence entraîne le recrutement de facteurs co-régulateurs impliqués dans le remodelage de la chromatine et l'activation transcriptionnelle (McKenna and O'Malley 2002) (**Figure 13**). En fonction du type cellulaire et des promoteurs mis en jeu, le récepteur peut alors exercer une activité stimulatrice ou inhibitrice vis-à-vis de l'expression des gènes cibles (Tora, White et al. 1989). Par ailleurs il existe des variations discrètes au sein des séquences ERE, qui modulent l'affinité pour les ER et donc la puissance de l'action

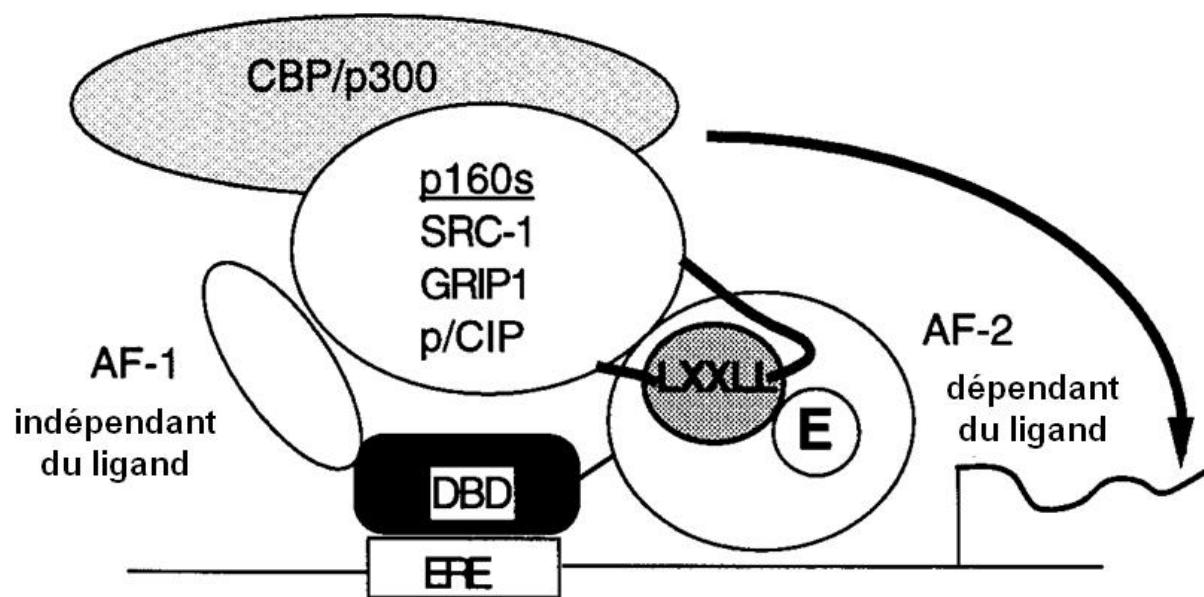


Figure 13 : Mécanisme d'activation transcriptionnelle par ER α via le site ERE et le recrutement de co-activateurs. Par l'intermédiaire de la fonction AF-2, le complexe ER-ligand lié à l'ERE recrute les co-activateurs de la famille p160, ainsi que CBP/p300 pour induire la transcription du gène cible (Kushner, Agard et al. 2000).

transcriptionnelle de ER selon les gènes cibles (Wood, Likhite et al. 2001; Yi, Driscoll et al. 2002).

ER est également capable d'induire la transcription de gènes contenant seulement des « demi-ERE » ou ERE imparfaits, par liaison indirecte avec l'ADN, en interagissant avec un complexe formé de deux facteurs de transcription fos et jun également appelé AP-1 (Activator Protein 1) (Safe and Kim 2008). Par ailleurs l'expression de certains gènes contenant des séquences promotrices riches en bases GC, est activée via l'interaction de ER avec le complexe SP1 (Stimulating Protein 1) (Petz and Nardulli 2000; Hall, Couse et al. 2001).

iii. Co-régulateurs

Les régions AF-1 et AF-2 permettent aux récepteurs ER d'interagir avec différents co-régulateurs regroupés sous les termes génériques de co-activateurs s'ils permettent d'induire la transcription d'un gène, et de co-répresseurs s'ils sont au contraire des inhibiteurs de la transcription.

L'interaction des ER avec différents co-activateurs stabilise la formation du complexe d'initiation transcriptionnelle et facilite l'accès au gène par la machinerie de transcription (**Figure 13**). La première famille de co-activateurs à avoir été identifiée se compose de SRC-1, SRC-2/TIF2/GRIP1 et SRC-3/pCIP (Steroid Receptor Coactivator 1, 2, 3). Cette famille de protéines nommée p160 en raison de leur poids moléculaire de 160 kDa, interagit avec de nombreux récepteurs nucléaires de façon ligand-dépendante (Onate, Tsai et al. 1995). Ces co-activateurs possèdent trois motifs LXXLL ou NR-box qui interviennent dans l'interaction avec la région AF-2 du récepteur (**Figure 13**). Deux régions d'activation transcriptionnelle sont également présentes dans la structure de ces co-activateurs : AD1 et AD2. Le domaine AD1 peut recruter d'autres co-activateurs possédant une activité histone acétyl-transférase intrinsèque comme CBP/p300, et le domaine AD2 peut recruter des protéines arginine méthyltransférases (PRMRT, ou CARM pour coactivator-associated arginine methyltransferase). Ces protéines vont permettre de remodeler la chromatine par modification des liaisons entre l'ADN et les histones notamment, afin d'augmenter l'accessibilité de la machinerie de transcription à l'ADN (Rowan and O'Malley 2000; McKenna and O'Malley 2002; McKenna and O'Malley 2002).

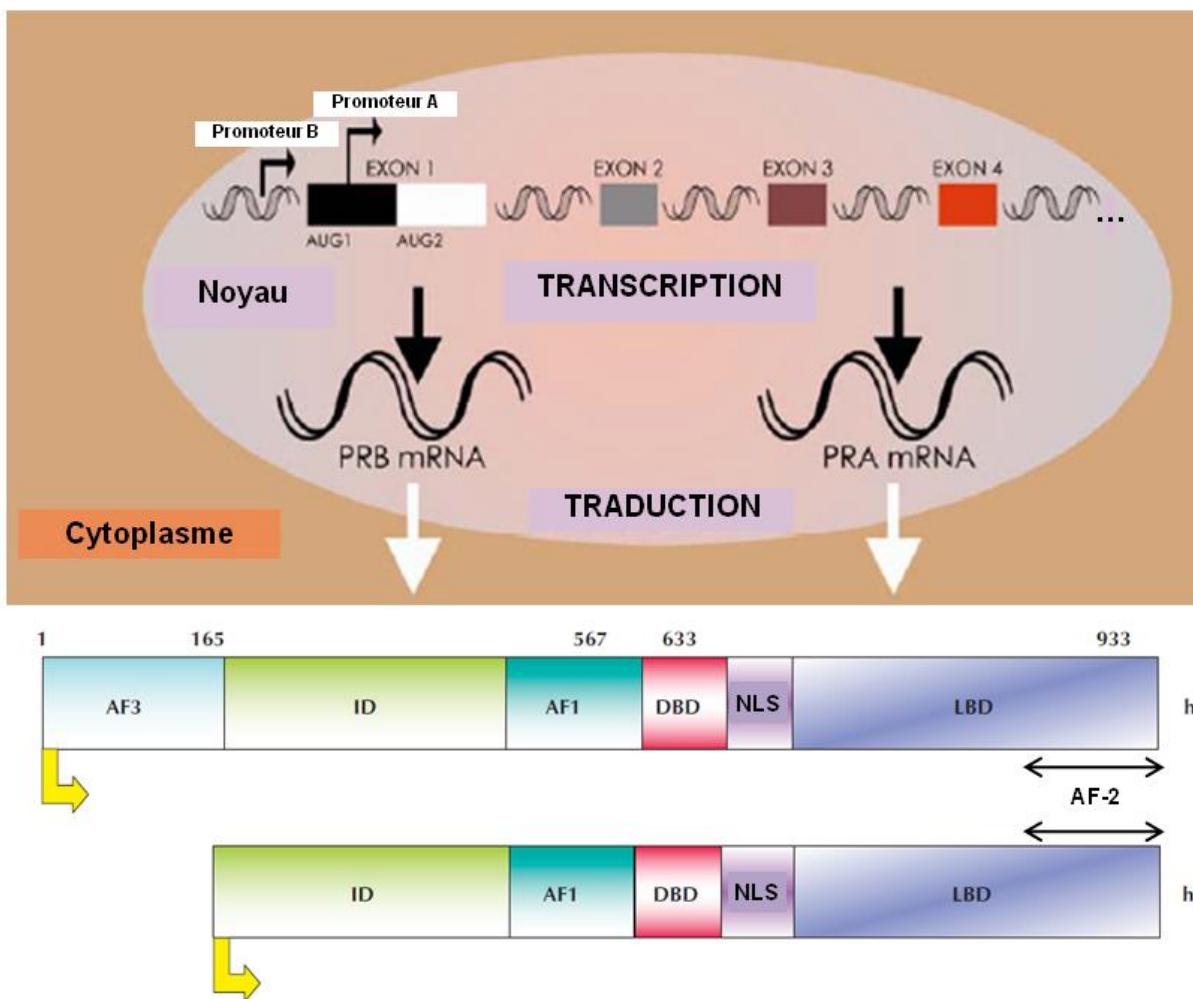


Figure 14 : Transcription et traduction des isoformes humaines PR-A et PR-B à partir de deux promoteurs distincts sur le même gène. Le site d'initiation du promoteur B est localisé au début de l'exon 1 (AUG1), tandis que celui du promoteur A (AUG2) est situé plus en aval dans l'exon 1. L'isoforme PR-B possède un domaine d'activation AF-3 manquant chez PR-A. Les deux isoformes présentent les domaines classiques des récepteurs nucléaires ; DBD, LBD ainsi que des signaux de localisation nucléaire (NLS). L'AF-2 est situé dans le LBD, en C-Terminal. Adapté de Chabbert-buffet 2005 ; Mc Cormack, Harrison et al. 2007.

Les co-répresseurs les mieux décrits pour leur rôle dans l'inhibition des activités transcriptionnelles des ER sont N-CoR (Nuclear Receptor CoRepressor) et SMRT (Silencing Mediator of Retinoic Acid). Ils peuvent être recrutés en absence de ligands ou bien en présence d'un antagoniste du récepteur, et permettent de mobiliser des histones déacétylases (HDAC) pour augmenter la compaction de la chromatine (Jackson, Richer et al. 1997; Wagner, Norris et al. 1998; Rowan and O'Malley 2000).

iv. Mécanismes transcriptionnels ligand-indépendants

En parallèle d'une activation ligand-dépendante, ER peut être modulé par des signaux extracellulaires, en absence d'E2. En effet, les facteurs de croissance comme l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'IGF-1 (Insulin Growth Factor 1) et l'insuline sont capables d'activer ER et d'induire l'expression de ses gènes cibles (Ignar-Trowbridge, Pimentel et al. 1995). L'activation de kinases MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) par ces facteurs de croissance entraîne la phosphorylation de la serine 118 localisée au niveau de la fonction AF-1 et permet au récepteur de potentialiser la transcription de gène cibles (Kato, Endoh et al. 1995; Kato, Kitamoto et al. 1998; Kato 2001).

A l'aide de l'ensemble de ces mécanismes transcriptionnels, l'un des rôles majeurs de la signalisation estrogénique est d'activer la signalisation progestative pour contrôler conjointement certains processus biologiques de l'organisme, parmi lesquels le développement de la glande mammaire.

4) Le récepteur de la progestérone

a. Isoformes

PR est composé de deux isoformes majoritaires, PR-A et PR-B, qui sont issues de la transcription d'un même gène localisé sur le chromosome 11 (11q2.2), contrôlé par deux promoteurs distincts A et B comportant chacun un site AUG d'initiation de transcription (Kastner, Krust et al. 1990; Giangrande, Pollio et al. 1997; Giangrande and McDonnell 1999) (**Figure 14**). PR-B est une protéine de 114 kDa contenant 933 acides aminés et trois fonctions d'activation AF-1, 2 et 3. L'isoforme PR-A est une protéine plus courte de 95 kDa, et diffère seulement de PR-B par l'absence de 164 acides aminés qui constituent la fonction AF-3 (ou domaine BUS) dans la région N-Terminale (**Figure 14**) (Lessey, Alexander et al. 1983; Sartorius, Melville et al. 1994). PR-A et PR-B présentent

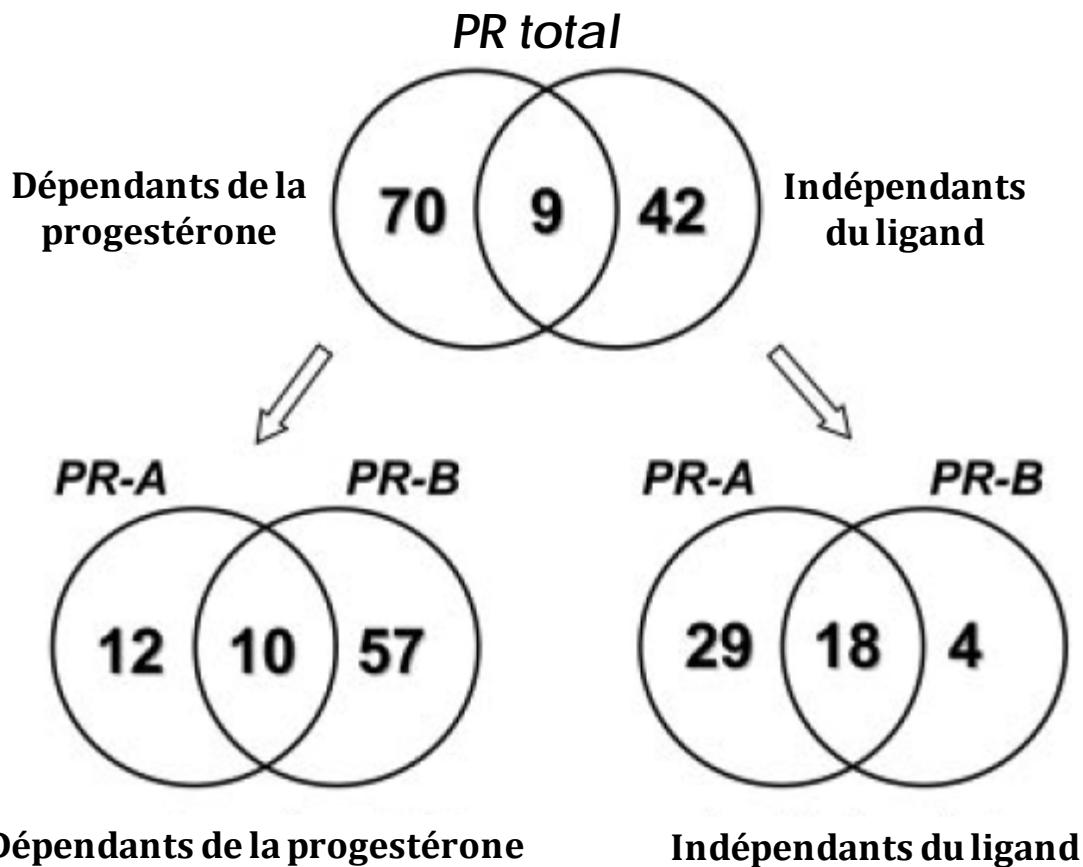


Figure 15 : Gènes cibles des isoformes de PR-A et PR-B. Nombre de gènes régulés par PR-A ou PR-B ou les deux, de façon dépendante ou indépendante de la progestérone dans la lignée tumorale mammaire humaine T-47D exprimant sélectivement les isoformes. La majorité des gènes cibles répondants à la progestérone sont régulés par PR-B tandis que la majorité des gènes indépendants du ligand sont régulés par PR-B (adapté de Jacobsen, Schittone et al. 2005). Il est à noter que ce travail a été effectué dans une lignée tumorale et qu'il est probable que les gènes cibles des isoformes PR puissent être en partie différents dans les cellules mammaires normales.

aussi un domaine inhibiteur (ID) de l'activation de transcription, situé en N-Terminal pour PR-A, et entre les fonctions AF-3 et AF-1 pour PR-B. Ces deux isoformes contiennent également les domaines classiques de la famille des récepteurs nucléaires décrits précédemment (**Figure 9 et 14**). L'isoforme PR-A serait inhibitrice de l'activité du PR-B ainsi que d'autres récepteurs comme ER α (Giangrande, Pollio et al. 1997; McGowan and Clarke 1999). Il a été proposé que les PR-A étaient plus affins des co-répresseurs de transcription comme SMRT mais avaient moins d'affinité pour des co-activateurs comme SRC-1 par rapport aux PR-B (Giangrande, Pollio et al. 1997; McGowan and Clarke 1999; Giangrande, Kimbrel et al. 2000). Cependant ces activités ont été montrées en condition de surexpression et non confirmées ultérieurement dans d'autres études dans les cellules de sein normal (Graham, Yager et al. 2005). L'action transcriptionnelle de ces deux isoformes est néanmoins différente, puisque les gènes cibles de PR-A et PR-B sont en partie différents bien que certains gènes puissent aussi être régulés par les deux isoformes (**Figure 15**) (Graham, Yager et al. 2005; Jacobsen, Schittone et al. 2005). Les études d'invalidation de PR-A ou B chez la souris indiquent d'ailleurs que ces deux isoformes se comporteraient comme des activateurs transcriptionnels mais de façon tissu-spécifique (Lydon, DeMayo et al. 1995; Mulac-Jericevic, Mullinax et al. 2000).

Une troisième isoforme de 60 kDa nommée PR-C et transcrrite à partir du même gène a aussi été décrite (Wei, Gonzalez-Aller et al. 1990). PR-C est tronqué dans sa partie N-Terminale et ne comporte ni le domaine ID, ni l'AF-1 présents chez PR-A et PR-B. Le DBD est également tronqué, bloquant la capacité de PR-C à se lier à l'ADN. Cette isoforme est majoritairement localisée dans le cytoplasme où elle peut se lier à la progestérone, et potentiellement exercer un effet dominant négatif en empêchant la fixation de la progestérone sur les autres isoformes (Wei, Gonzalez-Aller et al. 1990; Wei, Hawkins et al. 1996). PR-C est capable de dimériser avec PR-B, et de réduire l'affinité du complexe pour les PRE (Wei, Norris et al. 1997). Un rôle de PR-C a été suggéré dans la parturition puisque le ratio PR-C/PR-B est augmenté lors du travail, ce qui bloquerait la capacité de PR-B à maintenir l'utérus quiescent et augmenterait alors son pouvoir contractile (Condon, Jeyasuria et al. 2003; Condon, Hardy et al. 2006).

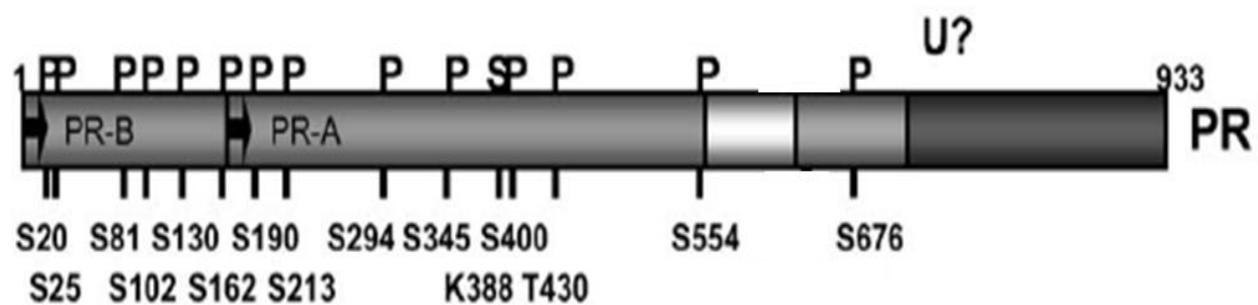


Figure 16 : Sites des principales modifications post-traductionnelles de PR. P : phosphorylation, S : sumoylation, U ? : ubiquitination dont le site n'est pas connu, S : sérine, K : lysine (adapté de Faus and Haendler 2006).

b. Modifications post-traductionnelles

Comme tous les récepteurs nucléaires, les PR sont soumis à des modifications post-traductionnelles qui vont permettre de moduler l'activité des PR au sein des cellules. Ces modifications dont les sites sont représentés en **Figure 16**, sont principalement des phosphorylations, des ubiquitinations et des sumoylations :

- La structure des PR comporte 14 sites de phosphorylation potentiels sur des résidus séries. Parmi les mieux caractérisés, la phosphorylation de la S294 par les MAPK p42 et p44 est induite par la fixation du ligand. Cette phosphorylation favorise la translocation du complexe vers le noyau et augmente son activité transcriptionnelle (Lange, Shen et al. 2000; Shen, Horwitz et al. 2001). Les facteurs de croissance comme l'EGF peuvent également stimuler la phosphorylation en S294 afin d'augmenter la sensibilité des PR pour les ligands ou bien même d'induire une activation de transcription ligand-indépendante (Daniel, Qiu et al. 2007). Par ailleurs, il a été montré que le site S294 du PR-B était plus susceptible d'être phosphorylé que celui du PR-A, ce qui pourrait expliquer une partie des différences observées dans leurs actions (Clemm, Sherman et al. 2000). La phosphorylation du résidu S345 permettrait l'identification des gènes cibles ne comportant pas de PRE, puisque la mutation de cette sérine empêche la reconnaissance des sites SP1 (Faivre, Daniel et al. 2008). La phosphorylation en S400 mène à la stabilisation du récepteur (Shen, Horwitz et al. 2001).

- La sumoylation des PR par addition de protéine SUMO sur le résidu lysine K388 est un mécanisme d'inhibition de l'activité transcriptionnelle du récepteur qui entre en compétition avec l'état de phosphorylation de PR (Abdel-Hafiz, Takimoto et al. 2002). En effet, la fixation d'un ligand agoniste sur PR-B fait entrer en jeu le mécanisme de sumoylation du récepteur pour contrôler ses effets, mais ce processus peut être inhibé par la phosphorylation de PR en S294 (Chauchereau, Amazit et al. 2003). Il y a donc une balance entre phosphorylation et sumoylation qui régit en partie l'activité transcriptionnelle des PR (Daniel, Faivre et al. 2007).

- Pour certains récepteurs nucléaires comme PR, la phosphorylation et l'ubiquitination sont des mécanismes conjoints puisque la phosphorylation de PR en S294 permet le démasquage et la reconnaissance de séquences spécifiques de dégradation par des ubiquitines ligases qui vont s'y fixer pour servir de substrat au protéasome 26S (Lange, Shen et al. 2000; Shen, Horwitz et al. 2001).

c. Mécanismes de la signalisation du récepteur de la progestérone

i. Fixation du ligand et trafic nucléo-cytoplasmique

Lorsqu'il n'est pas lié à un ligand, le récepteur PR est principalement localisé dans le noyau mais aussi dans le cytoplasme, et effectue des allers-retours constants grâce à son domaine NLS de localisation nucléaire et à une diffusion passive dans le cytoplasme (Guiochon-Mantel, Delabre et al. 1996). En absence de ligand, l'isoforme PR-A est principalement nucléaire tandis que l'isoforme PR-B est plus également répartie entre le noyau et le cytoplasme et présente une plus grande mobilité intracellulaire que PR-A (Boonyaratanaornkit, McGowan et al. 2007).

Tout comme le récepteur à l'estradiol, PR est sous forme monomérique en absence de ligand, lié à des protéines chaperonnes dont l'HSP90 (Smith, Whitesell et al. 1995). L'étude de PR par analyse cristallographique a montré que son LBD était constitué seulement de onze hélices alpha par rapport aux douze hélices des ER. La nomenclature de ces hélices est cependant conservée entre ces deux récepteurs, laissant ainsi la dénomination d'hélice H12 à l'hélice responsable de la fermeture de la poche de liaison du ligand. Cette hélice est plus longue pour les PR en comparaison des ER (Tanenbaum, Wang et al. 1998; Williams and Sigler 1998). De même que pour les ER, la fixation d'un ligand agoniste sur le LBD induit un changement conformationnel du PR et une stabilisation de ce complexe néo-formé dans lequel l'hélice H12 adopte une position active qui permet le recrutement d'un co-activateur. L'étude de la fixation de ligands agonistes, antagonistes ou mixtes, a montré que ces changements de conformation étaient spécifiques du ligand, et expliquaient en partie les différences d'effets biologiques observés en fonction de la nature du ligand fixé (Wagner, Pollio et al. 1996). Par ailleurs, il a récemment été établi que la stabilité des interactions entre le ligand et le récepteur pouvait varier selon la structure du ligand agoniste lié, ce qui expliquerait les variations d'efficacité transcriptionnelle des différents progestatifs (Petit-Topin, Turque et al. 2009). Une fois le ligand fixé, PR s'homo- ou s'hétéro-dimérisé et se transloque dans le noyau grâce à une séquence NLS située dans le LBD et activée par le changement de conformation induit par le ligand (Guiochon-Mantel, Loosfelt et al. 1989).

ii. Mécanismes transcriptionnels ligand-dépendants

Une fois dans le noyau, la reconnaissance des promoteurs des gènes spécifiques des PR se fait grâce à une séquence consensus PRE (Progesterone Responsive Element).

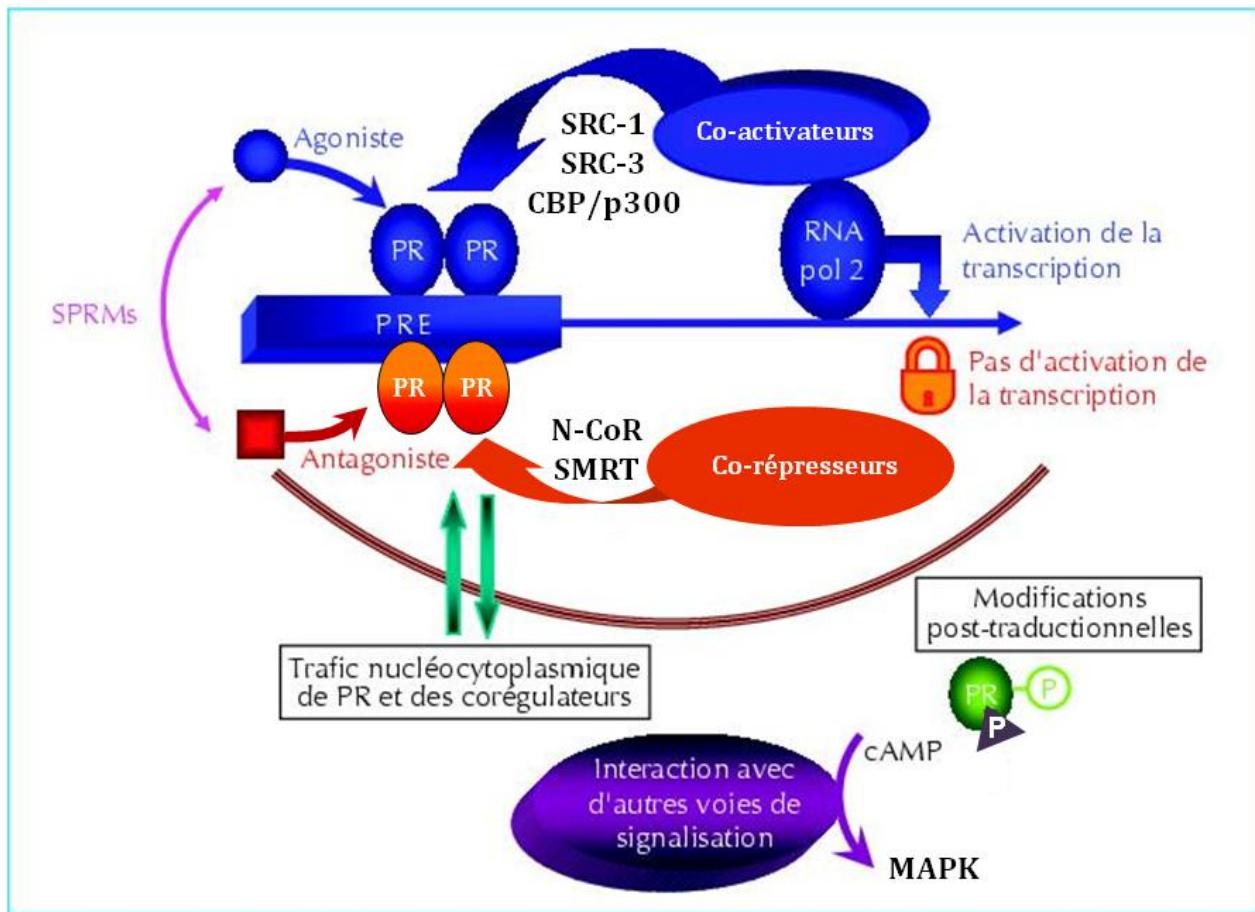


Figure 17 : Mécanismes transcriptionnels de PR, dépendants des ligands. La fixation d'un ligand entraîne la dimérisation de PR et la fixation du complexe sur la séquence PRE (Progesterone Responsive Element) du promoteur d'un gène cible. La fixation d'un agoniste induit le recrutement de co-activateurs tels que SRC-1, SRC-2 et CBP/p300 pour permettre l'activation de la transcription du gène. En revanche, la fixation de PR à un antagoniste mobilise des co-répresseurs comme N-CoR ou SMRT qui inhibent la transcription. La liaison de PR avec un ligand mixte ou SPRM (Selective Progesterone Receptor Modulator) permet le recrutement soit de co-activateurs, soit de co-répresseurs. L'effet d'un SPRM est donc mixte puisqu'il peut induire ou réprimer la transcription. D'autres facteurs entrent en jeu pour moduler la transcription des gènes cibles, comme les modifications post-traductionnelles, le trafic intracellulaire, le ratio des isoformes PR-A et PR-B ainsi que leurs interactions avec d'autres voies de signalisation comme la voie des MAPK (adapté de Chabbert-buffet 2005).

Le PRE est une séquence consensus 5'-AGAACAnnnTGTTCT-3' organisée en palindrome et séparée par trois nucléotides. Cette séquence diffère de celle du récepteur des estrogènes mais est commune à celle des récepteurs des glucocorticoïdes (GRE pour Glucocorticoid Responsive Element). De subtiles variations de bases ont été répertoriées au sein de ces séquences PRE/GRE selon les promoteurs, qui pourraient influer pour une part dans la spécificité des gènes cibles en réponse aux PR et aux récepteurs des glucocorticoïdes (Chan, Klock et al. 1989). Comme pour les autres récepteurs nucléaires, la fixation du complexe PR-ligand sur l'ADN entraîne le recrutement de co-régulateurs qui vont influer sur l'activité transcriptionnelle du gène cible (**Figure 17**).

De même que pour les ER, l'activation de la transcription par les récepteurs PR peut se faire indirectement par le biais des facteurs de transcription AP-1 et SP1. PR peut notamment activer l'expression du gène *P21* par liaison avec un complexe SP1 et recrutement de CBP/p300 (Owen, Richer et al. 1998).

iii. Co-régulateurs

Les études réalisées pour déterminer quels étaient les co-activateurs recrutés par PR fixé à un ligand agoniste ont indiqué qu'il s'agissait principalement des co-activateurs CBP/p300, et des protéines SRC, de façon similaire aux ER (Rowan and O'Malley 2000). Il a été montré chez la souris que le recrutement des SRC était spécifique du tissu puisque SRC-3 serait majoritairement recruté dans le sein tandis que le recrutement de SRC-1 semble favorisé dans l'utérus (Han, Jeong et al. 2005; Han, DeMayo et al. 2006). Cependant une étude a montré que le co-activateur SRC-1 était préférentiellement recruté dans les cellules T-47D de cancer du sein humain par les PR liés à un agoniste, suggérant une spécificité liée au contexte tumoral et/ou à l'espèce observée (Li, Wong et al. 2003).

Les co-répresseurs N-CoR et SMRT sont majoritairement recrutés par le complexe PR lorsqu'il est lié à un antagoniste (**Figure 17**) (Wagner, Norris et al. 1998). Cependant, il a été montré que les co-répresseurs RIP140 et L-CoR étaient capables d'agir sur le complexe PR lié à un agoniste pour inhiber la transcription (Parker, Leonardsson et al. 2003; Palijan, Fernandes et al. 2009).

iv. Mécanismes transcriptionnels non génomiques

Il existe des voies d'activation rapide de la progestérone, appelées voies non génomiques, qui passent principalement par les kinases (**Figure 17**).

En présence de ligand, PR-B peut se fixer et activer la kinase SRC, ce qui permet l'induction de la voie de signalisation des kinases MAPK (Boonyaratanaakornkit, Scott et al. 2001; Boonyaratanaakornkit, McGowan et al. 2007). Cette activation est également possible par l'intermédiaire d'une interaction entre PR et ER α non lié à son ligand, qui permet la liaison de ER α avec SRC, et l'activation des voies de signalisation SRC/RAS/ERK ainsi que PI3K/AKT (Migliaccio, Piccolo et al. 1998; Ballare, Vallejo et al. 2006). Ces effets sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire par la progestérone (Ballare, Vallejo et al. 2006; Boonyaratanaakornkit, McGowan et al. 2007). Par ailleurs, l'activation de la voie SRC/RAS/ERK par le complexe progestérone-PR-ER α serait aussi responsable d'un accès facilité des PR sur les PRE, via une accumulation de protéines ERK phosphorylées (P-ERK) dans le noyau. Ces P-ERK se fixent sur les dimères PR, puis recrutent et activent la protéine MSK1 qui, à son tour, est capable de remodeler la chromatine de façon à la décompactier et à ouvrir l'accès aux PRE (Vicent, Ballare et al. 2006; Vicent, Ballare et al. 2008).

5) Hormones sexuelles : les protagonistes du développement mammaire

Les différentes phases de développement du sein sont consécutives aux principales fluctuations des hormones sexuelles au cours de la vie, ce qui a permis de mettre en évidence le rôle de l'estriadiol et de la progestérone dans la croissance, la différentiation et l'involution de la glande mammaire (**Figure 18**). Des données *in vivo* et *in vitro* provenant du sein humain ont permis d'éclaircir en partie le rôle des hormones ovarielles dans le développement de la glande mammaire. En raison de l'accessibilité difficile au sein humain, les modèles murins ont également été utilisés afin d'étudier plus précisément l'effet des hormones. Cependant les données obtenues chez la souris ne sont pas totalement superposables à celle de la femme, en raison des nombreuses différences existantes entre le développement mammaire humain et murin, ainsi qu'au niveau de la répartition des récepteurs hormonaux. En effet la glande mammaire murine ne se développe que lors de la gestation et les structures lobulo-alvéolaires involuent ensuite tandis que le sein humain se développe dès la puberté et involue en partie après la lactation mais aussi après la ménopause. Chez la femme, les récepteurs PR-A et PR-B

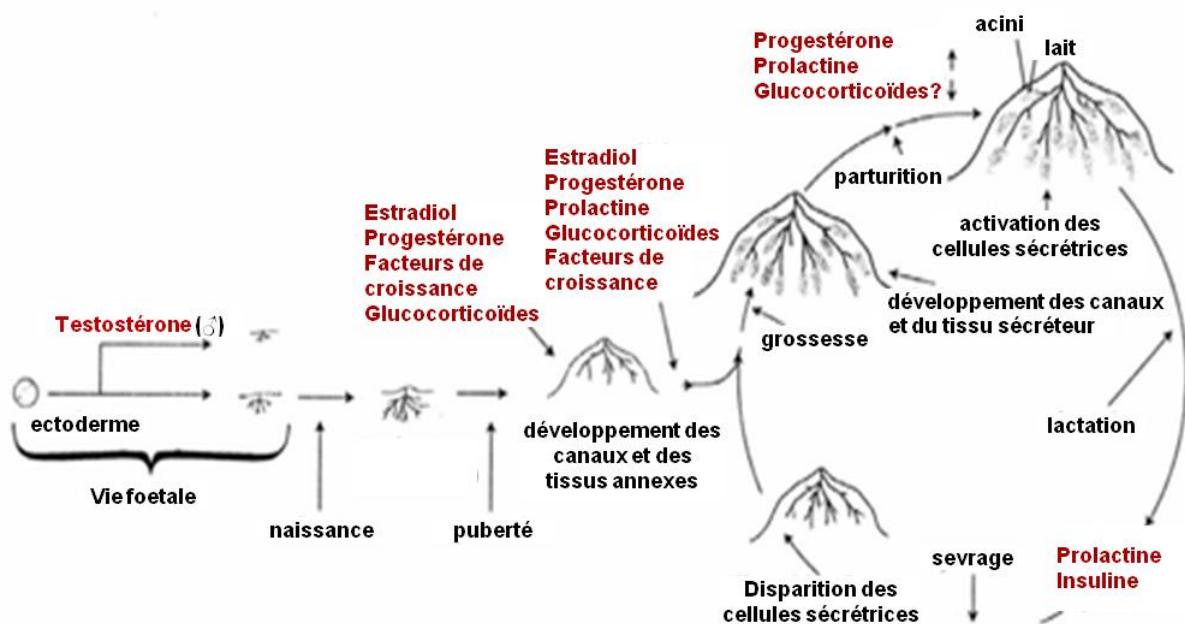


Figure 18: Hormones et facteurs de croissance impliqués dans les différentes étapes de développement du sein. Les hormones et facteurs de croissance sont indiqués en rouge (Espie 2007).

sont co-exprimés dans les cellules positives pour PR avec un ratio de 1:1 (Mote, Bartow et al. 2002). En revanche, chez la souris, les isoformes PR-B ne sont exprimées que lors de la gestation et sont rarement co-exprimées avec PR-A dans une même cellule (Aupperlee, Smith et al. 2005). Les résultats provenant des modèles murins ont donc apporté plusieurs éclaircissements mais restent cependant à considérer avec précaution et à être confirmés chez la femme.

a. Données issues du sein humain

Il existe des lacunes et des contradictions dans le rôle précis joué par les hormones lors du développement de la glande mammaire humaine. Si l'estradiol a clairement été établi comme un agent prolifératif dans le tissu mammaire, le rôle de la progestérone est encore incertain quant à ses capacités prolifératives et différentiantes. La définition précise de l'influence progestative dans le sein est par ailleurs rendue difficile par le fait qu'elle soit indissociable des effets estrogéniques. En effet, la sécrétion de progestérone est toujours associée à celle de l'estradiol, et ce dans toutes les situations de la vie reproductive de la femme. Parmi ses nombreux effets, l'estradiol permet d'ailleurs d'augmenter la transcription des PR afin de stimuler la signalisation progestative (Petz and Nardulli 2000; Petz, Ziegler et al. 2002; Schultz, Petz et al. 2003). Des données contradictoires existent dans la littérature quant à l'effet prolifératif ou antiprolifératif de la progestérone. Dans des coupes de sein humain prélevées à différents moments du cycle menstruel, il a été observé que la synthèse d'ADN, les mitoses mais également les cellules apoptotiques étaient plus importantes dans les cellules épithéliales lors de la phase lutéale théorique pendant laquelle les taux de progestérone sont généralement élevés (Masters, Drife et al. 1977; Ferguson and Anderson 1981; Going, Anderson et al. 1988; Ramakrishnan, Khan et al. 2002). En revanche, d'autres études *in vivo* indiqueraient que cet effet prolifératif observé serait plutôt une réponse à l'estradiol en phase lutéale. En effet, le traitement local par gel cutané d'estrogènes administré au niveau mammaire, provoque une augmentation du nombre de cellules mitotiques du sein tandis que l'addition de progestérone limite cet effet prolifératif (Chang, Lee et al. 1995; Foidart, Colin et al. 1998). L'analyse de fragments mammaires humains greffés chez la souris traitée par les hormones aux différentes concentrations du cycle menstruel de la femme, indique que l'E2 aux concentrations élevées de la phase lutéale augmente clairement la prolifération contrairement à l'E2 en concentration folliculaire. La progestérone aux taux de la phase

lutéale n'a en revanche pas d'effet sur la prolifération dans ces conditions (McManus and Welsch 1984; Laidlaw, Clarke et al. 1995; Clarke, Howell et al. 1997). La balance des résultats de ces études *in vivo* indiquerait plutôt un effet prépondérant de l'estradiol sur la prolifération des cellules mammaires durant la phase lutéale avec un effet plus limité de la progestérone. Ces interprétations sont toujours soumises à controverse parmi les auteurs, en raison de l'association faite entre les traitements hormonaux substitutifs estro-progestatifs et un risque plus élevé de cancer du sein que nous aborderons ultérieurement. Des analyses immunohistochimiques ont aussi permis de montrer que les cellules qui proliféraient en réponse aux hormones étaient adjacentes aux cellules ER⁺ et PR⁺, mais n'exprimaient pas ces récepteurs elles mêmes, mettant en exergue l'effet paracrine des hormones (Clarke, Howell et al. 1997; Russo, Ao et al. 1999). Il avait d'ailleurs été montré que la progestérone induisait la sécrétion de RANKL (tumor necrosis factor ligand) par les cellules épithéliales luminales, et que cette protéine pouvait agir avec le facteur de croissance hépatocytaire, HGF (hepatocyte growth factor) pour induire la prolifération des cellules myoépithéliales (Haslam, Drolet et al. 2008).

Les études *in vitro* sont également contradictoires. Une étude récente a mis en évidence un effet prolifératif de la progestérone associé à une capacité de cette dernière à augmenter le nombre de cellules progénitrices épithéliales en culture dans du Matrigel (Graham, Mote et al. 2009). Inversement, la prolifération des cellules épithéliales en cultures primaires sur plastique, est stimulée par l'E2 mais la progestérone combinée à l'E2 réverse cet effet (Gompel, Malet et al. 1986; Courtin, Communal et al. 2011). Au vu de l'ensemble de ces résultats, il semble que si la progestérone seule pourrait induire un effet prolifératif, elle exercerait plutôt des actions antiprolifératives en combinaison avec l'E2. Ces différences observées dans l'effet de la progestérone entre modèles *in vivo* et *in vitro* pourraient être également liées à l'environnement stromal qui influe sur les processus biologiques des structures épithéliales. Ces résultats sont relativement bien confirmés dans les modèles murins.

b. Données issues de la glande mammaire animale

La plupart des connaissances obtenues chez la souris résulte de modèles d'invalidations géniques ou Knockout (KO) des récepteurs hormonaux. De la naissance à la puberté, qui correspond à la 5^{ème} semaine de la souris, survient un développement continu du réseau des canaux de la glande mammaire murine. Ce développement des

galactophores n'a pas lieu chez les souris KO ER $\alpha^{-/-}$, témoignant de l'implication de l'estradiol dans ce processus (Bocchinfuso and Korach 1997). Cette croissance a en revanche bien lieu chez les souris KO PR $^{-/-}$, mais de façon limitée par rapport aux souris non invalidées. Cependant, ces souris PR $^{-/-}$ présentent une absence totale de terminaisons alvéolaires par rapport aux souris sauvages, ce qui indique que la progestérone est un acteur majeur du développement et de la différentiation lobulo-alvéolaire (Lydon, DeMayo et al. 1995). Ces mêmes résultats ont été retrouvés chez les souris PR-B $^{-/-}$ mais pas chez les souris PR-A $^{-/-}$ qui montrent un développement normal de la glande mammaire (Mulac-Jericevic, Mullinax et al. 2000; Mulac-Jericevic, Lydon et al. 2003). Les effets induits par la progestérone dans la différentiation lobulo-alvéolaire semblent donc principalement être régulés par l'isoforme PR-B dans la glande mammaire murine.

Concernant les effets différentiants des hormones ovariennes, l'inhibition de la synthèse des protéines du lait comme la caséine- β et la lactalbumine- α a été montrée dans plusieurs études et notamment dans la glande mammaire de ratten et de lapines ovariectomisées puis traitées par la progestérone, indiquant un effet inhibiteur de la lactation de cette dernière (Assairi, Delouis et al. 1974; Rosen, O'Neal et al. 1978). Par ailleurs, une action différentiante de l'estradiol par l'intermédiaire de ER β a été montrée au niveau de l'organisation et de l'adhésion des cellules épithéliales grâce à l'étude de souris ER $\beta^{-/-}$ gestantes (Forster, Makela et al. 2002).

L'effet paracrine des hormones a également été étayé par des expériences *in vivo* dans le modèle murin. Chez la souris, la progestérone combinée à l'estradiol induit une augmentation du compartiment cellulaire mammaire CD49f^{hi} à l'aide de signaux paracrines passant probablement par le ligand RANKL sécrété par les cellules PR $^{+/-}$ et capable de stimuler la division des cellules souches positives pour son récepteur RANK (Joshi, Jackson et al. 2010).

Bien que le modèle animal ne puisse pas être totalement étendu à la physiologie du sein humain, ces résultats sont cohérents quant au rôle présumé de l'estradiol dans le développement des structures mammaires lors de la puberté et la grossesse chez la femme. Cela confirme également le rôle de la progestérone dans le développement des terminaisons lobulaires et la différentiation des alvéoles lors du deuxième semestre de la grossesse, mais aussi au cours de la phase lutéale de chaque cycle menstruel. Au

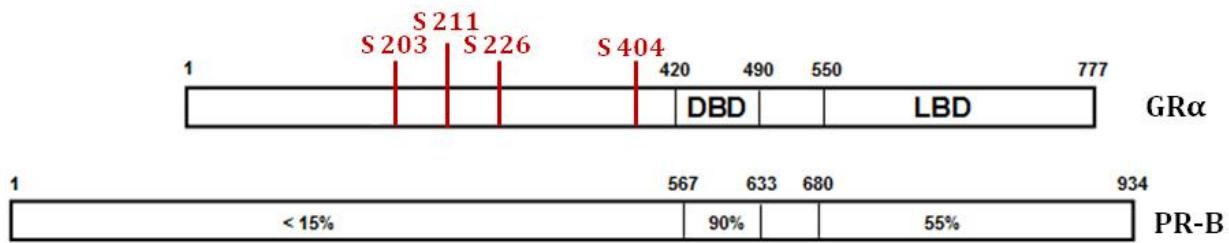


Figure 19 : Structure protéique du récepteur GR α et pourcentage d'homologie structurale avec PR-B. Les domaines DBD et LBD de ces deux récepteurs présentent des similitudes importantes, expliquant notamment leur capacité à se lier aux mêmes types d'éléments de réponse sur l'ADN. Les principaux sites de phosphorylation de GR α sont indiqués en rouge (adapté de Kovacs 1998).

moment de l'accouchement, la chute des taux de progestérone stoppe l'inhibition de la synthèse des protéines du lait et permet la lactation. Par ailleurs, ces résultats expliquent également pourquoi la glande mammaire involue lors de la ménopause, suite à la chute des niveaux d'hormones sexuelles qui ne peuvent donc plus maintenir leurs actions proliférative et différentiante sur les cellules mammaires.

B. Les glucocorticoïdes dans le sein : un rôle en exploration

En plus du rôle des hormones ovariennes dans le développement du sein, de récentes observations indiquent que les glucocorticoïdes (GC) exercent également une action sur le développement de la glande mammaire par l'intermédiaire de leur récepteur nucléaire, le récepteur des glucocorticoïdes (GR) (**Figure 19**) (Moutsatsou and Papavassiliou 2008; Vilasco, Communal et al. 2011). L'ensemble des données existantes entre le récepteur des GC et le sein ont été très récemment décrites dans une revue à laquelle j'ai contribué et qui figure en annexe de ce manuscrit (Vilasco, Communal et al. 2011).

1) Le récepteur des glucocorticoïdes

Ce récepteur nucléaire existe sous la forme de deux isoformes majoritaires GR α et GR β , mais les effets des GC sont exercés par l'intermédiaire de GR α , l'isoforme GR β étant incapable de lier les glucocorticoïdes. GR est constitué des domaines classiques des protéines de la famille des récepteurs nucléaires et partage de nombreuses homologies structurales avec le récepteur de la progestérone (**Figure 19**). Les GR sont capables d'induire la transcription de leurs gènes cibles via une séquence consensus GRE 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3', homologue à la séquence PRE. La phosphorylation de GR α joue un rôle clé dans ses actions transcriptionnelles et se fait sur quatre sites principaux qui sont les séries 203, 211, 226 et 404 (**Figure 19**). Ces sites sont préférentiellement phosphorylés par des MAPK comme la p38 (Miller, Webb et al. 2005; Galliher-Beckley and Cidlowski 2009; Vilasco, Communal et al. 2011). La phosphorylation des sites 211 (S211) ou 226 (S226) intervient après la liaison des GC sur le récepteur et permet l'entrée de GR dans le noyau et sa fixation sur les sites GRE. Cependant la phosphorylation S211 induit une action transcriptionnelle maximale tandis que la forme S226 phosphorylée inhibe cette action (Blind and Garabedian 2008; Chen, Dang et al. 2008). L'action des GR liés à leur ligand est donc modulée par le ratio des formes GR

phosphorylées en S211 (PS211-GR) et en S226 (PS211-GR). Les protéines kinases MAPK p38 et JNK sont responsables des phosphorylations des sites S211 et S226 respectivement.

2) Signalisation des glucocorticoïdes dans le sein

Bien qu'encore peu documentée, l'expression du récepteur des glucocorticoïdes a été détectée dans le tissu mammaire, dans les cellules myoépithéliales principalement, mais aussi dans le noyau des cellules luminales, ainsi que des adipocytes et des cellules stromales (Lien, Lu et al. 2006; Buxant, Engohan-Aloghe et al. 2010; Courtin, Communal et al. 2011; Vilasco, Communal et al. 2011). Des expériences d'invalidation conditionnelle de GR dans la glande mammaire chez la souris ont indiqué que GR était essentiel à la prolifération cellulaire pendant le développement lobulaire mais qu'il n'était pas nécessaire à la différentiation des acini et la sécrétion de lait (Wintermantel, Bock et al. 2005). Paradoxalement, les glucocorticoïdes seraient indispensables à l'organisation spatiale des acini de glande mammaire murine cultivés dans du Matrigel, et des études *in vitro* ont indiqué qu'ils stimulaient la production des protéines du lait par action synergique avec la prolactine (**Figure 18**) (Rosen, Zahnow et al. 1998; Murtagh, McArdle et al. 2004). Les protéines de lait étudiées, la caséine bêta et la WAP (Whey Acidic Protein) présentent sur leur promoteur des semi-GRE dont la mutation empêche la transcription de ces gènes par l'hydrocortisone associée à la prolactine. Cela indique que les effets des glucocorticoïdes sur la régulation de ces gènes passeraient bien par les GR (Rosen, Wyszomierski et al. 1999). La plupart des autres protéines du lait ne présentent pas de GRE sur leur promoteur, suggérant que les glucocorticoïdes n'interviendraient que dans la régulation de certaines protéines du lait comme la caséine bêta et la WAP, et ne gêneraient donc pas la sécrétion de lait mais uniquement sa composition. Enfin, notre équipe a récemment montré que la dexamethasone, un glucocorticoïde puissant, induisait la prolifération des cellules épithéliales mammaires humaines normales en culture primaire dans un travail auquel j'ai contribué en tant que deuxième auteur et qui figure en annexe de ce manuscrit (Courtin, Communal et al. 2011). L'implication des glucocorticoïdes dans le développement et la physiologie de la glande mammaire est donc probable mais reste à approfondir, tout particulièrement dans des modèles humains.

Incidence standardisée du cancer du sein dans le monde, sur 100 000 personnes

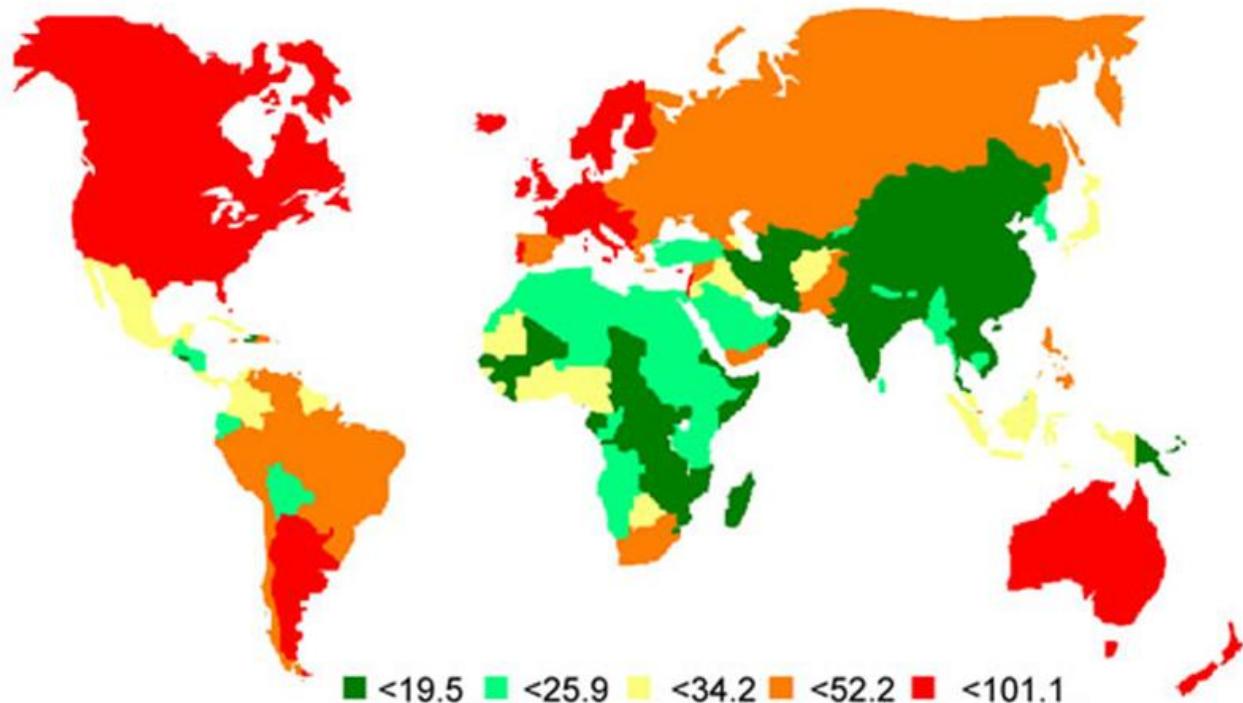


Figure 20 : Incidence du cancer du sein à travers le monde. Les incidences sont standardisées, c'est-à-dire ajustées par rapport à l'âge. Les incidences les plus importantes (<101,1) concernent l'Europe de l'Ouest, l'Amérique du Nord, le Brésil, l'Australie et la Nouvelle-Zélande (Institut National du Cancer, Université du Caire).

C. Autres facteurs de développement du sein

Parmi les autres hormones impliquées dans le développement et la physiologie de la glande mammaire, la prolactine joue un rôle essentiel dans la différentiation terminale des acini et dans la sécrétion du lait (**Figure 18**). A l'inverse de la progestérone qui inhibe la transcription de la caséine- β et de la lactalbumine- α , la prolactine stimule l'expression de ces protéines lors de la lactation (Brisken, Kaur et al. 1999).

Certains facteurs de croissance ont aussi un impact sur le développement de la glande mammaire comme l'IGF-1 et l'EGF qui participerait conjointement à l'expansion des galactophores (**Figure 18**) (Stull, Richert et al. 2002). De plus l'IGF-1 semble indispensable au développement de la glande mammaire puisqu'en dépit de la présence de E2 et P, les souris déficientes en IGF-1 ne développent pas de glande mammaire (Ruan, Monaco et al. 2005).

Les régulations physiologiques du sein sont donc nombreuses et extrêmement complexes. Les hormones jouent un rôle prépondérant dans la physiologie du sein normal mais leur implication dans la tumorigénèse mammaire est de plus en plus clairement établie, et nécessite d'être parfaitement maîtrisée pour optimiser la caractérisation et les traitements des tumeurs mammaires.

III. CANCER DU SEIN

A. Données épidémiologiques

Dans le monde, plus de 1 050 000 nouveaux cas de cancer du sein apparaissent chaque année, dont plus de 580 000 survenant dans les pays développés (Europe occidentale, Amérique du nord, Australie), l'incidence étant plus faible en Afrique ou en Asie (**Figure 20**). Dans les pays industrialisés environ une femme sur huit en sera atteinte au cours de sa vie. Il est responsable chaque année de plus de 400 000 décès à travers le monde (Institut National Du Cancer, Cancer du sein, 2008).

En France, il est le cancer le plus fréquent chez la femme et représente plus d'1 nouveau cas de cancer sur 3. En 2005, près de 50 000 nouveaux cas et 11 637 décès ont été répertoriés. Bien qu'entre 1980 et 2000 le nombre de nouveaux cas ait presque

Cancer du sein en France: incidence et mortalité de 1980 à 2005

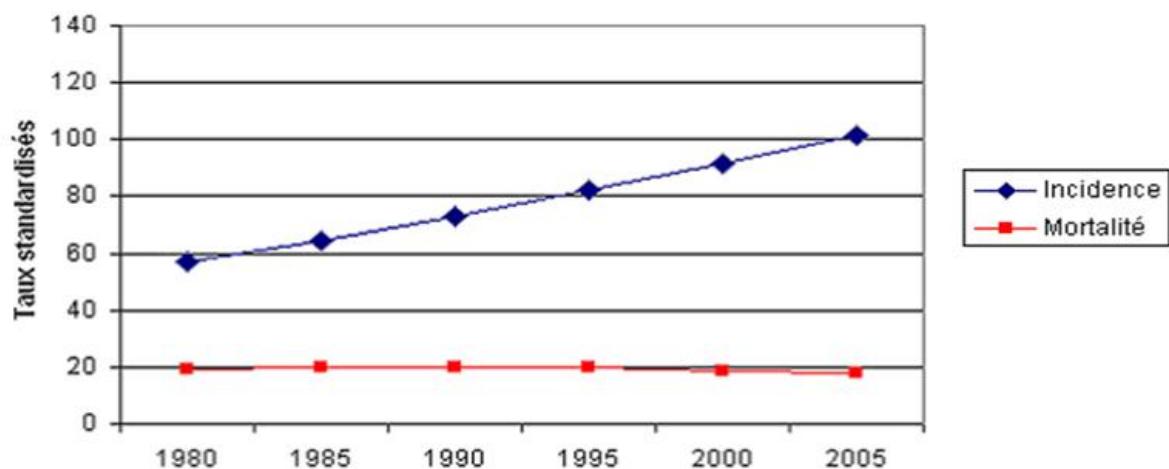


Figure 21 : Incidence et mortalité du cancer du sein entre 1980 et 2005 en France. Les taux sont standardisés pour 100000 personnes-années. D'après l'institut de veille sanitaire (<http://www.invs.sante.fr/surveillance/cancers>).

doublé, la mortalité n'a pas augmenté grâce à l'amélioration du dépistage et des thérapeutiques (**Figure 21**).

L'âge moyen d'apparition de ce cancer est de 61 ans. Plus de 50 % des cancers du sein sont observés après 65 ans, près de 10 % avant 35 ans. L'incidence croît régulièrement de 30 à 70 ans. Il existe cependant des cancers survenant plus tôt avec 15 à 20 % des cancers diagnostiqués avant 50 ans. La rapidité du diagnostic est un facteur clé du pronostic du cancer du sein.

B. Le cancer du sein : un cancer multifactoriel

1) Prédisposition familiale héréditaire

Les facteurs génétiques peuvent expliquer 5 à 10% des cas de cancer du sein (Newman, Austin et al. 1988; Claus, Risch et al. 1991). Les mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont responsables de l'augmentation des risques de développer cette maladie. Ces gènes sont également impliqués dans l'augmentation du risque de cancer ovarien chez la femme, ainsi que du sein et de la prostate chez l'homme. Dans de bien plus faibles proportions, les mutations de *BRCA1* ont un impact dans l'incidence des cancers de l'utérus, du pancréas et du colon, tandis que les mutations *BRCA2* augmentent le risque de mélanome, de cancers de l'estomac, du pancréas et du foie (1999; Thompson and Easton 2002; Kadouri, Hubert et al. 2007; Levy-Lahad and Friedman 2007; Lowery, Kelsen et al. 2011).

Des études ont répertorié qu'à l'âge de 70 ans, 71% des femmes mutées pour *BRCA1* auront développé un cancer du sein et 47 à 63% un cancer de l'ovaire (Easton, Ford et al. 1995). Pour les mutations du gène *BRCA2*, ces risques s'élèvent à 84% pour le cancer du sein et 27% pour le cancer des ovaires (Ford, Easton et al. 1998). L'évaluation du niveau exact des risques associés à ces mutations reste cependant variable en fonction des études, suggérant que des mutations différentes, ou bien l'hétérogénéité inter-individuelle génétique et environnementale puissent moduler le niveau de susceptibilité vis-à-vis de cette maladie (Levy-Lahad and Friedman 2007).

2) Facteurs environnementaux

Il est maintenant bien établi que le risque de développer un cancer du sein peut être modulé par plusieurs facteurs environnementaux et habitudes de la vie quotidienne.

Parmi ces facteurs, l'activité physique permet de réduire le risque de cancer du sein. La protection est plus importante chez les femmes après la ménopause et serait proportionnelle à la fréquence et l'intensité des exercices (Monninkhof, Elias et al. 2007).

L'alimentation influerait également sur le risque de cancer du sein, les matières grasses étant des facteurs potentiellement aggravant à l'inverse des fruits et légumes. Cela concorde avec l'impact de l'obésité dans l'augmentation du risque de cancer après la ménopause, sans doute en raison de la production supérieure d'hormones par le tissu adipeux (Hankinson, Willett et al. 1995).

La consommation d'alcool augmente les risques de développer un cancer du sein. Parmi les raisons les plus probables d'un risque accru, l'alcool augmente le niveau des facteurs de croissance circulants comme l'IGF, et allonge également la demi-vie de l'estradiol (Ginsburg, Walsh et al. 1995; Dorgan, Longcope et al. 1996; Feigelson, Calle et al. 2001).

L'impact du tabagisme sur les risques de cancer du sein est encore très discuté et a été associé soit à une diminution, soit à une augmentation du risque. Le tabac peut être considéré comme un anti-estrogène, accélérant le catabolisme de l'estradiol (Soldin, Makambi et al. 2011). Ainsi, une étude a montré une diminution significative du risque de cancer du sein dans le groupe fumeur d'une population de femmes porteuses de mutations *BRCA1* et *BRCA2* par rapport au groupe non fumeur (Brunet, Ghadirian et al. 1998). Une analyse plus récente a cependant indiqué que le risque de cancer du sein était légèrement augmenté chez les femmes fumant avant la ménopause et plus particulièrement avant la première grossesse (Xue, Willett et al. 2011).

Enfin, d'autres facteurs de risque liés à notre environnement ont été identifiés récemment, tels que les radiations ionisantes mais aussi certains produits chimiques ou xénohormones qui pourraient interférer avec les voies de signalisation des hormones

endocrinien et augmenter le risque de cancer du sein (Preston, Mattsson et al. 2002; Rudel, Attfield et al. 2007).

3) Facteurs hormonaux endogènes et vie reproductive

Les études épidémiologiques ont clairement démontré une association entre les facteurs hormonaux endogènes, la vie reproductive et le risque de développer un cancer du sein (Clemons and Goss 2001; Lange 2008; Lange and Yee 2008).

L'apparition des premières règles à un âge précoce et de la ménopause à un âge tardif augmente les risques de cancer du sein (Kelsey, Gammon et al. 1993). Cette relation est attribuée à une exposition plus longue aux cycles menstruels donc aux hormones ovariennes.

Les facteurs liés à la reproduction sont hautement associés aux risques de cancer du sein (Shantakumar, Terry et al. 2007). La naissance du premier enfant à un âge tardif augmente ce risque (Beral and Reeves 1993). Les femmes qui ont eu au moins une grossesse à terme ont moins de risque de développer un cancer du sein que celles qui n'ont pas eu d'enfants. Ce risque de cancer diminue avec l'augmentation du nombre de grossesses (Layde, Webster et al. 1989; Hinkula, Pukkala et al. 2001). L'équipe de J. et I. Russo a montré que les capacités prolifératives des lobules de la glande mammaire diminuaient avec leur différentiation. Les lobules primaires ou Lob 1 seraient donc les structures les plus prolifératives tandis que les cellules constituant les Lob 4 seraient bien différenciées et perdraient leur capacité à proliférer. Comme chaque grossesse contribue à la différentiation des lobules, cela expliquerait en partie leur effet protecteur. Par ailleurs, après la ménopause qui induit une dédifférenciation de la glande mammaire en structures de type Lob 1, ces lobules présentent une activité proliférative deux fois plus importante chez les femmes nullipares par rapport aux femmes ayant eu une ou plusieurs grossesses, confirmant cette action protectrice. Une résistance à l'action différentiante de la grossesse chez les femmes ayant développé un cancer du sein a également été rapportée (Russo, Mailo et al. 2005).

L'allaitement semble également offrir une protection significative contre le cancer du sein, même si cet effet serait moindre que celui procuré par les grossesses (Bernier, Plu-Bureau et al. 2000) (2002). L'allaitement est un facteur différentiant des cellules mammaires, expliquant un effet protecteur additionnel (Russo, Tay et al. 1982).

Le niveau d'estrogène est plus faible chez les femmes qui allaient ce qui contribuerait également à une réduction du risque de cancer du sein liée à une diminution de l'exposition à l'estradiol pendant cette période (Key and Pike 1988).

4) Facteurs hormonaux exogènes

La prise de contraceptifs oraux serait faiblement associée au risque de cancer du sein chez les femmes de la population générale ainsi que chez les femmes porteuses de mutations *BRCA1*. Ce risque augmenterait surtout lors de prises tardives des contraceptifs à l'âge où le risque de cancer du sein devient appréciable, ce qui serait lié à un effet promoteur des hormones exogènes sur des lésions préexistantes (1996; Cibula, Gompel et al. 2010).

De façon similaire, l'utilisation du traitement hormonal substitutif survient généralement à un âge où les risques de cancer du sein sont les plus élevés, c'est-à-dire après la ménopause. Cet apport d'hormones exogènes, des estrogènes souvent prescrits en combinaison avec des progestatifs, procure des avantages indéniables comme la réduction des symptômes de la ménopause et une prévention de l'ostéoporose. Plusieurs études ont cependant relevé une association entre la prise d'hormones de remplacement et le cancer du sein (Rossouw, Anderson et al. 2002; Beral 2003). Le risque ne semble pas augmenté dans une étude d'observation française avec la progestérone naturelle et la dydrogestérone, tandis qu'il est augmenté dans toutes les études portant sur les progestatifs de synthèse qui présentent des effets hormonaux autres que progestatifs purs (Fournier, Berrino et al. 2005; Foidart, Desreux et al. 2007; Fournier, Berrino et al. 2008).

5) Implication des glucocorticoïdes dans le cancer du sein

Plusieurs données vont dans le sens d'une influence des glucocorticoïdes dans le cancer du sein. Les GC sont impliqués dans un grand nombre de voies de signalisation telles que la régulation des facteurs de croissance, des MAPK, des gènes de survie, de prolifération ou d'apoptose, ainsi que de plusieurs autres types de protéines comme les cytokines et les facteurs de transcription (Moutsatsou and Papavassiliou 2008; Vilasco, Communal et al. 2011). Etant donné la participation des glucocorticoïdes dans le développement de la glande mammaire comme indiqué précédemment, il ne paraît donc pas surprenant qu'ils puissent jouer un rôle dans la tumorigénèse mammaire.

Les GR sont exprimés dans le tissu mammaire humain ainsi que dans les cellules tumorales du sein mais cette expression tend à diminuer du tissu normal jusqu'aux dernières étapes de progression. Il a été suggéré que cette réduction d'expression de GR pouvait être liée à une translocation des GR dans la mitochondrie puisqu'il s'agit d'un mécanisme associé à l'effet anti-apoptotique des GR qui contribuerait donc à la survie des cellules tumorales (Vilasco, Communal et al. 2011).

Par ailleurs, les GC sont impliqués dans la voie de signalisation liée au stress et de plus en plus de données montrent une influence du stress dans le développement du cancer. Récemment, un article a montré que des rats régulièrement soumis au stress par une isolation chronique étaient plus susceptibles de développer des tumeurs mammaires plus agressives. Cet effet est associé à une augmentation du niveau de corticostérone ainsi qu'à une dérégulation des GR qui se concentrent dans le noyau des cellules mammaires (Hermes, Li et al. 2011). Une autre étude réalisée chez la femme par la Women Health Initiative Study, a montré qu'un évènement ponctuel de stress aigu augmentait le risque de développer un cancer du sein, tandis que l'accumulation d'événements stressants réduisait ce risque (Michael, Carlson et al. 2009).

Enfin les croisements existants entre les voies de signalisation des GR avec les PR et les ER suggèrent également une implication des glucocorticoïdes dans le cancer du sein. En effet, des actions inhibitrices réciproques entre les voies de signalisation GR et ER ont largement été démontrées et plusieurs équipes ont signalé que les taux de GR étaient augmentés dans les tumeurs ER-. Les estrogènes inhiberaient l'action des GC par l'intermédiaire d'une déphosphorylation des GR (Vilasco, Communal et al. 2011). D'autre part, les GR et les PR partagent de nombreuses similarités structurales menant à un chevauchement de certains de leurs effets. Les GR et PR sont capables de se lier aux mêmes éléments de réponse sur le promoteur de leurs gènes cibles mais des différences d'action ont été rapportées et seraient notamment liées au profil des co-régulateurs recrutés par les récepteurs sur les sites de transcription (Li, Wong et al. 2003; Vilasco, Communal et al. 2011).

La voie des glucocorticoïdes pourrait donc participer à l'initiation et au maintien de la croissance tumorale, mais les actions précises des GC nécessitent d'être mieux définies.

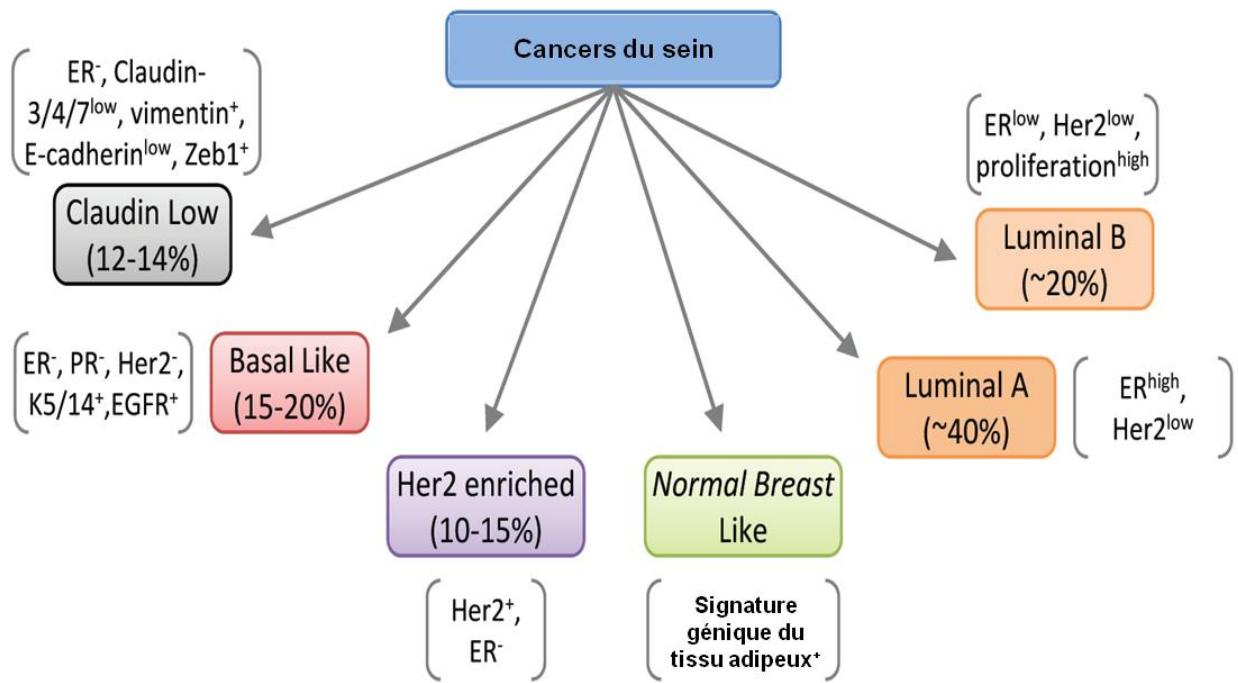


Figure 22 : Classification moléculaire des six principaux sous-types de cancer du sein identifiés en fonction de l'analyse par microarray des gènes de ces tumeurs. La fréquence de chaque sous-type est indiquée en pourcentage. Les profils des marqueurs de ces tumeurs sont signalés entre parenthèses (adapté de Malhotra, Zhao et al. 2010).

C. Le cancer du sein : une maladie hétérogène

1) Classification des sous-types majeurs du cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie très hétérogène dans le sens où les tumeurs mammaires présentent une grande variété phénotypique d'un cancer à l'autre mais aussi au sein d'une même tumeur, en fonction des structures mammaires dans lesquelles elles prennent naissance, de leur stade de progression, mais aussi des marqueurs biologiques exprimés dans chaque cellule tumorale. Les classifications des cancers du sein ont évolué au cours du temps et des méthodes d'analyse.

Les premières classifications se sont basées sur des observations histologiques et morphologiques. Les biopsies et l'analyse de marqueurs spécifiques par immunohistochimie permettent premièrement de déterminer si la tumeur est « *in situ* », c'est-à-dire localisée, ou si elle est invasive, c'est-à-dire disséminée. Deux principaux types morphologiques sont distingués en fonction des structures mammaires desquelles elles sont issues :

- les tumeurs canalaires *in situ* et invasives, qui sont les plus fréquentes,
- les tumeurs lobulaires *in situ* et invasives.

Afin de différencier plus précisément les sous-types de tumeurs, des marqueurs se sont imposés et ont permis d'améliorer le pronostic et le choix des thérapeutiques. Les principaux marqueurs adoptés sont le Ki67 qui permet de déterminer l'index mitotique de la tumeur, les récepteurs hormonaux ER et PR qui témoignent du niveau de différenciation du cancer, et le récepteur de l'EGF, HER2/ERBB2 (v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2) (Holland, Peterse et al. 1994; Poller, Silverstein et al. 1994; Silverstein, Poller et al. 1995). Les marqueurs luminaux et myoépithéliaux comme les kératines, p63 ou SMA sont aussi couramment utilisés. Néanmoins, ces marqueurs s'avèrent insuffisants pour déterminer le traitement le plus adapté et prévoir les taux de réponse et les progressions de certaines tumeurs. Pour tenter de pallier à ces difficultés, la mise en place d'analyses des profils génomiques des tumeurs a permis de différencier et caractériser six principaux sous-types moléculaires de tumeur, en fonction de l'expression de certains gènes clés ainsi que des marqueurs précédents (**Figure 22**) (Perou, Sorlie et al. 2000; Sorlie, Perou et al. 2001; Sorlie, Tibshirani et al. 2003; Herschkowitz, Simin et al. 2007; Prat, Parker et al. 2010).

- Les deux sous-types luminaux (luminal A et luminal B) sont positifs pour les récepteurs hormonaux ER et PR, et ont un phénotype proche des cellules épithéliales luminales. Cependant, les tumeurs luminales A, qui sont les plus fréquentes et présentent le meilleur pronostic, expriment ER dans la majorité des cellules, tandis que les luminales B l'expriment plus faiblement et ont un pronostic plus réservé.
- Les tumeurs dites HER2 ont comme caractéristique de surexprimer ce récepteur protéique.
- Le sous-type « Claudin low » est caractérisé par une faible expression de molécules de jonctions serrées Claudines 3, 4 et 7 spécifiques des cellules luminales, ainsi que de l'E-Cadhéline, une glycoprotéine d'adhésion cellulaire.
- Les tumeurs du groupe « Normal breast like » sont définies par l'expression de gènes spécifiques des cellules du tissu adipeux.
- Enfin, les tumeurs de type « basal like » ou triple négatives, présentent un phénotype similaire à celui des cellules progénitrices puisqu'elles n'expriment ni les récepteurs hormonaux, ni HER2, mais expriment les CK5/6 et affichent un index mitotique élevé. Ces tumeurs constituent 15 à 20% des cancers du sein et sont celles qui présentent le plus mauvais pronostic, en raison de leur agressivité et de l'absence de traitement réellement efficace. Les tumeurs du sein survenant chez les femmes porteuses de mutations BRCA1 sont très majoritairement triple négatives.

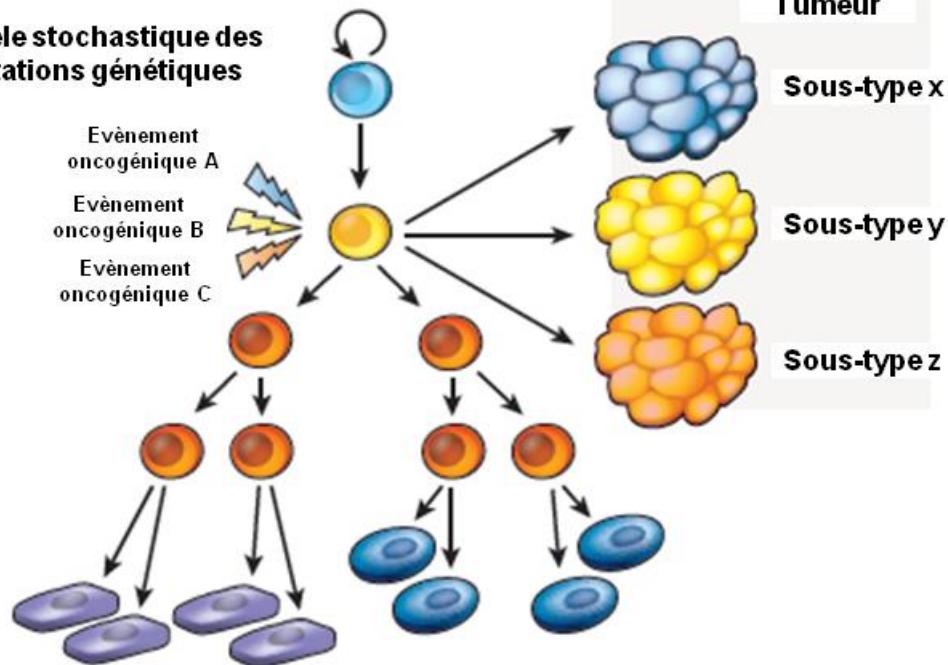
Tous ces sous-types ont des implications cliniques en termes de pronostic, évolution et réponses aux traitements, qui leur sont spécifiques et qui ont permis d'adapter plus précisément les diagnostics et les thérapeutiques associées pour certains sous-types. La détermination de leur profil génique a également constitué une avancée déterminante dans la caractérisation des cellules à l'origine de certaines tumeurs, notamment les tumeurs basales.

2) Une origine cellulaire en définition

Deux théories distinctes mais non exclusives sont actuellement soutenues afin d'expliquer l'existence de plusieurs catégories de tumeurs au sein des cancers solides tel que le cancer du sein. Il fut d'abord admis que cette hétérogénéité était liée à la variabilité des accidents génétiques et des gènes mutés intervenant successivement dans la transformation tumorale d'une cellule. Ce sont donc les différents événements génétiques qui définiraient le profil de la tumeur en développement. Cela excluait alors

A

Modèle stochastique des mutations génétiques

**B**

Modèle de la cellule d'origine

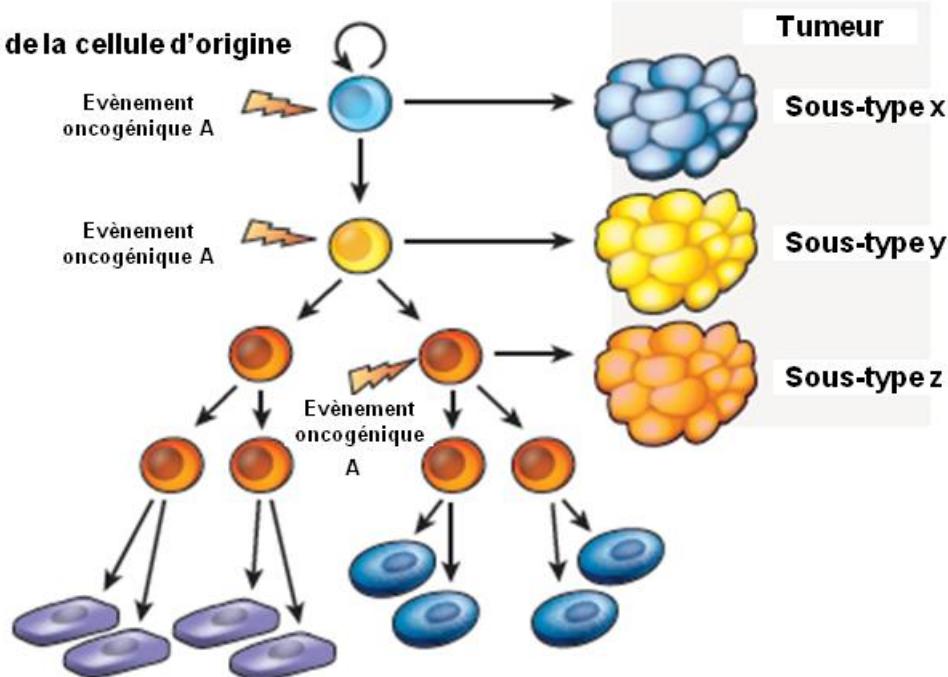


Figure 23 : Illustration de deux modèles d'hétérogénéité intertumorale. **A.** Les différents sous-types tumoraux résulteraient du type et de la succession des mutations génétiques survenant dans une cellule. **B.** Le phénotype de la cellule qui subit les transformations génétiques influence les caractéristiques des tumeurs. Ces deux modèles ne sont pas exclusifs, leur combinaison est également un schéma plausible pour expliquer la grande variabilité des sous-types tumoraux (adapté de Visvader 2011).

l'idée que le phénotype d'origine de la cellule transformée puisse entrer en ligne de compte dans le phénotype de la tumeur engendrée. Cette deuxième hypothèse a pourtant été soulevée récemment. Des études de plus en plus nombreuses et convaincantes indiquent que les caractéristiques de certains sous-groupes tumoraux seraient une conséquence du phénotype de la cellule initialement transformée. Ces deux théories sont illustrées en **Figure 23**, d'après J. Visvader.

Parmi les arguments en faveur de l'existence d'une « cellule d'origine », il a tout d'abord été observé que malgré l'hétérogénéité inter et intra-tumorale, le profil génique et histologique d'une tumeur donnée restait relativement constant durant sa progression du stade *in situ* au stade métastatique (Ma, Salunga et al. 2003; Weigelt, Glas et al. 2003). Par ailleurs, il a été remarqué que le programme génétique cellulaire d'un lignage tissulaire donné pouvait prédisposer aux mutations de gènes spécifiques, expliquant pourquoi certains oncogènes ne sont mutés que dans des types de cancers bien particuliers, à l'exemple d'HER2 dont l'amplification est spécifique du cancer du sein (Garraway and Sellers 2006). D'autre part, l'équipe de R. Weinberg a montré que la transformation *in vitro* de cellules épithéliales du sein induisait un phénotype tumoral spécifique du type cellulaire transformé. Cette équipe a isolé deux types de cellules épithéliales normales de sein, nommées HMEC (Human Primary Epithelial Cells) et BPEC (Breast Primary Epithelial Cells). Ces cellules présentent des phénotypes différents, les HMEC étant proches du phénotype myoépithelial à l'inverse des BPEC plus proches du phénotype luminal. La transformation puis la transplantation chez la souris suivant un protocole identique, mènent à un phénotype tumoral spécifique de ces deux types cellulaires. Les HMEC forment des tumeurs peu différenciées avec des zones squameuses très rarement retrouvées chez la femme, tandis que les BPEC engendrent des tumeurs plus différenciées et proches des carcinomes canalaire fréquemment observés parmi les cancers du sein humain (Ince, Richardson et al. 2007).

Ce concept de cellule d'origine a été associé à la notion de cellules souches ou progénitrices qui semblent plus susceptibles de subir une transformation tumorale en raison de leur capacités prolifératives exacerbées et de leur longévité. Les cellules d'une tumeur présentent toutes une capacité de prolifération limitée, exceptées certaines cellules appelées cellules souches cancéreuses (CSC) qui sont capables de reconstituer une tumeur hétérogène et ont un pouvoir de prolifération exacerbé. La distinction d'un

type cellulaire responsable du phénotype d'un sous-type de tumeur a principalement été mise en évidence pour expliquer les caractéristiques du sous-type basal des tumeurs du sein et notamment des tumeurs basales développées par les patientes porteuses de mutations du gène *BRCA1*. Tout d'abord l'équipe de G. Lindeman a montré que les cellules des tumeurs basales présentaient une signature génomique et un profil de marqueurs protéiques proches de celui des cellules progénitrices luminales (Lim, Vaillant et al. 2009). Dans le tissu mammaire non tumoral des femmes mutées pour *BRCA1*, cette même équipe a rapporté que le compartiment des cellules progénitrices luminales CD49f⁺/EpCam⁺ était plus riche que dans le tissu non muté (Lim, Vaillant et al. 2009). Cependant une autre étude de l'équipe de C. Kuperwasser utilisant la même technique, a montré qu'il s'agirait plutôt du compartiment CD49f⁺/EpCam⁻ des cellules progénitrices bipotentes, qui serait amplifié chez les patientes mutées, avec conjointement une diminution appréciable mais non significative du nombre de cellules progénitrices luminales CD49f⁺/EpCam^{hi} (Proia, Keller et al. 2011). Bien que contradictoires, ces deux résultats corroborent cependant ceux d'une autre étude qui avait indiqué à l'aide d'un modèle murin que *BRCA1* été impliqué dans la différentiation des cellules progénitrices luminales ER⁻ en cellules luminales différenciées ER⁺ (Liu, Ginestier et al. 2008). La mutation de *BRCA1* serait donc responsable d'une limitation de ce processus de différentiation, expliquant l'augmentation du nombre des cellules progénitrices bipotentes et/ou luminales. Enfin, un travail de l'équipe de M. Smalley a montré que l'invalidation spécifique de *Brca1* dans les cellules progénitrices luminales de la glande mammaire murine permettait de restituer un phénotype tumoral caractéristique des tumeurs basales triple négatives et histologiquement semblables à celles survenant chez les patientes mutées. En revanche l'invalidation de *Brca1* dans les cellules basales/myoépithéliales génère des tumeurs adénomyoépithéliales, rarement retrouvées dans le sein humain et présentant plutôt des caractéristiques de cellules souches (Molyneux, Geyer et al. 2010). Ces données constituent une avancée majeure dans la compréhension des tumeurs dites *BRCA1*, mais sont encore à préciser quant à l'origine cellulaire précise de la tumorigénèse *BRCA1*.

Concernant les autres sous-types tumoraux, des hypothèses ont été faites en fonction des similitudes de leur profil génétique avec celui des différents types cellulaires compris dans la hiérarchie du tissu mammaire. Ainsi les tumeurs luminales se développeraient à partir des cellules luminales plus ou moins différenciées, expliquant

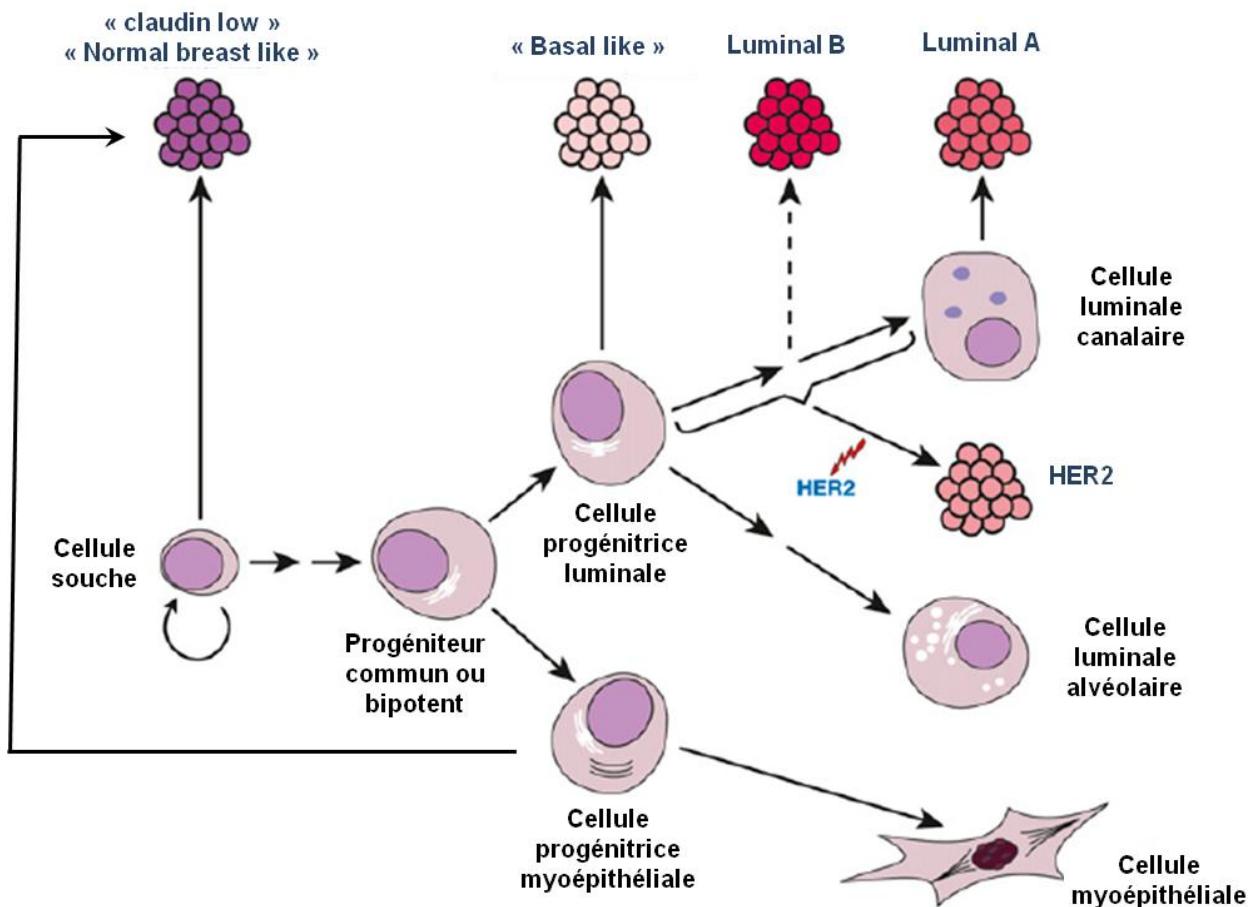


Figure 24 : Modèle hypothétique de la hiérarchie cellulaire de la glande mammaire en relation avec les principaux sous-types tumoraux. Cette classification est réalisée d'après les correspondances génétiques et moléculaires entre les cellules épithéliales et les sous-types tumoraux (adapté de Visvader 2009).

la présence de marqueurs communs (ER, PR, CK18). Les tumeurs HER2 surviendraient également dans les cellules luminales mais présentent un profil cependant moins différencié que les luminales matures. Enfin les tumeurs « Claudin low » et « Normal Breast like » présentent les caractéristiques génétiques et moléculaires les plus proches des cellules souches du sein, et une étude récente indique que ces tumeurs seraient plus précisément originaires de cellules myoépithéliales CD10⁺ (Lim, Vaillant et al. 2009; Keller, Arendt et al. 2011). Cette relation entre les sous-types tumoraux et les cellules qui pourraient en être l'origine phénotypique a été illustrée en **Figure 24** d'après J. Visvader. Ce modèle reste cependant hypothétique et présentent des limitations, notamment sur la capacité des cellules luminales matures à devenir tumorales compte tenu de leur degré de différenciation élevé et donc de leur pouvoir de prolifération réduit. Il est donc aussi concevable que les tumeurs luminales soient par exemples issues de cellules progénitrices luminales et exprimeraient progressivement certains marqueurs de différenciation selon les mutations accumulées et l'environnement tumoral (Charafe-Jauffret, Chaffanet et al. 2007).

IV. MUTATION DU GENE *BRCA1* ET CANCER DU SEIN

A. Présentation de *BRCA1* : une protéine multifonctionnelle

1) Découverte et localisation génomique

Le gène *BRCA1* (BReast CAncer 1) a été localisé sur le chromosome 17q12-21 dans le début des années 1990 à l'aide d'un effort international, puis identifié et cloné en 1994 (Hall, Lee et al. 1990; Easton, Bishop et al. 1993; Simard, Feunteun et al. 1993; Futreal, Liu et al. 1994; Miki, Swensen et al. 1994). La localisation de *BRCA1* sur un chromosome autosomique confère donc une susceptibilité héréditaire au cancer du sein. Le gène *BRCA1* est constitué de 81189 pb comprenant 24 exons, ce qui en fait l'un des plus longs gènes du génome humain. *BRCA1* code pour un transcrit majeur de 7224 paires de bases traduit en une protéine de 1863 acides aminés (220 kDa). L'exon 11 du gène *BRCA1* code à lui seul 60% de la protéine totale. Le promoteur du gène *BRCA1* s'étend sur environ 2000 paires de bases.

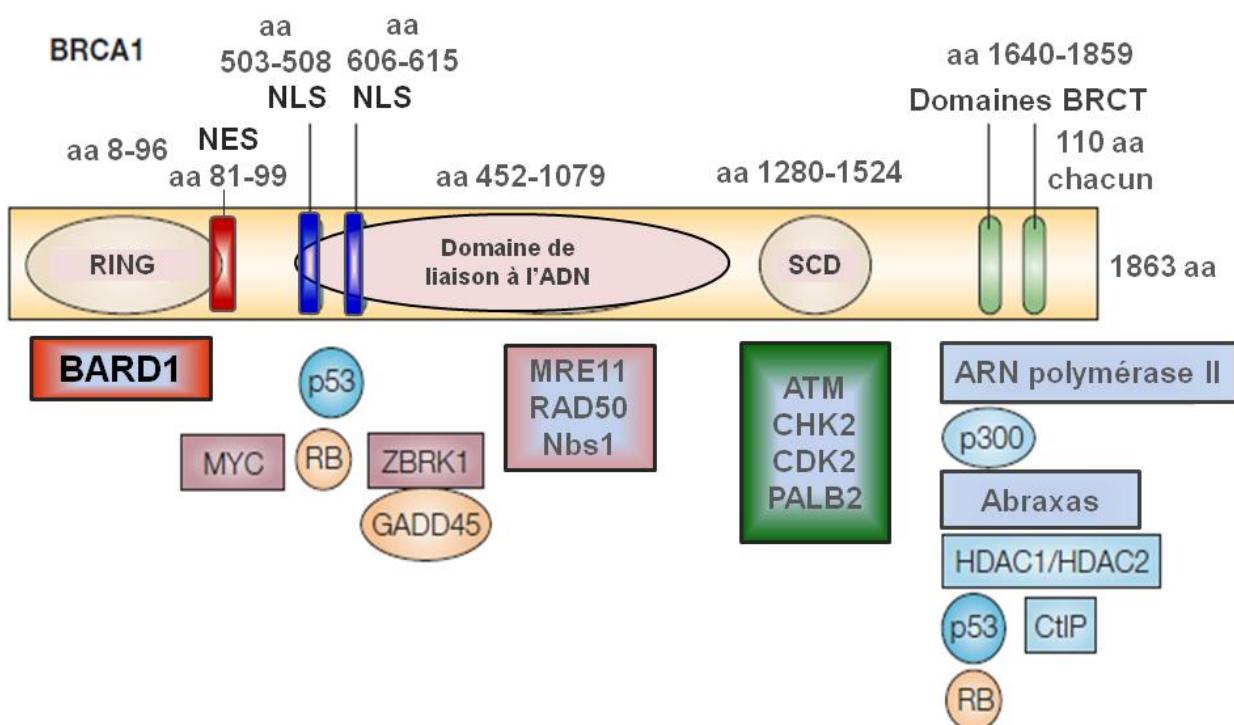


Figure 25 : Structure protéique et principaux domaines fonctionnels de BRCA1. La localisation et le nombre d'acides aminés (aa) des domaines RING, NES, NLS, de liaison à l'ADN, SCD et BRCT sont indiqués. BRCA1 interagit à différents niveaux de sa structure avec de nombreuses protéines impliquées notamment dans le cycle cellulaire ou la réparation de l'ADN (adapté de Narod and Foulkes 2004 ; Mullan, Quinn et al. 2006).

2) Structure protéique

BRCA1 est une protéine ubiquitaire, dont la localisation est principalement nucléaire. Les principaux domaines protéiques de BRCA1 sont illustrés en **Figure 25**. Le premier motif identifié de cette protéine est un domaine en doigt de zinc appelé RING, situé dans les 100 premiers acides aminés (a.a) de l'extrémité N-terminale, et caractérisé par un motif conservé de cystéines et histidines permettant des interactions protéine-protéine (Miki, Swensen et al. 1994). Ce domaine RING est un domaine retrouvé chez les protéines ayant une fonction d'ubiquitine ligase E3 (Brzovic, Keeffe et al. 2003). Un second motif bien conservé, appelé domaine BRCT, est une région de deux séquences répétées d'une centaine d'a.a chacune, fortement conservées en C-terminal. Le domaine BRCT est retrouvé dans de nombreuses protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et le cycle cellulaire tel que TP53 (Koonin, Altschul et al. 1996). Les domaines RING et BRCT sont impliqués dans la plupart des interactions de BRCA1 avec d'autres protéines (**Figure 25**). Au centre de la structure de BRCA1 se situe un domaine de liaison à l'ADN (Paull, Cortez et al. 2001). De plus, deux signaux de localisation nucléaire NLS (a.a. 503 à 508 et 606 à 615) ainsi qu'un signal d'exportation nucléaire NES (a.a. 81 à 99) sont essentiels au trafic nucleocytoplasmique de BRCA1 (Chen, Li et al. 1996; Thakur, Zhang et al. 1997; Rodriguez and Henderson 2000). Avant le domaine C-Terminal sont concentrés des groupements de résidus sérines et thréonines, appelés SCD, qui marquent l'emplacement des principaux sites de phosphorylation de BRCA1 (Cortez, Wang et al. 1999; Deng and Brodie 2000).

3) Fonctions cellulaires de BRCA1

En règle générale, la protéine BRCA1 existe sous la forme d'un hétérodimère avec la protéine BARD1 (BRCA1 Associated RING Domain 1) qui partage de nombreux domaines d'homologies avec BRCA1, et notamment les domaines RING et BRCT. En l'absence de BARD1, BRCA1 est instable et rapidement dégradé (Joukov, Chen et al. 2001). Plusieurs fonctions de BRCA1 ont été élucidées et permettent de comprendre son implication dans la tumorigénèse. En effet, ces rôles incluent la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire, la régulation transcriptionnelle de gènes cibles, le remodelage de la chromatine, ainsi que le maintien du chromosome X inactif. L'association de BRCA1 à BARD1 permet la participation de ce complexe à tous ces

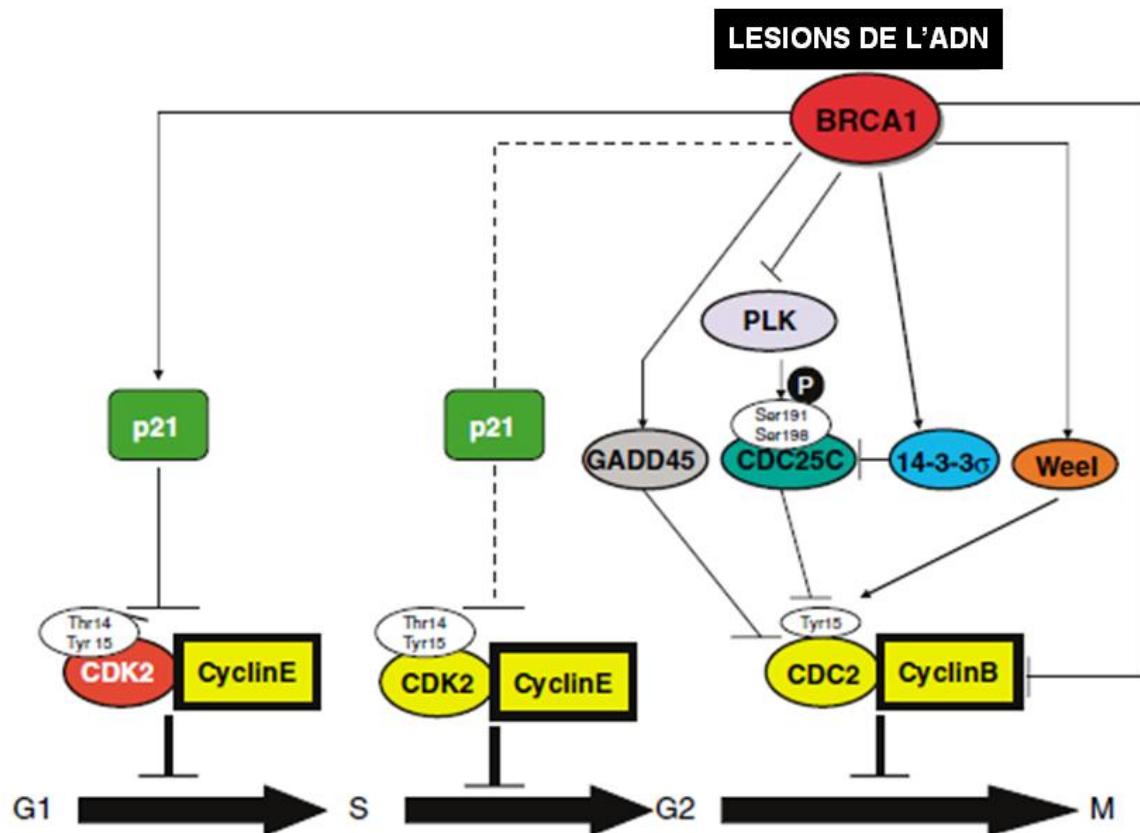


Figure 26 : Implication de BRCA1 dans les différents points de contrôle du cycle cellulaire en réponse à des dommages de l'ADN. BRCA1 intervient à tous les niveaux du cycle cellulaire en interagissant directement (—) ou indirectement (---) avec plusieurs acteurs comme p21 qui permet d'inhiber la progression en phase G0/G1 puis en phase S. BRCA1 stimule la transcription de gènes régulateurs du point de contrôle G2/M tel que *GADD45*, la protéine chaperonne 14-3-3 σ ou wee1, qui vont alors inhiber la cycline B et la progression dans le cycle. La cycline B peut également être inhibée directement par BRCA1 ou par la CDC25C via une inhibition de la PLK (Polo like kinase) par BRCA1 (adapté de Mullan, Quinn et al. 2006).

processus grâce à ses fonctions de facteur de transcription, ainsi qu'à son action d'ubiquitine ligase E3.

a. Intégrité du génome, réparation de l'ADN, et cycle cellulaire

La létalité embryonnaire précoce des souris nulles pour *brca1* témoigne de l'aspect essentiel de ce gène dans l'intégrité et le maintien du génome de la cellule. En effet, ces souris présentent de nombreuses aberrations chromosomiques qui sont exacerbées par la mutation de *TP53* (Shen, Weaver et al. 1998). Dans les cellules mammaires épithéliales humaines, les transcrits *BRCA1* sont induits en fin de phase G1 et atteignent un seuil maximum après le point de contrôle G1-S (Vaughn, Davis et al. 1996). La protéine BRCA1 est hyperphosphorylée en fin de phase G1 et durant la phase S, alors que sa déphosphorylation intervient rapidement après la mitose (Ruffner and Verma 1997). Ce trafic intracellulaire ainsi que l'état de phosphorylation de BRCA1 a pu être relié à l'induction de dommages de l'ADN (Scully, Chen et al. 1997). La lignée mammaire HCC1937 *BRCA1*^{-/-} présente un déficit de réparation de l'ADN par recombinaison homologue, qui peut être aboli par la réintroduction de BRCA1 démontrant clairement la participation de BRCA1 dans la réparation de l'ADN (Scully, Ganesan et al. 1999). De surcroît, BRCA1 est capable de se lier avec de nombreuses protéines impliquées dans le cycle cellulaire et dans la réparation de l'ADN (Deng and Brodie 2000; Mark, Liao et al. 2005). Ces données ont donc fortement suggéré un rôle de BRCA1 dans la régulation du cycle cellulaire, et le maintien de l'intégrité de l'ADN.

Au niveau du cycle cellulaire, BRCA1 est capable d'induire l'arrêt du cycle en phase G0/G1 et G1/S par activation de la transcription de p21/WAF1 et par une participation au mécanisme de phosphorylation et donc d'activation de TP53, en réponse à des dommages de l'ADN (Fabbro, Savage et al. 2004). De plus, la phosphorylation de BRCA1 par la protéine ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) est un mécanisme essentiel aux points de contrôle de la phase S et la phase G2/M. BRCA1 a par ailleurs montré une capacité à interagir avec plusieurs protéines de régulation de la phase G2/M telles que la cycline B ou GADD45 afin d'induire l'arrêt de la progression du cycle cellulaire (**Figure 26**) (Yoshida and Miki 2004; Mullan, Quinn et al. 2006). Il est également impliqué dans le point de contrôle mitotique (spindle checkpoint) qui permet l'arrêt du cycle cellulaire en cas de perturbation de la répartition des chromosomes (Wang, Yu et al. 2004). Ces données ne sont pas exhaustives, mais sont représentatives

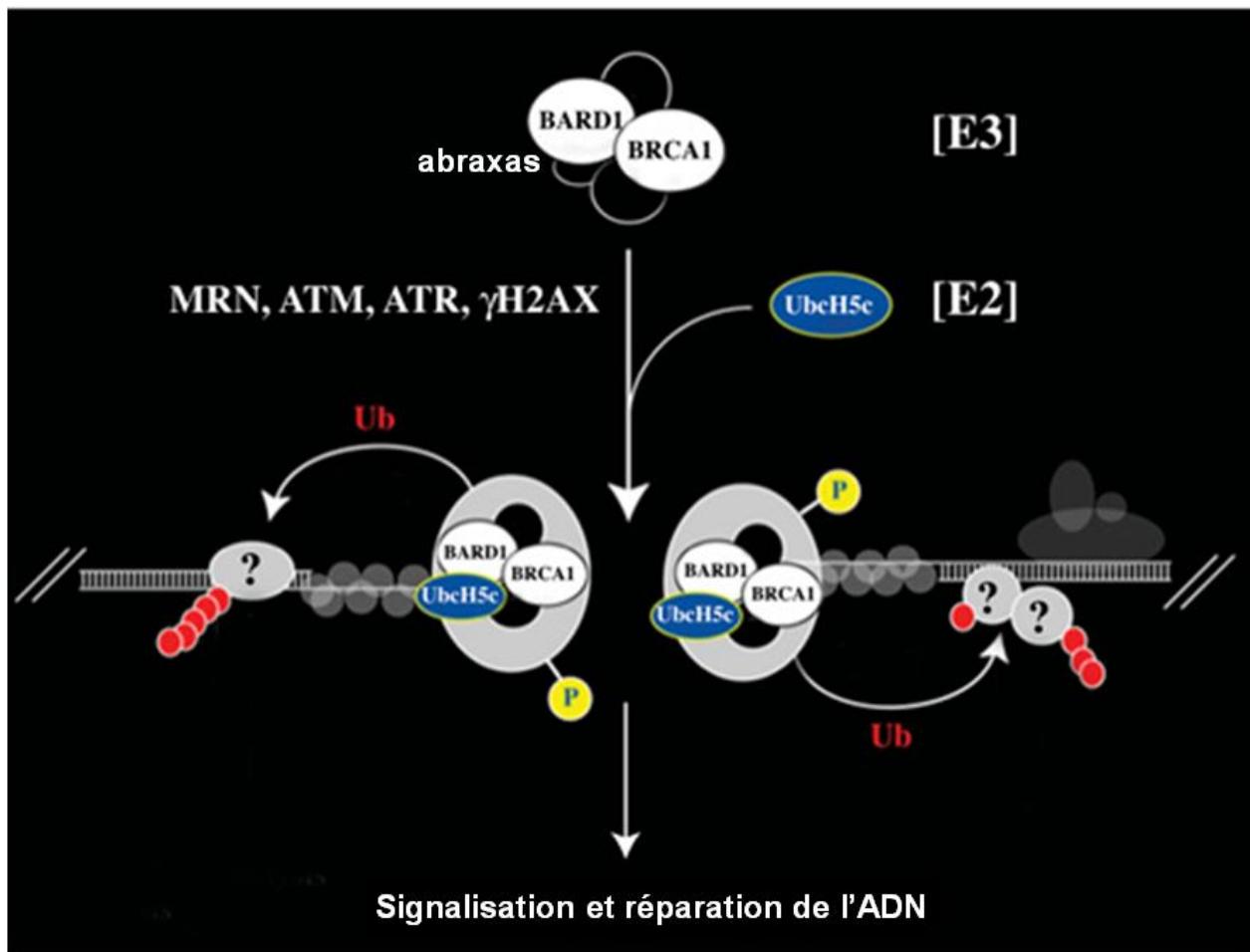


Figure 27 : Implication de BRCA1 dans la signalisation et la réparation de l'ADN. L'histone H2AX signale la présence des lésions de l'ADN double brin (DSB). Abraxas permet le recrutement du complexe BRCA1-BARD1 qui se lie au complexe MRN et est phosphorylé par ATM et ATR. BRCA1 et UbcH5c sont des ubiquitines-ligase E3 et E2 respectivement, qui agissent conjointement pour induire l'ubiquitination (Ub) de protéines cibles impliquées dans la réparation des DSB (adapté de Boulton 2006).

de l'importance de cette protéine dans le bon déroulement du cycle cellulaire qui inclue le respect des points de contrôle essentiels à la réparation des dommages de l'ADN et donc au maintien de l'intégrité du génome.

BRCA1 est aussi directement impliqué dans plusieurs étapes de la réparation des lésions double brin de l'ADN (DSB) par recombinaison homologue (RH) (**Figure 27**) (Boulton 2006; O'Donovan and Livingston 2010). L'histone H2AX marque l'emplacement des DSB et permet le recrutement des molécules nécessaires à leur réparation. BRCA1 participe à cette signalisation des DSB en étant recruté sur le site de réparation par la protéine abraxas qui s'associe aux domaines BRCT de BRCA1 et lie ensuite la protéine RAP80 à BRCA1. Au niveau des lésions de l'ADN, BRCA1 s'associe alors à la protéine CtIP ainsi qu'au complexe MRN formé de MRE11, RAD50 et Nbs1 qui permettent l'excision de l'ADN en amont des sites de cassures pour en faciliter la réparation. Le rôle précis de BRCA1 dans la suite des mécanismes de RH n'est pas encore totalement défini mais il consisterait d'abord en une ubiquitination essentielle de plusieurs acteurs de la réparation. BRCA1 pourrait également servir de protéine d'échafaudage pour faciliter les actions de ATM et ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related) sur le site de réparation (Huen, Sy et al. 2010). BRCA1 est d'ailleurs lui-même phosphorylé par les kinases ATR et ATM suite à l'apparition de dommages de l'ADN (Rosen, Fan et al. 2003). Enfin, BRCA1 s'associe au complexe formé par les protéines BRCA2 et RAD51 sur les sites de cassures double-brin de l'ADN. La protéine PALB2 vient récemment d'être identifiée comme un autre composant de ce complexe qui permettrait la liaison entre BRCA1 et BRCA2. Ce complexe catalyse l'échange de brins avec la partie homologue de la chromatide sœur non lésé, mais le rôle précis de BRCA1 au sein de ce complexe n'est pas encore totalement explicité (Yoshida and Miki 2004; Huen, Sy et al. 2010; O'Donovan and Livingston 2010).

Enfin il est très important de noter que la mutation d'un seul allèle *BRCA1* semble suffisante pour perturber le maintien de l'intégrité génomique, ce qui permet d'expliquer la prédisposition des patientes mutées au développement des cancers. Il a en effet été remarqué que les patientes mutées pour *BRCA1* présentaient des aberrations génomiques dans les cellules non tumorales *BRCA1^{+/−}* beaucoup plus fréquentes que chez les patientes non mutées *BRCA1^{+/+}*, ce qui met en évidence l'importance de

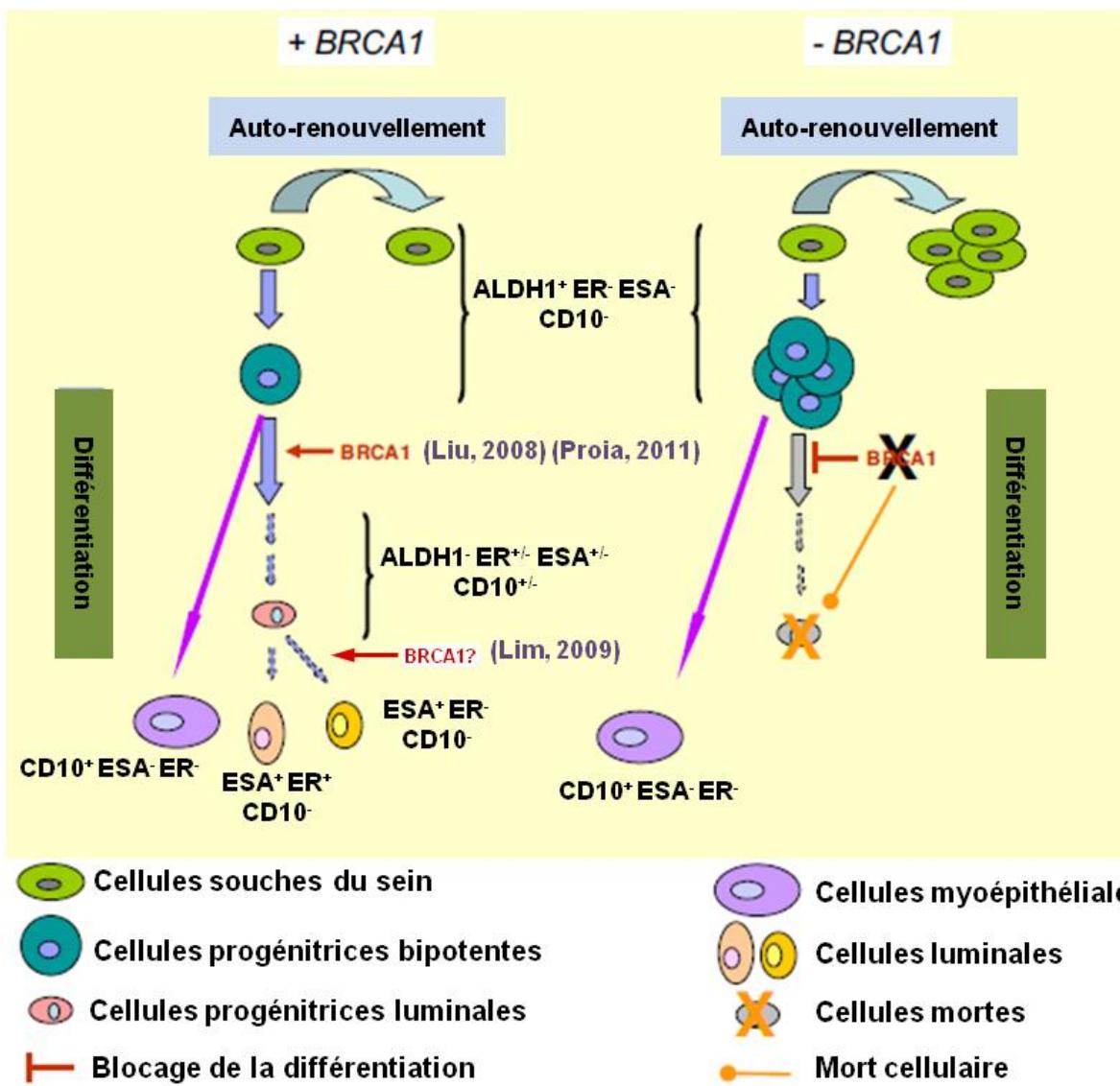


Figure 28 : Illustration du rôle proposé de BRCA1 dans la différenciation des cellules progénitrices ER⁻ en cellules progénitrices ER⁺ (Liu, 2008). La perte de BRCA1 induirait une accumulation anormale de cellules progénitrices ER⁻. Il est à noter que l'équipe de G. Lindeman a suggéré que cette action interviendrait plus précisément au niveau de la différenciation des cellules progénitrices luminales ER⁺⁻ en cellules luminales différenciées, en raison de l'augmentation du compartiment des cellules progénitrices luminales dans le sein des femmes mutées (Lim, 2009). Cela pourrait expliquer l'existence des 10% de tumeurs BRCA1 ER⁺ qui surviendraient donc à partir de cellules progénitrices luminales ER⁺. Cependant l'équipe de C. Kuperwasser a montré que le nombre de cellules progénitrices bipotentes était augmenté tandis que celui des cellules progénitrices luminales ne l'était pas chez les patientes mutées (adapté de Proia, Keller et al. 2011).

l'expression des deux allèles sauvages dans le maintien de l'intégrité génomique (Rennstam, Ringberg et al. 2010).

b. Régulation de la transcription

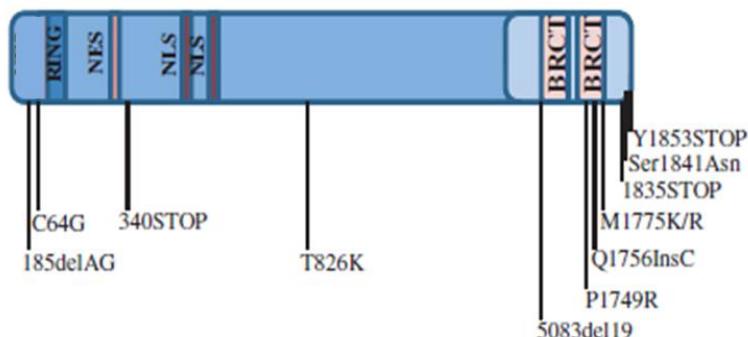
Un rôle de BRCA1 en tant que facteur de transcription lui fut attribué pour la première fois lorsque son domaine BRCT fusionné à un domaine de liaison à l'ADN Gal4 montra une capacité à activer la transcription (Monteiro, August et al. 1996). Puis il a également été montré que BRCA1 faisait partie du complexe transcriptionnel holoenzyme ARN polymérase II (Scully, Anderson et al. 1997). BRCA1 interagit également avec de nombreux co-régulateurs et facteurs de transcription incluant CBP/p300, SP1, STAT1, ER (Pao, Janknecht et al. 2000; Rosen, Fan et al. 2003). Parmi les gènes modulés transcriptionnellement par BRCA1, se trouvent *MDM2*, *BAX*, *P21/WAF1*, *P27/KIP1*, *GADD45*, mais aussi *ER* et *PR*, la plupart de ces gènes étant sous la dépendance de TP53 également régulé par BRCA1 (Somasundaram, Zhang et al. 1997; Ouchi, Monteiro et al. 1998; Zhang, Somasundaram et al. 1998; Jin, Zhao et al. 2000; Williamson, Dadmanesh et al. 2002).

c. Facteur de différenciation

Une large augmentation des niveaux du transcrit de *BRCA1* a été observée dans les cellules épithéliales mammaires de la souris pendant la puberté et la gestation, de façon parallèle à la différenciation fonctionnelle des lobules (Lane, Deng et al. 1995; Marquis, Rajan et al. 1995). L'invalidation de *BRCA1* dans la lignée épithéliale de sein humain MCF10A abroge la capacité de ces cellules à former des structures alvéolaires en culture en 3 dimensions dans du Matrigel, suggérant un rôle de BRCA1 dans la différenciation (Furuta, Jiang et al. 2005). Enfin comme suggéré précédemment, BRCA1 serait impliqué dans la différenciation des cellules progénitrices ER⁻ en cellules luminales différencierées ER⁺, ainsi que dans la compartimentation des cellules progénitrices bipotentes et luminales (**Figure 28**) (Liu, Ginestier et al. 2008; Lim, Vaillant et al. 2009; Proia, Keller et al. 2011).

d. Autres fonctions régulatrices de BRCA1

Parmi la multitude des fonctions de BRCA1, un rôle à également été décrit dans le remodelage de la chromatine. BRCA1 interagit avec des protéines de remodelage de la chromatine telles que SWI, SNF et BACH1 pour les recruter aux sites de transcription et faciliter l'accès de ces sites à la machinerie de transcription. De plus BRCA1 s'associe

A**BRCA1****B**

		Sensibilité à la chimiothérapie	Prolifération	Transcription	Tumorigénèse	Développement
Réparation de l'ADN	Apoptose	185delAG	185delAG	185delAG	1835STOP	Δ11 splice variant
5382InsC		5382InsC	5382InsC	M1775K	340STOP	
M1775K		5677InsA	5677InsA	P1749R		
P1749R		ΔN		Δ11 splice variant	Y1853STOP	
C64G				Q1756InsC		
T826K				5083del19		
M1775R				Ser1841Asn		

Figure 29 : Principales mutations de BRCA1 et implications démontrées sur ses actions cellulaires. **A.** les mutations les plus fréquentes de BRCA1 sont indiquées sur sa structure protéique. Les noms des mutations sont ceux donnés dans les publications d'origine **B.** Processus cellulaires pour lesquels les mutations de BRCA1 sont responsables d'une perte de fonction ou d'un fonctionnement différent par rapport à la forme sauvage de BRCA1 (adapté de Linger and Kruk 2010).

avec hGCN5 et TRRAP dans un complexe à activité histone acetyltransferase capable de promouvoir également la transcription (Mullan, Quinn et al. 2006).

Par ailleurs, BRCA1 est aussi un acteur de l'inactivation de l'un des deux chromosomes X chez la femme, puisqu'il a été montré qu'il permettait le recrutement du transcript *XIST* (X inactive Specific Transcript) sur l'un des deux chromosomes X afin d'induire son inactivation par mécanisme épigénétique (Narod and Foulkes 2004; Silver, Dimitrov et al. 2007).

Enfin BRCA1 joue aussi un rôle dans l'inhibition de la télomérase, l'enzyme responsable du maintien de la longueur des télomères, suggérant que la perte d'expression de *BRCA1* pourrait donc augmenter la survie cellulaire (Xiong, Fan et al. 2003).

BRCA1 est donc une protéine centrale présentant des fonctions multiples, dont la présence est essentielle au fonctionnement de la cellule ainsi qu'au contrôle de sa prolifération et de son intégrité génomique. Au vu de l'abondance de ses actions, il est aisément compréhensible que la perte de son expression puisse être responsable de la transformation tumorale de la cellule. *BRCA1* a donc été classé parmi les gènes suppresseurs de tumeurs puisque la présence de mutations sur ce gène est un facteur carcinogène important.

B. Implication de BRCA1 dans le développement du cancer du sein et influence des hormones

1) Tumeurs *BRCA1*

Il existe un grand nombre de mutations du gène *BRCA1* puisque plus de 300 mutations ont été recensées jusqu'à aujourd'hui. Tous les types de mutations ont été rapportés pour cette protéine, incluant des décalages du cadre de lecture (frameshift), des mutations non-sens, ou faux-sens, des délétions, des insertions, des mutations silencieuses des parties codantes et des mutations introniques. Les mutations majoritairement associées à un risque tumoral sont les mutations frameshift et les mutations non-sens qui conduisent la plupart du temps à l'apparition d'un codon stop prématûr et donc à la traduction d'une protéine tronquée (**Figure 29**) (Linger and Kruk 2010). Les tumeurs du sein dites « *BRCA1* », c'est à dire développées chez les

individus mutés pour ce gène, présentent des caractéristiques bien spécifiques, à commencer par un profil typique de cancer de type basal, et triple négatif, c'est-à-dire n'exprimant pas les récepteurs ER, PR et HER2. Chez les patientes porteuses de mutations *BRCA1*, près de 80% des tumeurs sont négatives pour ER et PR tandis que les 20% restantes présentent une positivité plus ou moins forte (Eisinger, Nogues et al. 1999; King, Wieand et al. 2001). Cette caractéristique est vraiment spécifique des tumeurs *BRCA1* puisque parmi les tumeurs sporadiques, la proportion de tumeurs positives pour ces récepteurs est beaucoup plus importante (60 à 70%) (Pujol, Hilsenbeck et al. 1994; King, Wieand et al. 2001). Les tumeurs *BRCA1* surviennent à un âge précoce par rapport aux tumeurs sporadiques, et sont les plus agressives. Ceci est lié à un index mitotique élevé et à une faible différentiation des cellules tumorales. La protéine TP53 est retrouvée mutée dans presque toutes les tumeurs *BRCA1* mais le spectre des mutations *TP53* observés dans les tumeurs *BRCA1* est plus large et plus complexe que celui des tumeurs sporadiques (Holstege, Joosse et al. 2009; Manie, Vincent-Salomon et al. 2009). Ces tumeurs présentent également un fort degré d'aneuploïdie relativement aux autres types tumoraux (Tirkkonen, Johannsson et al. 1997).

L'absence de récepteurs hormonaux et de HER2 rend les thérapies ciblées inefficaces à l'instar de l'antagoniste de ER α (Tamoxifen), des inhibiteurs d'aromatases ou bien de l'inhibiteur des HER2 (Trastuzumab). Les tumeurs *BRCA1* sont donc généralement traitées par des chimiothérapies cytotoxiques qui présentent une efficacité limitée dans le temps et le taux de réponse. L'efficacité du traitement par des inhibiteurs de la Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) impliquée dans la réparation de l'ADN est en cours d'évaluation clinique et semble constituer une voie thérapeutique anti-tumorale prometteuse pour les femmes mutées (Sandhu, Yap et al. 2011).

D'autre part, des tumeurs sporadiques dites *BRCA*ness ayant perdu l'expression de *BRCA1* peuvent survenir chez les femmes non mutées suite à une inactivation épigénétique du promoteur de *BRCA1* dans les cellules tumorales, la plus fréquente étant l'hyper-méthylation. Une partie de ces tumeurs présente un phénotype très proche des tumeurs avec mutation constitutionnelle *BRCA1* et répondraient aux mêmes traitements (Turner, Tutt et al. 2004).

2) Spécificité tissulaire des cancers liés à la mutation de *BRCA1*

Les femmes porteuses d'une mutation dans *BRCA1* sont plus particulièrement prédisposées au cancer du sein et de l'ovaire, mais cette spécificité tissulaire n'est pas encore totalement comprise. Le rôle de *BRCA1* dans la réparation de l'ADN a bien entendu été impliqué dans le développement du cancer. Cependant il est difficile d'imaginer qu'il s'agisse de la seule fonction de *BRCA1* mise en cause car dans cette hypothèse les tumeurs surviendraient dans n'importe quel type cellulaire. Il reste toutefois possible d'imaginer que la déficience de réparation de l'ADN puisse être critique dans les cellules mammaires alors qu'elle serait soit compensée par d'autres acteurs, soit obligatoirement létale dans d'autres types cellulaires, empêchant ainsi la possibilité d'une transformation tumorale. Par ailleurs, la perte d'expression du deuxième allèle (sauvage) de *BRCA1* est une étape clé et essentielle de la tumorigénèse mammaire des patientes mutées. Ce phénomène peut être la conséquence d'une perte d'hétérozygotie ou LOH (Loss Of Heterozygosity), c'est à dire d'une mutation ou délétion de l'allèle normal empêchant son expression. La perte d'expression de la forme sauvage de *BRCA1* peut également être due à une inhibition transcriptionnelle du gène par un mécanisme épigénétique. Il a donc été proposé que cette perte d'expression de *BRCA1* puisse être un évènement spécifique ou prépondérant dans les cellules du sein et de l'ovaire (Monteiro 2003). L'implication de facteurs de survie spécifiques de l'environnement de ces tissus a aussi été suggérée pour expliquer une survie possible des cellules suite au LOH de *BRCA1*, tandis que cette perte mènerait à l'apoptose dans les autres tissus (Elledge and Amon 2002).

Plus vraisemblablement, une implication tissu-spécifique de certaines fonctions de *BRCA1*, a été suggérée dans le développement des tumeurs du sein et des ovaires. Cette hypothèse n'est pas incompatible avec les précédentes et est corroborée par une spécificité d'action de *BRCA1* dans les cellules du sein et de l'ovaire. Par exemple, des expériences de surexpression de *BRCA1* dans plusieurs types cellulaires tumoraux ont montré une inhibition de la croissance cellulaire dans toutes les lignées de sein et d'ovaires testées mais pas dans les lignées de poumon, de colon ou de fibroblastes, argumentant pour la spécificité tissulaire des actions de *BRCA1* (Holt, Thompson et al. 1996).

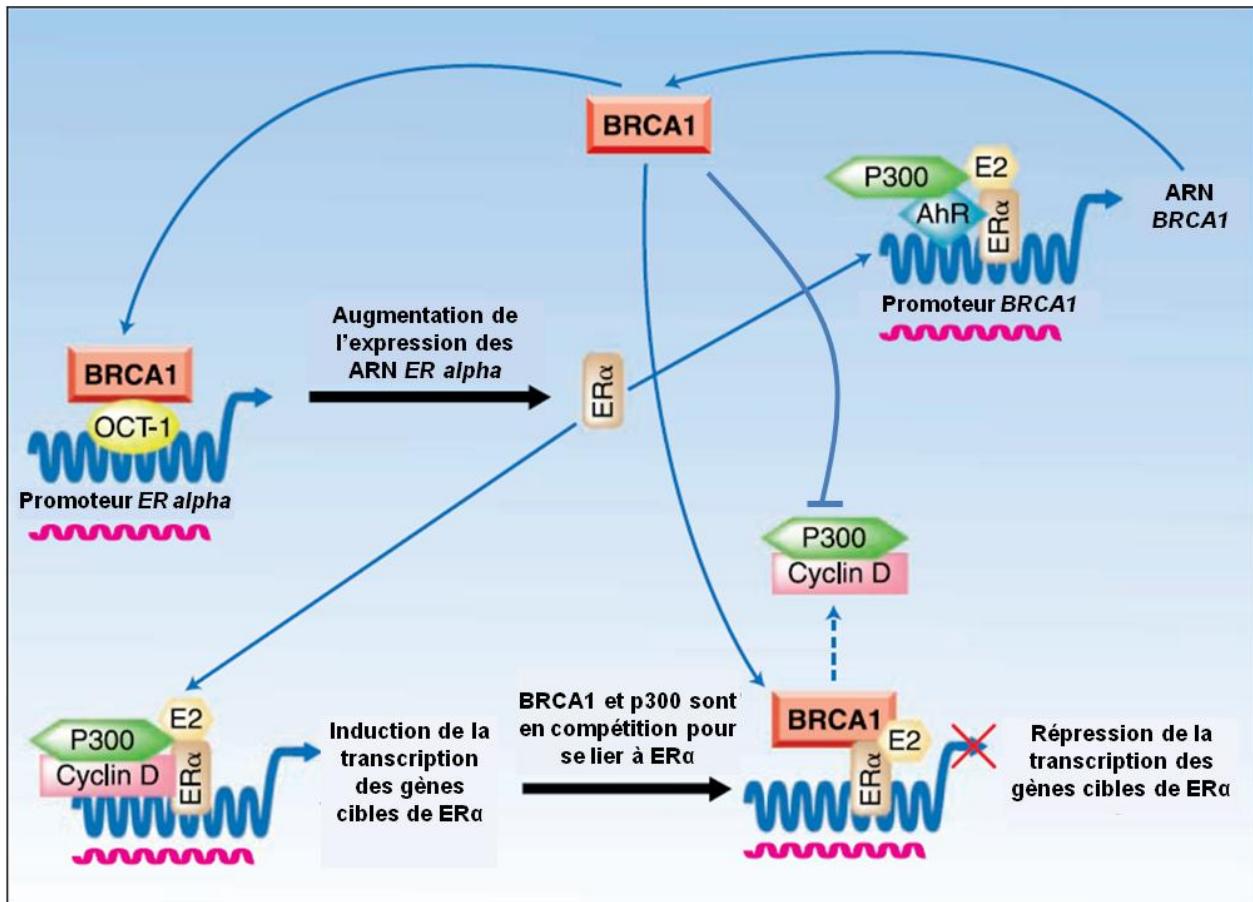


Figure 30 : Représentation des différentes voies de régulation mises en jeu entre BRCA1 et ER α . L'estradiol stimule l'expression des transcrits *BRCA1* par un mécanisme impliquant potentiellement p300 et AhR (Aromatic hydrocarbon receptor). A son tour, BRCA1 régule *ER alpha* en augmentant la synthèse de ses ARN dépendamment de la présence d'OCT-1. BRCA1 inhibe également l'activité transcriptionnelle de la protéine en modifiant la conformation de ER α et en déplaçant le complexe p300/Cycline D sur le promoteur de ses gènes cibles. BRCA1 diminue également la transcription de p300 (adapté de Gorski, Kennedy et al. 2009).

Enfin et surtout, cette spécificité d'action de BRCA1 a été reliée aux hormones sexuelles. En effet, les seins et les ovaires sont des tissus dont les régulations s'exercent sous le contrôle majeur de l'estradiol et de la progestérone. De plus, les patientes qui subissent une ovariectomie ont un risque diminué de 50% de développer un cancer du sein. Des études cliniques indiquent que le traitement par le Tamoxifén, un antagoniste de ER, pourrait prévenir l'apparition de cancers du sein controlatéraux chez les patientes mutées ayant déjà développé une tumeur mammaire (Narod, Brunet et al. 2000; Metcalfe, Lynch et al. 2004). Ce lien clinique entre BRCA1 et les récepteurs hormonaux a déterminé la poursuite des recherches afin de comprendre les mécanismes mis en jeu.

3) Relation entre BRCA1 et les récepteurs hormonaux

a. Récepteur des estrogènes

La connexion entre BRCA1 et le récepteur de l'estradiol fut largement rapportée par l'équipe de E. Rosen à partir 1999, qui démontra d'abord que BRCA1 inhibait l'activité de ER α sur la transactivation d'un gène rapporteur après stimulation par un ligand (Fan, Wang et al. 1999). Cette relation fut ensuite étayée par la capacité de BRCA1 à inhiber l'expression E2-dépendante de deux gènes cibles de ER α , pS2 et la cathepsine D (Fan, Ma et al. 2001). Cette observation a été étendue à un large panel de gènes régulés par l'estradiol, à l'aide d'une analyse microarray dans la lignée MCF-7 de cancer du sein après traitement par E2 et surexpression de BRCA1 (Xu, Fan et al. 2005). Le mécanisme impliqué dans cette inhibition met en jeu une interaction directe entre le domaine RING de BRCA1 et la région LBD/AF2 de ER α , entraînant une diminution de la capacité du récepteur à se lier aux ERE (**Figure 30**) (Fan, Ma et al. 2001; Wang, Fan et al. 2005). BRCA1 induit également une réduction de la transcription du co-activateur p300 impliqué dans la stimulation de l'activité transcriptionnelle de ER α (Fan, Ma et al. 2002). Une autre équipe a montré que l'inhibition de ER α par BRCA1 existait indépendamment de la fixation d'un ligand (Zheng, Annab et al. 2001).

Par ailleurs, une étude de A. Hosey *et al.* a montré que l'introduction de la forme sauvage de BRCA1 induisait l'expression du gène *ER alpha* dans des cellules HCC1937 mutées pour *BRCA1* et initialement négatives pour ER α . BRCA1 interagit avec le facteur de transcription OCT-1 sur le promoteur du récepteur pour stimuler son expression (**Figure 30**). L'invalidation de *BRCA1* par ARN interférence dans deux lignées

mammaires ER+, les T-47D et les MCF-7, provoque la perte d'expression de ER α . D'après cet auteur, l'absence d'expression de ER α dans la majorité des tumeurs mammaires des patientes mutées pourrait donc être une conséquence de la perte d'expression de *BRCA1* suggérant que *BRCA1* serait indispensable à l'activation de l'expression du récepteur (Hosey, Gorski et al. 2007). Cependant, les résultats sur ce sujet sont contradictoires, à l'image d'une autre étude portant sur des souris transgéniques utilisant le système Cre-recombinase. Ces souris expriment constitutivement un variant de *brca1* ($\Delta 11$) amputé de l'exon 11, qui n'est donc plus capable de reproduire la majorité des fonctions de *BRCA1*. Un allèle de *TP53* est également invalidé dans ce modèle afin d'empêcher la létalité embryonnaire provoquée par l'absence de forme sauvage de *BRCA1* (Xu, Qiao et al. 2001). Chez ces souris *brca1 $^{\Delta 11/\Delta 11}$ /TP53 $^{+/-}$* , l'absence de *BRCA1* provoque une expression exacerbée de ER α dans les cellules mammaires, paradoxalement au résultat observé par A. Hosey *et al.*, avec un développement augmenté des structures canalaires et alvéolaires par rapport aux souris sauvages. Cette étude indique donc que si *BRCA1* régule l'expression des ARN *ER alpha*, son action ne semble pas pour autant indispensable à l'expression du récepteur. Mais il est aussi possible que le variant $\Delta 11$ utilisé dans le modèle de souris n'empêche pas l'action de *BRCA1* dans la transcription de *ER alpha*, ce qui expliquerait la présence du récepteur dans le tissu mammaire de ces souris *brca1 $^{\Delta 11/\Delta 11}$ /TP53 $^{+/-}$* . En effet *BRCA1* induit l'expression du gène *ER alpha* via une interaction directe avec OCT-1, mais le domaine de *BRCA1* impliquée dans cette interaction n'a pas été déterminé. Cette association pourrait donc être possible entre OCT-1 et la forme mutante ($\Delta 11$) qui n'empêcherait donc pas l'activation du gène *ER alpha*. Dans le sein normal de femmes mutées *BRCA1 $^{+/-}$* , il n'a pas été rapporté de différence d'expression de ER α , mais une diminution de l'expression de pS2, un gène cible de l'estadiol, a été observée (Mote, Leary et al. 2004). Ceci indique que la mutation d'un seul allèle de *BRCA1* serait suffisante pour perturber les réponses hormonales des cellules mammaires.

D'autre part, chez les mêmes souris *brca1 $^{\Delta 11/\Delta 11}$ /TP53 $^{+/-}$* , des tumeurs mammaires apparaissent après six mois et sont positives pour ER aux stades précoces avant de perdre l'expression du récepteur au cours de leur progression (Li, Xiao et al. 2007). Ce dernier résultat va à l'encontre de la notion de cellule d'origine progénitrice ER- des cancers *BRCA1*, ce qui peut être lié à une spécificité du modèle murin au niveau des étapes la tumorigénèse mammaire liée à la perte d'expression de *BRCA1*. Cependant, le

fait que les tumeurs présentent des cellules positives pour ER ne signifie pas que la cellule transformée initialement l'ait été aussi, mais cela remet en question le rôle de BRCA1 dans la différentiation des progénitrices ER⁻ en cellules luminales ER⁺. Cependant, dans le sein humain, la tumorigénèse se déclenche à partir de cellules initialement hétérozygotes pour *BRCA1* et non mutées pour *TP53*, ce qui induit un biais important dans ce modèle murin dont les cellules sont déjà *brca1^{Δ11/Δ11}* et *TP53^{+/−}*. Une autre étude portant sur des souris *brca1^{MMTV-Δ11/Δ11}* exprimant la forme Δ11 mais de façon ciblée à l'épithélium de la glande mammaire à l'aide d'un promoteur MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) et sans altération de *TP53*, montre aussi un développement augmenté des canaux mais associé à une moindre différentiation des alvéoles par rapport aux souris normales (Jones, Tilli et al. 2008). Toutefois, dans ce modèle, l'expression de ER α reste identique entre les souris *brca1^{MMTV-Δ11/Δ11}* et les souris normales contrairement au résultat observé avec le précédent modèle murin. Ces deux modèles présentent aussi des caractéristiques communes : la mutation d'un allèle *TP53* est nécessaire aux souris *brca1^{MMTV-Δ11/Δ11}* pour mener à l'apparition de tumeurs. De plus, l'adjonction d'estradiol favorise la prolifération cellulaire et l'apparition des tumeurs dans ces deux modèles (Li, Xiao et al. 2007; Jones, Tilli et al. 2008). La surexpression de ER α dans les souris *brca1^{MMTV-Δ11/Δ11}* et *TP53^{+/−}* stimule encore davantage l'apparition de tumeurs dont la moitié présente un profil ER⁻ typique des tumeurs *BRCA1* (Jones, Tilli et al. 2008).

Il a également été rapporté que le traitement des cellules mammaires par l'estradiol provoquait une augmentation de la transcription du gène *BRCA1* par l'intermédiaire de ER α (Spillman and Bowcock 1996). Une autre étude a explicité le mécanisme mis en jeu en montrant que ER α et le co-activateur p300 interagissaient lors de la phase S pour induire la transcription de *BRCA1* au niveau d'un site AP-1 de son promoteur (**Figure 30**) (Jeffy, Hockings et al. 2005). Cet effet est cohérent avec l'importance de *BRCA1* dans le bon déroulement du cycle cellulaire et le maintien de l'intégrité de l'ADN pendant les phases de prolifération induites par l'estradiol. Cela suggère un effet prolifératif exacerbé de l'estradiol dans les cellules ayant perdu l'expression de *BRCA1*.

Enfin, *BRCA1* est également capable d'inhiber l'expression de l'aromatase, l'enzyme responsable de la transformation des androgènes en estrogènes dans les

cellules de la granulosa des ovaires. Les taux de BRCA1 sont diminués en phase folliculaire pré-ovulatoire pour permettre une élévation des taux d'aromatase et accroître la biosynthèse d'estradiol qui va ainsi atteindre le pic déclencheur de l'ovulation (Hu, Ghosh et al. 2005). Cette action de BRCA1 sur l'expression de l'aromatase a aussi été observée dans les adipocytes, également responsables de la production d'estradiol (Ghosh, Lu et al. 2007). Ces effets pourraient donc avoir des conséquences sur les taux d'estradiol circulants chez les femmes mutées pour BRCA1.

L'ensemble de ces résultats confirment bien le rôle prédominant joué par la voie de signalisation E2/ER α dans la transformation tumorale liée à la mutation de *BRCA1*, mais restent à approfondir au regard des nombreuses contradictions observées dans les étapes précises du développement tumoral.

b. Récepteur de la progestérone

En plus des effets estrogéniques, la voie de signalisation progestative contribue certainement au développement des tumeurs *BRCA1*. Tout d'abord, l'expression de PR-A et PR-B est stimulée par les estrogènes via leur récepteur. Il est donc logique de penser que la perte de BRCA1 puisse conduire à la dérégulation de l'expression de PR par un mécanisme indirect impliquant la voie de signalisation estrogénique (**Figure 31**). Au niveau du tissu normal des patientes mutées, les observations concernant l'expression des PR sont contradictoires. Dans une première étude, l'équipe de C. Clarke a montré que l'isoforme PR-B était moins exprimée dans le tissu *BRCA1^{+/−}*, menant à une prédominance de l'expression de l'isoforme PR-A bien qu'elle soit également moins exprimée que dans le tissu normal non muté (Mote, Leary et al. 2004). En revanche, une seconde étude indique que les taux de PR seraient augmentés dans le tissu *BRCA1^{+/−}* normal entourant les tumeurs. Une tendance non significative à l'augmentation a aussi été observée dans le tissu normal plus éloigné de la zone tumorale (King, Gemignani et al. 2004). L'opposition des résultats de ces deux études peut être liée à l'hétérogénéité d'expression des récepteurs nucléaires existant entre les patientes, ainsi qu'au nombre limité d'échantillons (n=20 pour la première et n=15 pour la seconde). Par ailleurs, la deuxième étude ne discrimine pas les isoformes PR-A et PR-B. Enfin, l'augmentation des PR visualisée dans la seconde étude est seulement significative dans le tissu bordant les tumeurs, donc potentiellement dérégulé par des facteurs paracrines en provenance des cellules tumorales, tandis que la première étude porte sur du tissu normal issu de

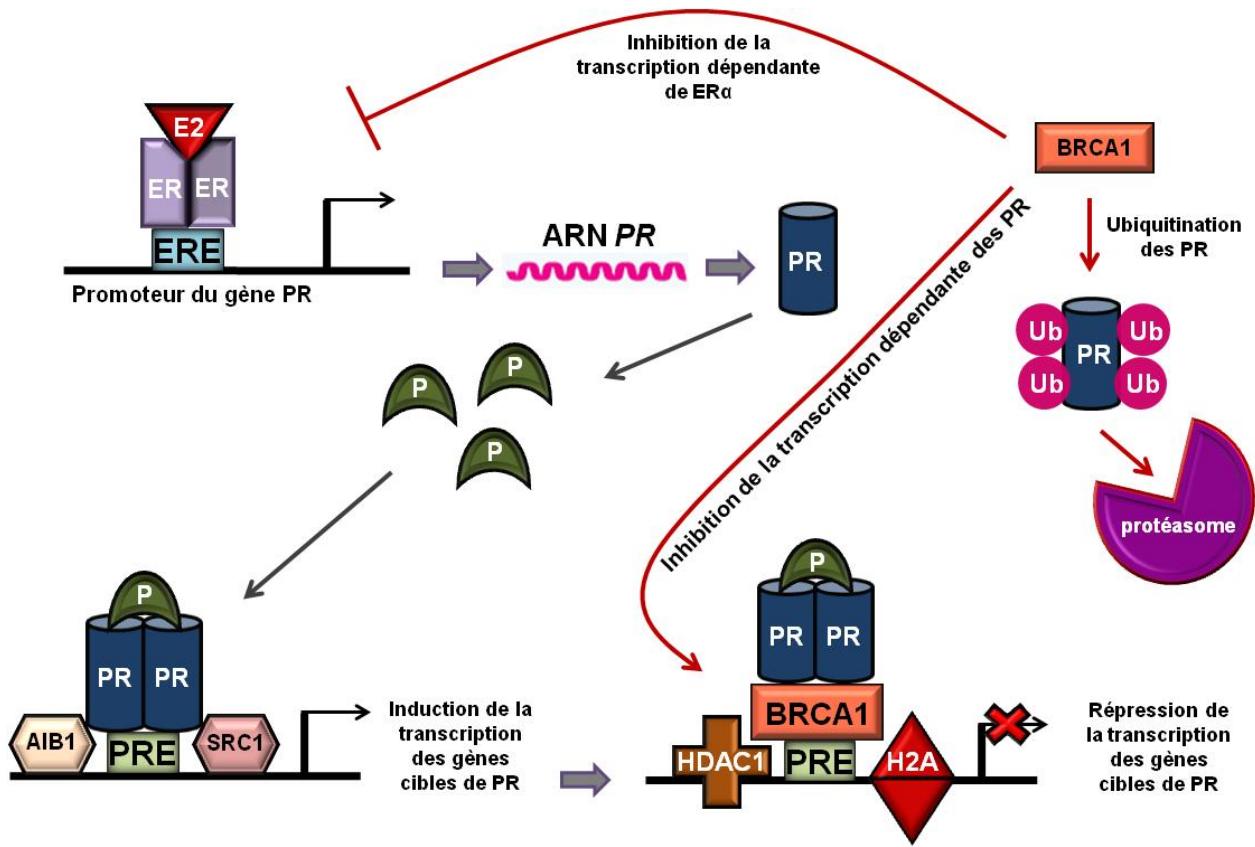


Figure 31 : Représentation de la régulation des PR par BRCA1. BRCA1 pourrait indirectement diminuer la transcription des PR par l'inhibition de la signalisation de ER α (Figure 23). BRCA1 est capable d'induire l'ubiquitination des PR pour conduire à leur dégradation par le protéasome. Une fois activé par P, PR exerce son activité transcriptionnelle en se fixant aux PRE de ses gènes cibles et en recrutant des co-activateurs de transcription (SRC-1, AIB1). La fixation de BRCA1 sur les PR gène la liaison des PR sur les PRE. De plus BRCA1 peut se lier aux PRE pour inhiber le recrutement des co-activateurs et favoriser celui de co-répresseurs transcriptionnels comme l'histone H2A et HDAC1 qui vont augmenter la compaction de la chromatine au niveau des promoteurs des gènes cibles des PR. BRCA1 intervient donc à plusieurs niveaux pour inhiber la voie de signalisation des PR.

mastectomies prophylactiques de seins n'ayant jamais développé de tumeurs auparavant.

Un lien direct entre BRCA1 et les PR a également été démontré par l'équipe de E. Rosen. Tout comme avec ER α , BRCA1 est capable de s'associer directement aux PR et d'induire une répression de la transcription dépendante de ces récepteurs, à la fois d'un promoteur luciférase, mais aussi de gènes cibles des PR (**Figure 31**) (Ma, Katiyar et al. 2006). Dans cette même étude, l'adjonction de progestérone exogène chez des souris *brca1^{MMTV-Δ11/Δ11}*, induit un développement exacerbé des structures mammaires lobulaires par rapport aux souris normales. Ce développement est encore accru lorsque la progestérone est associée à E2 avec une croissance de la glande significativement supérieure au groupe non traité mais aussi au groupe traité par E2 seul. Cette équipe a ensuite précisé les mécanismes impliqués dans l'inhibition des effets des PR par BRCA1. La fixation de BRCA1 sur les PR ne perturbe pas la fixation du ligand sur le récepteur, mais bloque la capacité du complexe ligand-PR à lier les PRE. De plus, BRCA1 favorise le recrutement de co-répresseurs comme l'histone déacetylase 1, et inhibe le recrutement des co-activateurs SRC-1 et AIB1 sur les PRE des gènes cibles de P, afin de réduire leur expression (**Figure 31**) (Katiyar, Ma et al. 2009). Très récemment, une autre équipe a encore affiné les mécanismes impliqués en montrant que BRCA1 exerçait une action d'ubiquitine ligase E3 sur les PR, en augmentant leur ubiquitination pour les mener à la dégradation par le protéasome (**Figure 31**). En corrélation avec les résultats observés par E. Rosen, cette équipe a également observé une fixation exacerbée de BRCA1 sur les PRE en réponse au traitement par la progestérone. BRCA1 induit alors le recrutement des histones H2A qui vont compacter la chromatine au niveau des promoteurs des gènes cibles de P pour inhiber leur transcription (**Figure 31**) (Calvo and Beato 2011).

Un autre travail réalisé par le groupe d'E. Lee a permis de mettre en évidence de façon très convaincante, l'influence de la progestérone dans la tumorigénèse liée à la perte de BRCA1 chez des souris *brca1^{WAPΔ11/Δ11}/TP53^{-/-}* (Poole, Li et al. 2006). Le promoteur de la Whey Acidic Protein (WAP) est utilisé ici pour cibler les mutations dans les cellules épithéliales de la glande mammaire, comme décrit précédemment avec le promoteur MMTV. Cette étude a d'abord permis de confirmer le processus de dégradation des PR par le protéasome via une action ubiquitine ligase de BRCA1 dans les cellules épithéliales mammaires issues de ces souris et cultivées *in vitro*. Mais

surtout, cet article met en évidence des effets prolifératifs et carcinogènes de la progestérone. Chez les souris *brca1^{WAPΔ11/Δ11}/TP53^{-/-}*, la prolifération de la glande mammaire est largement amplifiée par rapport aux souris sauvages ou aux souris *brca1^{+/+}/TP53^{-/-}*, et les cellules prolifératives sont à la fois PR⁺ et adjacentes à des cellules PR⁺, suggérant un effet prolifératif paracrine et autocrine lié à la progestérone. Par ailleurs, une nette augmentation de l'expression des PR-A est observée en phase lutéale. La prolifération est encore exacerbée par l'apport d'E2 ou de P, et d'autant plus par la combinaison des deux hormones. Enfin ces souris développent des tumeurs mammaires très précocement contrairement aux souris sauvages ou *brca1^{+/+}/TP53^{-/-}*, et les auteurs ont cherché à savoir si cette tumorigénèse pouvait être une conséquence des effets de la progestérone en leur administrant de la mifépristone, un antagoniste des PR. Non seulement la mifépristone est capable d'empêcher l'apparition de tumeurs mammaires, mais après cinq semaines de traitement, la croissance des structures mammaires est nettement réduite. Cette étude a donc véritablement mis l'accent sur l'impact de la progestérone dans la tumorigénèse *BRCA1* (Poole, Li et al. 2006). Dans un autre modèle utilisant des souris *brca1^{MMTV-Δ11/Δ11}*, la différentiation en structures alvéolaires est limitée par rapport aux souris sauvages sans que cela soit lié à une perturbation des effets de la prolactine, ce qui suggère que cette action passerait par une inhibition des effets différentiants de la progestérone ou bien par une diminution des capacités cellulaires à se différencier en l'absence de *BRCA1* et donc de son action dans le processus de différentiation (Jones, Tilli et al. 2008).

Cependant, ces résultats obtenus dans un modèle murin nécessitent d'être confirmés dans des modèles humains avant de pouvoir envisager une thérapeutique prophylactique par un antiprogestatif chez les femmes mutées.

c. Récepteur des glucocorticoïdes

Les relations décrites entre *BRCA1* et les récepteurs nucléaires laissent entrevoir un lien probable entre *BRCA1* et le récepteur des glucocorticoïdes. En effet, si *BRCA1* est capable de réguler ER et PR, une interaction de cette protéine avec le récepteur des androgènes a également été montrée (Park, Irvine et al. 2000). Cela suggère que *BRCA1* pourrait jouer un rôle dans la voie de signalisation d'autres récepteurs nucléaires tels que les GR qui partagent de surcroît de nombreuses homologies avec les PR. Par ailleurs, l'implication des glucocorticoïdes dans le développement mammaire chez la souris et

très probablement chez la femme ainsi que leur impact potentiel dans la tumorigénèse du sein vont dans le sens de cette hypothèse qui nécessite d'être explorée.

4) Etapes et facteurs de transformation tumorale *BRCA1* : une chronologie à établir.

La question de l'impact de l'hétérozygotie de *BRCA1* dans le fonctionnement cellulaire et dans la transformation tumorale reste encore à résoudre. Il a d'abord été présumé que la présence d'un allèle muté sur les deux n'avait pas d'impact sur la cellule grâce à une compensation de l'allèle sauvage. La perte d'expression de l'allèle sauvage de *BRCA1* était donc considérée comme étant l'élément déclencheur de la tumorigénèse des cellules mammaires. Cependant, plusieurs données probantes ont finalement indiqué que l'hétérozygotie de *BRCA1* était corrélée à un certain nombre de perturbations de la physiologie cellulaire. La plupart de mutations *BRCA1* conduisent soit à une absence d'expression de la forme mutée, soit à la présence d'une forme tronquée qui est incapable de fonctionner correctement. Dans tous les cas, cette mutation conduit donc à une haplo-insuffisance, c'est-à-dire à une quantité réduite de protéines sauvages dans la cellule mutée par rapport aux cellules non mutées. Les cellules *BRCA1^{+/−}* présentent des aberrations génomiques fréquentes, signe d'une instabilité génétique due à cette haplo-insuffisance de la forme sauvage de *BRCA1* (Rennstam, Ringberg et al. 2010). Il est donc plausible que cette instabilité favorise la survenue du LOH dans les cellules hétérozygotes pour *BRCA1*. En effet la perte d'expression de l'allèle sauvage est systématiquement observée dans les tumeurs *BRCA1*. Ce dommage serait un évènement précoce de la tumorigénèse puisqu'il est fréquemment observé dans le tissu normal des patientes mutées pour *BRCA1*. De plus il a été montré que la perte d'expression des deux allèles de *BRCA1* pouvait être concentrée dans les cellules luminales et myoépithéliales d'une même structure, ce qui indiquerait une propagation de ce trait à partir des cellules progénitrices bipotentes, corroborant ainsi l'hypothèse de la cellule d'origine du cancer (Lakhani, Chaggar et al. 1999; Cavalli, Singh et al. 2004; Clarke, Sandle et al. 2006). La perte d'expression de la forme sauvage de *BRCA1* semble donc être un évènement précoce et nécessaire de la transformation tumorale *BRCA1*.

D'autre part, l'instabilité génétique des cellules *BRCA1^{+/−}* pourrait favoriser l'apparition de mutations oncogéniques ou de gènes suppresseurs de tumeurs

permettant la transformation tumorale. Parmi ces dernières, la mutation de *TP53* serait l'un des évènements les plus fréquents et précoce de la transformation, comme l'indique la grande proportion de tumeurs *BRCA1* mutées pour *TP53*. Il n'est cependant pas établi si ces mutations de gènes spécifiques peuvent survenir avant que les cellules aient perdu l'expression de la forme sauvage de *BRCA1*. En effet, il est possible que la présence d'encore une forme sauvage de *BRCA1* suffise à freiner la progression cellulaire ou à provoquer l'apoptose dans le cas d'une mutation sur un oncogène ou un gène suppresseur de tumeurs. Cependant, compte tenu du rôle primordial de *TP53* dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la conservation de l'intégrité du génome, il est également vraisemblable que la perte du deuxième allèle *BRCA1* ne puisse être associée à une survie cellulaire et à la tumorigenèse qu'en présence d'une mutation de *TP53*, qui empêche la cellule d'entrer en apoptose (Reedy, Hang et al. 2001).

Une étude très récente de l'équipe de C. Kuperwasser a établi par génotypage que les cellules mammaires *BRCA1*^{+/−} présentaient des profils d'expression génétique différents des cellules *BRCA1*^{+/+}, confirmant l'impact de l'hétérozygotie *BRCA1* sur la cellule (Proia, Keller et al. 2011). Les différences retrouvées concernent tout particulièrement les gènes impliqués dans la transcription, la liaison à l'ADN et le remodelage de la chromatine, correspondant à des fonctions connues de *BRCA1* et suggérant donc une altération de ces domaines de régulation dans les cellules *BRCA1*^{+/−}. Les gènes impliqués dans la différentiation lumineuse des cellules épithéliales de la glande mammaire sont également modifiés dans les cellules *BRCA1*^{+/−} avec notamment une réduction de l'expression des ARN *PR* et *ER beta*.

En effet, l'hétérozygotie de *BRCA1* semble perturber l'expression des récepteurs protéiques et notamment des *PR* dans le tissu normal de patientes mutées (Mote, Leary et al. 2004). Il est possible de penser que cette hétérozygotie rende les cellules plus sensibles à l'effet des hormones. Cependant, très peu d'études ont été réalisées sur le tissu normal hétérozygote alors que les cellules *BRCA1*^{+/−} sont sans doute déjà soumises à des dérégulations hormonales dont la compréhension semble capitale pour mieux caractériser et prévenir la transformation tumorale chez les femmes mutées. L'effet inhibiteur de *BRCA1* sur *ERα* et *PR* fournit une explication logique à la spécificité tissulaire des tumeurs *BRCA1*. Néanmoins, l'absence des récepteurs hormonaux dans ces

tumeurs constitue un paradoxe encore inexpliqué à ce jour. Deux modèles de développement sont possibles :

- Les tumeurs *BRCA1* seraient issues des cellules progénitrices négatives pour les récepteurs. Les effets de ER α et PR seraient alors transmis de façon paracrine à partir des cellules positives pour les récepteurs qui entourent les cellules progénitrices. Ces effets paracrines participeraient à la transformation en favorisant la prolifération et la survie des cellules progénitrices puis la croissance tumorale. Ces actions hormonales seraient potentiellement exacerbées en raison de l'hétérozygotie de *BRCA1* dans les cellules ER $^+$ et PR $^+$ entourant les cellules tumorales.
- Les tumeurs *BRCA1* seraient issues de cellules initialement positives pour les récepteurs hormonaux, et deviendraient négatives au cours de la transformation tumorale. La perte d'expression des récepteurs pourrait être liée à une dédifférenciation des cellules tumorales ainsi qu'à l'inhibition de la transcription des ARN *ER alpha* en conséquence de la perte d'expression de *BRCA1*. L'effet aggravant des hormones interviendrait donc principalement au début de la tumorigénèse et jusqu'à ce que les cellules perdent l'expression des récepteurs. Cependant un rôle paracrine des cellules ER $^+$ et PR $^+$ entourant la tumeur pourrait également entretenir la croissance tumorale après la perte des récepteurs dans les cellules de la tumeur.

D'autre part la capacité de ER α à induire la transcription des ARN *BRCA1* après un traitement par E2 pourrait conférer aux cellules ER $^+$ une protection supérieure contre les dommages de l'ADN comparativement aux cellules progénitrices luminales ER $^-$, plus prolifératives, qui seraient plus susceptibles d'accumuler des lésions de l'ADN.

En somme, les dérégulations qui apparaissent dans le tissu normal des patientes mutées semblent jouer un rôle conséquent dans le développement tumoral, mais qui reste encore mal caractérisé. Il paraît donc de la plus haute importance de mieux comprendre les phases de transformation et l'influence des hormones dans ce processus pour pouvoir appliquer des traitements préventifs efficaces chez les femmes *BRCA1 $^{+/-}$* .

Parmi les solutions préventives actuellement envisagées, l'administration d'anti-estrogènes, d'inhibiteurs d'aromatase ou de molécules antiprogestatives seules ou combinées avec un anti-estrogène seraient les plus prometteuses, au regard de l'implication évidente des hormones dans la tumorigénèse *BRCA1*. Des essais utilisant un

anti-aromatase ou un anti-estrogène sont d'ailleurs en cours, et un premier essai randomisé sur quelques patientes à montré que les patientes mutées traitées par le Tamoxifen, un anti-estrogène, après un premier cancer du sein, avaient un risque diminué de développer un cancer controlatéral (Gronwald, Tung et al. 2006). L'étude murine décrite précédemment et montrant une prévention de l'apparition des tumeurs mammaires chez les souris *brca1^{WAP11/Δ11}/TP53^{-/-}* traitées par la mifépristone, participe nettement à l'engouement développé autour du potentiel préventif des antiprogestatifs (Poole, Li et al. 2006). En conséquence, l'un des objectifs de mon travail a été d'une part de mieux caractériser les effets de l'estriadiol et de la progestérone dans le tissu mammaire normal de patientes mutées pour *BRCA1*, mais aussi d'approfondir le potentiel préventif d'un antiprogestatif dans ce contexte.

V. ANTIPROGESTATIFS ET POTENTIEL CLINIQUE

A. Développement et mécanismes d'action des antiprogestatifs

Les effets physiologiques de la progestérone sont nombreux et ciblent plusieurs tissus incluant l'utérus, les ovaires, et la glande mammaire. La progestérone est un acteur majeur de la grossesse grâce à ses actions dans l'implantation de l'ovocyte fécondé, dans sa maturation, mais aussi dans le développement de la glande mammaire pour permettre la lactation. Il n'est donc pas surprenant que les antiprogestatifs introduits en clinique aient initialement été utilisés dans le cadre de l'interruption de grossesse. La première molécule antagoniste utilisée comme traitement abortif fut la mifépristone (RU 486) (Herrmann, Wyss et al. 1982). Par la suite, d'autres molécules ont été développées avec des actions inhibitrices variables, allant de l'antagoniste pur (PA) aux modulateurs sélectifs du récepteur de la progestérone (SPRM). Ces derniers présentent une action mixte agoniste/antagoniste des PR et sont donc associés à un éventail d'effets. Il a d'ailleurs été établi que l'activité fonctionnelle de ces antiprogestatifs dépendait du tissu et du type cellulaire dans lesquels ils étaient étudiés. Une même molécule peut ainsi exercer une action agoniste sur les PR dans un tissu donné tandis qu'elle sera antagoniste dans un autre tissu (Smith and O'Malley 2004).

Comme décrit précédemment, les effets agoniste/antagoniste des ligands dépendent de plusieurs critères :

- le taux des récepteurs disponibles et le ratio des isoformes PR-A et PR-B,
- l'affinité du ligand pour le récepteur,
- la conformation ligand-dépendante du récepteur qui va influencer le recrutement des co-régulateurs,
- la disponibilité de ces co-régulateurs et notamment le ratio des co-activateurs et des co-répresseurs.

En effet, à l'inverse des molécules agonistes, les ligands antagonistes vont empêcher le positionnement actif de l'hélice H12 du LBD du récepteur, ce qui va entraver le recrutement des co-activateurs mais favoriser celui de co-répresseurs. Parmi les PA et les SPRM, la nature structurale du ligand va influencer son affinité et la stabilité des liaisons créées avec le récepteur, ce qui va être à l'origine d'un effet antagoniste plus ou moins marqué. Une étude de B. Wagner a montré que la conformation de PR lié à un SPRM différait à la fois de celle induite par un agoniste ainsi que par un PA, mais qu'en revanche l'affinité du complexe formé pour l'ADN était identique pour les trois types de ligand (Wagner, Pollio et al. 1996). De façon plus précise, un autre travail a montré que la conformation du LBD induite par un SPRM, l'asoprisnil, était du même type que celle induite par le RU 486 mais présentait cependant des différences d'affinité pour les co-régulateurs : cette équipe montre que le PR lié au RU 486 n'est favorable qu'au recrutement de co-répresseurs tandis que la fixation de l'asoprisnil sur le LBD du PR permet également des interactions avec des co-activateurs (Madauss, Grygielko et al. 2007). D'après cette équipe, le recrutement des co-régulateurs serait influencé par la structure moléculaire du ligand lui-même capable d'interagir directement avec les co-régulateurs, ainsi que par une plasticité conformationnelle subtile des LBD des récepteurs nucléaires liés à leur ligand. Le ratio et la disponibilité des co-activateurs et co-répresseurs participent donc largement à l'action transcriptionnelle du récepteur lié à son ligand (Smith and O'Malley 2004; Chwalisz, Perez et al. 2005). Par exemple, en absence de co-répresseurs, le RU 486 initialement considéré comme un antagoniste pur, exerce des effets agoniste des PR (Wagner, Norris et al. 1998). Le terme SPRM va donc être utilisé dans la suite de ce chapitre pour désigner l'ensemble des ligands des PR. Parmi ces derniers, nous nous sommes intéressés tout particulièrement à l'ulipristal

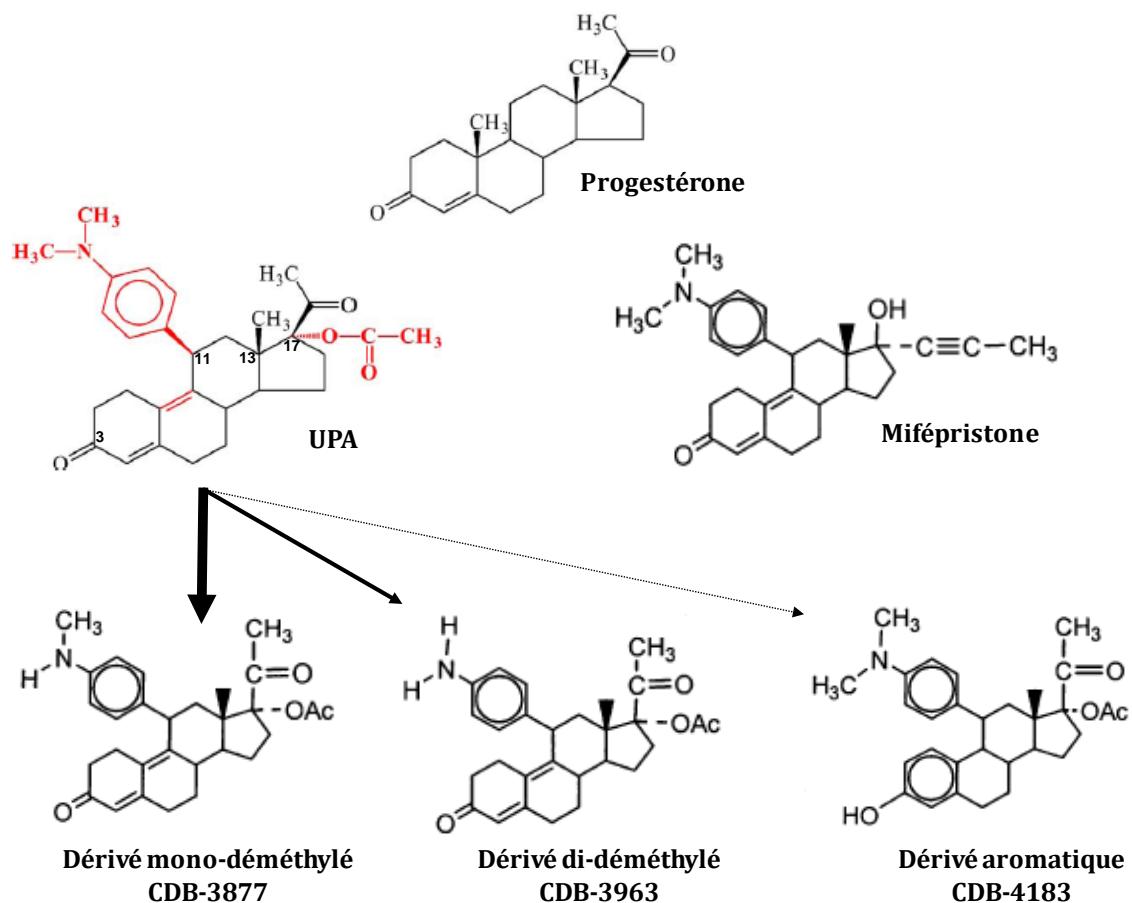


Figure 32 : Structures de la progestérone, de la mifépristone, de l'ulipristal acétate et de ses métabolites. Les structures de l'UPA qui diffèrent de celles de la progestérone sont indiquées en rouge. Les numéros des carbones 3, 11, 13 et 17 porteurs des principales fonctions sont signalés sur la structure de l'UPA. Trois métabolites possibles de l'UPA sont représentés et la proportion de chaque forme est schématisée par le type de flèche qui lui est associé : le dérivé mono-déméthylé est la forme principale la plus retrouvée, suivie du dérivé di-déméthylé. L'UPA est très faiblement métabolisé dans sa forme aromatique.

acétate (UPA), en raison de ses effets anti-glucocorticoïdes limités comparativement à d'autres SPRM comme le RU 486.

B. Ulipristal Acétate

1) Structure et métabolisme de l'ulipristal acétate

Les SPRM sont généralement des composés stéroïdiens dérivés de la 19-nortestostérone comme le RU 486, ou de la 19-norprogesterone comme l'UPA. L'activité antagoniste des PR de ces molécules leur est conférée par la présence d'un radical dimethylaminophenyl en position C11. Ces dérivés stéroïdiens ont cependant conservé certaines structures présentes dans la progesterone comme la fonction cétone en C3 et le radical méthyl en C13, ainsi que des fonctions substituées en C17 qui participent à augmenter leur demi-vie et leur activité biologique. La fonction 11 β -aryl substituée des SPRM est responsable de leur affinité pour les GR (**Figure 32**).

L'UPA, initialement connu sous le nom de VA 2914, CDB 2914, HRP 2000 ou RTI 3021-012 a été développé dans le cadre de la Contraceptive Development Branch du National Institute of Health aux Etats-Unis. Le métabolisme de l'UPA est principalement catalysé par la CYP34A et dans une moindre mesure par la CYP1A2 de la famille des cytochromes P450. Ce métabolisme donne naissance à un composé mono-déméthylé majoritaire et pharmacologiquement actif (CDB-3877), ainsi qu'à une forme plus minoritaire di-déméthylée sans action clinique notable (CDB-3963) (**Figure 32**). Il existe d'autres métabolites de l'UPA à l'exemple de son dérivé aromatique, mais ils sont très faiblement représentés par rapport au métabolite mono-déméthylé (Gainer and Ulmann 2003; HRA-pharma 2010).

2) Actions de l'UPA sur les récepteurs nucléaires

Les différences structurales existantes entre le RU 486 et l'UPA sont responsables de leur variation d'affinité pour les récepteurs nucléaires ainsi que de la différence des effets transcriptionnels qu'ils exercent sur ces récepteurs. Cependant, le niveau d'affinité des SPRM pour les récepteurs ne reflète pas la nature (agoniste ou antagoniste) ni la puissance de leurs actions sur ces récepteurs. L'étude des effets transcriptionnels des récepteurs permet donc de caractériser les activités propres à chaque SPRM. Plusieurs tests d'activité existent pour un même récepteur et selon les différents récepteurs

Récepteur	Stéroïde de référence	RU 486		UPA	
		EC ₅₀ (nM)	RBA (%) ^a	EC ₅₀ (nM)	RBA (%)
PR de l'utérus de lapin	Progesterone, EC ₅₀ = 11.2 ± 0.4 nM (n = 32); RBA = 100% ^b	11.5 ± 1.1 ^b	98	13.5 ± 0.7	83
PR-B humain recombinant	Progesterone, EC ₅₀ = 8.7 ± 0.7 nM (n = 14); RBA = 100%	7.8 ± 0.7	103	6.8 ± 0.2	109
PR-A humain recombinant	Progesterone, EC ₅₀ = 9.3 ± 0.7 nM (n = 12); RBA = 100%	9.6 ± 2.1	105	7.8 ± 0.8	113
GR de thymus du lapin	Dexamethasone, EC ₅₀ = 7.9 ± 0.6 nM (n = 26); RBA = 100%	10.0 ± 1.1	80	18.2 ± 2.0	44
LBD du AR recombinant de rat	R1881, EC ₅₀ = 7.2 ± 0.2 nM (n = 12); RBA = 100%	45.3 ± 8.2	13	65.5 ± 10.4	8

Tableau 1 : Affinité du RU 486 et de l'UPA pour les récepteurs nucléaires PR, GR et AR. ^a RBA, affinité de liaison relative (%). RBA = EC₅₀ du stéroïde de référence/EC₅₀ du composé testé x100. ^b Valeurs représentant la moyenne ± SEM de 3 à 32 expériences indépendantes (adapté de Attardi, Burgenson et al. 2002).

étudiés. Le RU 486 est l'antiprogestatif le mieux caractérisé ; il présente à la fois un effet antagoniste pur des PR dans presque toutes les conditions mais également un effet inhibiteur puissant des GR, ce qui a contribué à en faire un antagoniste de référence pour ces deux types de récepteurs. Les effets de l'UPA ont donc été comparés à ceux du RU dans la majorité des analyses pharmacologiques réalisées pour cette molécule.

L'UPA présente une affinité élevée pour les PR et les GR, une affinité faible pour les récepteurs des androgènes (AR) et nulle pour les ER (**Tableau 1**) (Attardi, Burgenson et al. 2002; Attardi, Burgenson et al. 2004). Les affinités du CDB-3877, son métabolite actif, sont similaires à celles de l'UPA (Attardi, Burgenson et al. 2004).

L'UPA montre une activité antagoniste puissante des PR dans tous les modèles *in vivo* et *in vitro* utilisés et cette activité est superposable à celle du RU 486 (Wagner, Pollio et al. 1996; Wagner, Pollio et al. 1999; Hild, Reel et al. 2000; Attardi, Burgenson et al. 2002; Attardi, Burgenson et al. 2004). En revanche l'UPA ne présente pas d'effet agoniste, excepté dans une étude *in vitro* utilisant la transfection des isoformes PR-A et PR-B dans la lignée tumorale MDA-MB-231 dépourvue de PR endogènes. Dans ce modèle, l'UPA est capable d'induire certains gènes cibles de la progestérone via PR-A et PR-B (Leo and Lin 2008).

Concernant les GR, l'UPA présente une activité anti-glucocorticoïde nettement plus réduite que le RU 486 en culture *in vitro*. Ces différences d'actions ont été observées dans les cellules HeLa riches en GR, sur la transcription du gène rapporteur MMTV-Luciférase comprenant des PRE et des GRE dans son promoteur (Wagner, Pollio et al. 1999). Une étude présente des résultats similaires mais cette fois en utilisant des cellules HepG2 transfectées par un PRE2-tk-Luciférase (Attardi, Burgenson et al. 2004). Dans une étude *in vivo* sur la mesure de l'involution de thymus de rats adrénalectomisés, l'UPA présente également une action anti-glucocorticoïde réduite par rapport au RU 486 (Hild, Reel et al. 2000). Aucun effet agoniste des GR n'a été observé parmi ces études.

Bien que l'affinité de l'UPA pour ER α soit nulle, son dérivé aromatique est capable de se lier sur les ER avec une faible affinité, et d'activer la transcription d'un gène rapporteur 3XRE-Luciférase comportant des ERE dans les T-47D et les MCF-7, mais à un niveau beaucoup plus faible que l'estradiol (Attardi, Burgenson et al. 2004).

Les effets antiprogestatifs puissants associés à une activité anti-glucocorticoïde limité de l'UPA ont donc argumenté en faveur de son développement dans plusieurs voies thérapeutiques incluant des utilisations sur le long terme.

C. Applications thérapeutiques actuelles et potentielles de l'ulipristal acétate

1) Contraception

Les activités antiprogestatives de l'UPA en ont fait un candidat de choix dans le domaine de la contraception d'urgence. Son administration dans de nombreux modèles animaux ainsi que chez la femme a confirmé son efficacité à empêcher l'ovulation ou bien la nidation de l'ovocyte fécondé en inhibant les modifications de la muqueuse utérine liée à la progestérone (Reel, Hild-Petito et al. 1998; Hild, Reel et al. 2000; Chabbert-Buffet, Pintiaux-Kairis et al. 2007; Brache, Cochon et al. 2010; Brenner, Slayden et al. 2010; Stratton, Levens et al. 2010). Ces études ont donc conduit au développement de l'UPA comme contraceptif d'urgence et mené à sa récente commercialisation sous le nom de EllaOne® par le laboratoire HRA pharma.

Les effets anti-glucocorticoïdes limités de l'UPA ont aussi incité à développer cette molécule comme contraceptif régulier. Une étude préclinique est en cours pour son potentiel en tant que dispositif intra-utérin et un essai clinique de phase II se poursuit également dans le but d'utiliser cette molécule sous forme d'anneau vaginal (http://www.popcouncil.org/pdfs/factsheets/RH_ContraceptiveDev.pdf).

2) Fibromes de l'utérus

Une application très prometteuse de l'UPA concerne le traitement des fibromes de l'utérus pour lequel l'UPA est actuellement en phase III d'essai clinique et a montré des résultats convaincants. La réduction du volume des fibromes utérins et des symptômes associés est obtenue grâce à une administration quotidienne d'UPA durant trois ou six mois chez la femme en préopératoire (Levens, Potlog-Nahari et al. 2008; Nieman, Blocker et al. 2011). Les fibromes de l'utérus touchent 40% des femmes entre 35 et 55 ans, ce qui laisse entrevoir la possibilité d'une utilisation fréquente de l'UPA en traitement chronique.

3) Cancers : traitement et prévention

Enfin, une application a été suggérée dans le cadre de la prévention ou du traitement du cancer du sein hormono-dépendant. En effet il a été montré que des antiprogestatifs pouvaient avoir des effets inhibiteurs de la croissance tumorale, mais ces effets n'ont pas été évalués avec l'UPA (Spitz, Croxatto et al. 1996; Cadepond, Ulmann et al. 1997; Klijn, Setyono-Han et al. 2000). L'intérêt de traiter les tumeurs du sein par un antiprogestatif a été mis de côté en faveur de l'utilisation des anti-estrogènes mais la variabilité des profils tumoraux et des réponses aux thérapeutiques suggère que les antiprogestatifs pourraient être utiles pour inhiber la croissance de types tumoraux spécifiques. De plus une administration préventive d'un SPRM tel que l'UPA pourrait réduire le risque de développer un cancer du sein, notamment chez les patientes mutées pour *BRCA1* comme cela a été proposé précédemment.

L'ensemble de ces applications promet donc une utilisation prochaine de cette molécule dans le cadre d'une administration au long cours.

OBJECTIFS DU PROJET

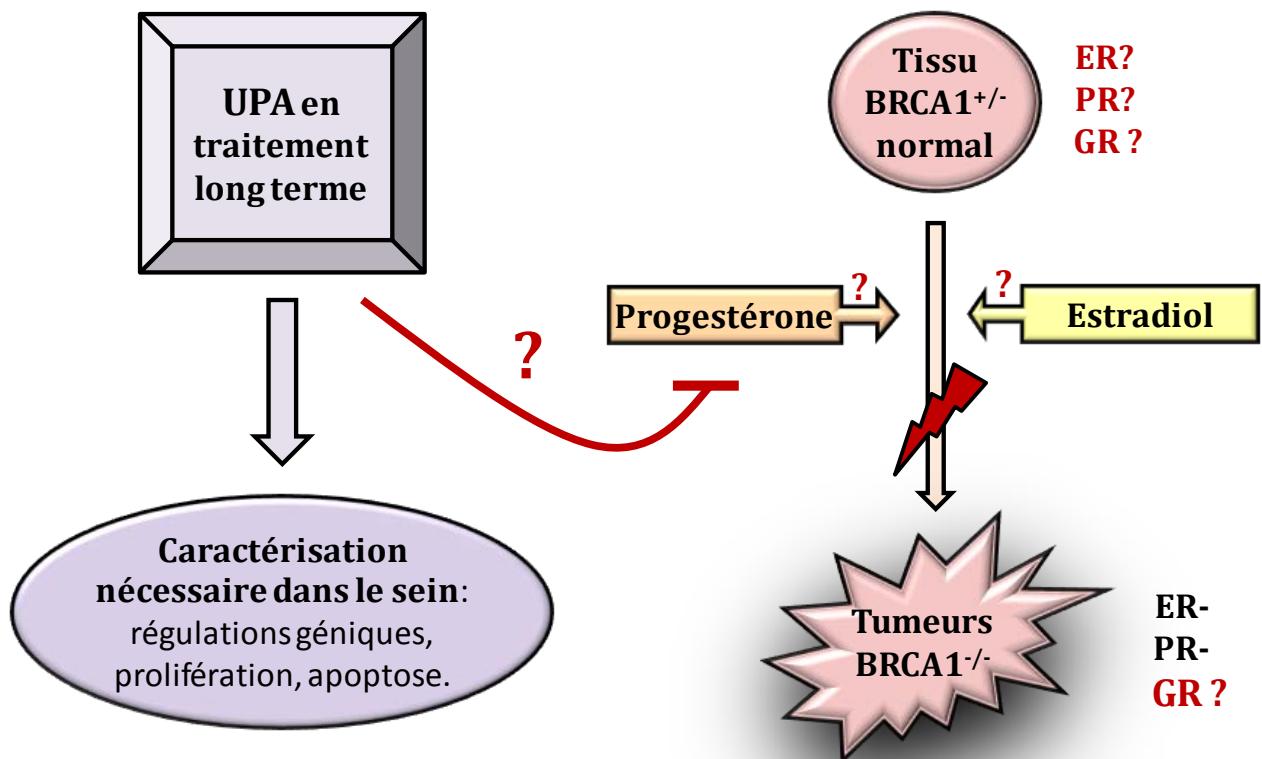


Figure 33 : Illustration des problématiques de l'étude. Les effets de l'UPA doivent être caractérisés dans le sein afin d'observer si son administration long terme chez la femme pourrait perturber les régulations du tissu mammaire de façon délétère ou non. L'UPA pourrait également être appliqué comme traitement préventif de la tumorigenèse du sein des femmes mutées pour *BRCA1*, ce qui nécessite donc de préciser l'influence des hormones ovaraines et l'efficacité de l'UPA dans ce cadre là. L'étude des influences hormonales sur le tissu muté normal et tumoral doit être approfondie par la caractérisation du statut des récepteurs aux glucocorticoïdes, qui n'a jamais été observée dans le sein des femmes mutées.

OBJECTIFS DU PROJET

Le développement de la glande mammaire au cours de la vie est de mieux en mieux compris et il est maintenant admis que l'homéostasie de ce tissu est principalement régie par les hormones sexuelles, l'estradiol et la progestérone, mais également par d'autres facteurs comme les glucocorticoïdes. Cependant de nombreuses zones d'ombre persistent encore dans la précision des mécanismes associés à ces régulations. Il en va de même concernant la compréhension des étapes de transformation tumorale du sein qui représente l'un des grands challenges actuels et constitue la clé de l'élaboration de thérapeutiques adaptées et efficaces pour traiter cette maladie. Il est de plus en plus clair que des dérégulations hormonales préexistantes dans le tissu normal mammaire vont contribuer ou accélérer la transformation tumorale, à l'exemple des tumeurs survenant chez les patientes mutées pour *BRCA1*. Cependant la nature et l'impact de ces dérégulations sont encore mal comprises et nécessitent d'être expliqués plus précisément afin de déterminer des thérapeutiques préventives agissant sur la signalisation hormonale dans le cadre du cancer du sein. Pour les patientes porteuses d'une mutation *BRCA1*, les seules solutions préventives possibles sont de subir une ablation des ovaires qui permet de réduire de moitié le risque de cancer du sein, ainsi qu'une mastectomie prophylactique, qui annule presque totalement ce risque. Mais ces méthodes sont mutilantes et il est donc urgent de caractériser des techniques de prévention efficaces et moins traumatisantes pour limiter le risque de développer un cancer du sein chez ces femmes.

Mes travaux de thèse ont donc porté sur la caractérisation des étapes précoce de la tumorigénèse mammaire liée à la mutation du gène *BRCA1*, et notamment sur les réponses hormonales du tissu mammaire muté avant et après la perte d'expression de *BRCA1*. Les données concernant le rôle aggravant de la progestérone dans les étapes de transformation tumorale nous ont également conduits à examiner l'effet préventif potentiel d'un antiprogestatif comme l'UPA sur le tissu mammaire muté. Mais la possibilité d'une telle application pour cette molécule ainsi que celle d'une prochaine utilisation en traitement long terme dans d'autres domaines gynécologiques, nécessitaient avant tout de bien caractériser les effets de l'UPA dans le tissu mammaire normal de la femme. Les problématiques de mon projet de thèse sont illustrées en **Figure 33.**

I. Utilisation au long cours de l'UPA : quels effets sur un tissu hormono-dépendant tel que le sein ?

L'UPA devrait être prochainement administré en traitement long terme pour des applications telles que le traitement des fibromes de l'utérus, ou bien la contraception. Son utilisation est également suggérée dans le traitement des tumeurs mammaires mais aussi pour prévenir la tumorigénèse des femmes porteuses de mutation *BRCA1*. Des études cliniques ont permis d'observer certains effets du traitement par l'UPA allant jusqu'à six mois d'administration quotidienne de doses comprises entre 2,5 à 20 mg par jour. Ses actions ont été caractérisées au niveau de l'endomètre, des ovaires et de l'axe gonatropique, ainsi que des symptômes liés à la présence des fibromes. L'absence d'effets toxiques hépatiques de l'UPA a également été observée (Chabbert-Buffet, Pintiaux-Kairis et al. 2007; Levens, Potlog-Nahari et al. 2008; Nieman, Blocker et al. 2011). Cependant, des conséquences physiologiques liées à une administration chronique d'une molécule antiprogestative comme l'UPA peuvent être attendues au niveau de tous les tissus hormono-dépendants de l'organisme, à l'exemple du sein. Des actions prolifératives ou apoptotiques exacerbées conférées par cette molécule seraient en effet délétères pour le tissu mammaire et pourraient être responsables de l'apparition de lésions voir même de tumeurs. Il semble donc primordial de bien évaluer les effets de l'UPA dans le tissu normal du sein de la femme en ce qui concerne l'intensité de ses actions antiprogestatives et anti-glucocorticoïdes ainsi que les processus biologiques mis en jeu dans la cellule. En effet, si certains effets de l'UPA ont déjà été partiellement caractérisés dans des lignées tumorales mammaires, son action dans le sein normal n'a absolument pas été observée jusqu'ici et nécessitent donc d'être étudiés avant de pouvoir envisager l'utilisation de cet antiprogestatif en toute sécurité.

Afin de caractériser l'action de l'UPA dans le sein, les effets PR- et GR-dépendants de ce SPRM ont tout d'abord été étudiés *in vitro* dans un modèle de primo-cultures de cellules épithéliales mammaires humaines normales (HBE). Ces effets ont également été examinés dans deux lignées tumorales de sein hormono-dépendantes, les T-47D et les MCF-7, afin d'évaluer la spécificité d'action de l'UPA en fonction du contexte cellulaire. Enfin, l'utilisation d'un modèle original *in vivo* de xénogreffes de tissu de sein humain chez la souris nous a permis de préciser les actions de l'UPA sur l'activité proliférative de

l'épithélium mammaire dans un environnement hormonal physiologique. L'ensemble des méthodes utilisés et des résultats obtenus sont décrits et discutés dans la première partie et font également l'objet d'un premier article qui sera soumis très prochainement.

II. Rôle des hormones stéroïdiennes dans le tissu mammaire muté pour *BRCA1* et potentiel préventif de l'ulipristal acétate

Dans la seconde partie de mon projet de thèse, j'ai cherché à caractériser les régulations hormonales présentes dans le tissu mammaire normal hétérozygote pour *BRCA1* en incluant dans mon étude les hormones ovariennes (estradiol et progestérone) ainsi que les glucocorticoïdes. En effet, la compréhension des dérégulations hormonales préexistantes dans ce tissu est primordiale pour pouvoir mettre en place et caractériser les bénéfices d'un traitement préventif tel que l'administration d'un SPRM comme l'UPA. D'autre part, l'implication de la voie de signalisation des glucocorticoïdes dans la tumorigénèse liée à la mutation de *BRCA1* a également été examinée afin de mieux caractériser les facteurs mis en jeu dans cette transformation tumorale, ainsi que leurs implications potentielles dans le développement des tumeurs *BRCA1*.

A. Caractérisation de la réceptivité hormonale du tissu mammaire normal muté pour *BRCA1* et positionnement de l'UPA

L'évaluation des dérégulations hormonales potentiellement préexistantes dans le tissu mammaire normal hétérozygote pour *BRCA1* manque clairement à l'établissement du rôle des hormones ovariennes dans la tumorigénèse liée à la mutation de ce gène. L'établissement d'un modèle *in vivo* de xénogreffes de tissu mammaire humain chez les souris immunodéficientes, nous a permis de rechercher des différences de comportement entre le tissu mammaire normal muté et non muté pour *BRCA1*, en réponse aux traitements par les hormones ovariennes. Dans l'hypothèse d'une action proliférative exacerbée de la progestérone dans le tissu mammaire muté pour *BRCA1*, nous avons également voulu observer quel serait l'effet de l'administration conjointe d'un antiprogestatif comme l'UPA. L'inhibition par l'UPA des probables effets

prolifératifs de la progestérone dans le tissu muté pourrait en faire un traitement préventif de choix chez les patientes porteuses de mutations *BRCA1*.

B. Influence des glucocorticoïdes dans la tumorigénèse *BRCA1*

Notre équipe a pu montrer dans un travail auquel j'ai contribué que la dexaméthasone ainsi qu'un progestatif à action glucocorticoïde, l'acétate de médroxyprogesterone, exerçaient un effet mitogène et anti-apoptotique dans les HBE (Courtin, Communal et al. 2011). De plus, il est connu par des travaux antérieurs que les glucocorticoïdes ont un effet antiprolifératif et anti-apoptotique dans la plupart des lignées de cancer du sein (Vilasco, Communal et al. 2011). L'ensemble de ces données, ainsi que les interactions connues entre *BRCA1* et les récepteurs nucléaires ER, PR et AR, nous ont donc conduits à rechercher si l'expression des GR pouvait être altérée dans le tissu normal hétérozygote *BRCA1*, et si la voie des glucocorticoïdes pouvait être impliquée dans le déclenchement et la progression des cancers liés à la mutation de ce gène. Comme décrit en introduction, il existe peu de données sur l'expression du GR dans le tissu normal et les données sont contradictoires dans le tissu tumoral, en particulier dans les cancers triple négatifs, caractéristiques des femmes porteuses de mutation *BRCA1* (Vilasco, Communal et al. 2011). Par ailleurs, aucune donnée n'est disponible sur l'expression des formes phosphorylées du GR, dans le tissu normal et tumoral, et notamment de sa forme phosphorylée en Sérine 211 (P-S211GR). Il semble pourtant intéressant de s'intéresser à cette forme puisqu'il s'agit de la forme active de GR, qui permet la régulation de la transcription par les glucocorticoïdes. Nous avons donc examiné l'expression du GR et du P-S211GR dans le tissu mammaire normal muté pour *BRCA1* comparé au tissu normal non muté de plusieurs femmes. L'expression de GR et P-S211GR a également été évaluée dans des tumeurs triple négatives de patientes mutées et non mutées.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

Ce travail s'est constitué d'une partie *in vitro* comprenant trois modèles cellulaires de sein humain, ainsi que d'une partie *in vivo* utilisant une technique originale de greffes de glande mammaire humaine chez la souris NMRI^{nu/nu} immunodéficiente.

I. ETUDE *IN VITRO*

A. Modèles cellulaires

Les modèles *in vitro* de sein humain utilisés sont des cultures primaires de cellules épithéliales mammaires humaines, ainsi que deux lignées issues de cancers du sein humain, les T-47D et les MCF-7.

1) Cellules tumorales de sein

Les lignées épithéliales tumorales humaines T-47D et MCF-7 proviennent d'effusions pleurales d'un carcinome canalaire et d'un adénocarcinome mammaire respectivement. Ces lignées sont cultivées en absence d'antibiotiques dans les milieux RPMI (T-47D) et DMEM (MCF-7) contenant 10% de SVF et 2 mM de glutamine. Les cellules sont incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂.

2) Culture primaires de cellules épithéliales de sein, les HBE

a. Patientes

Durant ma thèse j'ai eu accès à du tissu mammaire normal de femmes non mutées ayant recours à des réductions mammaires de chirurgie plastique et de femmes mutées pour le gène *BRCA1* subissant une mastectomie prophylactique. L'accès au tissu mammaire des femmes non mutées a été mis en place par notre laboratoire il y a plusieurs années, avec la collaboration du Dr Chaouat, chirurgien clinicien des hôpitaux de Paris. L'accès au tissu mammaire des femmes mutées *BRCA1* a été établi il y a quatre ans dans le cadre du projet BRACAPS financé par l'INCa (Institut National du Cancer), en collaboration avec l'équipe de recherche CNRS UMR 8200 du Pr J. Feunteun (Institut Gustave Roussy, Villejuif) ainsi qu'avec plusieurs cliniciens responsables de patientes *BRCA1* en France ; Dr S. Delaloge (Institut Gustave Roussy, Villejuif), Pr P. Pujol (CHRU, Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier), Dr M.P. Chauvet (Centre Oscar Lambret,

Lille), et Dr M. Perrault de Jotemps (Clinique Hartmann, Neuilly sur Seine). A l'aide de ces collaborations, des cultures primaires de cellules ont été réalisées à partir de la glande mammaire normale (non tumorale) de 34 patientes non mutées âgées de 17 à 50 ans, ainsi que de 24 patientes mutées pour *BRCA1* âgées de 26 à 57 ans. Ces femmes ont toutes signé un consentement éclairé et ce projet a été validé par le Comité de Protection des Personnes, Ile de France V (projet de recherche biomédical n° 11826). Les patientes non mutées sélectionnées pour notre étude ne présentaient aucun antécédent de pathologies mammaires et l'absence de lésions a systématiquement été vérifiée par mammographie avant l'opération ainsi que par des analyses immunohistologiques des tissus prélevés. Lorsque les patientes mutées pour *BRCA1* présentaient un antécédent de cancer du sein, seul le sein opposé a été prélevé.

b. Culture des HBE

Les mises en culture de la glande mammaire sont réalisées à l'aide de plusieurs étapes de digestion enzymatique, de centrifugation et de filtration des cellules. Ce modèle de culture a été bien décrit dans plusieurs publications de notre équipe (Gompel, Malet et al. 1986; Malet, Gompel et al. 1988; Malet, Gompel et al. 1991; Courtin, Communal et al. 2011). Les fragments de glande mammaire sont séparés du tissu adipeux et recueillis dans des conditions stériles au bloc opératoire dans une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) (PAA, Les Mureaux, France). Le tissu est ensuite découpé en fins fragments avant d'être digéré sous agitation dans du milieu HAM-F10 (PAA) à 5% de sérum de veau foetal (SVF) (PAA) à l'aide de 0,15% de collagénase (Roche, Meylan, France) pendant 3h à 37°C, puis de l'addition de 0,05% de hyaluronidase pendant 30 minutes supplémentaires (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Le lysat est ensuite centrifugé pour recueillir le culot cellulaire qui est alors passé sur un filtre en nylon de 60 µm. Les fibroblastes, sont des petites cellules bien dissociées qui passent à travers les mailles du filtre. En revanche, les cellules épithéliales sont sous forme d'îlots cellulaires non dissociés et sont donc retenues par le filtre. Ces cellules sont ainsi récupérées sur le filtre et ensemencées dans du milieu HAM-F10 contenant 2 mM de glutamine, 1% de pénicilline/streptomycine (PAA), 5 ng/ml d'hydrocortisone, 6,5 ng/ml de Triiodothyronine, 10ng/ml de choleratoxine, 5 mg/ml de transferrine, 0,016 U/ml d'insuline, 10 ng/ml d'EGF (Sigma) et 5% de sérum humain (Etablissement Français du Sang, Rungis, France). Lorsque le développement des

cellules HBE atteint une confluence de 80%, les cellules sont décollées à l'aide de trypsine ou d'acutase (PAA) pour être comptées et réensemencées afin de procéder aux diverses expériences. Le maintien des caractéristiques épithéliales de ces cellules en culture a été validé précédemment, notamment par le marquage de la CK18 (Courtin, Communal et al. 2011).

3) Traitement des cellules par les stéroïdes

Le 17β -estradiol (E2), la progestérone (P), la dexaméthasone (DEX) et la mifépristone (RU) proviennent de chez Sigma. L'ulipristal acétate (UPA) et son métabolite mono-déméthylé, le CDB-3877 (CDB) ont été fournis par le laboratoire HRA pharma durant ce projet.

Après ensemencement, les cellules sont cultivées pendant 24h en milieu dépourvu de sérum et de rouge de phénol. Les cellules sont ensuite traitées par les stéroïdes E2 (10 nM), P (100 nM), DEX (100 nM), UPA (1 nM à 1 μ M), CDB (100 nM) et RU (1 nM à 1 μ M), dans leur milieu de référence dépourvu de rouge de phénol et contenant 5% de sérum dé-stéroïdé en solution charbon-dextran (SH-DCC pour les HBE et SVF-DCC pour les lignées). Les conditions contrôles sont traitées par de l'éthanol (EtOH) ou par l'E2 seul. Les solutions de stéroïdes réalisées dans l'EtOH sont ajoutées aux milieux de façon à obtenir une dilution finale inférieure à 3/1000 d'EtOH. Les concentrations de P correspondent aux concentrations sériques de la phase lutéale chez la femme soit 30 à 150 nM, et la DEX a été ajusté à la concentration de P. L'E2 est ajouté au milieu de traitement dans certaines expériences en raison de son implication dans la transcription des PR (Malet, Gompel et al. 1991). Les temps de traitement des cellules ont été ajustés aux expériences ainsi qu'aux types cellulaires, à savoir que le temps de doublement des HBE est plus long que celui des lignées tumorales (Cavailles, Gompel et al. 2002).

B. Techniques d'étude

1) Transfection des cellules

Les différents plasmides utilisés sont transfectés à l'aide de Lipofectamine dans les lignées tumorales et de Lipofectamine LTX dans les HBE selon les recommandations

du fournisseur (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Nos expériences nous ont conduits à utiliser différents types de plasmides :

- Le gène rapporteur MMTV-Luc est constitué du promoteur MMTV-LTR (Mouse Mammary Tumor Virus Long Terminal Repeat) en amont du gène de la luciférase firefly. Cette construction est insérée dans le vecteur pFC31. Ce promoteur contient quatre séquences GRE/PRE : un palindrome complet localisé entre la position -190 et -160 du site d'initiation de transcription de la luciférase et trois hémi-palindromes situés entre les bases -128 et -78 (Gouilleux, Sola et al. 1991). Le gène rapporteur GRE-Luc est constitué de six copies GRE/PRE en amont du gène de la luciférase firefly. Cette construction est insérée dans le vecteur pBL. Lorsque les récepteurs nucléaires activés par leurs ligands interagissent avec les GRE/PRE, le gène de la luciférase va s'exprimer et l'activité de l'enzyme résultante va être détectée dans les cellules. La transfection de ces gènes rapporteurs est associée à celle du plasmide pRSV-β-Gal (Rous sarcoma virus promoter en amont du gène de la beta-galactosidase) dans le but de normaliser l'induction de la luciférase sur l'efficacité de transfection indiquée par l'expression de la β-Gal. La luciférase est détectée grâce au Luciferase Assay System (Promega, Charbonnières-les-bains, France) et la β-Gal est détectée grâce au kit Galacto Star (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).
- Les plasmides de surexpression des isoformes humaines de PR-A (hPR-A) ou PR-B (hPR-B) clonées dans le vecteur d'expression POP3 ont été ajoutés au MMTV-Luc dans les HBE dans certaines expériences, et transfectés par la même technique.

Les cellules sont traitées 24h après la transfection de ces plasmides, pendant 24h pour les lignées tumorales et 48h pour les HBE.

2) PCR quantitative en temps réel

Les extractions des ARN totaux sont réalisées à l'aide du réactif Trizol (Invitrogen). Les réactions de transcription inverse sont réalisées à partir de 2 µg d'ARN pendant 1h à 37°C. Deux microlitres de la dilution de RT au 1/10 sont utilisés pour la PCR quantitative (Q-PCR) dont le milieu de réaction contient 300 nM de primers spécifiques ainsi que le mix Brillant SYBR GREEN QPCR master mix (Fermentas, Saint-Rémy-lès-Chevreuse, France). Les Q-PCR sont réalisées dans le Mx3000P (Agilent Technologies, Massy, France) programmé pour 1 cycle à 95°C pendant 10 min et 40

		Dilutions en fonction de la technique		
Anticorps	fournisseur	WB	ICC	IHC
PR Total 1	Novocastra NCL-L-PGR- 312	1/2000 T-47D 1/500 MCF-7 1/100 HBE	1/100	/
PR Total 2	Biogenex, MU-328-UC	/	/	1/80
ER	Novocastra NCL-L-ER- 6F11	1/500 T-47D 1/2000 MCF-7 1/100 HBE	1/50	1/300
PR-B	Novocastra NCL-PGR-B	/	/	1/250
GR	Santa Cruz, H300, 8992	1/2000	/	1/75
P-S211GR	Cell signaling # 4161	/	/	1/100
Ki67	Novocastra, NCL-L-Ki67- MM1	/	/	1/100

Tableau 2 : Anticorps utilisés et dilutions associées en fonction de la technique et des cellules. WB : Western Blot ; ICC : Immunocytochimie ; IHC : Immunohistochimie. Trois anticorps PR ont été utilisés : deux anticorps PR total, l'un pour le WB et l'autre pour l'IHC, et un anticorps spécifique de l'isoforme PR-P en IHC.

cycles à 95°C pendant 30 sec. Les séquences de primers des gènes étudiés sont : *36B4*, upper, 5'-gattggctacccaactgttg-3'; lower, 5'-caggggcagcagccacaaa-3'; *FASN*, upper, 5'-tacatcgactgcatcaggca-3'; lower, 5'-gatactttcccgctgcatac-3'; *RANKL*, upper, 5'-ggctgggccaggttgtct-3' ; lower 5'-gcagtgagtgccatttctgtat-3'; *ALPL*, upper, 5'-tcactctccgagatggtgggtgg-3'; lower, 5'-ttccttcatggtgccgtgg-3'; cyclin A, upper, 5'-gcagacggcgctccaagagg-3', lower 5'-ctgctgctgcgcgtaccc-3'; *BCL2*, upper, 5'-ggacggggtaactggggga-3', lower 5'-agttccacaaaggcatccca-3', *IEX-1*, upper, 5'-cggtcctgagatcttcacct-3'; lower, 5'-accctttcagccatcagga-3'; *GOS8*, upper, 5'-ttcctctactcctggaaagc-3', lower, 5'-agtcttcacaggccagccag-3'. L'expression de chaque gène a été normalisée par l'expression du gène de ménage *36B4*.

3) Western blot

Les cellules sont lysées en tampon RIPA (50 mM Tris-HCl (pH8), 150 mM NaCl, 0.2% azide de sodium, 0.1% SDS, 0.5% acide déoxycholate, 1% NP40, et un cocktail d'inhibiteurs de protéases fourni par Sigma). Les protéines sont déposées sur un gel dénaturant de 8 à 12% de polyacrylamide puis séparées par électrophorèse. Après transfert des protéines sur une membrane de Polyfluorure de vinylidène (PVDF), les sites antigéniques sont saturées dans du tampon PBS-T (PBS et 0,05% de tween) contenant 5% de lait écrémé. Les membranes sont ensuite incubées 2h à température ambiante (RT) avec les anticorps primaires (**Tableau 2**). Puis, les membranes sont rincées au PBS-T et incubées 1h avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (1/2000). Les signaux protéiques sont détectés par chimioluminescence à l'aide du kit ECL ou ECL Plus (Amersham).

4) Immunocytochimie par technique de cytospin

Les cellules HBE en culture sont décollées par la trypsine, rincées et comptées de façon à obtenir une suspension de 75000 cellules/ml dans du PBS. Cette solution est centrifugée 8 minutes à 1000 rpm dans un cytospin (StatSpin Cytofuge 2) afin de projeter les cellules sur des lames SuperFrost Plus (CML, Nemours, France). Les cellules sont ensuite fixées sur les lames pendant 15 min dans du PFA 4% - HEPES 250 mM, puis dans du méthanol pendant 4 min à -20°C et dans de l'acétone pendant 4 min à -20°C. Après rinçages au PBS, les cellules sont délimitées sur la lame par un rond de DAKOPEN (Invitrogen), et les sites antigéniques sont saturés 15 minutes dans du sérum bloquant

universel (PickCell Laboratories, Amsterdam, Pays-Bas). Les lames sont ensuite incubées avec les anticorps primaires ER α et PR pendant 24h à 4°C en chambre humide (**Tableau 2**). Après rinçage, l'anticorps secondaire (Abcys, Paris, France) est déposé sur les lames pour 30 min à RT. Les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps Streptavidine-HRP du kit ABC Vectastain (Abcys) 30 min à RT. La détection du signal se fait à l'aide d'une incubation de 5 min à RT dans du diaminobenzidine (DAB). Les lames de cystospin sont ensuite rincées et passées en EtOH puis en toluène avant d'être recouvertes par des lamelles à l'aide d'un liquide de montage EUKITT (Dutscher, Brumath, France).

5) Etude de prolifération par incorporation de thymidine tritiée

Après 24h de traitement par les stéroïdes, les cellules sont incubées à 37°C avec de la thymidine tritiée [methyl- 3 H] (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) pendant 20h et 48h respectivement pour les lignées tumorales et les HBE. Les cellules sont ensuite rincées au PBS puis incubées pendant 15 min dans de l'acide trichloroacétique 5% à 4°C avant d'être lysées dans une solution de NaOH (0,1 M) pendant 30 min à 37°C. Le lysat cellulaire est dilué dans du liquide de scintillation (Ecolite, MP biomedical, Illkirch, France) afin que la radioactivité soit quantifiée dans un compteur β HIDEX 300SL (ScienceTec, Courtaboeuf, France).

6) Analyse d'apoptose et du cycle cellulaire en cytométrie de flux

Après 48h et 96h de traitement par les stéroïdes respectivement pour les lignées tumorales et les HBE, les cellules sont décollées à l'acutase puis fixées dans de l'EtOH à 70% et conservées à -20°C. Pour procéder à l'analyse, de l'iodure de propidium (10 μ g/ml) est incorporé aux cellules en présence de 0,835 U/ml de RNase A (Sigma). Pour chaque échantillon, un minimum de 10000 cellules est compté par le cytomètre de flux BD LSR II (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). La distribution du cycle cellulaire et le pourcentage de cellules en phase subG1 sont analysés à l'aide du logiciel ModFit LT (Verity Software House).

7) Analyses statistiques

La significativité des différences observées entre les conditions est déterminée par un test de variance ANOVA suivi d'un post-test de Tukey-Kramer, à l'aide du logiciel

Instat 3 GraphPad. Lorsque deux conditions seulement sont comparées, un test t de Student non apparié est effectué. Le degré minimum de significativité retenu est p<0,05.

II. ETUDE *IN VIVO*

A. Xénogreffes de tissu mammaire chez la souris

1) Patientes et xénogreffes

Du tissu mammaire de 6 patientes normales non mutées âgées de 29 à 42 ans, ainsi que de 5 patientes mutées pour *BRCA1* âgées de 36 à 57 ans a été utilisé pour les expériences de xénogreffes. Les souris femelles NMRI^{nu/nu} immunodéficientes ont été ovariectomisées à 4 semaines avant d'atteindre leur puberté par le laboratoire Janvier (Le Genest Saint Isle, France) puis livrées dans notre laboratoire. Pour les xénogreffes, la glande mammaire est découpée en petits fragments de 2x2x2 mm et 8 fragments sont greffés en sous cutané sur le dos, de part et d'autres de la colonne vertébrale des souris sous anesthésie générale. Généralement, du tissu mammaire d'une patiente mutée pour *BRCA1* et d'une patiente non mutée ont été greffés en parallèle sur chaque souris (4 fragments non muté à gauche de la colonne vertébrale et 4 fragments mutés à droite).

2) Traitements

Quatre groupes de traitement sont réalisés pour chaque expérience, comportant chacun 4 souris : contrôle, E2, E2+P et E2+P+UPA. La dose et la chronologie des stéroïdes administrés ont pour objectif d'imiter les sécrétions hormonales durant un cycle menstruel classique chez la femme. Chaque expérience a donc duré 28 jours. Les stéroïdes sont administrés aux souris sous forme de petits comprimés réalisés au laboratoire et greffés en sous-cutané au niveau du cou. Les comprimés greffés dans le groupe contrôle sont composés de cholestérol uniquement. Les comprimés E2 sont constitués d'un mélange de 0,3 mg d'E2 dans du cholestérol. Les comprimés de P et d'UPA contiennent chacun 20 mg de P ou d'UPA respectivement. Les comprimés de cholestérol, d'E2 et d'UPA sont greffés dès le premier jour de l'expérience, et délivrent les hormones durant les 28 jours de l'expérimentation. Le 14^{ème} jour, les comprimés de P sont également greffés aux souris des groupes E2+P et E2+P+UPA, tandis que les souris des groupes contrôles et E2 reçoivent un comprimé de cholestérol. Après 28 jours, les

souris sont sacrifiées. Le sang est prélevé et le sérum est congelé à -20°C avant de déterminer les concentrations des différents stéroïdes. Les fragments de tissu mammaire sont collectés et immédiatement fixés dans du PFA 4%.

3) Mesures des concentrations sériques des stéroïdes

Les concentrations sériques en E2 et P ont été déterminées dans le laboratoire de Biologie hormonale de l'Hôpital Cochin, par l'équipe du Dr N. Lahlou.

L'estriadiol est mesuré par radiocompétition classique en phase liquide à l'aide des réactifs Clinical Assays Estradiol-2 (Sorin Biomedica Diagnostics SpA, Saluggia, Italie). L'antisérum est un antisérum polyclonal anti-estradiol-6(carboxy-méthyl-oxime) couplé à l'albumine sérique bovine et développé chez le lapin. Le traceur est de l'estriadiol-6(carboxy-méthyl-oxime-125-iodo-histamine) marqué à l'iode 125. La limite de détection est de 0,8 pg/mL.

La progestérone est dosée par spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MSMS, équipement Acquity UPLC, et Quattro Premier XE de chez Waters, Milford MA, USA) mise au point par le Dr N. Lahlou. La mesure est opérée après extraction préalable des échantillons. Les résultats sont lus sur une courbe étalon réalisée avec de la progestérone hautement purifiée. L'étalon interne utilisé est de la progestérone deutérée. La limite de détection est de 0,03 ng/mL.

Les concentrations d'UPA ont été mesurées par LC-MS/MS chez MPI Research (State College, Pennsylvania, USA). La limite de détection est de 0,5 ng/mL.

4) Analyses immunohistochimiques des greffes de tissu mammaire

Chaque fragment greffé, ainsi que les fragments avant greffes provenant de la patiente d'origine des tissus greffés ont été analysés par immunohistochimie (IHC), afin de déterminer l'expression de ER α , PR, PR-B et du Ki67 en fonction des traitements et du type de tissu mammaire (muté/non muté). Les greffes sont placées en bloc de paraffine et les techniques IHC sont réalisées à l'aide d'un automate BOND-MAX Workstation (Leica, Nanterre, France) au Service d'Anatomopathologie de l'Hôpital Saint-Antoine. Les sites antigéniques sont démasqués par de l'EDTA ph 9,0 pour ER et PR et par du citrate ph 6,0 pour le Ki67, pendant 30 mn à 95°C, avant d'être incubés

avec les anticorps primaires (**Tableau 2**). La détection du signal est réalisée à l'aide du kit Bond Polymer Refire Detection (MENARINI-Diagnostic, Rungis, France).

Chaque marqueur a été quantifié en aveugle par un observateur. Un pourcentage d'expression du marqueur a été établi pour chaque lame sur un total de 1000 cellules épithéliales lobulaires et de 1000 cellules épithéliales canalaire comptées sachant que chaque lame contient les 4 fragments de tissu muté ou non muté greffés dans une souris. Lorsque les lames ne contenaient pas assez de structures pour atteindre les 1000 cellules, un nombre inférieur a été compté mais les lames dans lesquelles il n'était pas possible de compter plus de 100 cellules ont été écartées. Les moyennes établies pour chaque traitement d'une série de tissu correspondent donc à la moyenne des 4 lames représentant les 4 souris de chaque groupe de traitement.

5) Analyses statistiques

La significativité des différences observées entre les marquages des différentes conditions est déterminée par un test de variance ANOVA suivi d'un post-test de Tukey-Kramer, à l'aide du logiciel Instat 3 GraphPad. Les différences significatives ont été confirmées par une analyse multivariée appariée sur les femmes et les souris. Le degré minimum de significativité retenu est $p < 0,05$.

B. Analyse du marquage GR et P-S211GR dans le tissu mammaire normal et dans les tumeurs triple négatives

1) Obtention des tissus

a. *Tissu normal*

Du tissu mammaire normal issu de 20 patientes non mutées et de 17 patientes porteuses d'une mutation *BRCA1* à l'état hétérozygote a été obtenu pour cette étude.

b. *Tissu tumoral*

Une collaboration avec le Service d'Anatomopathologie du Centre Jean Perrin à Clermont-Ferrand a été mise en place avec le Pr F. Penault Llorca et nous a permis d'avoir accès à une série de 25 cancers du sein triple négatifs (TN) ER⁻, PR⁻ et HER2⁻ dont 14 proviennent de femmes non mutées (TN sporadiques) et 11 de femmes porteuses d'une mutation *BRCA1*.

2) Analyses immunohistochimiques

Les analyses IHC de l'expression du GR et du P-S211GR sont réalisées à l'aide d'un automate BOND-MAX Workstation (Leica, Nanterre, France) dans le Service d'Anatomopathologie de l'Hôpital Saint-Antoine. Les sites antigéniques sont démasqués puis incubés avec les anticorps primaires (**Tableau 2**). La détection du signal est réalisée à l'aide du kit BOND POLYMER REFIRE DETECTION (MENARINI-Diagnostic, Rungis, France). Le score d'Allred a été utilisé pour analyser les marquages du GR et du P-S211GR. Cette technique permet d'établir un score semi-quantitatif sur 8. Ce score est composé de deux items : la proportion de cellules marquées cotée de 0 à 5 et l'intensité de ce marquage cotée de 0 à 3. La proportion est évaluée en réalisant une moyenne du pourcentage de cellules marquées sur la lame pour un total de 1000 cellules comptées par lame. Les cellules basales/myoépithéliales et luminales ont été comptées séparément. L'intensité est évaluée en fonction de celle des témoins internes positifs associés à chaque série.

3) Analyses statistiques

Les moyennes et les déviations standards des scores d'Allred et de ses composantes ont été calculées. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel statistique R package version 2.4.0. Les données quantitatives des deux groupes de patientes non mutées et mutées *BRCA1^{+/−}* ainsi que des cellules myoépithéliales et luminales sont comparées en utilisant un test de Student non apparié. Le degré minimum de significativité retenu est $p < 0,05$.

RESULTATS

PREMIERE PARTIE :

INFLUENCE DE L'ULIPRISTAL ACETATE DANS LE SEIN

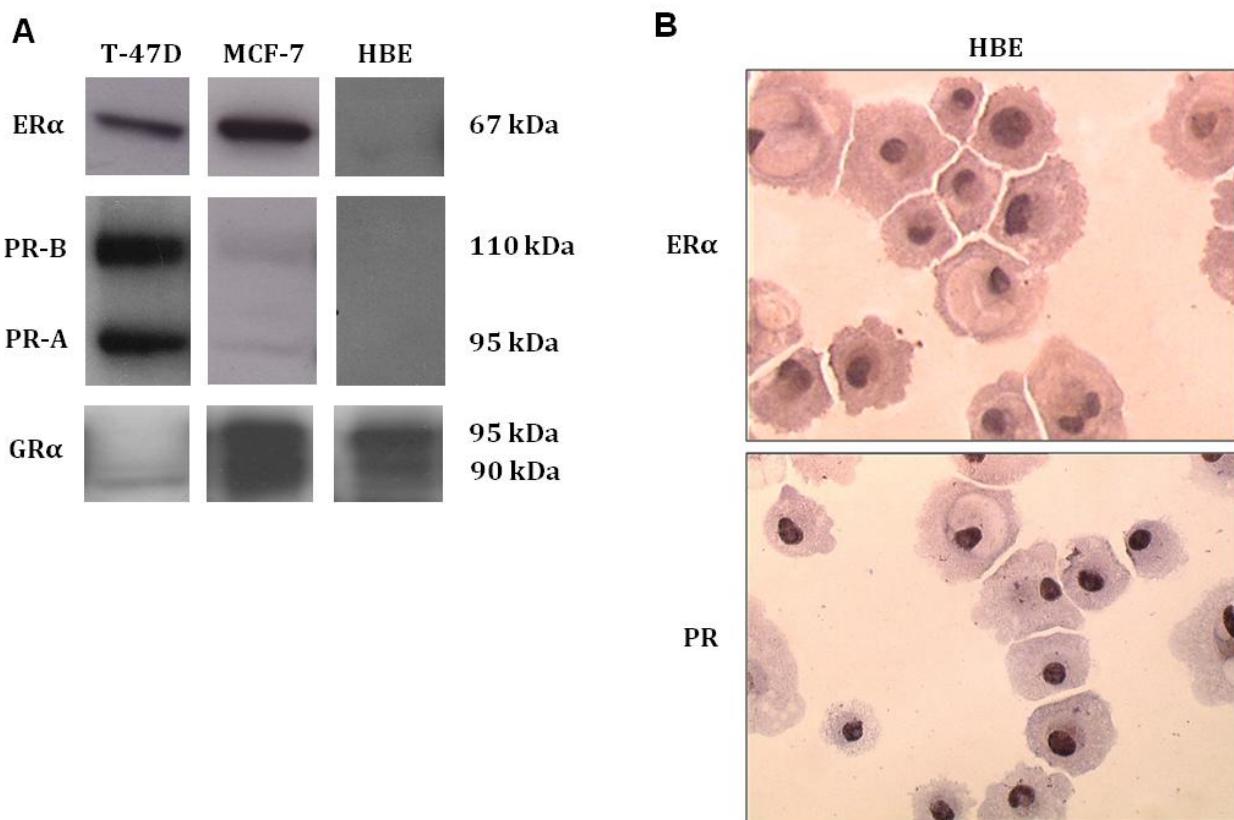


Figure 34 : Profil des récepteurs nucléaires ER α , PR et GR α dans les T-47D, les MCF-7 et les HBE. **A.** Expression des récepteurs ER α , PR-A, PR-B et GR α par technique de Western Blot dans les T-47D, les MCF-7 et les HBE. Pour ER α et les isoformes PR, 80 μ g de lysat protéique ont été déposés pour chaque type cellulaire. Pour GR α , 50 μ g de lysat protéique ont été déposés. **B.** Expression des récepteurs ER α et PR dans les HBE par marquage immunocytochimique après dépôt des cellules sur lames par technique de cytospin. Grossissement x400.

RESULTATS

I. PREMIERE PARTIE : INFLUENCE DE L'ULIPRISTAL ACETATE DANS LE SEIN

Les effets des SPRM et notamment de la mifépristone ont été caractérisés dans différents types cellulaires *in vitro*, dans plusieurs modèles animaux *in vivo*, mais aussi chez l'humain. La synthèse de ces données indique que les effets biologiques d'un SPRM dépendent d'une part de ses capacités intrinsèques mais également du phénotype cellulaire dans lequel il est étudié (Spitz 2003).

Les effets de l'UPA n'ayant jamais été observés dans les cellules mammaires humaines normales *in vivo* ou *in vitro*, il nous a donc semblé important d'apporter des éléments supplémentaires à la caractérisation de cette molécule avant la mise en place de son utilisation sur le long terme. De plus nous avons cherché à déterminer la spécificité cellulaire et l'impact du contexte oncogénétique des actions de l'UPA en comparant ses effets dans les cellules mammaires normales (HBE) à ceux observés dans deux lignées tumorales de sein (T-47D et MCF-7). La méthodologie et les résultats de cette étude sont discutés dans cette première partie et font l'objet d'un article qui sera très prochainement soumis.

A. Caractérisation des modèles cellulaires

Afin d'interpréter les effets des stéroïdes administrés aux cellules et notamment ceux de l'UPA, il a d'abord été primordial de bien caractériser les différents modèles cellulaires pour leur contenu en récepteurs nucléaires ainsi que pour les réponses cellulaires induites par les stéroïdes.

Tout d'abord, l'expression des récepteurs hormonaux ER α , PR et GR α a été observée dans les trois modèles cellulaires par immunocytochimie (ICC) et western blot (WB). Le récepteur ER α est fortement exprimé dans les T-47D et les MCF-7 (**Figure 34 A**). Dans les HBE, le niveau d'expression de ER α est trop faible pour être détecté par technique de WB, mais la méthode plus sensible de détection du récepteur par ICC permet de visualiser son expression dans les noyaux des cellules HBE recueillies en

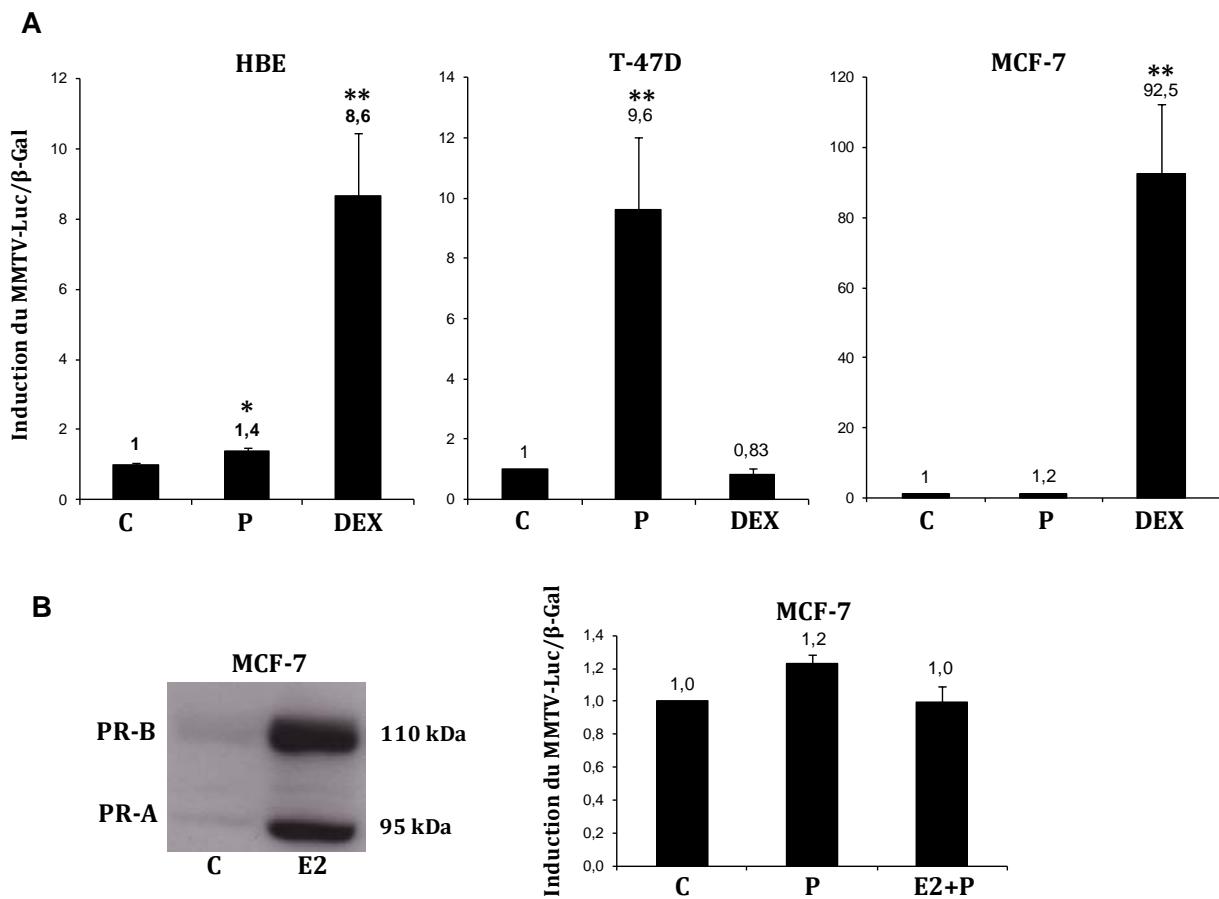


Figure 35 : Activité transcriptionnelle des PR et des GR dans les T-47D, les MCF-7 et les HBE. **A.** Induction du MMTV-Luc dans les cellules traitées par P et DEX (moyenne \pm SEM, n=3 pour les T-47D et les MCF-7, n=5 pour les HBE, *p < 0,05, **p < 0,001). **B.** A gauche, induction de l'expression des isoformes PR par E2 dans les MCF-7 détectée par WB (80 μ g de lysat protéique déposés). A droite, induction du MMTV-Luc dans les MCF-7 par P en absence ou en présence d'E2 (moyenne \pm SEM, n=3 pour les MCF-7).

cytospin (**Figure 34 A et B**). La technique de cytospin a l'avantage de faciliter la perméabilisation du noyau et donc l'accès des anticorps aux protéines nucléaires. Concernant l'expression du récepteur PR, nous avons observé que les isoformes PR-A et PR-B étaient fortement exprimées dans les T-47D tandis que leur expression est très faible dans les MCF-7 et n'est pas visible par WB dans les HBE (**Figure 34 A**). Tout comme pour ER α , les PR ont néanmoins été détectés dans les noyaux des HBE par ICC (**Figure 34 B**). Enfin le récepteur GR α est retrouvé exprimé de façon significative dans les MCF-7 et les HBE, mais pas dans les T-47D en WB (**Figure 34 A**). La bande supérieure est celle qui représente le GR α tandis que la bande inférieure caractérise la forme GR β qui ne possède pas d'activité transcriptionnelle. Les quantités protéiques déposées et la dilution de l'anticorps anti-GR étant identiques, le récepteur GR α est plus fortement exprimé dans les MCF-7 que dans les HBE.

Nous avons ensuite cherché à caractériser les signalisations transcriptionnelles induites par les récepteurs PR et GR dans ces modèles cellulaires afin de pouvoir interpréter par la suite les effets antiprogestatifs et anti-glucocorticoïdes de l'UPA dans ces cellules. Pour cela, les trois modèles cellulaires ont été transfectés par le gène rapporteur MMTV-Luc puis traités par la progestérone et la dexaméthasone. Le gène rapporteur comporte des copies de PRE/GRE sur son promoteur, ce qui permet une induction de l'expression de la luciférase par les PR et les GR activés par leur ligand. Dans les HBE, la P a une action limitée mais significative sur l'induction d'expression de la luciférase, confirmant la présence d'une activité transcriptionnelle des PR dans ces cellules (**Figure 35 A**). La DEX augmente fortement l'activité de la luciférase, ce qui confirme le niveau d'expression élevé des GR et leur capacité à activer la transcription d'un gène cible une fois liés à leur ligand. Dans les T-47D, nous observons une forte induction de l'activation de la luciférase par P, mais une absence totale d'induction par la DEX, confirmant l'absence de récepteur GR dans ces cellules (**Figure 35 A**). Cela signifie également que la DEX est incapable d'activer la transcription du MMTV-Luc par l'intermédiaire des récepteurs PR. Concernant les MCF-7, la DEX induit très fortement l'expression de la luciférase (**Figure 35 A**), ce qui corrobore les taux élevés de GR α détectés par WB dans ces cellules (**Figure 34 A**). En revanche, aucune induction de la luciférase par P n'a été observée dans ces cellules (**Figure 35 A**). Les MCF-7 ont donc été traitées par E2 afin d'induire les récepteurs PR comme en témoigne la nette augmentation de leur expression par WB (**Figure 35 B**). L'augmentation de l'expression

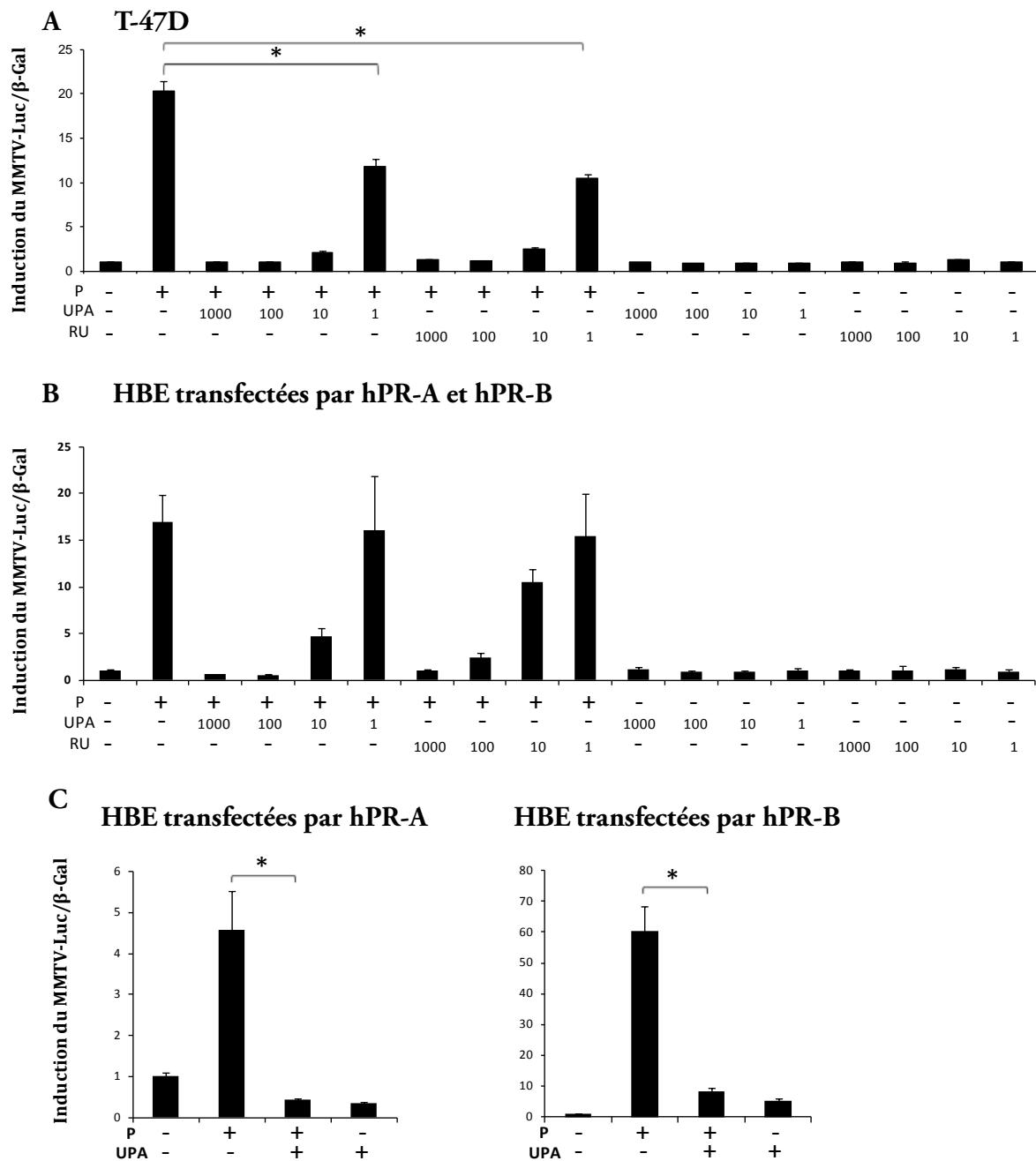


Figure 36 : Effets de l'UPA sur la transactivation du gène rapporteur MMTV-Luc. Le plasmide MMTV-Luc a été transfété dans les cellules T-47D (A), et dans les HBE en combinaison avec hPR-A et hPR-B (B) hPR-A seul ou hPR-B seul (C). Les cellules ont été traitées par P à 100nM et/ou l'UPA ou le RU de 1 à 1000 nM comme indiqué ou bien à 100 nM si non précisé. Les résultats sont exprimés en induction du contrôle non traité après normalisation sur la β -Gal (moyenne \pm SEM, n = 3, *p < 0,001).

des PR par l'adjonction d'estradiol ne permet cependant pas d'induire la luciférase par P dans ces cellules (**Figure 35 B**). Ces résultats démontrent que les PR sont exprimés dans les MCF-7 mais qu'ils ne sont pas capables d'activer l'expression des gènes cibles. Il est probable qu'une mutation soit survenue dans le gène PR de nos cellules MCF-7, n'empêchant pas l'expression de la protéine, ni sa reconnaissance par l'anticorps mais bloquant ses capacités fonctionnelles.

L'établissement des profils des récepteurs hormonaux de ces modèles cellulaires était un pré-requis pour caractériser les effets de l'UPA sur les PR et les GR dans les modèles cellulaires adéquats. Cette caractérisation du niveau des récepteurs et des réponses associées nous a permis de discriminer les modèles les plus adéquats pour étudier les effets de l'UPA sur les PR ou sur les GR. Ainsi, dans la suite de ce travail, les effets de l'UPA transmis par les PR ont été observés dans les HBE et les T-47D, tandis que les réponses régulées par les GR ont été examinées dans les HBE et les MCF-7.

B. Action transcriptionnelle de l'UPA dans les cellules mammaires

Comme décrit précédemment, l'UPA montre une affinité importante pour les récepteurs PR et GR, mais ses actions agonistes et antagonistes sont variables en fonction du type cellulaire et des conditions expérimentales. Nous avons donc souhaité caractériser ses effets sur les PR et les GR de cellules de sein normales et tumorales.

1) UPA et récepteur de la progestérone

Pour observer l'activité transcriptionnelle des PR en présence d'UPA, les T-47D et les HBE ont été transfectées par le gène rapporteur MMTV-Luc (**Figure 36**). L'UPA exerce une puissante activité antagoniste des PR dans les T-47D entre 1 et 1000 nM. Cette action est dose-dépendante et est totalement superposable à celle de la mifépristone (RU), l'antiprogestatif de référence (**Figure 36 A**). Dans les HBE, les isoformes PR-A et PR-B humaines ont été surexprimées dans cette expérience afin de mieux visualiser les actions doses-dépendantes de l'UPA sur ces récepteurs (**Figure 36 B et C**). Entre 100 à 1000 nM, l'UPA et le RU inhibent totalement l'induction de l'activité de la luciférase par la P dans les HBE (**Figure 36 B**). A 10 nM, l'UPA et le RU montre une efficacité antagoniste partielle qui n'est plus observable à 1 nM. Enfin, l'UPA et le RU ne présentent pas d'effet agoniste sur la transactivation du MMTV-Luc par les PR dans les T-47D et les HBE (**Figure 36 A et B**). La dose de 100 nM étant la concentration la plus

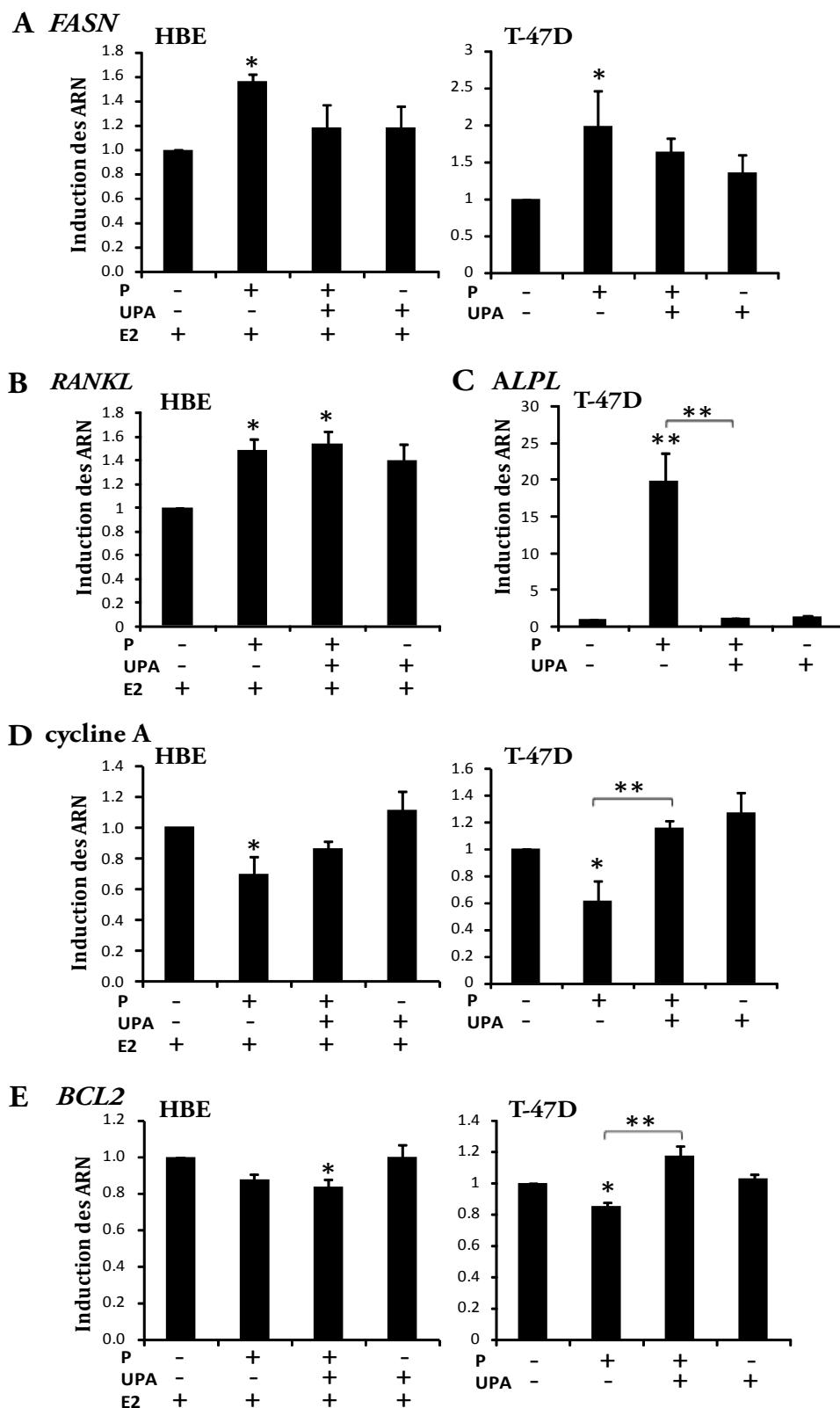


Figure 37 : Effets de l'UPA sur la transcription des gènes cibles de PR. L'expression des ARN des gènes *FASN* (A), *RANKL* (B), *ALPL* (C), cycline A (D) et *BCL2* (E) a été analysée par Q-PCR dans les HBE et/ou les T-47D. Les cellules ont été traitées par P et/ou l'UPA à 100 nM et/ou l'E2 à 10 nM comme indiqué par les croix. L'expression des ARN *FASN*, *RANKL* et *BCL2* a été examinée après 24h de traitement et après 48h pour la cycline A. Les résultats sont exprimés en induction du contrôle non traité pour les T-47D ou traité par E2 seul pour les HBE (moyenne \pm SEM, n = 5 pour les HBE et n = 2 pour les T-47D, *p < 0,05, **p < 0,01).

faible requise pour une action antagoniste totale de l'UPA dans les HBE, cette concentration a donc été choisie pour la suite de cette étude. Par ailleurs il s'agit de la concentration équimolaire à celle de la progestérone. Dans les HBE transfectées par hPR-A ou hPR-B seul, l'UPA présente une action antagoniste puissante des effets de la progestérone démontrant la capacité de l'UPA à inhiber la signalisation transmise par les deux isoformes de PR. En revanche l'UPA ne montre pas d'effet agoniste sur ces isoformes dans les T-47D (**Figure 36 C**).

Nous avons ensuite observé les actions de cette molécule sur la transcription de gènes cibles de la progestérone dans ces cellules par technique de Q-PCR. Dans les HBE, les traitements ont été combinés à l'estradiol afin d'augmenter le niveau d'expression des récepteurs PR endogènes, et de se situer dans les conditions physiologiques de la femme chez laquelle la sécrétion de l'E2 est toujours concomitante à celle de P (Malet, Gompel et al. 1991; Clarke, Howell et al. 1997; Anderson 2001). Les effets de l'UPA ont été évalués sur l'expression des ARNm du gène de synthèse des acides gras, fatty acid synthase (*FASN*), un gène cible de la progestérone impliqué à la fois dans la différentiation des cellules épithéliales mammaires normales et dans le maintien de la croissance tumorale (Chalbos, Joyeux et al. 1990; Chalbos, Joyeux et al. 1990; Chalbos, Joyeux et al. 1992; Kuhajda 2006; Courtin, Communal et al. 2011). Dans les HBE et les T-47D, l'UPA empêche l'induction de l'expression des ARNm de *FASN* par la P (**Figure 37 A**). En revanche, dans les HBE, l'UPA ne parvient pas à inhiber l'expression P-dépendante des ARNm du gène tumor necrosis factor ligand superfamily member 11 (*RANKL*), nécessaire à la prolifération de la glande mammaire murine pendant la gestation (**Figure 37 B**) (Fata, Kong et al. 2000; Gonzalez-Suarez, Branstetter et al. 2007). L'expression de ce gène n'est pas détectée dans les T-47D. Dans ces dernières, nous avons observé la régulation transcriptionnelle du gène de la phosphatase alcaline (*ALPL*), impliquée dans les métastases osseuses du cancer du sein et stimulée par la progestérone (Di Lorenzo, Gianni et al. 1993; Reale, Santini et al. 1995; Ritzke, Stieber et al. 1998). L'expression des ARNm *ALPL* est fortement stimulée par la P dans les T-47D et l'UPA réverse totalement cet effet (**Figure 37 C**). L'effet de l'UPA a ensuite été observé sur deux autres gènes régulés par P et jouant un rôle dans la croissance cellulaire : le gène de la cycline A, impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, ainsi que le gène B-cell CLL/lymphoma 2 (*BCL2*) dont la protéine exerce une action anti-apoptotique (Kandouz, Siromachkova et al. 1996; Gompel, Somai et al. 2000; den Elzen and Pines

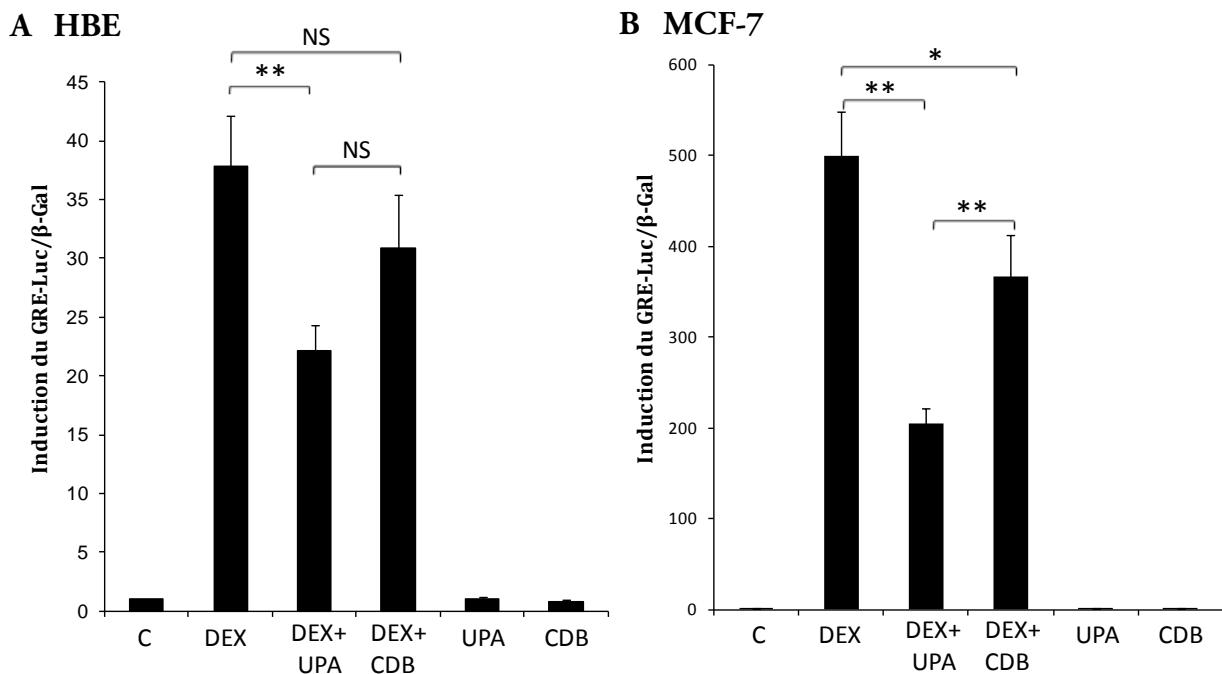


Figure 38 : Effets de l'UPA sur la transactivation du gène rapporteur GRE-Luc. Le plasmide GRE-Luc a été transfecté dans les cellules HBE (**A**) et MCF-7 (**B**). Les cellules ont été traitées par la DEX et/ou l'UPA à 100nM. Les résultats sont exprimés en induction du contrôle après normalisation sur la β -Gal (moyenne \pm SEM, n = 13 pour les HBE et n = 3 pour les MCF-7, *p < 0,01, **p < 0,001).

2001; Lin, Woon et al. 2003; Fung and Poon 2005). Dans les HBE et les T-47D, la progestérone diminue l'expression des ARNm de la cycline A. L'UPA inhibe très légèrement l'effet de P dans les HBE tandis qu'il l'inhibe significativement dans les T-47D (**Figure 37 D**). De la même façon, l'UPA ne présente aucune action inhibitrice sur la diminution d'expression de *BCL2* induite par P dans les HBE, alors que son action antagoniste est marquée dans les T-47D (**Figure 37 E**). Ces résultats indiquent d'une part que l'UPA aurait une action antagoniste des PR plus importante dans les T-47D que dans les HBE, mais également que ses actions seraient spécifiques du gène observé. Par ailleurs, l'UPA ne présente aucune activité agoniste des PR sur tous les gènes étudiés dans ces deux modèles cellulaires (**Figure 37**).

2) UPA et le récepteur des glucocorticoïdes

Afin d'observer les effets de l'UPA sur les réponses transcriptionnelles des GR, nous avons transfété le gène rapporteur GRE-Luc dans les HBE et les MCF-7. Le promoteur de ce gène comporte 6 copies de la séquence de réponse GRE. Les cellules ont ensuite été traitées par la DEX, l'UPA, ainsi que son plus proche métabolite, le CDB-3877 (CDB), connu pour exercer des activités anti-glucocorticoïdes plus limitées que celles de l'UPA (Attardi, Burgenson et al. 2004). Dans les HBE, l'UPA inhibe à $41,3 \pm 5,8\%$ l'expression de la luciférase induite par la DEX tandis que son métabolite ne montre pas d'action antagoniste significative ($18,1 \pm 11,8\%$) (**Figure 38 A**). Dans les MCF-7, l'UPA et le CDB sont capables d'inhiber significativement la transactivation du GRE-Luc par la DEX de $59 \pm 3,4\%$ ($p < 0,001$) et $26,5 \pm 9,1\%$ ($p < 0,01$) respectivement (**Figure 38 B**). Ces résultats suggèrent que ces deux molécules pourraient présenter une efficacité anti-glucocorticoïde supérieure dans les MCF-7 par rapport aux HBE. En revanche, elles ne montrent aucun effet agoniste des GR sur la transactivation du GRE-Luc dans ces cellules mammaires (**Figure 38**).

Les effets de l'UPA ont ensuite été précisés par l'étude de la régulation transcriptionnelle de certains gènes cibles des GC par Q-PCR. Le gène de l'immediate response 3 (*IEX-1*) est impliqué dans la survie cellulaire stress-induite (Wu 2003; Shen, Guo et al. 2006). Le gène regulator of G-protein signaling 2 (*G0S8*) est un acteur de la voie de signalisation des protéines G (Kehrl and Sinnarajah 2002). Il a été montré, notamment dans notre laboratoire, que ces deux gènes étaient régulés par la DEX par l'intermédiaire des GR (Wan and Nordeen 2002; Courtin, Communal et al. 2011).

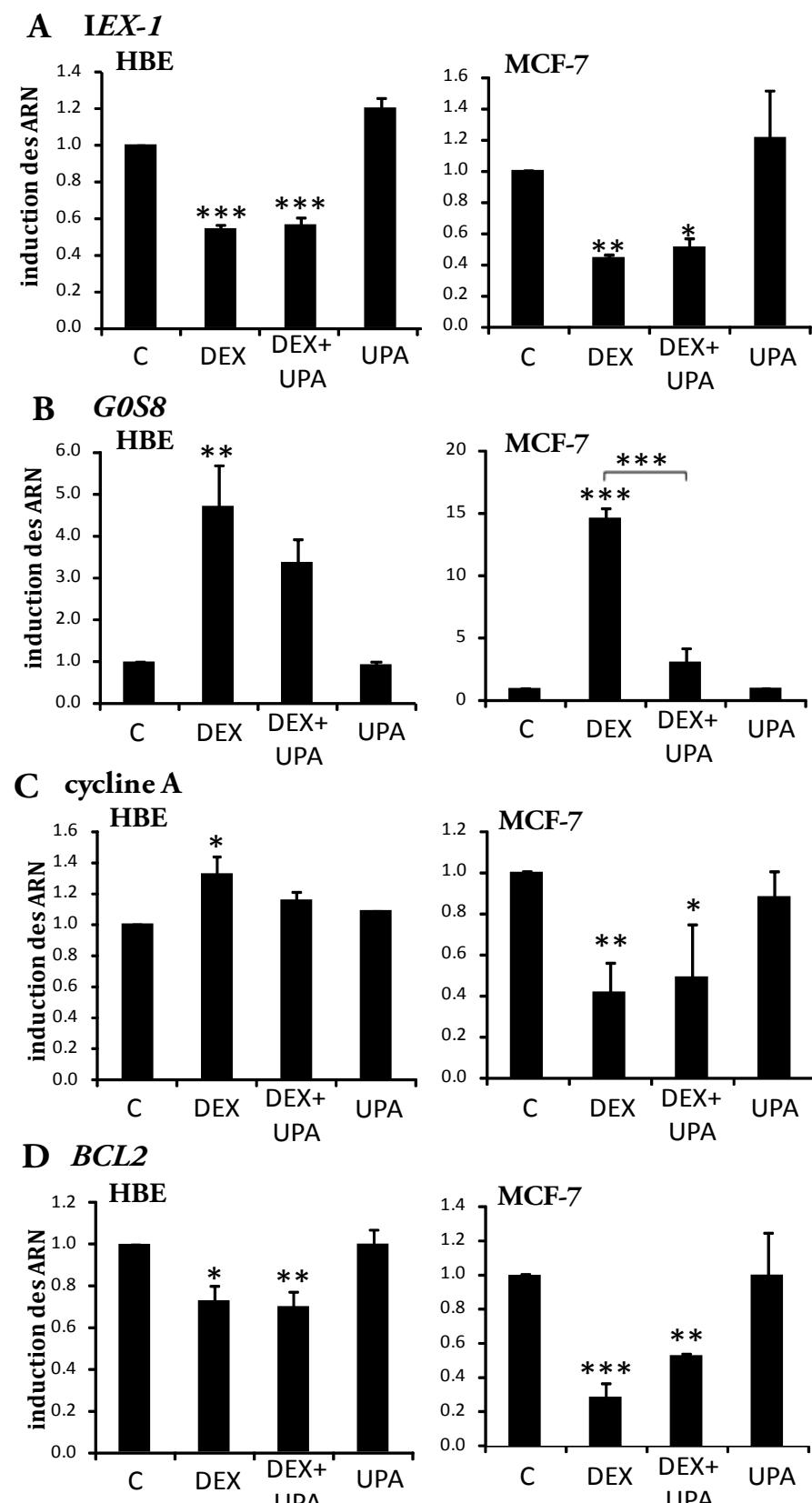


Figure 39 : Effets de l'UPA sur la transcription des gènes cibles de GR. L'expression des ARN des gènes *IEX-1* (A), *GOS8* (B), cycline A (C) et *BCL2* (D) a été analysée par Q-PCR dans les HBE et les MCF-7. Les cellules ont été traitées par DEX et/ou l'UPA à 100 nM. L'expression des ARN *IEX-1*, cycline A et *BCL2* a été examinée après 24h de traitement et après 6h pour *GOS8*. Les résultats sont exprimés en induction du contrôle (moyenne \pm SEM, n = 5 pour les HBE et n = 2 pour les MCF-7, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

L'expression d'*IEX-1* est inhibée par la DEX mais l'UPA n'exerce pas d'antagonisme sur cette action dans les HBE et les MCF-7 (**Figure 39 A**). L'UPA inhibe faiblement et de façon non significative l'augmentation d'expression des ARNm *GOS8* dans les HBE, tandis que dans les MCF-7, son action antagoniste est hautement significative ($p < 0,001$) (**Figure 39 B**). Les effets de l'UPA sur l'expression des ARNm de la cycline A et de *BCL2* ont ensuite été examinés pour tenter de prévoir son action sur le cycle cellulaire et l'apoptose, puisque ces gènes sont également régulés par les GC (Sengupta, Vonesch et al. 2000; Gabet, Noh et al. 2011). La régulation de la cycline A par la DEX est opposée entre les HBE et les MCF-7. Dans les HBE, les ARNm de la cycline A sont logiquement induits par la DEX qui exerce une action proliférative sur ces cellules (Courtin, Communal et al. 2011). Dans les MCF-7, la DEX est anti-proliférative et inhibe l'expression des ARNm de la cycline A (**Figure 39 C**) (Courtin, Communal et al. 2011). Dans ces deux types cellulaires, l'UPA induit une inhibition très limitée et non significative des actions de la DEX sur la régulation de la cycline A (**Figure 39 C**). Concernant *BCL2*, son expression est diminuée par la DEX dans les HBE et les MCF-7 (**Figure 39 D**). L'UPA n'inhibe pas les effets de la DEX dans les HBE, tandis qu'il exerce une faible action antagoniste dans les MCF-7 (**Figure 39 D**). L'UPA ne présente aucune activité agoniste glucocorticoïde sur les gènes étudiés dans ces deux modèles cellulaires (**Figure 39**). Ces résultats témoignent d'une action gène et cellule-spécifique de l'UPA, et confirme son activité antagoniste des GR globalement plus limitée dans les HBE comparativement aux MCF-7.

C. Action de l'UPA sur la prolifération et l'apoptose des cellules mammaires *in vitro*

La détermination du risque lié à l'utilisation d'un antiprogestatif dans le tissu mammaire, passe par l'étude des effets de cette molécule sur la croissance des cellules composant ce tissu. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet prolifératif et apoptotique de l'UPA seul ou combiné avec P ou DEX dans les trois modèles cellulaires.

La prolifération cellulaire a été évaluée par le niveau d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules, celle-ci étant intégrée dans l'ADN à chaque phase de réplication et donc lors de chaque division cellulaire (**Figure 40**). Dans les HBE, les effets prolifératifs de P et DEX sont opposés, la progestérone étant légèrement

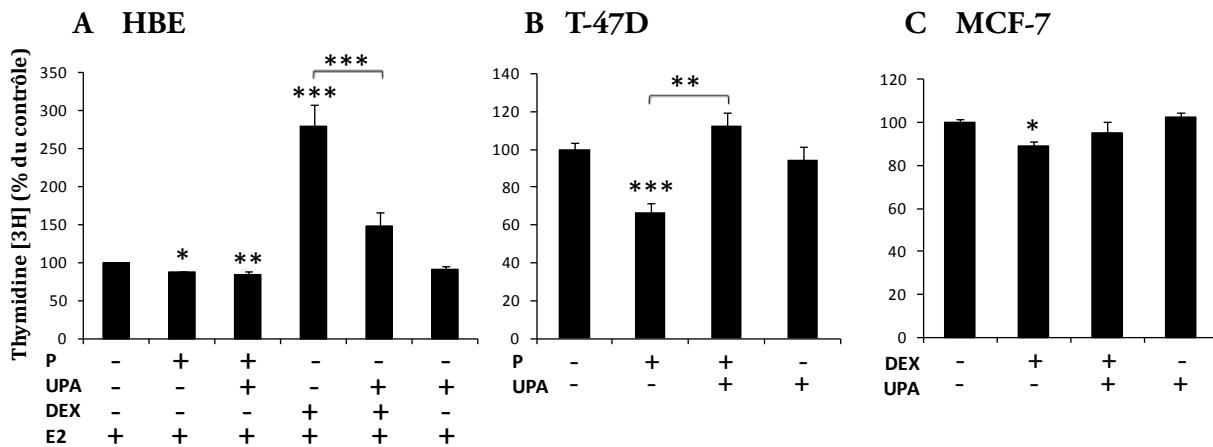


Figure 40 : Effets de l'UPA sur la prolifération cellulaire régulée par les stéroïdes. La prolifération a été mesurée par incorporation de thymidine tritiée dans les cellules HBE (A), T-47D (B) et MCF-7 (C). Les cellules HBE ont été traitées pendant 96h et les T-47D et les MCF-7 pendant 48h par P, DEX et l'UPA à 100 nM et l'E2 à 10 nM comme indiqué par les croix. Les résultats sont exprimés en pourcentages du contrôle traité par E2 seul dans les HBE ou non traité dans les T-47D et les MCF-7 (moyenne \pm SEM, n = 7 pour les HBE, n = 4 pour les T-47D et n = 3 pour les MCF-7, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

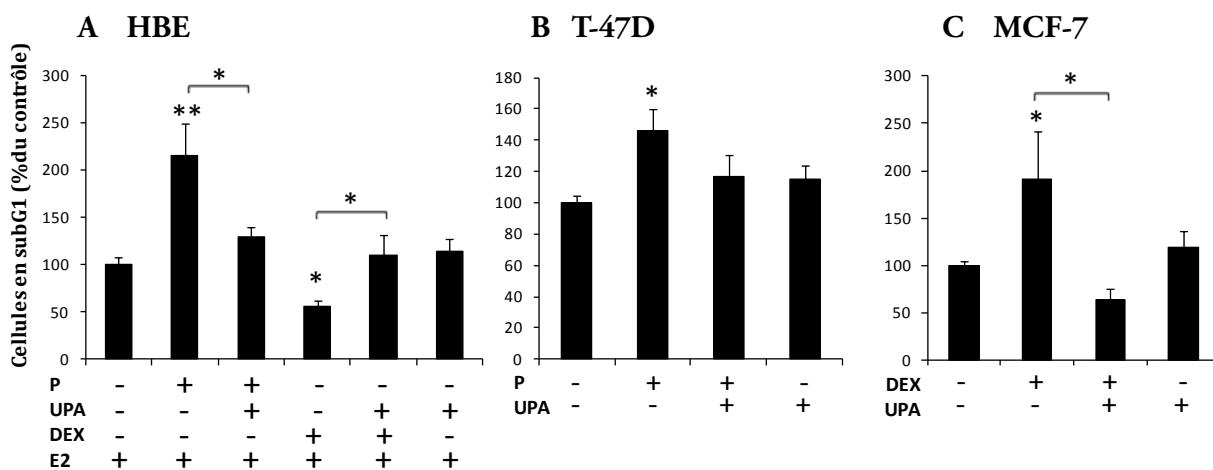


Figure 41 : Effets de l'UPA sur l'apoptose cellulaire régulée par les stéroïdes. L'apoptose a été mesurée par quantification des cellules en subG1 par cytométrie de flux dans les HBE (A), T-47D (B) et MCF-7 (C). Les cellules HBE ont été traitées pendant 96h et les T-47D et MCF-7 pendant 48h par P, DEX et l'UPA à 100 nM et l'E2 à 10 nM comme indiqué par les croix. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle traité par E2 seul dans les HBE ou non traité dans les T-47D et les MCF-7 (moyenne \pm SEM, n = 9 pour les HBE, n = 3 pour les T-47D et n = 4 pour les MCF-7, *p < 0,05, **p < 0,001).

antiproliférative contrairement à la DEX qui exerce une action proliférative marquée sur ces cellules (**Figure 40 A**). De façon intéressante, l'UPA ne réverse pas les effets antiprolifératifs de P, tandis qu'il inhibe la prolifération cellulaire induite par la DEX dans les HBE. Dans les lignées tumorales, P et DEX exercent une action antiproliférative dans les T-47D et les MCF-7 respectivement (**Figure 40 B et C**). Dans ces cellules, l'UPA réverse les effets antiprolifératifs de P dans les T-47D, et réduit l'effet antiprolifératif limité de la DEX dans les MCF-7. L'UPA non combiné à P ou DEX n'exerce aucun effet sur la prolifération dans les trois types cellulaires (**Figure 40**).

L'apoptose a ensuite été examinée par quantification du pourcentage de cellules apoptotiques en subG1 en fonction des traitements, par technique de cytométrie de flux (**Figure 41**). Dans les HBE, les effets apoptotiques de P et DEX sont opposés, la progestérone étant significativement pro-apoptotique contrairement à la DEX qui inhibe l'apoptose de ces cellules (**Figure 41 A**). L'UPA est capable d'inhiber à la fois les effets de P et DEX sur l'apoptose dans les HBE. Dans les lignées, P et DEX sont pro-apoptotiques dans nos conditions expérimentales dans les T-47D et les MCF-7 respectivement (**Figure 41 B et C**). L'UPA inhibe les effets pro-apoptotiques de la P dans les T-47D et de la DEX dans les MCF-7. L'UPA seul n'exerce aucun effet sur l'apoptose dans les trois types cellulaires (**Figure 41**).

Ces résultats suggèrent que l'action de l'UPA sur la croissance des cellules mammaires est complexe puisqu'elle dépend à la fois du contexte hormonal et du phénotype cellulaire.

D. Action de l'UPA sur la prolifération du tissu mammaire humain *in vivo*

Etant donné l'importance de l'environnement hormonal et cellulaire dans les réponses induites par l'UPA, il nous a ensuite semblé important de caractériser les effets de cette molécule dans un modèle de glande mammaire *in vivo* qui puisse imiter les conditions physiologiques hormonales de la femme. Les caractéristiques des patientes dont la glande mammaire a été prélevée pour cette étude sont répertoriées dans le **Tableau 3** qui rapporte l'âge des patientes lors de l'opération ainsi que les informations gynécologiques pertinentes. Des fragments de glandes mammaires humaines normales ont donc été greffés en sous cutané sur le dos de souris NMRI^{nu/nu} immunodéficientes

patientes non mutées	1	2	3	4	5	6
âge	29	36	38	31	42	40
grossesses/parité (PGMT)	2/0	1/1 (31)	4/3 (23)	1/1 (/)	2/2 (31)	non
allaitements	non	non	non	/	non	non

Tableau 3 : Caractéristiques des 6 patientes non mutées : âge des patientes le jour du prélèvement du tissu mammaire ; nombre de grossesses et de la parité associée, et âge de la première grossesse menée à terme (PGMT) ; allaitement après les grossesses. Aucune patiente n'était ménopausée ou ovariectomisée, et aucune ne présentait d'antécédents de cancer du sein. / : Informations manquantes.

Traitements	E2 (pg/ml) moyenne \pm SEM	P (ng/ml) moyenne \pm SEM	UPA (ng/ml) moyenne \pm SEM
Contrôle	< 0,8	< 0,4	< 0,5
E2			
E2+P	$36,88 \pm 4,25$	$13,05 \pm 1,14$	
E2+P+UPA			$63,49 \pm 10,46$

Tableau 4 : Concentrations sériques des stéroïdes après 28 jours de traitement chez la souris.

ovariectomisées. Les souris greffées ont été traitées durant 28 jours par des comprimés de stéroïdes réalisés au laboratoire et également greffés en sous cutané. Quatre groupes de traitement ont été réalisés : contrôle (C), E2, E2+P et E2+P+UPA. Afin de reproduire la chronologie des sécrétions d'E2 et P durant le cycle menstruel chez la femme, les comprimés d'E2 ont été greffés dès le premier jour de l'expérience tandis que les comprimés de P n'ont été greffés que le 14^{ème} jour. Les comprimés d'UPA sont greffés dès le premier jour pour mimer un traitement quotidien par cette molécule. La mesure des concentrations sériques des trois stéroïdes chez les souris nous a permis de valider cette méthode de traitement (**Tableau 4**). Dans le groupe contrôle, les hormones sont à une concentration extrêmement faible ou indétectable. La concentration moyenne de l'estradiol circulant chez les souris des groupes E2, E2+P et E2+P+UPA est de $36,88 \pm 4,25$ pg/ml, ce qui correspond à la gamme basse des niveaux sériques d'E2 observés chez la femme en période d'activité génitale (**Tableau 4**). La concentration moyenne de la progestérone chez les souris des groupes E2+P et E2+P+UPA est de $13,05 \pm 1,14$ ng/ml, soit une concentration équivalente à celle rapportée chez la femme durant la phase lutéale du cycle menstruel. Les concentrations détectées d'UPA sont de $63,49 \pm 10,46$ ng/ml (**Tableau 4**).

L'apport de ces hormones jusqu'au tissu mammaire greffé a été confirmé par l'observation de l'expression des PR totaux dans les cellules épithéliales de la glande mammaire greffée (**Figure 42 A**). En effet, nous avons observé que l'expression des PR était systématiquement augmentée dans les groupes traités par E2 par rapport au groupe C, démontrant une efficacité de l'E2 à atteindre les cellules épithéliales de la glande greffée pour induire l'expression des PR (**Figure 42 A**). Les récepteurs ER α sont également exprimés dans le noyau dans une moyenne de 40 à 60% des cellules épithéliales et leur expression ne montre pas de variation significative en fonction des traitements (**Figure 42 A**). L'UPA ne présente pas d'action marquée sur l'expression des PR et des ER, puisque les niveaux d'expression de ces récepteurs dans le groupe E2+P+UPA ne diffèrent pas de ceux des groupes E2 et E2+P (**Figure 42 A**).

L'index mitotique a ensuite été analysé par la quantification du marqueur de prolifération Ki67 dans les cellules épithéliales des structures canalaires et lobulaires de la glande mammaire greffée (**Figure 42 A et B**). Dans le groupe C, le pourcentage de cellules mitotiques est bas, à $1,7 \pm 0,4\%$ dans les canaux et $1,8 \pm 0,6\%$ dans les lobules

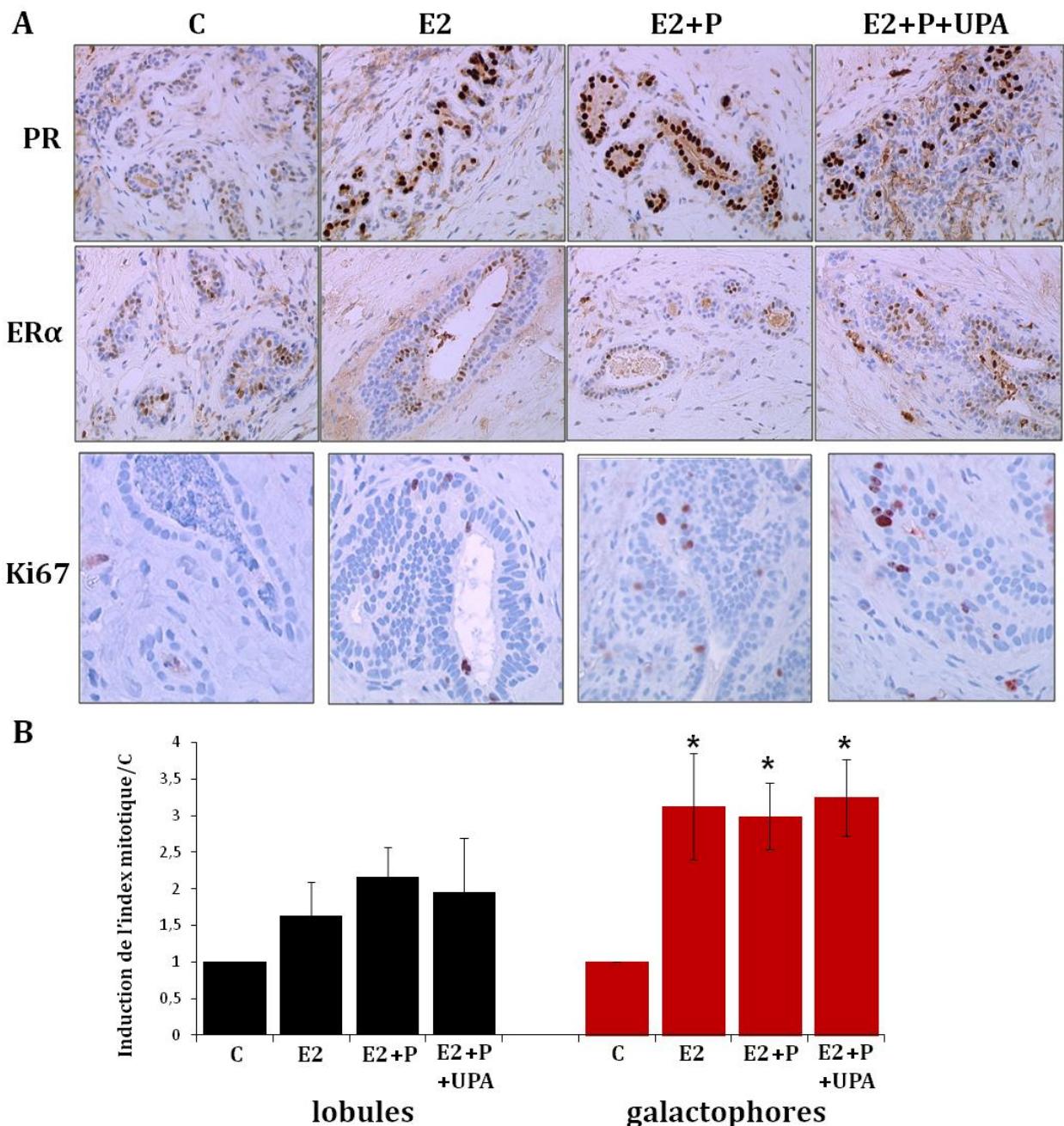


Figure 42 : Expression de PR, ER α , et du Ki67 dans la glande mammaire xénogreffée chez la souris. **A.** Expression des marqueurs par IHC dans les groupes C, E2, E2+P et E2+P+UPA. Grossissement x400. **B.** Induction de l'index mitotique (% de cellules épithéliales lumineuses marquées pour Ki67) par rapport au groupe C dans les lobules et les galactophores (moyenne \pm SEM, $p < 0,05$).

(données non montrées). L'activité proliférative exprimée en induction des taux du groupe C est légèrement augmentée dans les lobules des groupes E2, E2+P et E2+P+UPA sans que cette induction ne soit significative ni que des différences ne soient observées entre les traitements. En revanche dans les canaux, tous les groupes traités par E2 montrent une induction significative de l'activité proliférative du tissu de l'ordre de $3,1 \pm 0,7$ fois dans le groupe E2, $3,0 \pm 0,4$ fois dans le groupe E2+P et $3,2 \pm 0,5$ fois dans le groupe E2+P+UPA ($p < 0,05$, confirmé en analyse multivariée appariée sur les femmes et les souris). Aucune différence n'est donc observée pour les taux d'expression du Ki67 entre les groupes E2, E2+P et E2+P+UPA, suggérant une absence d'effet de l'UPA sur la prolifération des cellules luminales des structures mammaires (**Figure 42 A et B**).

E. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons montré que les effets antagonistes de l'UPA sur les PR et les GR étaient dépendants du type cellulaire et de l'environnement hormonal. Globalement, l'UPA a montré une capacité antagoniste amplifiée dans les lignées tumorales par son aptitude à inhiber de façon plus puissante les gènes rapporteurs mais surtout certains gènes cibles de PR dans les T-47D ou de GR dans les MCF-7 par rapport aux HBE. Le phénotype cellulaire intervient donc dans la modulation des effets de l'UPA et certainement de l'ensemble des SPRM, comme l'avait démontré précédemment une étude indiquant des différences d'actions de l'UPA et de l'asoprisnil, un autre SPRM, entre les cellules normales du myomètre et celles de léiomyome utérin (Yoshida, Ohara et al. 2010). Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer ces spécificités d'effets pour les gènes et les cellules.

Premièrement, cette spécificité des actions cellulaires de l'UPA pourrait être en partie attribuée à des variations de son métabolisme selon le phénotype cellulaire. Il a été démontré que le cytochrome CYP34A de la famille des cytochromes P450 était à l'origine du métabolisme de l'UPA comme de celui d'autres stéroïdes (Jang, Wrighton et al. 1996; Gainer and Ullmann 2003). Des variations de l'activité de cette enzyme d'une femme à l'autre ont été décrites et corrélées à un métabolisme plus ou moins efficace des stéroïdes (Keshava, McCanlies et al. 2004). En conséquence, la transformation de l'UPA en sa forme mono-déméthylée la plus proche, le CDB-3877, pourrait varier entre les HBE, les T-47D et les MCF-7. Comme le CDB présente des capacités anti-

glucocorticoïdes plus faibles que celles de l'UPA (**Figure 38**), une transformation plus importante ou plus rapide de l'UPA en CDB dans les HBE pourrait expliquer ses effets anti-glucocorticoïdes réduits par rapport aux MCF-7 sur les gènes cibles de GR. En revanche, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer les différences d'effets antagonistes des PR observés entre les HBE et les T-47D. En effet il a été montré que le CDB présentait une efficacité antiprogestative totalement superposable à celle de l'UPA dans des cellules de l'endomètre par l'équipe de J. Reel, mais aussi dans les T-47D dans notre laboratoire (données non montrées) (Attardi, Burgenson et al. 2004).

D'autre part, les activités agonistes et antagonistes passant par les GR et les PR sont étroitement régulées par des co-activateurs et des co-répresseurs transcriptionnels, connus pour être spécifiques du récepteur nucléaire mis en jeu et pour être exprimés à des taux variables en fonction du type cellulaire (Hudelist, Czerwenka et al. 2003). La liaison des PR et des GR avec un ligand agoniste favorise le recrutement de co-activateurs de transcription au niveau des promoteurs des gènes cibles. Les complexes PR-ligand s'associent préférentiellement à SRC-1 et SRC-3, tandis que les complexes GR-ligand recrutent principalement SRC-2 (Li, Wong et al. 2003; Han, DeMayo et al. 2006). Ces deux récepteurs nucléaires recrutent les co-répresseurs SMRT et N-Cor lorsqu'ils sont liés à un ligand antagoniste, induisant ainsi une répression de la transcription des gènes cibles (Chen and Evans 1995; Horlein, Naar et al. 1995). Les différences de profils de ces co-régulateurs en fonction du type cellulaire étudié pourraient donc jouer un rôle important dans les effets induits par les SPRM. Il a d'ailleurs été montré que les capacités agonistes/antagonistes du RU étaient modulées par la différence de ratio des co-régulateurs endogènes SRC-1/SMRT entre les T-47D et les cellules tumorales de prostate HeLA (Liu, Auboeuf et al. 2002). Par conséquent, une variabilité des taux des co-régulateurs entre les HBE, les T-47D et les MCF-7 pourrait contribuer à expliquer la spécificité cellulaire des effets de l'UPA.

Le ratio de co-activateurs et co-répresseurs pourrait également expliquer l'absence d'effet agoniste de l'UPA dans les trois modèles cellulaires. En effet l'UPA avait montré des effets agonistes dans les MDA-MB-231 transfectées par les PR-A et les PR-B, indiquant que la capacité de cette molécule à se comporter comme un agoniste est influencée par le phénotype cellulaire (Leo and Lin 2008). L'absence d'effet agoniste de l'UPA sur les PR dans les HBE et les T-47D par rapport aux MDA-MB-231 pourrait donc

être liée à un ratio en faveur des co-répresseurs dans les HBE et les T-47D ou des co-activateurs dans les MDA-MB-231. En effet, une étude a par exemple montré que l'expression du co-activateur Amplified in Breast Cancer (AIB1) était corrélée avec le caractère invasif des tumeurs et était négative dans le tissu mammaire normal (Hudelist, Czerwenka et al. 2003). De plus, il a été montré que les taux de AIB1 étaient élevés dans les MDA-MB-231 et seulement modérés dans les T-47D (Li, Louie et al. 2008). Cela expliquerait l'existence des effets agonistes de l'UPA dans les MDA-MB-231.

Un autre aspect important de cette étude a été d'examiner les effets de l'UPA sur la prolifération et l'apoptose des cellules tumorales. La résultante des effets prolifératifs et apoptotiques dans les cellules traitées par P ou DEX, est en faveur d'une augmentation de la croissance de ces cellules puisque l'UPA inhibe les effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques des deux hormones dans les T-47D et les MCF-7. De façon surprenante, nous avons observé une action pro-apoptotique de la DEX dans les MCF-7 dans nos conditions expérimentales (**Figure 41 C**). En effet, un effet anti-apoptotique de cette molécule a plus généralement été décrit dans les cellules mammaires de sein, à l'exemple de nos observations dans les HBE (**Figure 41 A**), mais aussi d'autres types tissulaires, mettant en exergue la spécificité cellulaire des réponses hormonales (Moran, Gray et al. 2000; Pang, Kocherginsky et al. 2006). Nos propres résultats dans le laboratoire ont indiqué que la DEX pouvait diminuer l'apoptose des MCF-7 à des temps plus courts de traitement que ceux utilisés dans cette étude suggérant une action biphasique de la DEX sur les mécanismes apoptotiques des MCF-7 (données non montrées). Ces données suggèrent que l'UPA pourrait prévenir l'action anti-apoptotique des glucocorticoïdes endogènes ou exogènes dans les tumeurs mammaires, mais cela reste à confirmer *in vivo*. D'autre part, de nombreuses études avaient auparavant souligné le potentiel de l'utilisation de molécules antiprogestatives dans le traitement du cancer du sein et ont été résumées par J. Klijn (Klijn, Setyono-Han et al. 2000). La mifépristone et l'onapristone inhibent la croissance cellulaire des lignées tumorales positives pour PR ainsi que des tumeurs mammaires induites chez la souris (Bardon, Vignon et al. 1985; Bakker, Setyono-Han et al. 1987; Schneider, Michna et al. 1992; Klijn, Setyono-Han et al. 1994; Dannecker, Possinger et al. 1996; Poole, Li et al. 2006). L'administration d'un traitement de seconde ou troisième ligne par la mifepristone ou l'onapristone chez 123 femmes ménopausées présentant des cancers du sein métastatiques induit un taux de réponse objective de 11% des patientes et une

stabilisation de la maladie pour 43% d'entre elles (Romieu, Maudelonde et al. 1987; Klijn, de Jong et al. 1989). Malheureusement, les études cliniques n'ont pas été poursuivies en raison d'effets secondaires toxiques au niveau hépatique ainsi que des effets indésirables liés à l'action anti-glucocorticoïde de ces molécules. Cela renforce l'intérêt de développer des SPRM comme l'UPA dont les effets secondaires sont plus limités et qui devrait donc être examiné pour son potentiel anti-tumoral. De plus, dans notre étude, nous observons une capacité de l'UPA à inhiber l'expression des gènes *FASN* et *ALPL* induits par P, soulignant une action positive possible de cette molécule sur l'inhibition du développement des tumeurs mammaires métastatiques.

La résultante des effets de l'UPA sur la croissance cellulaire du sein normal est également difficile à déterminer en raison de ses effets variables sur la prolifération et l'apoptose selon le contexte hormonal. Cependant, nos résultats suggèrent que les effets de l'UPA tendraient à diminuer la croissance des HBE par inhibition de leur prolifération en présence de P ou de DEX, ainsi que par l'inhibition des effets anti-apoptotiques de la DEX. D'un autre côté, l'UPA réverse également les effets pro-apoptotiques induits par la P, laissant entrevoir une action complexe de l'UPA sur la croissance des cellules mammaires normales en présence de P.

Ces dernières observations ainsi que la spécificité cellulaire des réponses de l'UPA nous ont conduits à examiner ses actions dans un environnement plus proche des conditions physiologiques chez la femme. La glande mammaire greffée chez les souris traitées dans les conditions du cycle menstruel féminin constitue un modèle de choix pour étudier les réponses hormonales de ce tissu. Nos résultats indiquent tout d'abord que les galactophores semblent plus sensibles à l'action proliférative des hormones par rapport aux structures lobulaires. Toutefois, dans les lobules, la prolifération cellulaire semble accrue en présence de E2+P par rapport au groupe contrôle et même à l'E2 seul bien que ce résultat ne soit pas significatif. Cela pourrait suggérer que les cellules lobulaires seraient sensibles aux effets prolifératifs de la progestérone combinée à l'E2. La phase lutéale chez la femme correspond à une présence de progestérone couplée à l'estradiol ainsi qu'à la phase la plus proliférative des structures lobulo-alvéolaires (Ramakrishnan, Khan et al. 2002). De la même façon, la prolifération lobulo-alvéolaire est largement exacerbée lors de la grossesse pendant laquelle les taux de progestérone sont élevés. Nos résultats sont donc cohérents vis-à-vis de ces dernières observations.

Cette étude montre également que les effets prolifératifs observés dans les galactophores sont majoritairement régulés par la voie de signalisation estrogénique. Comme expliqué en introduction, des études avaient montré un effet prépondérant de l'E2 durant la phase lutéale avec un effet limité de la progestérone sur la prolifération globale du sein (Clarke, Howell et al. 1997; Foidart, Colin et al. 1998). Nous observons une absence d'action proliférative de la progestérone sur les cellules canalaires par rapport à l'E2 seul. Compte tenu des données de la littérature et de nos résultats, cela confirmerait que l'E2 serait majoritairement responsable du développement des galactophores pendant la puberté et la grossesse alors que la progestérone agirait de façon plus discrète sur la prolifération et dans les lobules plus spécifiquement. D'autre part, ce travail conforte l'idée d'une action limitée de l'UPA au niveau de l'activité proliférative du sein puisqu'il ne modifie pas l'index mitotique des lobules et des canaux, par rapport à l'estradiol seul ou à l'estradiol combiné à la progestérone. Ces résultats sont observés pour une concentration élevée de l'UPA ($63,49 \pm 10,46$ ng/ml). Cette concentration supérieure à celle de la progestérone a été choisie dans le but de pouvoir inhiber totalement les effets de cette dernière. De plus, il s'agit aussi de la concentration sérique rapportée chez la femme lors d'un essai clinique visant à traiter les fibromes de l'utérus par une administration quotidienne de 10 mg d'UPA pendant 3 mois (données HRA pharma). En revanche, ces résultats ne sont pas en accord avec une étude menée *in vivo* chez des femmes recevant 50 mg de mifépristone pendant trois mois. Les cellules mammaires de ces femmes recueillies par cytoponction par aspiration dans une aiguille, présentent une diminution significative de l'index mitotique par rapport au groupe placebo (Engman, Skoog et al. 2008). Cependant il est à noter que dans cette étude, les taux d'estradiol et de progestérone étaient significativement abaissés entre les deux groupes par un effet antagoniste du RU. De plus, la technique utilisée ne donne pas de renseignements histologiques et peut être associée à un problème de faible puissance, le recueil étant considéré comme significatif à partir de 50 cellules seulement (Engman, Skoog et al. 2008).

L'absence d'effet prolifératif de l'UPA que nous observons dans le tissu mammaire est cruciale pour permettre l'utilisation sur le long terme de cette molécule. Notre étude suggère donc que l'UPA ne présenterait pas d'effet marqué sur la croissance des cellules normales du sein, bien qu'une extension de nos observations chez la femme par une étude clinique soit souhaitable.

RESULTATS

DEUXIEME PARTIE :

**REGULATIONS HORMONALES DU
TISSU MAMMAIRE MUTE POUR
BRCA1 ET POSITIONNEMENT DE
L'ULIPRISTAL ACETATE**

RESULTATS

II. DEUXIEME PARTIE : REGULATIONS HORMONALES DU TISSU MAMMAIRE MUTÉ POUR *BRCA1* ET POSITIONNEMENT DE L'ULIPRISTAL ACETATE

Dans la deuxième partie de ce projet, nous avons focalisé nos études sur les régulations hormonales du tissu mammaire muté pour *BRCA1* et sur leurs implications potentielles dans la transformation tumorale liée à la mutation de ce gène. L'étude de ces régulations a tout d'abord porté sur la caractérisation des effets de l'estradiol, de la progestérone et de l'UPA dans le tissu muté *BRCA1^{+/−}*. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'expression des GR dans le tissu *BRCA1^{+/−}* ainsi que dans des tumeurs triple négatives de femmes mutées et non mutées, de façon à évaluer un rôle potentiel de ce récepteur dans la tumorigénèse *BRCA1*.

A. Caractérisation de la réceptivité hormonale du tissu mammaire normal muté par rapport au tissu non muté et positionnement de l'UPA

Nous avons cherché à savoir si des dérégulations hormonales préexistaient dans les cellules épithéliales du tissu mammaire humain normal des femmes mutées pour *BRCA1* par rapport au tissu *BRCA1^{+/+}*.

1) *In vitro*

Dans un premier temps, nous avons recherché s'il existait des variations de réponses hormonales entre les HBE provenant de patientes normales comparées aux HBE mises en culture à partir de patientes mutées. Pour cela, les cellules ont été traitées par les hormones ovarielles combinées ou non à l'UPA et l'induction de plusieurs gènes cibles de ces hormones a été observée par Q-PCR. Bien que ces expériences aient été réalisée sur 5 cultures *BRCA1^{+/+}* et 7 cultures *BRCA1^{+/−}*, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les réponses des cellules mutées et non mutées (données non montrées).

patientes mutées	1	2	3	4	5
âge	36	55	36	46	57
grossesses/parité (PGMT)	/	non	3/3 (27)	2/2 (24)	8/8 (24)
allaitements	/	non	oui	non	oui
ménopause	non	non	non	/	oui, à 41 ans
ovariectomie	non	non	non	oui, depuis 15 mois	non
antécédents personnels de cancer du sein	oui	non	non	oui	non
chimiothérapie	oui	non	non	oui	non
radiothérapie	oui	non	non	oui	non
antécédents personnels divers	non	- métrorragies sur uterus fibromateux - diabète insulino-dépendant - hypertension artérielle - hypercholestérolémie	non	lymphangite du sein ayant développé le cancer	non
mutations du gène <i>BRCA1</i>	c.1731C>T p.Gln538X	exon 16, 5083del19pb, 1670stop	exon 20, 5382insC	c.917_918delTT p.ser267fs	exon 11 c.2125_2126insA stop p.Phe709Tyr
Fonctions perdues démontrées	/	transcription	Réparation de l'ADN, apoptose, chimio-sensibilité	/	/

Tableau 5 : Caractéristiques des 5 patientes mutées pour *BRCA1* : âge des patientes le jour du prélèvement du tissu mammaire ; nombre de grossesses et de la parité associée, et âge de la première grossesse menée à terme (PGMT) ; le cas échéant, âge de la ménopause et/ou du recours à une ovariectomie ; antécédents de cancer et traitements du sein controlatéral de celui prélevé ; antécédents personnels divers ; mutations et fonctions connues comme altérées par la mutation (Linger and Kruk 2010). / : Informations manquantes.

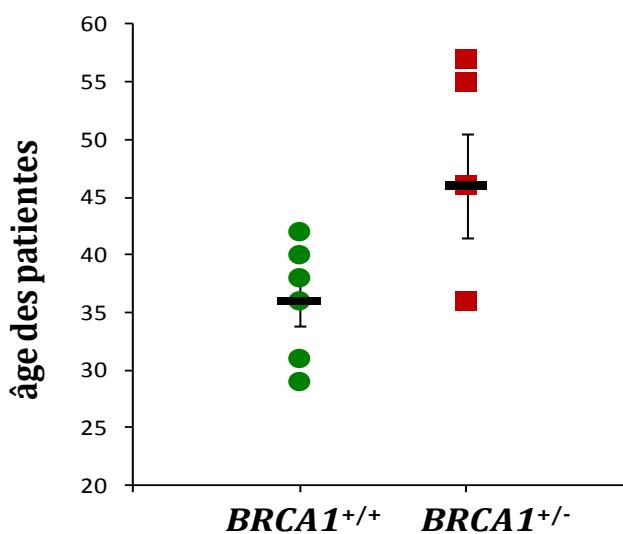


Figure 43 : Age des patientes prélevées pour l'étude de xénogreffes du tissu mammaire chez la souris. Les moyennes d'âge des 6 patientes non mutées (*BRCA1*^{+/+}) et des 5 patientes mutées (*BRCA1*^{+/-}) sont représentées par les barres — ± SEM.

De la même façon, les études de prolifération des HBE *BRCA1^{+/+}* et *BRCA1⁺⁻*, par incorporation de thymidine tritiée ou analyse du cycle cellulaire après traitement par E2, P, DEX et l'UPA seuls ou combinés, n'ont pas montré de différences significatives entre les cellules mutées et non mutées (données non montrées). Cependant une hétérogénéité importante des réponses a été observée en fonction de la glande mammaire d'origine.

En dépit des avantages de ce modèle, les cultures primaires possèdent malgré tout des limitations ; les taux des récepteurs hormonaux sont réduits par rapport au tissu *in vivo*, et les réponses obtenues sont faibles mais surtout hétérogènes d'une mise en culture à l'autre. Ce résultat signifie cependant que si des différences de réponses de signalisation des hormones existent dans le tissu mammaire muté, elles sont fines et certainement variables d'une patiente à l'autre puisque non appréciables dans ce modèle.

2) *In vivo*

Pour tenter d'analyser de façon plus sensible des différences de comportement en réponse aux traitement hormonaux entre le tissu muté et non muté, le modèle de greffes *in vivo* de tissu mammaire humain chez les souris immunodéficientes a été utilisé. En effet, ce modèle permet de se rapprocher de la situation hormonale physiologique féminine tout en conservant l'environnement tissulaire. Pour cette étude, nous avons recueilli le tissu de 6 patientes non mutées et de 5 patientes mutées pour *BRCA1*. Les informations concernant les patientes non mutées ont déjà été présentées en première partie dans le **Tableau 3**, et celles des patientes mutées sont répertoriées ici dans le **Tableau 5**. Les âges respectifs des patientes sont représentés en **Figure 43**, la moyenne d'âge étant de $36 \pm 2,1$ ans pour les patientes non mutées et de $46 \pm 4,5$ ans pour les patientes mutées. Les effets des traitements sur les fragments greffés ont été évalués sur deux paramètres : le niveau d'expression des récepteurs ER et PR, ainsi que l'activité proliférative du tissu. Ces paramètres ont systématiquement été examinés sur le tissu mammaire de chaque patiente avant les greffes grâce au prélèvement d'une zone adjacente à celle utilisée pour les greffons. Et ces caractéristiques ont également été analysées pour chacun des fragments greffés chez la souris après 28 jours de traitement par les différents stéroïdes.

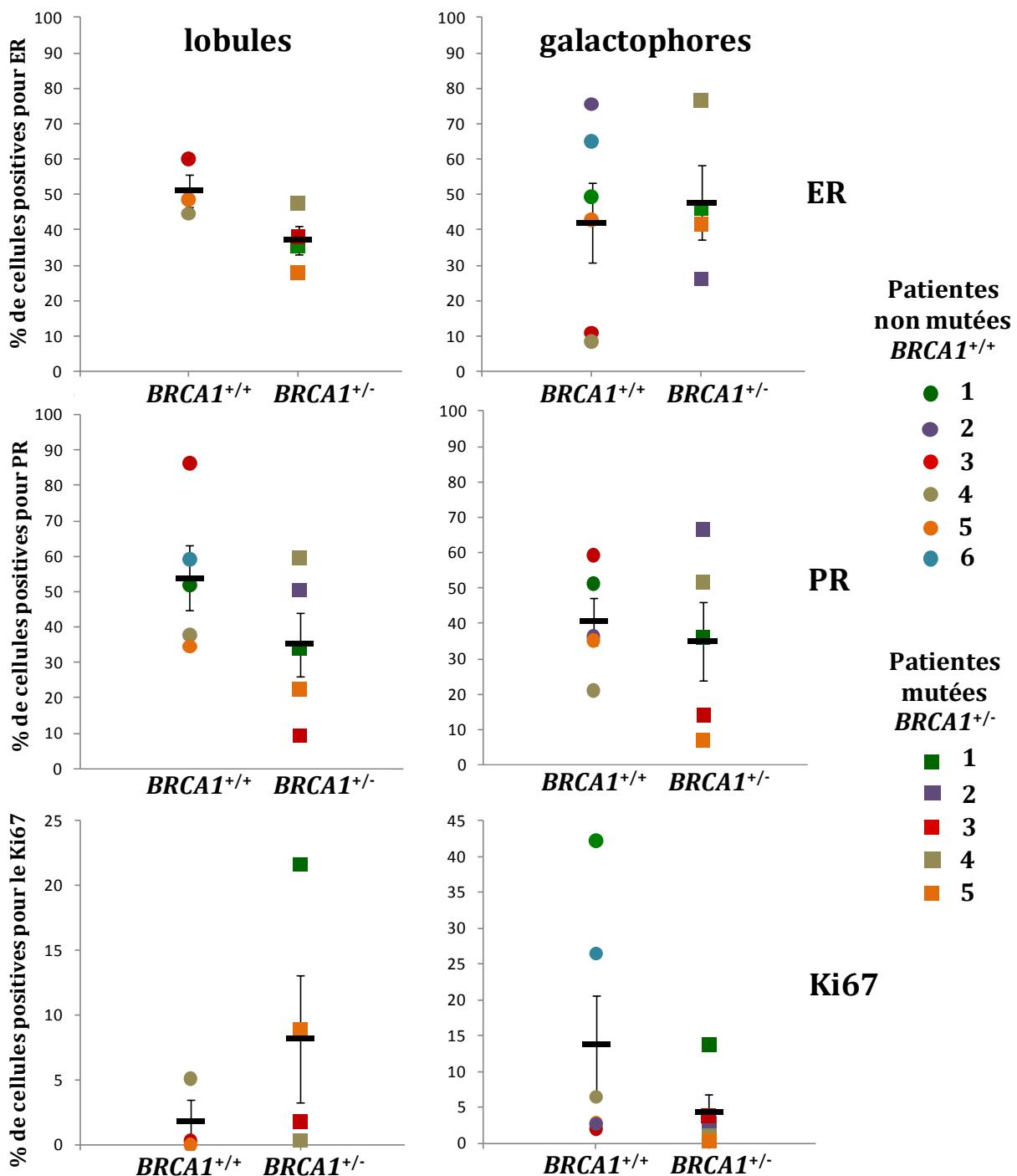


Figure 44 : Expression de ER α , PR et du Ki67 dans le tissu avant greffes des patientes non mutées ($BRCA1^{+/+}$) et mutées ($BRCA1^{+/-}$). L'expression de ces marqueurs est exprimée en pourcentage de cellules positives et a été quantifiée dans les cellules épithéliales luminales des lobules (panel de gauche) et des galactophores (panel de droite).

a. Tissus avant greffes

Comme rapporté en introduction, des différences d'expression des récepteurs hormonaux et notamment des PR ont été décrites dans la littérature dans le tissu mammaire normal *BRCA1^{+/−}* comparé au tissu *BRCA1^{+/+}*, mais ces données sont contradictoires. Nous avons donc commencé par observer l'expression des récepteurs dans les structures mammaires des tissus d'origine des patientes afin de voir si des différences étaient présentes dans notre étude. Le marquage nucléaire des ER et des PR a été quantifié séparément dans les lobules et les galactophores de la glande mammaire afin d'établir un pourcentage des cellules marquées pour chaque patiente. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 44**. De manière générale, les structures lobulaires ont été retrouvées moins fréquemment que les structures canalaires, expliquant le plus faible nombre d'échantillons décrits pour les lobules, puisque ces structures n'étaient pas présentes dans tous les tissus avant greffes.

Concernant l'expression des ER α , il semble que les cellules mutées *BRCA1^{+/−}* aient une tendance à exprimer plus faiblement le récepteur dans les lobules par rapport au tissu non muté ($51,0 \pm 4,6\%$ dans les lobules non mutés contre $37,3 \pm 4,0\%$ dans les lobules mutés). Mais cette différence n'est pas significative ($p = 0,0748$). Dans les galactophores, il n'y a pas de différence notable entre les deux types de tissus. Nous avons cependant observé une hétérogénéité plus marquée de l'expression des ER α entre les patientes dans les canaux par rapport aux lobules dans lesquelles cette expression est plus homogène (**Figure 44**).

Tout comme pour ER α , l'expression des PR semble diminuée dans les lobules du tissu muté ($35,1 \pm 10,6\%$) par rapport au tissu non muté ($53,9 \pm 14,7\%$) mais les niveaux d'expression lobulaire des PR sont plus variables que pour les ER entre les tissus des patientes mutées ou non (**Figure 44**). Dans les galactophores, aucune différence dans l'expression des PR n'a été mise en évidence entre le tissu muté et le tissu non muté, mise à part une plus grande hétérogénéité d'expression entre les patientes mutées (**Figure 44**). Afin de voir si cette hétérogénéité était expliquée par une répartition altérée du ratio PR-A/PR-B dans le tissu non muté comme cela avait été rapporté (Mote, Leary et al. 2004), nous avons également quantifié l'expression de PR-B dans les tissus avant greffes des femmes mutées et non mutées. Dans les tissus mutés

A

ER lobules	Patientes non mutées								Patientes mutées							
	1	2	3	4	5	6	moy	SEM	1	2	3	4	5	moy	SEM	
Avant greffes (%)	/	/	60,0	44,6	48,6	/	51,0	4,6	35,5	/	38,0	47,5	28,0	37,3	4,0	
Greffes C (%)	/	21,6	51,2	38,1	48,6	46,0	41,1	5,3	42,6	32,5	22,7	24,9	32,4	31,0	3,5	

ER galactophores	Patientes non mutées								Patientes mutées							
	1	2	3	4	5	6	moy	SEM	1	2	3	4	5	moy	SEM	
Avant greffes (%)	49,3	75,5	10,9	8,4	43,0	65,1	42,0	11,3	46,1	26,3	/	76,5	41,7	47,7	10,5	
Greffes C (%)	80,6	18,4	54,5	29,5	40,5	46,3	45,0	8,8	36,9	47,4	15,3	72,8	42,5	43,0	9,2	

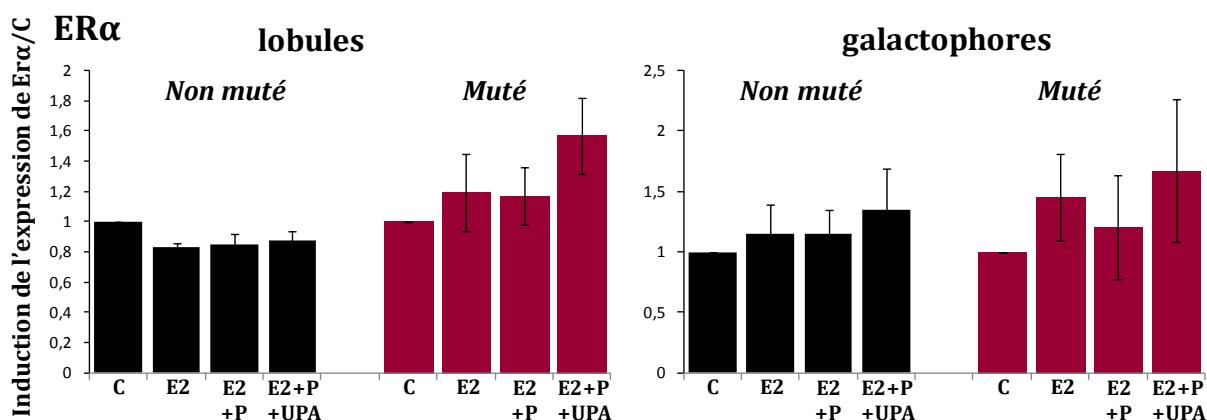
B

Figure 45 : Expression de ER α dans les lobules et les galactophores. **A.** Pourcentage des cellules exprimant ER α dans les tissus d'origine (Avant greffes) des patientes non mutées $BRCA1^{+/+}$ et mutées $BRCA1^{+/-}$, ainsi que dans les tissus greffés du groupe contrôle (Greffes C). La moyenne (moy) des pourcentages des tissus non mutés et des tissus mutés, ainsi que les SEM sont indiqués. / : Absence de structures. **B.** Expression de ER α dans les lobules et les galactophores des tissus greffés non mutés et mutés en réponse aux traitements (induction de l'expression de ER α par rapport au contrôle, moyenne \pm SEM). La patiente 1 non mutée ne présentait pas de structures lobulaires dans le groupe contrôle des greffes et n'a donc pas pu être incluse dans cette analyse.

pour *BRCA1*, les patientes 2 et 4 expriment une forte proportion de PR-B alors que les patientes 1, 3 et 5 sont totalement négatives pour cette isoforme. Ceci à l'inverse des 6 femmes non mutées qui expriment toutes l'isoforme PR-B (données non montrées).

Enfin, l'activité proliférative des tissus avant greffes a été examinée. De façon intéressante, les cellules lobulaires ont une tendance plus marquée à proliférer avec des variations importantes de l'index mitotique chez les patientes *BRCA1^{+/−}* par rapport aux tissus non mutés. Dans les galactophores, une relation inverse est observée avec une prolifération à la fois plus variable et plus marquée dans le tissu normal par rapport au tissu muté (**Figure 44**).

b. Effet des traitements sur les tissus greffés

Nous avons tout d'abord quantifié l'expression de ER α , dans les greffes de glande mammaire des 6 patientes non mutées *BRCA1^{+/+}* et des 5 patientes mutées *BRCA1^{+/−}*, pour chaque groupe de traitement. Dans les lobules des groupes contrôles, ER α est exprimé dans 21,6 à 51,2% des cellules de 5 tissus non mutés sur les 6 et dans 22,7 à 42,6% des cellules des 5 tissus mutés (**Figure 45 A**). Une faible diminution de l'expression des ER α dans les lobules des tissus mutés du groupe contrôle est observée, tout comme dans le tissu avant greffes, mais de façon non significative. Ces résultats suggèrent principalement que l'expression de ce récepteur est stable puisque relativement constante malgré l'absence d'hormones ovariennes pendant 28 jours, en comparaison des tissus avant greffes (**Figure 45 A**).

Dans les lobules des tissus greffés non mutés, nous avons observé que les variations d'expression de ER α en fonction des traitements étaient homogènes et que le taux des cellules marquées tendait à diminuer dans le tissu traité par l'E2, bien que cette diminution ne soit pas significative (**Figure 45 B**). En revanche, dans les lobules du tissu muté pour *BRCA1*, les niveaux d'expression de ce récepteur sont plus variables mais ces variations restent limitées et non significatives (**Figure 45 B**).

Dans les galactophores, l'expression de ER α dans les groupes contrôles est beaucoup plus hétérogène puisque retrouvée dans 18,4 à 80,6% des cellules dans le

A

PR lobules	Patientes non mutées								Patientes mutées							
	1	2	3	4	5	6	moy	SEM	1	2	3	4	5	moy	SEM	
Avant greffes (%)	51,8	/	86,3	37,7	34,5	59,2	53,9	9,3	33,9	50,5	9,4	59,4	22,5	35,1	9,1	
Greffes C (%)	/	/	22,2	18,6	22,4	7,4	17,7	3,5	/	/	18,2	11,8	4,7	11,6	3,9	

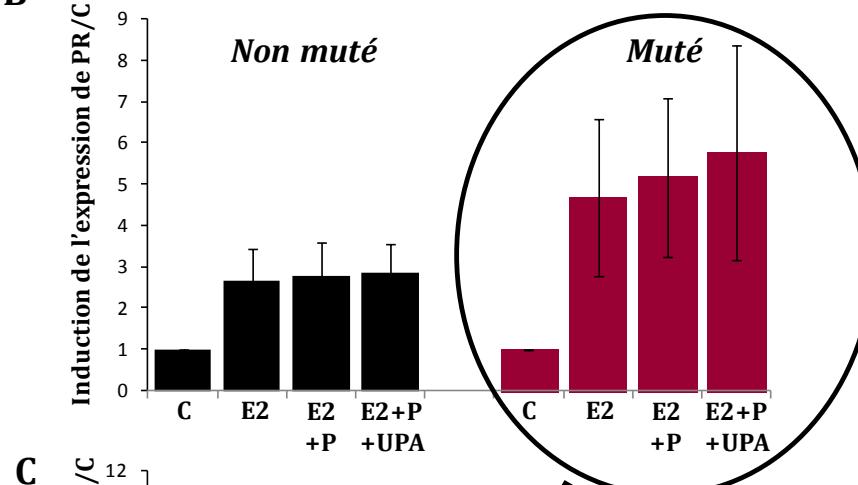
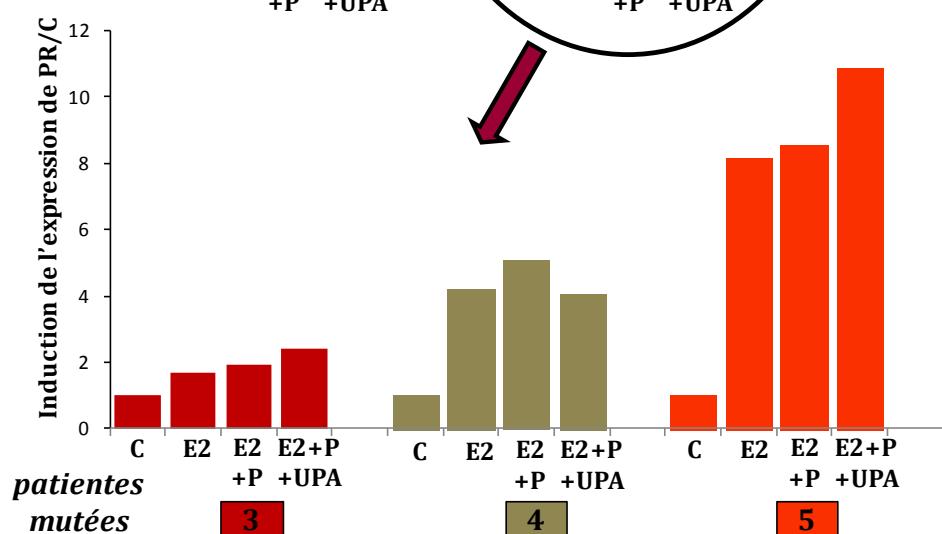
B**C**

Figure 46 : Expression de PR dans les lobules. **A.** Pourcentage des cellules exprimant PR dans les tissus d'origine (Avant greffes) des patientes non mutées $BRCA1^{+/+}$ et mutées $BRCA1^{+/-}$, ainsi que dans les tissus greffés du groupe contrôle (Greffes C). La moyenne (moy) des pourcentages des tissus non mutés et des tissus mutés, ainsi que les SEM sont indiqués. / : Absence de structures. **B.** Expression de PR dans les lobules des tissus greffés non mutés et mutés en réponse aux traitements (induction de l'expression de PR par rapport au contrôle, moyenne \pm SEM). Les patientes 1 et 2 non mutées et mutées ne présentaient pas de structures lobulaires dans le groupe contrôle des greffes et n'ont donc pas pu être incluses dans cette analyse. **C.** Variations individuelles de l'expression des PR dans le tissu greffé des patientes mutées (induction de l'expression de PR par rapport au contrôle).

tissu non muté et dans 15,3 à 72,8% des cellules dans le tissu muté (**Figure 45 A**). Cela rappelle l'hétérogénéité des taux observés dans les galactophores des tissus avant greffes. Des variations d'expression conséquentes sont d'ailleurs retrouvées pour une même patiente entre les galactophores des tissus avant greffe et des tissus greffés. Cependant, l'expression de ER dans les greffes ne varie pas significativement dans les groupes traités des tissus *BRCA1^{+/+}* et *BRCA1⁺⁻*, suggérant donc une action limitée des hormones sur le niveau d'expression de ER dans les structures canalaires des deux types de tissu (**Figure 45 B**).

Les taux d'expression des PR dans les lobules des groupes contrôles des tissus non mutés vont de 7,4 à 22,4% de cellules marquées dans le tissu non muté et de 4,7 à 18,2% dans le tissu muté, ce qui signifie que l'expression des PR chute drastiquement après 28 jours en absence d'hormones ovariennes puisque les pourcentages de cellules avant greffes étaient plus importants dans les deux types de tissu (**Figure 46 A**). Cependant, une induction du niveau de ces récepteurs est observée dans les tissus non mutés pour les groupes E2, E2+P et E2+P+UPA, bien que cette augmentation ne soit pas significative par rapport au groupe contrôle (**Figure 46 B**). Dans les lobules du tissu muté, le profil des variations liées aux traitements est beaucoup plus hétérogène, mais aussi globalement plus augmenté que dans le tissu non muté pour les trois groupes de traitement. Les valeurs individuelles observées dans le tissu de trois des patientes *BRCA1⁺⁻* illustrent cette hétérogénéité observée, par les nettes différences d'induction des PR dans les groupes de traitement comportant E2 entre la patiente 3 et la patiente 5 (**Figure 46 C**). L'UPA ne semble pas exercer d'effet marqué sur l'expression des PR par rapport au groupe E2+P. Il est à noter que le marquage observé pour les patientes 3 et 5 ne devrait représenter que l'expression de l'isoforme PR-A, puisque l'absence de l'isoforme PR-B a été démontrée dans le tissu avant greffe de ces patientes. Les patientes mutées 1 et 2 ne présentaient pas de structures lobulaires dans les lames marquées pour PR et n'ont donc pas pu être intégrées dans l'analyse. Il en est de même pour les patientes 1 et 2 non mutées (**Figure 46 A**).

Au niveau des galactophores, les taux de PR dans les groupes contrôles sont de 6,5 à 28,5% de cellules marquées dans le tissu non muté, indiquant que l'expression du récepteur est largement diminuée en absence d'hormones dans les canaux du tissu non muté par rapport au tissu avant greffes (**Figure 47 A**). En revanche, dans les tissus

A

PR galactophores	Patientes non mutées								Patientes mutées							
	1	2	3	4	5	6	moy	SEM	1	2	3	4	5	moy	SEM	
Avant greffes (%)	51,2	36,3	59,3	21,1	35,3	/	40,6	6,7	36,0	66,4	14,1	51,7	6,9	35,0	11,2	
Greffes C (%)	28,5	14,6	28,9	6,5	26,9	15,3	20,1	3,8	10,8	59,8	4,5	35,3	1,7	22,4	11,1	

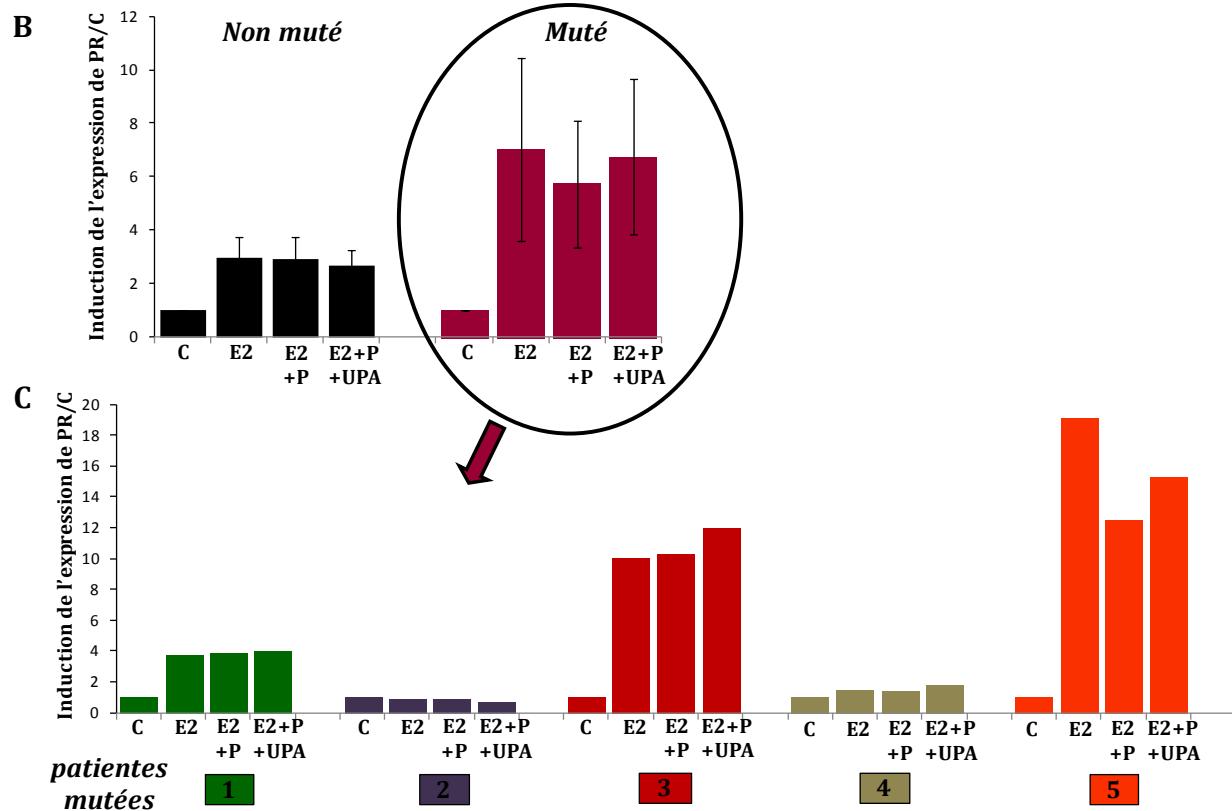


Figure 47 : Expression de PR dans les galactophores. **A.** Pourcentage des cellules exprimant PR dans les tissus d'origine (Avant greffes) des patientes non mutées $BRCA1^{+/+}$ et mutées $BRCA1^{+/-}$, ainsi que dans les tissus greffés du groupe contrôle (Greffes C). La moyenne (moy) des pourcentages des tissus non mutés et des tissus mutés, ainsi que les SEM sont indiqués. / : Absence de structures. **B.** Expression de PR dans les galactophores des tissus greffés non mutés et mutés en réponse aux traitements (induction de l'expression de PR par rapport au contrôle, moyenne \pm SEM). La patiente 6 non mutée ne présentait pas de structures lobulaires dans le groupe contrôle des greffes et n'a donc pas pu être incluse dans cette analyse. **C.** Variations individuelles de l'expression des PR dans le tissu greffé des patientes mutées (induction de l'expression de PR par rapport au contrôle).

mutés du groupe C, l'expression de PR est trouvée dans 1,7 à 59,8% des cellules indiquant que cette diminution d'expression n'est pas observée dans les tissus de toutes les patientes *BRCA1^{+/−}*, ce qui montre à nouveau une hétérogénéité plus marquée. Par exemple, la patiente 2 *BRCA1^{+/−}* présentait 66,4% de cellules positives pour PR avant greffes (**Figure 47 A**) et ce taux se maintient à 59,8% après 28 jours en absence d'hormones. De façon intéressante, cette observation n'a été faite pour aucune des patientes non mutées. Dans les tissus greffés des groupes traités, l'expression des PR semble ré-induite dans les deux types de tissu mais de façon non significative et sans distinction d'effet entre les groupes E2, E2+P, et E2+P+UPA (**Figure 47 B**). Les variations des réponses entre les tissus de chaque patiente mutée sont illustrées en **Figure 47 C**. Dans le tissu muté, la présence d'E2 induit des variations de l'expression des PR par rapport aux groupes contrôles qui s'échelonnent entre 0,83 fois dans le tissu de la patiente 2, jusqu'à 19 fois dans le tissu de la patiente 5 (**Figure 47 C**). Dans le tissu non muté, ces inductions de l'expression de PR par E2 sont plus homogènes puisque seulement comprises entre 1,1 à 6,7 fois l'expression de PR par rapport aux tissus du groupe contrôle. Il est à noter que le marquage observé pour les patientes, 1, 3 et 5 représente uniquement l'expression de l'isoforme PR-A. Cela correspond aux patientes qui montrent les augmentations d'expression de PR les plus élevées dans les greffes traitées par l'E2, E2+P et E2+P+UPA. L'UPA ne perturbe pas l'expression de PR dans les galactophores, comparativement au groupe E2+P (**Figure 47 B et C**).

L'activité proliférative a ensuite été examinée. Dans les lobules des deux groupes de tissu, la moyenne des taux de prolifération est diminuée dans le groupe C par rapport au tissu avant greffes (**Figure 48 A**). La prolifération observée dans les groupes contrôles du tissu non muté est faible et homogène de 2,1 à 3,1% de cellules exprimant le Ki67 entre les patientes. En revanche, dans le tissu muté, cette expression est plus hétérogène et s'étend de 0,2 à 8,8% de cellules marquées entre les tissus des différentes patientes, signifiant que l'absence d'hormones ne permet pas de diminuer la prolifération des tissus de toutes les patientes mutées, à l'exemple des patiente 4 et 5 (**Figure 48 A**). L'action des traitements sur la prolifération lobulaire du tissu non muté est limitée et non significative (**Figure 48 B**). Une homogénéité des réponses est observée avec une induction maximale observée dans les groupes traités de 3,2 fois l'activité proliférative dans le groupe E2+P par rapport au groupe C. En revanche dans le tissu muté, ces variations sont plus hétérogènes d'une patiente à l'autre et ont donc été

A

Ki67 lobules	Patientes non mutées								Patientes mutées							
	1	2	3	4	5	6	moy	SEM	1	2	3	4	5	moy	SEM	
Avant greffes (%)	/	/	0,3	5,1	0,0	/	1,8	1,7	21,6	/	1,8	0,4	8,9	8,2	4,9	
Greffes C (%)	/	/	3,1	2,1	2,4	3,1	1,8	0,6	0,2	0,4	2,2	2,1	8,8	2,7	1,6	

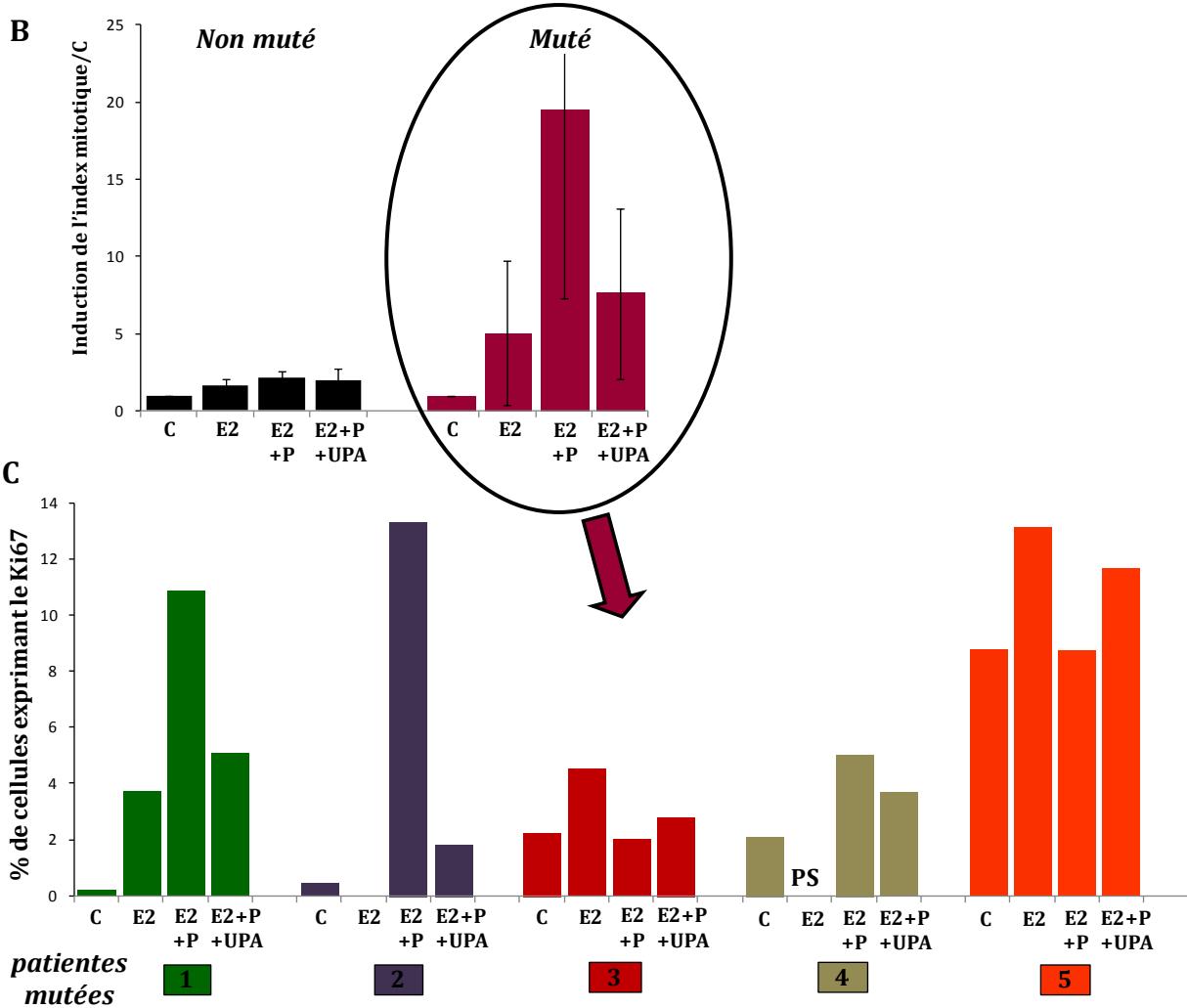


Figure 48 : Expression du Ki67 dans les lobules. **A.** Pourcentage des cellules exprimant le Ki67 dans les tissus d'origine (Avant greffes) des patientes non mutées $BRCA1^{+/+}$ et mutées $BRCA1^{+/-}$, ainsi que dans les tissus greffés du groupe contrôle (Greffes C). La moyenne (moy) des pourcentages des tissus non mutés et des tissus mutés, ainsi que les SEM sont indiqués. / : Absence de structures. **B.** Expression du Ki67 dans les lobules des tissus greffés non mutés et mutés en réponse aux traitements (induction de l'expression du Ki67 par rapport au contrôle, moyenne \pm SEM). Les patientes 1 et 2 non mutées ne présentaient pas de structures lobulaires dans le groupe contrôle des greffes et n'ont donc pas pu être incluses dans cette analyse. **C.** Variations individuelles du pourcentage de cellules exprimant le Ki67 dans le tissu greffé des patientes mutées. PS : pas de structures observées pour cette condition, qui n'a donc pas été incluse dans la moyenne calculée dans le graphe B.

représentées individuellement en **Figure 48 C**, en pourcentage brut de cellules marquées pour le Ki67. Dans le tissu des patientes mutées 1 et 2, nous observons que l'induction du Ki67 est particulièrement exacerbée par la progestérone. Dans le tissu de la patiente 1, le niveau d'expression du Ki67 est triplé par rapport à l'E2 seul. Pour la patiente 2, la condition E2+P est également responsable d'une forte induction des niveaux du Ki67, alors que l'E2 seul est inefficace à induire la prolifération. Dans les tissus des patientes 3 et 4, les inductions du Ki67 dans les groupes traités sont cependant plus modérées, et sont similaires à celles observées dans le tissu des patientes non mutées (**Figure 48 B et C**). Concernant la patiente 5, les résultats sont singuliers puisque cette patiente montre une prolifération importante dans le groupe C. Cette prolifération est légèrement augmentée avec E2. Cet effet E2-dépendant est inhibé totalement dans le groupe E2+P mais seulement partiellement dans le groupe E2+P+UPA, suggérant une action inhibitrice de la P sur l'activité proliférative de E2. Il est à noter que cette patiente présentait déjà une prolifération élevée dans les lobules avant greffes, du même ordre que celle observée dans les groupes C, signifiant que la prolifération des lobules de cette patiente n'est pas diminuée en absence d'hormones. L'UPA réverse l'action proliférative exacerbée de la progestérone dans le tissu greffé des patientes 1 et 2 mutées. L'UPA inhibe également l'effet antiprolifératif de P observé dans le tissu de la patiente 5 mutée (**Figure 48 C**).

Dans les galactophores, les niveaux de prolifération observés dans le groupe C des tissus non mutés étaient de l'ordre de 0,2 à 2,5% de cellules positives pour le Ki67, signalant une chute drastique et homogène de l'activité proliférative en absence d'hormones par rapport aux tissus avant greffes dont la prolifération moyenne était de 13,7% (**Figure 49 A**). De la même façon que pour les lobules, dans les canaux des tissus mutés du groupe C, l'expression du Ki67 varie de 0,4 à 8,7% indiquant que l'absence d'hormones pendant 28 jours ne provoque pas la diminution de la prolifération dans tous les tissus (**Figure 49 A**). En effet, un effet inverse est même observé dans le tissu de la patiente 5 puisque le marquage du Ki67 passe de 0,3% avant greffes à 8,7% dans le groupe C (**Figure 49 A**). Ce phénomène n'est observé dans aucun des tissus non mutés. Ces derniers voient leur activité proliférative significativement augmentée dans les groupes E2, E2+P et E2+P+UPA dans les canaux ($p < 0,05$), sans différences notables entre les groupes E2+P et E2+P+UPA par rapport à l'E2 seul (**Figure 49 B**). Tout comme observé dans les lobules, les galactophores des tissus mutés pour *BRCA1* présentent un

A

Ki67 galactophores	Patientes non mutées								Patientes mutées							
	1	2	3	4	5	6	moy	SEM	1	2	3	4	5	moy	SEM	
Avant greffes (%)	42,2	2,7	2,0	6,5	2,6	26,4	13,7	6,9	13,7	2,7	3,8	1,1	0,3	4,3	2,4	
Greffes C (%)	0,2	2,3	0,8	2,5	1,9	2,4	1,7	0,4	0,4	1,0	3,3	1,7	8,7	3,0	1,5	

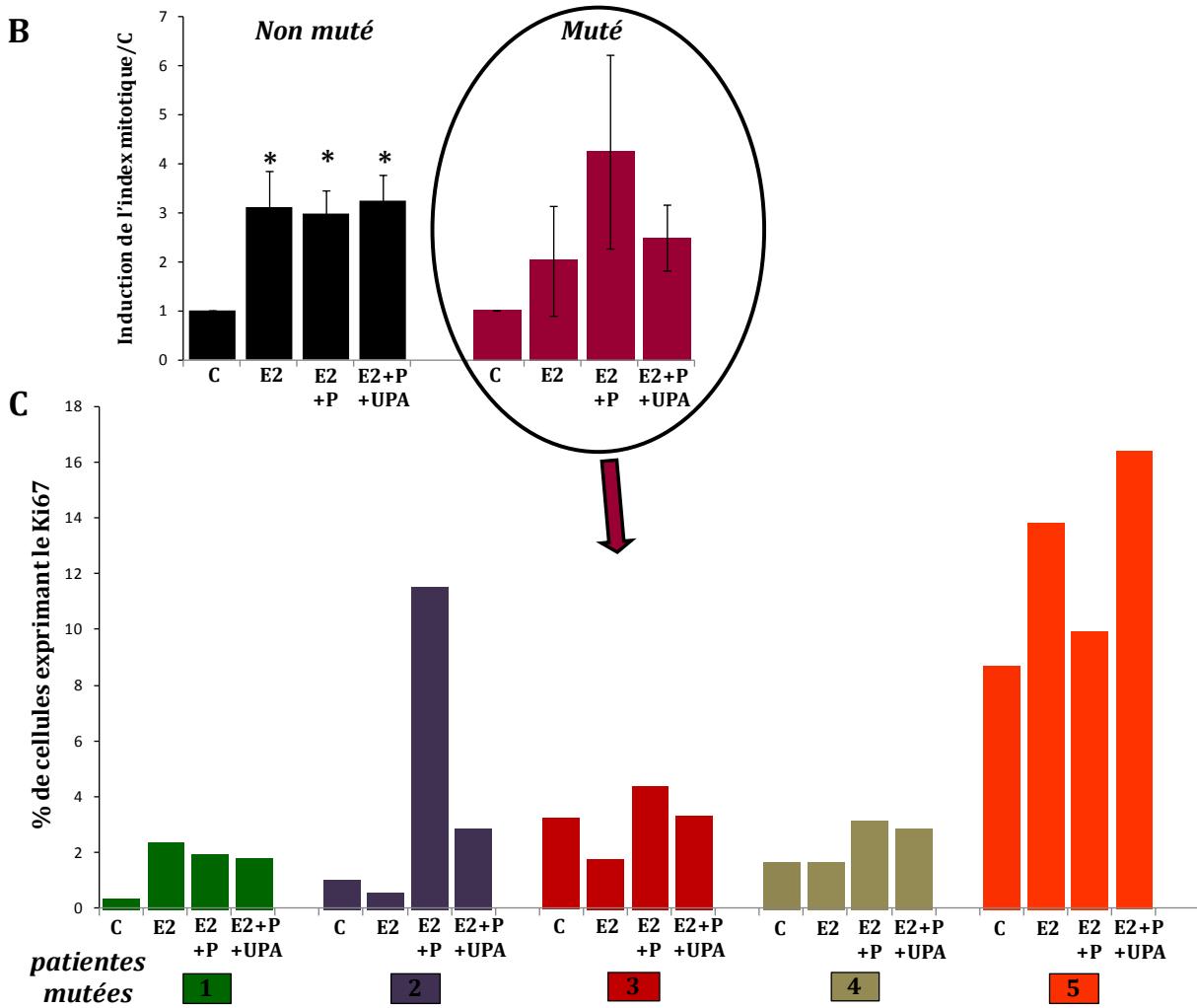


Figure 49 : Expression du Ki67 dans les galactophores. **A.** Pourcentage des cellules exprimant le Ki67 dans les tissus d'origine (Avant greffes) des patientes non mutées $BRCA1^{+/+}$ et mutées $BRCA1^{+/-}$, ainsi que dans les tissus greffés du groupe contrôle (Greffes C). La moyenne (moy) des pourcentages des tissus non mutés et des tissus mutés, ainsi que les SEM sont indiqués. **B.** Expression du Ki67 dans les galactophores des tissus greffés non mutés et mutés en réponse aux traitements (induction de l'expression du Ki67 par rapport au contrôle, moyenne \pm SEM, * $p<0,05$). **C.** Variations individuelles du pourcentage de cellules exprimant le Ki67 dans le tissu greffé des patientes mutées.

profil de réponses aux hormones différent de celui du tissu non muté et associé à une variabilité interindividuelle prononcée (**Figure 49 B et C**). En effet, la prolifération des tissus induite par les traitements est nettement supérieure dans les tissus des patientes *BRCA1* 2 et 5 par rapport aux tissus des trois autres patientes mutées ainsi qu'aux tissus non mutés. A nouveau pour la patiente 2, l'augmentation de prolifération est particulièrement importante dans le groupe E2+P alors qu'elle est plus modérée dans le groupe E2+P+UPA indiquant un effet prolifératif induit par l'action de la progestérone et inhibé par l'UPA (**Figure 49 C**). Le tissu mammaire de la patiente 5 présente des taux prolifératifs extrêmement élevés dans le groupe C avec un effet prolifératif de l'E2 et antiprolifératif de la P, comme observé dans les lobules de cette patiente. Cet effet antiprolifératif de P est inhibé par l'UPA chez cette patiente. Cependant, pour les patientes *BRCA1* 1, 3 et 4, l'activité proliférative observée en condition contrôle et en présence des hormones, reste limitée dans les galactophores (**Figure 49 C**).

Ces données montrent nettement que les activités prolifératives sont perturbées dans le tissu normal hétérozygote pour *BRCA1* de certaines patientes, avec une action « non standardisée » des hormones, puisque spécifique à la fois des patientes et des structures observées.

3) DISCUSSION

Cette étude nous indique donc en premier lieu que les réponses cellulaires aux hormones observées dans le tissu mammaire hétérozygote pour le gène *BRCA1* sont hétérogènes et complexes autant au niveau de l'expression des récepteurs hormonaux et notamment des PR, mais aussi de l'activité proliférative. En effet, si les actions des hormones dans le tissu non muté sont relativement homogènes pour l'ensemble des marqueurs observés, les réponses aux hormones dans le tissu muté montrent systématiquement une plus grande disparité associée à des effets prolifératifs aberrants. Cette disparité est dépendante à la fois des séries de tissu mais aussi des traitements et des structures examinées. Plusieurs hypothèses ont été suggérées selon les marqueurs observés, afin d'expliquer cette hétérogénéité.

Tout d'abord une légère diminution de l'expression de ER α est observée dans les lobules mutés par rapport aux lobules non mutés avant greffes ainsi que dans les groupes contrôles des tissus greffés. Cela pourrait correspondre à une diminution de la

différentiation des cellules en raison de l'haplo-insuffisance de *BRCA1* comme nous l'avons abordé en introduction. Les conséquences de cette haplo-insuffisance se répercuteraient sur la capacité de *BRCA1* à différencier les cellules progénitrices en cellules luminales exprimant les récepteurs nucléaires ER et PR comme l'avaient indiqué plusieurs études (Liu, Ginestier et al. 2008; Lim, Vaillant et al. 2009; Proia, Keller et al. 2011). Cependant, une autre étude ne montrait pas de différence d'expression du récepteur ER α entre les tissus mammaires normaux mutés et non mutés pour *BRCA1*, mais cette étude ne distinguait pas les structures lobulaires et canalaires et les différences d'expression du récepteur dans les lobules pouvaient donc être masquée par l'hétérogénéité importante des taux d'expression de ER α dans les galactophores (Mote, Leary et al. 2004). Le niveau d'expression de ER α nécessite donc d'être précisé par l'étude d'un plus grand nombre de patientes mutées et non mutées. Par ailleurs, le niveau d'expression des ER α ne témoigne pas forcément de son activité et les recherches doivent donc être étendues à la signalisation cellulaire régulée par les ER α , puisqu'il a été montré que cette dernière était amplifiée par la perte d'expression de *BRCA1* *in vitro* (Fan, Ma et al. 2001).

Parmi les gènes cibles de ER α , des différences d'expression du récepteur PR entre le tissu muté et non muté sont d'ailleurs observées. Tout comme pour les ER, l'expression de PR dans les lobules avant greffes tend à être plus faible dans le tissu non muté. D'autre part, nous observons que l'isoforme PR-B n'est pas exprimée dans le tissu mammaire avant greffes de 3 femmes sur 5. Cela va dans le sens d'une précédente étude qui avait signalé une diminution d'expression des récepteurs PR dans le tissu *BRCA1* $^{+/-}$, et plus particulièrement du récepteur PR-B (Mote, Leary et al. 2004). Cette diminution d'expression du PR total et du PR-B pourrait être liée à deux mécanismes non exclusifs dans les cellules mutées :

1) une voie de signalisation estrogénique altérée en raison de l'haplo-insuffisance de *BRCA1* et conduisant à des perturbations de l'expression du gène *PR* dépendante de l'estradiol. En conditions normales, l'estradiol permet en effet d'induire la transcription des ARNm de *PR*. Dans les cellules mutées, il est possible que cet effet soit altéré. Cependant, nous observons une diminution de l'expression de PR et notamment de PR-B dans les cellules mutées, ce qui ne va pas dans le sens de l'augmentation des effets transcriptionnels de ER décrite en absence de *BRCA1* (Fan, Ma et al. 2001).

2) une dérégulation des interactions directes existantes entre BRCA1 et les PR, également liée à l'haplo-insuffisance de *BRCA1*. La perte d'expression de l'isoforme PR-B pourrait résulter d'une répression de transcription spécifique du PR-B et pas du PR-A, ou d'une dégradation exacerbée de cette isoforme. La dégradation par ubiquitination et envoie vers le protéasome est induite par BRCA1 (Ma, Katiyar et al. 2006; Poole, Li et al. 2006). Il paraît donc surprenant que ce mécanisme soit amplifié en absence d'une des deux formes sauvages. En revanche l'implication de BRCA1 dans le remodelage de la chromatine et la transcription génique pourrait intervenir dans l'expression de l'isoforme PR-B. De la même façon que BRCA1 est capable d'induire l'expression de ER α (Hosey, Gorski et al. 2007), il est effectivement possible que cette protéine puisse jouer un rôle dans la transcription de PR-B en ouvrant la chromatine au niveau de son promoteur, ou bien en favorisant le recrutement de co-activateurs spécifiquement sur le promoteur de PR-B. En effet l'implication de BRCA1 dans le remodelage chromatiniens a été décrite, de même que ses interactions avec des protéines de remodelage et des facteurs de transcription pour faciliter l'accès et activer la machinerie de transcription sur les promoteurs (Pao, Janknecht et al. 2000; Rosen, Fan et al. 2003; Mullan, Quinn et al. 2006). Il a par ailleurs déjà été démontré que la perte d'expression de PR-B retrouvée dans certaines tumeurs mammaires, pouvait être la conséquence d'une hyperméthylation de son promoteur, entraînant une inhibition de sa transcription. Ce mécanisme pourrait être inhibé par BRCA1 en condition normale, et cet effet pourrait être perdu dans les cellules mutées. De plus amples études sont donc nécessaires pour rechercher des relations spécifiques entre l'isoforme PR-B et la protéine BRCA1 et le marquage distinctif de PR-B est en cours de réalisation sur les tissus d'un plus grand nombre de patientes.

Au niveau des conséquences cellulaires de la perte d'expression de PR-B, une étude a indiqué que dans les cancers, l'expression de cette isoforme est associée à un meilleur pronostic (Mc Cormack, Chung et al. 2008). La perte d'expression de PR-B pourrait donc être un témoin de transformation tumorale précoce du tissu, comme cela a déjà été montré dans des hyperplasies (Mote, Bartow et al. 2002). Les conséquences de la perte de PR-B pourraient aussi se traduire par un contrôle anormal des actions de P compte tenu du fait que les gènes cibles de PR-A et PR-B soient partiellement communs mais diffèrent en majorité (Graham, Yager et al. 2005; Jacobsen, Schittone et al. 2005). Il a été rapporté dans des modèles *in vitro* qu'une expression de PR-A supérieure à celle de

PR-B modifiait les signaux habituellement induits par P en particulier au niveau des molécules d'adhésion cellulaire (Graham, Yager et al. 2005). En ce qui concerne la prolifération et la différentiation, PR-B est responsable du développement lobulo-alvéolaire dans des modèles de souris KO ou transgéniques (Mulac-Jericevic, Mullinax et al. 2000; Mulac-Jericevic, Lydon et al. 2003). De plus, notre groupe a observé dans des cellules MDA-MB-231 transfectées stablement par PR-A ou PR-B, que P et des progestatifs de synthèse exerçaient un effet antiprolifératif sur les clones PR-B mais pas sur les clones PR-A (A. Courtin *et al*, données non publiées). La perte de PR-B pourrait donc être responsable d'un effet différent de P sur la prolifération et la différentiation cellulaire. Ceci n'est cependant pas totalement concordant avec les résultats observés sur la prolifération en présence d'E2+P dans nos expériences (**Figures 48 et 49**). En effet parmi les patientes n'exprimant plus PR-B (1, 3 et 5), seule la patiente 1 montre un effet prolifératif du traitement E2+P dans les lobules, ainsi que la patiente 3 dans les galactophores. Chez la patiente 5, la progestérone est antiproliférative. En revanche, les patientes 2 et 4 pour lesquelles PR-B est exprimé, montrent toutes les deux une action proliférative de P. Ces résultats suggèrent que dans le tissu muté, des effets prolifératifs pourraient être dispensés par les deux isoformes, mais aussi que PR-A pourrait permettre une action anti-proliférative de P à l'exemple de la patiente 5. Cependant, l'expression de PR-B a pour l'instant été caractérisée dans les tissus avant greffes uniquement. Nous devons donc confirmer cette observation dans les tissus greffés des patientes afin de vérifier que la perte de PR-B observées chez les patientes 1, 3 et 5 ne soit pas uniquement restreinte à la zone non greffée mais puisse être corrélée aux observations faites dans les greffes.

D'autre part, il a été rapporté *in vitro* et *in vivo* que les effets purement antagonistes des antiprogestatifs passaient principalement par les isoformes PR-A (Leo and Lin 2008; Wargon, Helguero et al. 2009). Il serait donc logique de s'attendre à un effet antiprogestatif exacerbé de l'UPA dans le tissu ayant perdu PR-B. Une action antiprogestative de l'UPA est effectivement observée au niveau des effets de P sur la prolifération, particulièrement chez la patiente 1 et 5 mais de façon plus limitée chez la patiente 3. De plus ces effets antagonistes ne sont pas plus puissants que ceux observés chez les patientes exprimant le PR-B, comme la patiente 2. Cela signifie que des effets antiprogestatifs peuvent être attendus chez les patientes exprimant soit PR-A seul soit les deux isoformes. L'UPA serait donc efficace pour inhiber les effets prolifératifs de la

progesterone même chez les patientes ayant perdu PR-B. Ce résultat est capital dans l'idée de son utilisation préventive chez les femmes mutées. Les effets prolifératifs exacerbés de la progesterone observés dans le tissu des femmes mutées pourraient être inhibés par un antiprogestatif comme l'UPA, ce qui réduirait le risque de transformation tumorale dans les cellules mutées.

La caractérisation de l'activité proliférative des tissus *BRCA1* confirme la présence de dérégulations des réponses cellulaires aux hormones dans le tissu normal muté pour *BRCA1*. Il était plausible de s'attendre à des dérégulations du même ordre entre les patientes mutées, les mutations du gène *BRCA1* conduisant soit à l'absence d'expression de la protéine soit à des pertes de ses fonctions. Cependant, seules 3 patientes mutées sur les 5 n'expriment plus PR-B dans le tissu avant greffes, et nous observons des profils de réponses prolifératives aux hormones très hétérogènes entre les patientes. Les dérégulations de réponses par rapport au tissu non muté sont surtout flagrantes dans le tissu de trois des patientes *BRCA1* sur lesquelles nous nous sommes donc concentrés afin d'évaluer plus précisément les mécanismes impliqués.

- La patiente 1 *BRCA1^{+/−}* présente une perte d'expression de PR-B associée à une élévation aberrante de son index mitotique par l'estradiol mais surtout par P. L'haplo-insuffisance de *BRCA1* pourrait donc être responsable d'une levée d'inhibition des effets prolifératifs de ces deux hormones, qui pourrait être menée par l'isoforme PR-A en ce qui concerne les réponses à la progesterone.
- La patiente 2 *BRCA1^{+/−}* présente également des activités prolifératives anormales associées à des perturbations du profil des récepteurs de la progesterone, mais de façon différente de la patiente 1. L'expression des PR de cette patiente est élevée dans le tissu avant greffes mais ne varie pas après 28 jours sans hormones ou bien en présence d'E2 dans les greffes, contrairement aux observations faites dans le tissu des autres femmes mutées ou non mutées. Les PR sont donc exprimés constitutivement dans ce tissu, et indépendamment des effets de l'E2. Cette expression constitutive pourrait être la conséquence soit d'une dérégulation transcriptionnelle du gène PR qui serait constamment activé, soit d'un défaut du système de dégradation des protéines PR. Cette dernière hypothèse semble la plus probable dans les cellules mutées, étant donné le rôle décrit de *BRCA1* dans la dégradation des PR (Ma, Katiyar et al. 2006; Poole, Li et al.

2006). Le tissu de cette patiente est soumis à un effet prolifératif très important de la progestérone dans les lobules et les galactophores. Cela suggère donc également une activation exacerbée de la signalisation des PR par la progestérone. L'haplo-insuffisance de *BRCA1* pourrait être associée à une diminution de la capacité de *BRCA1* à inhiber les activités transcriptionnelles des PR (Ma, Katiyar et al. 2006). Cela nécessite d'être approfondi par l'étude de gènes cibles des PR dans les greffes.

- Le tissu de la patiente 5 *BRCA1*^{+/−} présente un index mitotique élevé malgré l'absence d'hormones dans les greffes du groupe C. Cela est associé à une perte de l'expression de PR-B, à une faible expression de PR-A avant greffes ainsi que dans les greffes du groupe C. En somme, le tissu de cette patiente présente plutôt des caractéristiques de cellules situées à un niveau intermédiaire de différentiation proche des progénitrices qui expriment peu les récepteurs et sont plus prolifératives. Il est à noter que cette patiente est ménopausée, ce qui pourrait expliquer le faible niveau de PR en raison des bas niveaux d'E2 présents dans le tissu d'origine. Cependant, la perte de PR-B n'est pas classiquement observée dans le tissu mammaire des femmes ménopausées, ce qui met en évidence l'implication de la mutation de *BRCA1* dans ce phénomène. Il est donc possible que dans les structures observées, l'haplo-insuffisance de *BRCA1* puisse être responsable à la fois et de la perte de PR-B ainsi que d'un état plus indifférencié des cellules qui expliquerait une prolifération plus marquée. Dans les greffes, le niveau de PR est nettement augmenté par l'E2 qui n'exerce cependant qu'un faible effet prolifératif. Cela peut s'expliquer par l'imprégnation estrogénique réduite du tissu d'origine et par des taux de PR initialement très bas, ce qui rendrait donc les cellules plus sensibles à la ré-induction de l'expression du gène PR en présence d'E2 dans les greffes. En revanche, l'effet d'E2 sur la prolifération est sans doute limité par un index mitotique déjà important dans ce tissu.

Chacun des trois profils tissulaires de ces patientes est spécifique et diffère singulièrement des réponses observées dans le tissu non muté. Les hypothèses formulées pour expliquer les phénotypes observés mettent en jeu l'altération de différentes fonctions de *BRCA1* selon le tissu. De telles différences entre les tissus des patientes n'ont jamais été décrites auparavant et soulèvent plusieurs questions quant aux conséquences cellulaires de l'hétérozygotie de *BRCA1*, et de leur hétérogénéité en fonction des tissus. Nous avons tout d'abord vérifié si ces différences de comportement

pouvaient avoir un lien avec les caractéristiques cliniques des femmes recrutées dans cette étude (**Tableau 3 et 5**). Les patientes *BRCA1^{+/−}* présentent en effet certaines différences de profil personnels, à commencer par un écart d'âge entre ces patientes âgées de 36 à 57 ans (**Tableau 5 et Figure 43**). La moyenne d'âge des patientes non mutées est plus faible de 10 ans par rapport à celle des patientes *BRCA1^{+/−}*, avec un écart d'âge plus limité entre les patientes (29 à 42 ans). Cette différence est à prendre en compte dans l'hétérogénéité des réponses des tissus mutés. Le tissu mammaire réagit différemment en fonction de la période de la vie génitale et des stimulations hormonales (Russo and Russo 2004). Cependant il est intéressant de noter que la patiente 1 dont la prolifération lobulaire est très exacerbée par E2 et P, est âgée de 36 ans ce qui correspond donc à l'âge moyen des patientes normales. Cela indique que le paramètre de l'âge n'est pas responsable des perturbations de l'activité proliférative du sein de cette patiente. De plus, les patientes 2 et 5 sont âgées de 55 et 57 ans respectivement, et cet écart avec l'âge moyen des patientes non mutées pourrait influer sur les réponses singulières observées à l'exemple de celles de la patiente 5. Toutefois, ces deux patientes présentent des réponses prolifératives tout à fait différentes l'une de l'autre, en présence ou non des hormones, ce qui signifie que si l'âge peut entrer en ligne de compte, il n'est absolument pas le seul facteur modulateur de l'hétérogénéité observée des régulations du tissu mammaire chez les femmes *BRCA1^{+/−}*.

Nous nous sommes intéressés aux autres caractéristiques cliniques des patientes recrutées. De façon intéressante, nous observons que les patientes 3, 4 et 5 ayant eu 3, 2 et 8 enfants respectivement sont celles dont les activités prolifératives sont les moins induites par les hormones par rapport à la patiente 2 qui est nullipare et pour laquelle la progestérone exerce un effet prolifératif aberrant. Bien que la question reste posée pour la patiente 1 pour laquelle cette information n'a pas pu être obtenue, les grossesses pourraient réduire les activités prolifératives des hormones grâce à une différentiation plus importante des cellules comme cela a été décrit (Russo, Moral et al. 2005). Cependant nous venons également de rapporter que la patiente 5 qui a eu 8 grossesses présentait plutôt un phénotype cellulaire indifférencié et prolifératif ce qui indique que les grossesses ne suffiraient pas à abaisser l'index mitotique des tissus mutés. Concernant les patientes non mutées, 4 sur 6 ont mené au moins une grossesse à terme et les deux patientes pour lesquelles ce n'est pas le cas présentent les taux prolifératifs les plus forts dans les galactophores. Ces résultats signifient que si les grossesses

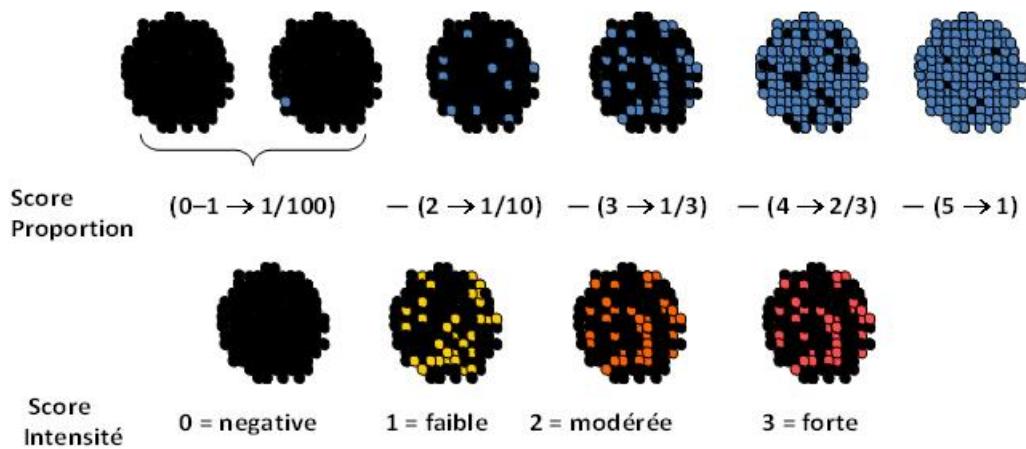
pourraient effectivement limiter la prolifération basale ou induite par les hormones dans le sein des femmes non mutées, cet effet n'est pas clair chez les femmes mutées, suggérant à nouveau une implication de la mutation de *BRCA1* dans le comportement des cellulaires mammaires normales.

En ce qui concerne les autres paramètres disponibles tels que l'allaitement, les antécédents de cancer, les traitements associés, la ménopause ou l'ovariectomie, aucune association claire n'a pu expliquer les réponses observées et leur hétérogénéité entre les patientes. Il faudrait réaliser cette même étude sur un nombre plus important de patientes pour pouvoir envisager des corrélations entre ces informations cliniques et les réponses observées.

Il en va de même concernant le type de mutation mis en jeu. En effet, selon la mutation portée par la patiente, les conséquences cellulaires pourraient être différentes. Cependant les effets biologiques de chaque mutation sont encore mal caractérisés, et nous n'avons pas trouvé d'informations à ce sujet pour 3 des 5 mutations décrites des patientes mutées de cette étude (**Tableau 5**). Pour la patiente 2, l'absence de la fonctionnalité de *BRCA1* sur les mécanismes de transcription permettrait cependant d'expliquer le faible niveau de ER α dans les galactophores avant greffes de cette patiente, suggérant que l'haplo-insuffisance réduirait la capacité de *BRCA1* à activer la transcription de ER malgré la présence d'une protéine sauvage (Hosey, Gorski et al. 2007). Les faibles niveaux de ER expliqueraient ainsi pourquoi l'effet prolifératif de l'E2 est absent chez cette patiente. Cependant, si la perte de fonctionnalité de *BRCA1* sur la transcription a été décrite pour cette mutation précise, il est probable qu'il en soit de même pour la majorité des autres mutations tronquantes de *BRCA1*, suggérant que ces observations devraient être les mêmes chez toutes les patientes mutées. Or ce n'est pas le cas, ce qui indique que cette hétérogénéité retrouvée entre chaque patiente dépend d'autres critères que le type de mutation de *BRCA1*.

Concernant le modèle de xénogreffes, les variabilités inter-expériences entre chaque série de souris utilisée pourraient être un autre paramètre modulateur des intensités des réponses cellulaires aux hormones. Des différences dans la densité de la vascularisation environnant les tissus greffés, ainsi qu'une libération plus ou moins efficace des hormones par les comprimés greffés pourraient entrer en jeu dans l'accessibilité des hormones aux fragments de sein greffés. Cependant, les dosages

Score Allred



score total = score proportion + score intensité (entre 0 et 8).

Figure 50 : Description du score d'Allred utilisé pour la quantification immunohistochimique du GR et du P-S211GR. Ce score prend en compte la proportion de cellules marquées ainsi que l'intensité de marquage.

hormonaux ont montré que notre technique donnait des résultats homogènes et reproductibles, et bien que des faibles variations des concentrations hormonales aient pu être observées entre chaque souris d'un même groupe, ces variations sont du même ordre entre chaque expérience. De plus au sein d'une même expérience, du tissu d'une patiente non mutée et d'une patiente mutée était généralement greffé en parallèle dans chaque souris, assurant les mêmes conditions de concentrations hormonales pour les deux types de tissu. Exceptionnellement, le tissu de la patiente 4 *BRCA1^{+/−}* a été greffé seul dans une expérience, et les tissus des patientes 4 et 5 non mutées ont été greffés dans la même expérience. Chaque expérience étant par ailleurs réalisée dans des conditions rigoureusement identiques, cela signifie que les tissus des patientes mutées et non mutées ont été traités de façon reproductibles. Les variabilités de concentrations hormonales existantes entre chaque souris ont donc été généralement répercutées sur les deux types de tissus et ne permettent pas d'expliquer les différences des réponses observées.

Ces réflexions mettent ainsi en évidence un rôle de l'hétérozygotie de *BRCA1* dans les dérégulations des réponses cellulaires aux hormones observées dans les tissus mutés. De plus, ces résultats témoignent de l'intérêt de discriminer les structures lobulaires et canalaires compte tenu des différences observées entre ces structures. Cette étude suggère fortement que ces dérégulations préexistent dans les tissus mutés pour *BRCA1*, et qu'elles sont responsables d'une perturbation de l'activité proliférative des tissus. La variabilité des réponses observées indique que les effets délétères de la mutation de *BRCA1* peuvent être de différentes natures et avoir des conséquences cellulaires spécifiques de chaque patiente. Un stade de transformation intermédiaire plus ou moins marqué entre les cellules de chaque patiente pourrait expliquer cette variabilité, ce que nous évoqueront plus précisément dans la discussion générale. L'âge et la vie reproductive et gynécologique des patientes comptent sans doute pour une part de l'hétérogénéité observée, mais ne suffisent pas à l'expliquer, de même que le type de mutation de *BRCA1* mis en jeu. Les raisons de cette hétérogénéité nécessitent donc d'être plus précisément étudiés dans le tissu muté.

N° patiente	Age	Grossesses	Antécédents carcinologiques	Chimiothérapie	Radiothérapie	Mastectomie prophylactique	Ovariectomie
1	56	G4P2	aucun	non	non	bilatérale en 2009	prophylactique en 1985
2	39	/	CCI triple négatif, sein gauche en 2008	oui	oui	sein droit en 2009	prophylactique en 2008
3	51	/	Cancer ovarien en 2003	oui	non	bilatérale en 2009	oui
4	37	G2P2	CCI triple négatif, sein droit en 2001	oui	oui	sein gauche en 2009	non
5	45	G2P2	Cancer du sein gche en 2004 + ovarie en 2007	oui	oui	sein droit en 2009	oui en 2007
6	43	G3P2	CCI sein gauche triple négatif en 2000 + rechute en 2008	oui	oui	sein droit en 2009	prophylactique en 2005
7	42	G1P2	aucun	non	non	bilatérale en 2009	prophylactique en 2009
8	48	G4P4	CCI triple négatif, sein droit en 2010	oui	oui	sein gauche en 2010	prophylactique en 2008
9	28	G0P0	aucun	non	non	bilatérale en 2010	non
10	28	G0P0	aucun	non	non	unilatérale	non
11	50	G1P1	cancer du sein gauche	oui	oui	sein gauche en 2010	gauche à 16 ans (kyste) et prophylactique à droite en 2010
12	36	G2P2	CCI triple négatif, sein droit en 2010	oui	oui	sein gauche en 2010	non
13	33	G3P3	aucun	non	non	bilatérale en 2010	non
14	36	/	CCI sein droit triple négatif en 2008	oui	oui	sein gauche en 2010	non
15	55	G0P0	aucun	non	non	bilatérale en 2011	prophylactique en 2011
16	36	G3P3	aucun	non	non	bilatérale en 2011	non
17	39	G2P2	aucun	non	non	bilatérale en 2011	non

G: grossesse, P: parité, CCI: carcinome canalaire infiltrant

Tableau 6 : Caractéristiques des patientes porteuses de mutations *BRCA1*. L'âge, le statut reproductif (grossesse et parité), le statut hormonal (ovariectomie), les antécédents de cancer et les traitements par chimiothérapie et radiothérapie sont rapportés.

B. Influence des glucocorticoïdes dans la tumorigénèse *BRCA1*

Le dernier aspect de mon travail sur le sein des patientes mutées pour *BRCA1* a porté sur la voie des glucocorticoïdes et notamment sur l'expression du récepteur GR et de sa forme active phosphorylée P-S211GR dans le tissu mammaire normal des femmes porteuses de mutations *BRCA1* ainsi que dans les tumeurs mammaires triple négatives de ces femmes. Des dérégulations de l'expression de ces récepteurs ont donc été recherchées par comparaison avec les tissus normaux et les tumeurs triple négatives de patientes non mutées.

Le marquage nucléaire du GR total et du P-S211GR a été quantifié à l'aide d'un score d'Allred, qui permet d'évaluer à la fois la proportion de cellules marquées et l'intensité du marquage (**Figure 50**). Ce score a été utilisé dans cette étude car les marquages du GR et P-S211GR sont variables en intensité, et nous avons supposé que ces variations pouvaient avoir une signification sur nos interprétations.

1) Expression des GR et P-S211GR dans le sein normal *BRCA1^{+/−}* et *BRCA1^{+/+}*

Le marquage de GR total et P-S211GR a été observé dans le noyau des cellules luminales et basales/myoépithéliales des structures mammaires normales de 17 patientes mutées pour *BRCA1* et de 20 patientes non mutées recrutées pour cette étude. La moyenne d'âge des 17 patientes mutées est de $41,3 \pm 8,6$ ans, et celle des 20 patientes non mutées est de $32,4 \pm 10,9$ ans. Les caractéristiques des 17 patientes mutées sont rapportées dans le **Tableau 6**.

a. Expression du GR total

Le marquage nucléaire du GR total a d'abord été examiné et quantifié par le score d'Allred dans les cellules luminales et myoépithéliales des tissus non mutés et mutés pour *BRCA1* (**Figure 51**). Les résultats suivants portent sur les deux variables du score d'Allred (proportion de cellules positives et intensité) :

- Dans les tissus normaux non mutés, la moyenne du score d'Allred est de $7,2 \pm 0,6$ sur 8 dans les cellules myoépithéliales, ce qui est significativement supérieur à la moyenne de $4,35 \pm 1,09$ sur 8 observée dans les cellules luminales ($p < 0.00001$).
- Dans les tissus normaux mutés pour *BRCA1*, la moyenne du score d'Allred des cellules myoépithéliales est de $7,7 \pm 0,9$ sur 8, ce qui est significativement

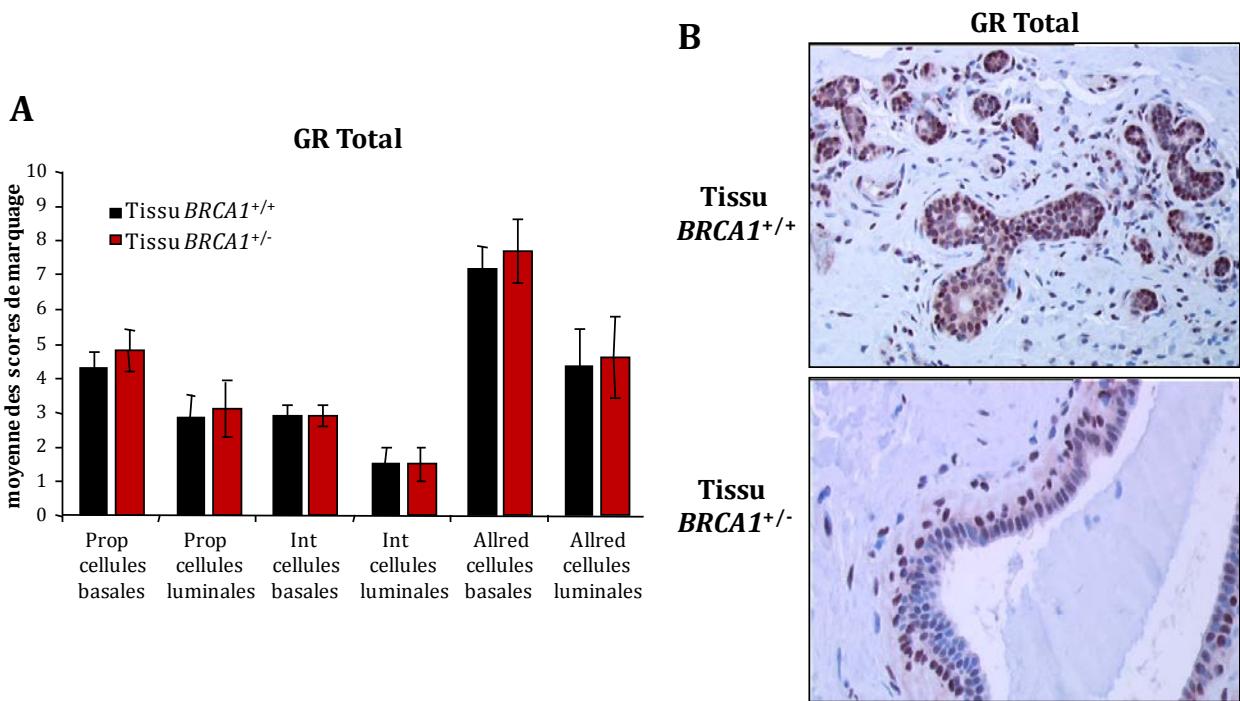


Figure 51 : Expression du GR total dans les tissus mammaires normaux non mutés *BRCA1^{+/+}* et mutés *BRCA1^{+/-}*. **A.** Le marquage du GR total a été évalué à l'aide du score d'Allred qui correspond à l'addition de la proportion (prop) et de l'intensité (int) du marquage dans les cellules basales et luminales (moyenne \pm SEM). **B.** Marquage du GR total dans le tissu *BRCA1^{+/+}* et *BRCA1^{+/-}*. Grossissement x200.

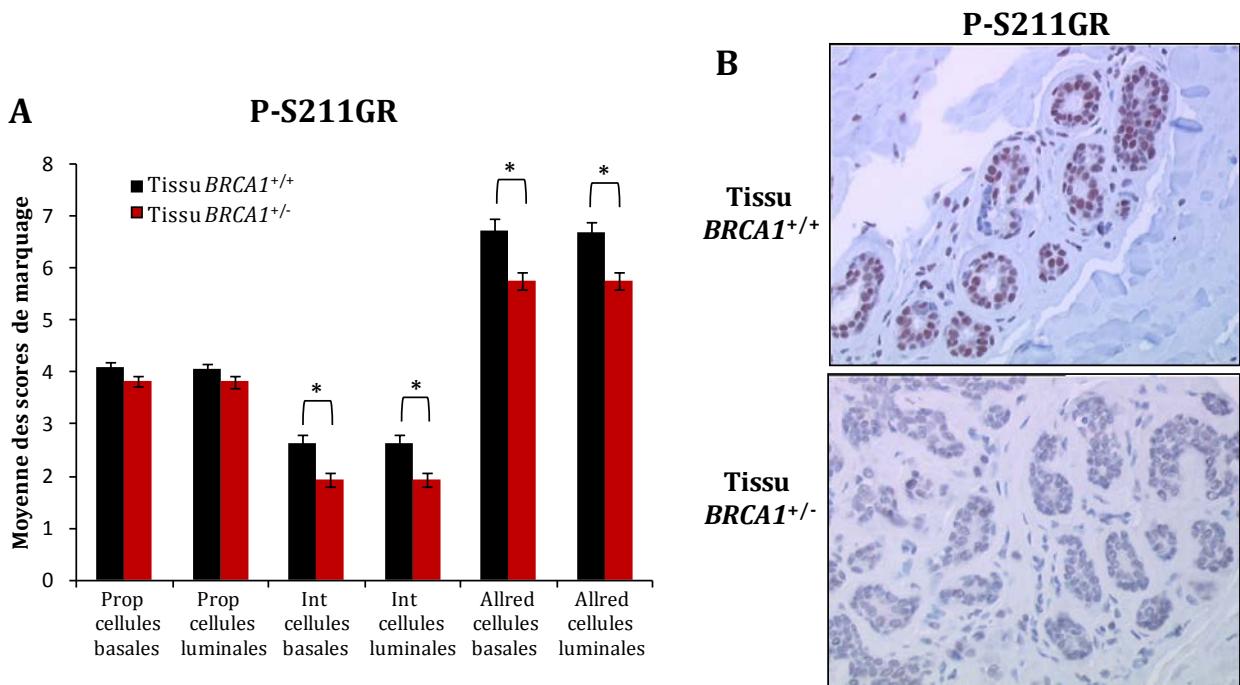


Figure 52 : Expression du P-S211GR dans les tissus mammaires normaux non mutés *BRCA1^{+/+}* et mutés *BRCA1^{+/-}*. **A.** Le marquage du P-S211GR a été évalué à l'aide du score d'Allred qui correspond à l'addition de la proportion (prop) et de l'intensité (int) du marquage dans les cellules basales et luminales (moyenne \pm SEM, *p < 0,01). **B.** Marquage du P-S211GR dans le tissu *BRCA1^{+/+}* et *BRCA1^{+/-}*. Grossissement x200.

supérieur à la moyenne de $4,6 \pm 1,2$ sur 8 observée dans les cellules luminales ($p < 0,00001$).

Ces résultats indiquent que le marquage de GR est prédominant dans les noyaux des cellules myoépithéliales par rapport aux cellules luminales de l'ensemble des tissus (**Figure 51 A et B**). Cette prédominance est visible aux deux niveaux du score d'Allred, puisque le marquage est observé à la fois de façon plus intense et dans plus de cellules du compartiment myoépithélial par rapport au compartiment des cellules luminales. En revanche, nous n'avons pas observé de différence au niveau du score d'Allred du marquage de GR dans les cellules basales ou luminales entre les deux groupes de patientes (**Figure 51 A**). La séparation des paramètres proportion et intensité du marquage GR dans les cellules myoépithéliales et luminales ne donne pas non plus de différences observables entre les tissus mutés et non mutés (**Figure 51 A**).

b. Expression de P-S211GR

Le marquage nucléaire du P-S211GR a ensuite été examiné et quantifié par le score d'Allred dans les cellules luminales et myoépithéliales des tissus non mutés et mutés pour *BRCA1* (**Figure 52**). Les résultats suivants portent sur les deux variables du score d'Allred (proportion de cellules positives et intensité) :

- La moyenne du score d'Allred des cellules myoépithéliales est de $6,7 \pm 0,7$ sur 8 dans les tissus normaux non mutés, et est donc significativement supérieure à celle des tissus normaux mutés qui est de $5,8 \pm 0,9$ sur 8 ($p < 0,01$).
- La moyenne du score d'Allred des cellules luminales est de $6,7 \pm 0,7$ sur 8 dans les tissus normaux non mutés, et est donc significativement supérieure à celle des tissus normaux mutés qui est de $5,7 \pm 0,9$ sur 8 ($p < 0,01$).

Cette différence est particulièrement liée à une intensité de marquage plus faible dans les cellules basales et luminales du tissu muté par rapport au tissu non muté ($p < 0,01$). Le nombre de cellules marquées est également plus faible dans le tissu muté par rapport au tissu non muté mais de façon non significative. De façon intéressante, le marquage des cellules luminales et myoépithéliales est identique en proportion de cellules positives et en intensité au sein de chaque groupe de tissu (**Figure 52**).

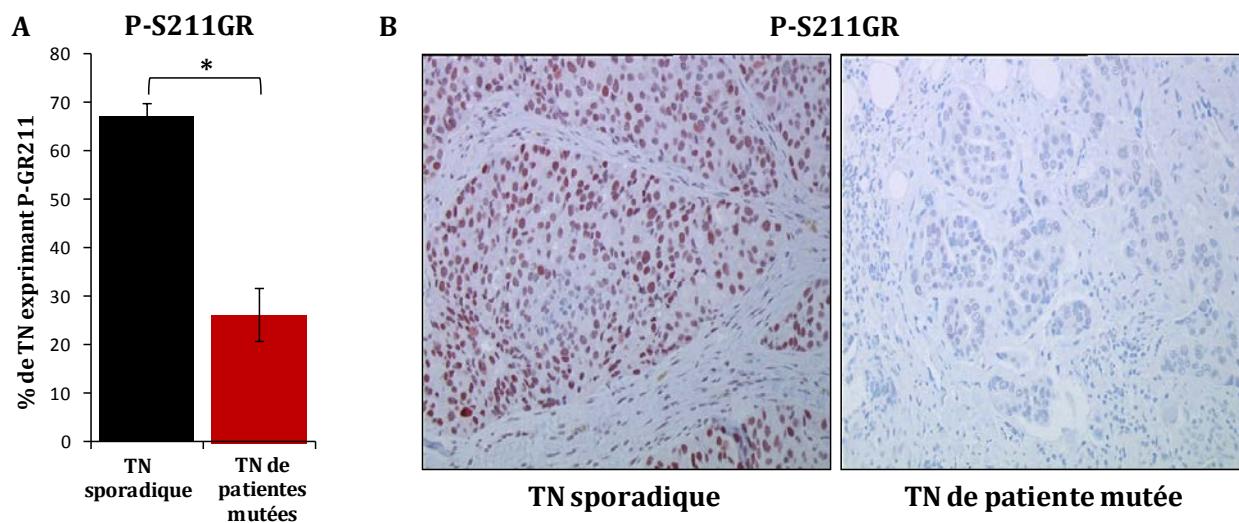


Figure 53 : Expression du P-S211GR dans les cancers triple négatifs (TN) de patientes non mutées et de patientes mutées pour *BRCA1*. **A.** Pourcentage des TN exprimant P-S211GR (P-S211GR est considéré comme étant exprimé dans la tumeur lorsque son marquage est observé dans au moins 10% des cellules) (moyenne \pm SEM, *p < 0,0001). **B.** Marquage du P-S211GR dans un TN sporadique provenant d'une patiente non mutée et d'un TN survenu chez une patiente mutée pour *BRCA1*. Grossissement x200.

Il est à noter qu'aucune différence de marquage n'a été corrélée à l'âge, au statut reproductif (grossesses) ou hormonal (ovariectomie), ni aux antécédents de cancers et aux traitements par chimiothérapie et radiothérapie des patientes mutées.

2) Expression des GR et P-S211GR dans les tumeurs triple négatives des femmes mutées et non mutées

L'observation d'une diminution relative de l'intensité du marquage du P-S211GR dans le tissu normal des femmes mutées par rapport à celui des femmes normales non mutées nous a conduits à étudier l'expression du GR total et du P-S211GR dans une série de 25 cancers triple négatifs (TN) provenant de femmes mutées pour *BRCA1* et de femmes non mutées (cancers sporadiques).

Le GR total est retrouvé faiblement exprimé dans l'ensemble des TN, sans différences significatives entre les TN des patientes mutées et des patientes non mutées : 10/11 TN de femmes mutées versus 11/14 TN de femmes non mutées présentent une expression du GR total dans moins de 10% des cellules tumorales (données non montrées).

En revanche, de façon extrêmement intéressante, une diminution très significative du nombre de cellules marquées pour le P-S211GR a été visualisée dans les TN des patientes mutées par rapport aux TN sporadiques (**Figure 53**). En effet, $67,14 \pm 10,32\%$ des cellules des TN survenant chez des femmes non mutées expriment le P-S211GR contre $26,3 \pm 18\%$ des TN des femmes mutées pour *BRCA1* (moyenne \pm SEM, $p < 0,0001$).

3) DISCUSSION

Cette étude nous a tout d'abord permis de mieux caractériser l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes dans les cellules mammaires. Le marquage observé de GR total dans la série des 20 tissus mammaires normaux non mutés est différent des résultats de H. Lien *et al* (Lien, Lu *et al.* 2006). En effet, cette équipe avait observé un marquage nucléaire exclusivement dans les cellules myoépithéliales dans 8 tissus mammaires, alors que nous avons détecté un marquage dans les cellules myoépithéliales et luminales, bien qu'il soit effectivement plus intense et plus fréquent dans les cellules myoépithéliales. Cette distinction peut s'expliquer par le faible nombre d'échantillons analysés par cet auteur mais également par l'utilisation d'anticorps différents. Nos

travaux montrent que l'expression du GR est semblable entre les cellules mammaires des patientes mutées et non mutées. Comme observé précédemment avec l'expression des récepteurs ER et PR dans les greffes, le niveau d'expression d'un récepteur n'est pas toujours représentatif de son activité dans les cellules. Cette réflexion nous a donc amenés à cibler nos recherches à l'activité du GR par l'étude de l'expression d'une de ses formes phosphorylées principalement responsable de l'activation de la transcription au niveau nucléaire. Le ratio entre P-S211GR et une autre forme phosphorylée en sérine 226 détermine en effet l'efficacité des actions transcriptionnelles induites par les glucocorticoïdes (Blind and Garabedian 2008; Chen, Dang et al. 2008).

De façon intéressante, nos résultats indiquent que l'expression de la forme active phosphorylée de GR, P-S211GR, diffère dans le tissu mammaire normal mais aussi tumoral des patientes porteuses de mutations *BRCA1* par rapport aux patientes non mutées. Les conséquences possibles de cette observation sur les cellules mammaires des patientes mutées nécessitent d'être approfondies. Tout d'abord, l'expression de P-S211GR est similaire dans les cellules luminales et myoépithéliales pour chaque tissu, contrairement aux observations faites avec le GR total. D'après nos résultats, il semble que l'anticorps GR « total » ne reconnaît en fait que peu ou pas cette forme phosphorylée. En effet, les phosphorylations entraînent des modifications conformationnelles qui pourraient gêner la reconnaissance de l'épitope de la forme P-S211GR. Compte tenu de nos résultats, il serait probable que l'anticorps GR total ne reconnaît que la forme GR non phosphorylée et éventuellement d'autres formes phosphorylées de GR, mais pas la P-S211GR. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le marquage de P-S211GR soit observé dans une proportion plus importante des cellules luminales que ne l'est le marquage du GR total (**Figures 51 et 52**). En effet, le score de proportion de GR total est de 3,1 et 2,85 pour les cellules luminales mutées et non mutées respectivement, tandis que celui de P-S211GR s'élève à 3,8 et 4,1 pour les cellules luminales mutées et non mutées respectivement. Cela signifie que l'anticorps GR ne reconnaît pas P-S211GR puisque si c'était le cas, la proportion de cellules positives pour GR serait au moins égale à celle des cellules positives pour P-S211GR. Cette observation indique que l'expression du GR « inactif » serait donc plus forte dans les cellules myoépithéliales que dans les cellules luminales, mais que les niveaux de phosphorylation du GR en Sérine 211 et donc d'activation de ce récepteur seraient similaires dans les deux types cellulaires. Dans les cellules luminales, les protéines GR

seraient donc plus rapidement phosphorylées, ce qui expliquerait l'absence de forme GR « totale » dans la plupart des cellules luminales. Cela signifie que les glucocorticoïdes exerçaient leurs actions dans le sein par l'intermédiaire des cellules myoépithéliales et luminales de la glande mammaire.

Les réductions de l'intensité et de la fréquence d'expression du P-S211GR dans les cellules mammaires normales hétérozygotes pour *BRCA1* sont extrêmement intéressantes puisqu'elles suggèrent une altération de la voie de signalisation des glucocorticoïdes dans le sein des patientes mutées, mais elles renforcent également l'idée d'une préexistence de dérégulations hormonales dans les cellules normales *BRCA1^{+/−}*. La régulation transcriptionnelle liée à l'action des glucocorticoïdes dans le sein pourrait donc être amenuisée par rapport au tissu non muté, ce qui pourrait conduire à un certain nombre d'anomalies tissulaires dans le sein de ces patientes. Il est plausible de penser que ces dérégulations pourraient favoriser la transformation tumorale chez ces patientes.

Afin de voir si ces dérégulations de la voie des glucocorticoïdes subsistent après la transformation tumorale des cellules, nous avons ensuite analysé l'expression de GR et de sa forme phosphorylée dans les cancers triple négatifs de patientes mutées et non mutées. En effet les cancers triple négatifs sont les plus fréquemment retrouvés chez les patientes porteuses d'une mutation *BRCA1*. Nous observons une perte fréquente de l'expression de GR dans les TN issues des patientes mutées et non mutées sans que des différences significatives de l'expression du GR ne soient visibles entre ces deux types de patientes, mais ceci peut être lié au faible nombre d'échantillons analysés dans cette étude préliminaire. Concernant le P-S211GR, son expression est retrouvée dans plus de tumeurs TN que le GR total. Il existe une forte différence d'expression entre les TN des patientes mutées et celles des non mutées avec une perte d'expression de P-S211GR chez les femmes mutées pour *BRCA1* par rapport aux femmes non mutées (**Figure 53**). La nette diminution des TN positives pour P-S211GR chez les patientes mutées suggère que les dérégulations observées dans le tissu normal *BRCA1^{+/−}* persisteraient durant la transformation tumorale et se traduirraient par une diminution, voir une absence d'actions régulatrices des glucocorticoïdes sur leurs gènes cibles.

Nous avons préalablement démontré que la DEX augmentait la prolifération et diminuait l'apoptose des cellules épithéliales normales en culture. Il pourrait donc être

supposé que cet effet prolifératif/anti-apoptotique soit réduit chez les patientes mutées pour *BRCA1*. Cependant, aucune différence significative dans les taux de prolifération des cellules HBE mutées ou non mutées pour *BRCA1* n'a été observé en culture primaire durant ce travail (données non montrées), ce qui signifie que cette diminution de la forme P-S211GR n'aurait que peu ou pas de conséquences sur les effets prolifératifs des glucocorticoïdes, mais cela reste à démontrer *in vivo*. Il faut cependant souligner que l'expression des GR observée dans les HBE en culture est élevée, signifiant que les effets glucocorticoïdes pourraient être saturés dans ce modèle *in vitro*. Par ailleurs, la DEX exerce un effet antiprolifératif dans les cellules de cancer du sein *in vitro* et cet effet bénéfique potentiel pourrait être perdu chez les femmes mutées.

Les glucocorticoïdes sont impliqués non seulement dans la prolifération et l'apoptose des cellules mammaires épithéliales, mais aussi dans la régulation de l'inflammation et des cellules immunes. Ces stéroïdes sont de puissants anti-inflammatoires et immunosupresseurs. Le rôle promoteur de l'inflammation ainsi que des macrophages dans la progression tumorale a été récemment démontré tant au niveau épidémiologique que biologique et en particulier pour les tumeurs triple négatives (Hinohara and Gotoh 2010; Campbell, Tonlaar et al. 2011; Cramer and Finn 2011). Une diminution des effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes dans le sein des patientes *BRCA1^{+/−}* pourrait donc jouer un rôle dans leur susceptibilité accrue au cancer du sein. Le cortisol est sécrété en permanence selon un rythme nycthéméral et ses taux plasmatiques sont doublés en cas de stress. Des études ont montré que si le stress chronique diminuait le risque de cancer du sein sur le long terme, un stress aigu pouvait en revanche accroître ce risque (Michael, Carlson et al. 2009). Chez les patientes mutées, cette observation pourrait donc être inversée puisque l'effet protecteur du stress chronique pourrait être diminué par une réduction des effets glucocorticoïdes, tandis que l'action délétère d'un stress aigu serait plus limitée chez ces femmes. Ces éléments sont donc en faveur d'une implication probable des dérégulations de la voie des glucocorticoïdes observées dans la tumorigénèse *BRCA1* bien que les mécanismes et les conséquences biologiques mises en jeu nécessitent d'être approfondis.

Par ailleurs, le marquage des TN par le P-S211GR pourrait constituer un facteur diagnostic intéressant. La perte d'expression de P-S211GR pourrait servir de marqueur des mutations *BRCA1* dans le cas de patientes n'ayant pas encore été diagnostiquées

pour ces mutations, ce qui permettrait un screening plus précis des tumeurs TN. Enfin le statut de P-S211GR reste à étudier dans les tumeurs sporadiques ayant perdu l'expression de *BRCA1* (tumeurs BRCAness) et pourrait également constituer un marqueur intéressant dans la stratégie thérapeutique (indication des inhibiteurs PARP). De plus, les glucocorticoïdes sont utilisés couramment au cours des traitements adjuvants du cancer du sein et en phase métastatique. Chez les patientes mutées, l'utilisation de ces glucocorticoïdes pourrait avoir une efficacité anti-proliférative nulle ou réduite dans le cas des tumeurs négatives pour P-S211GR. L'utilisation de ce marqueur permettrait donc d'affiner le choix des molécules thérapeutiques ciblant ce type de tumeur.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES DU PROJET

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES DU PROJET

Ce travail met en évidence l'existence de réponses cellulaires anormales en présence des dérégulations hormonales du tissu mammaire muté pour *BRCA1* avant même l'apparition de lésions tumorales. Nous observons que les tissus mutés réagissent de façon différente du tissu non muté en réponse aux hormones ovarielles, et présentent également une expression altérée du P-S211GR, majoritairement responsable de la transmission des effets transcriptionnels des glucocorticoïdes. Cependant, les dérégulations préexistantes dans le tissu muté montrent un profil très différent en fonction des patientes étudiées. Cela suggère fortement que ces dérégulations hormonales seraient couplées à d'autres anomalies cellulaires, variables selon les patientes et qui seraient à l'origine de la variabilité des réponses observées. Les réponses altérées aux hormones pourraient donc être à la fois la conséquence de l'haplo-insuffisance de *BRCA1* sur les interactions de cette protéine avec les récepteurs, mais aussi de perturbations de leur voie de signalisation par d'autres acteurs protéiques ayant acquis une mutation ou dérégulation de leur expression. Par exemple il a été montré que les MAPK pouvaient moduler les ratios PR-A/PR-B, suggérant qu'un dysfonctionnement de la voie de signalisation des MAPK pourrait conduire à l'altération du ratio des isoformes PR (Khan, Amazit et al. 2011). *BRCA1* étant impliqué dans de nombreuses voies de signalisation et étant capable d'interagir avec une grande variété de protéines, il ne serait pas surprenant que son haplo-insuffisance puisse perturber des acteurs de la phosphorylation comme les MAPK, et conduire ainsi à une dérégulation du ratio des isoformes PR, comme nous l'avons observé avec la perte de PR-B chez 3 patientes sur 5. De plus il a également été montré que les effets antiprolifératifs de la progestérone dans le tissu mammaire pouvaient être inhibés par la mutation de gènes tels que *TP53* ou la cycline D1, induisant au contraire une action proliférative de cette hormone (Musgrove, Hunter et al. 2001; Medina and Kittrell 2003). *TP53* étant retrouvée muté dans la majorité des cancers du sein *BRCA1*, cela pourrait expliquer l'effet prolifératif exacerbé de la progestérone dans le tissu de certaines femmes mutées. La compréhension des altérations de la voie de signalisation des hormones nécessite d'être complétée par l'étude des marqueurs ER α , PR, PR-B et Ki67 sur une plus grande série de patientes, ce qui est prévu d'ici la fin de mon doctorat, le tissu mammaire de 24

patientes mutées étant disponible au laboratoire. Par ailleurs d'autres marqueurs doivent être évalués dans le tissu avant greffes et le tissu greffé, et notamment des marqueurs témoignant de l'activité des récepteurs tels que des gènes cibles de ces hormones comme *pS2* pour E2, *FASN* pour P et *BCL2* pour E2 et P. Les analyses immunohistochimiques de ces protéines viennent d'être réalisées et sont actuellement en cours de comptage. Cela nous permettra de mieux comprendre les effets biologiques induit par les hormones dans les cellules *BRCA1^{+/−}*.

Ces observations mettent en évidence la multiplicité des mécanismes impliqués dans la tumorigénèse mammaire des patientes mutées pour *BRCA1*. Il existerait donc une plus grande variété d'états phénotypiques intermédiaires des cellules mutées par rapport aux cellules non mutées. Parmi ces phénotypes, il est tout à fait probable que certains soient favorables à la transformation tumorale, en fonction du niveau d'instabilité génétique cellulaire et des gènes ayant été altérés dans les cellules. La démonstration d'une perturbation de l'intégrité génomique dans les cellules hétérozygotes pour *BRCA1* étaye largement cette hypothèse (Rennstam, Ringberg et al. 2010). Il est donc plausible de penser que des mutations ou anomalies génétiques seraient présentes dans les cellules hétérozygotes sans qu'un phénotype tumoral ne soit encore déclaré. *BRCA1* est impliqué dans la recombinaison homologue (RH) qui est un système de réparation préférentiellement utilisé par les cellules humaines pour réparer de façon fidèle les cassures double brins. L'absence d'une protéine sauvage sur les deux normalement présentes, est sans doute responsable d'une altération de l'efficacité de réparation par RH, ce qui induirait une accumulation de lésions génétique dans les cellules. Ces lésions pourraient conduire soit à la mort cellulaire par apoptose, soit à la survie de la cellule jusqu'à ce que les altérations acquises ne l'entraînent vers la transformation tumorale. De plus, dans l'hypothèse selon laquelle l'haplo-insuffisance de *BRCA1* conduirait à une réduction de la différenciation des cellules épithéliales, il y aurait donc une augmentation du nombre de cellules du compartiment des progénitrices bipotentes ou luminales. Ces cellules étant capables de se diviser plus fréquemment et de survivre plus longtemps, l'accumulation de mutations délétères d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs liée à l'instabilité génétique des cellules *BRCA1^{+/−}* serait d'autant plus favorisée. Ces anomalies génomiques seraient alors propagées dans les structures mammaires à chaque division de la cellule anormale. Un effet paracrine des cellules adjacentes différenciées et exprimant les récepteurs pourraient être mis en jeu

et favoriser ou non la croissance des cellules aberrantes, de façon spécifique des anomalies génomiques présentes dans les cellules.

Une autre possibilité serait que les anomalies génomiques surviennent dans une cellule exprimant les récepteurs ER et PR. Dans ce cas, l'action des hormones sur cette cellule sera également perturbée de façon spécifique des anomalies biologiques présentes dans la cellule, conduisant potentiellement à une prolifération exacerbée par E2 et P, où à un défaut de la différentiation dépendante de P. Notre étude ne nous permet pas de répondre à la question du statut de la cellule d'origine des tumeurs *BRCA1*, du point de vue de sa position dans la hiérarchie cellulaire et de l'expression de ses récepteurs ER et PR. Afin de préciser le niveau de différentiation des cellules mutées par rapport aux cellules non mutées, nous envisageons un double-marquage IHC par le marqueur ALDH1 des cellules progénitrices couplé au Ki67 dans les tissus avant greffes ainsi que dans les tissus greffés des patientes présentant une prolifération exacerbée par la progestérone. Ce travail nous permettra d'observer d'une part si le nombre de cellules exprimant ALDH1 est augmenté dans le tissu muté mais aussi si la progestérone favorise la prolifération du compartiment des cellules progénitrices comme cela a déjà été décrit dans la glande mammaire de la souris mais aussi de la femme (Graham, Mote et al. 2009; Joshi, Jackson et al. 2010).

Nos observations soulignent le rôle complexe des hormones dans cette transformation tumorale, indiquant qu'il pourrait être différent selon le profil génomique de la cellule mutée pour *BRCA1*. La question reste donc posée concernant le potentiel préventif d'un antiprogestatif chez ces femmes. Dans notre étude, la progestérone est responsable d'une prolifération cellulaire exacerbée dans le tissu de certaines patientes mais son action est également antiproliférative pour d'autres patientes mutées. L'UPA parvient majoritairement à inhiber les effets de P mais avec une intensité spécifique de chaque tissu observé. Des études cliniques utilisant l'UPA en traitement préventif sont donc nécessaires pour évaluer les effets protecteurs de cette molécule. D'après nos résultats, il est probable que cette molécule puisse présenter une efficacité préventive chez certaines femmes mais pas sur la totalité. En effet, l'E2 est également responsable d'un effet prolifératif exacerbé chez certaines patientes mutées, ce qui pose la question d'une utilisation conjointe de l'UPA et d'un anti-estrogène ou bien d'un anti-aromatase. Cependant, si l'UPA montre pour l'instant des effets

indésirables très limités dans les études cliniques de trois ou six mois, les effets délétères de molécules anti-estrogéniques administrées sur le long terme sont avérés au point de vue du risque cardiovasculaire et des fonctions hépatiques (Redig and Munshi 2010). Une utilisation locale de ces molécules sous forme d'administration topique de gel cutané sur le sein par exemple, pourrait être envisageable. Concernant les effets de l'UPA dans le sein normal, nos résultats tendent à indiquer qu'il n'augmenterait pas la prolifération des cellules mammaires, ce qui est encourageant pour la perspective d'une utilisation long terme non risquée de cette molécule. De même, ses effets anti-glucocorticoïdes limités dans les cellules mammaires normales en culture sont également en faveur d'une application au long cours de l'UPA. Cette remarque est d'autant plus valable concernant les femmes mutées puisque nos résultats indiquent que leur voie de signalisation par les glucocorticoïdes serait inhibée par une expression diminuée du P-S211GR. Nous avons vu précédemment que ce phénomène pourrait favoriser l'occurrence de la tumorigénèse chez ces femmes. Il pourrait donc être néfaste d'ajouter à cela les effets d'une molécule puissamment anti-glucocorticoïde dans le tissu muté. L'UPA est un antiprogestatif qui présente des effets anti-glucocorticoïdes limité, ce qui en fait un candidat de choix dans le cadre d'un traitement préventif de ces patientes par un inhibiteur de la P.

En ce qui concerne les effets d'une diminution de la signalisation anti-glucocorticoïde dans le sein muté, les études doivent être poursuivies pour déterminer quels en sont les mécanismes précis ainsi que les conséquences biologiques. Ce travail est en cours dans le laboratoire, et est effectué par Myriam Vilasco, une post-doctorante de notre équipe qui a pu mettre en évidence une action de *BRCA1* sur l'activation des GR par augmentation des niveaux de P-S211GR et de la transcription de ses gènes cibles (M. Vilasco, L. Communal *et al*, en cours de rédaction). Il reste à déterminer plus précisément les conséquences biologiques de la dérégulation de ces interactions chez les patientes mutées pour *BRCA1* et notamment sur la tumorigénèse mammaire de ces femmes.

Enfin, concernant un autre aspect des applications potentielles de l'UPA, nos études indiquent que ce SPRM pourrait être responsable d'une augmentation de la croissance cellulaire des lignées T-47D et MCF-7. Cela va à l'encontre des données de la littérature indiquant des effets antiprolifératifs de molécules antiprogestatives sur des

lignées de cancer du sein. Il serait donc tout intéressant d'approfondir les effets de l'UPA sur la croissance tumorale d'autres lignées *in vitro* ou implantées *in vivo* chez la souris, puis en clinique chez la femme (Spitz, Croxatto et al. 1996; Cadepond, Ullmann et al. 1997; Klijn, Setyono-Han et al. 2000). En effet, en plus de son potentiel dans la prévention tumorale des femmes mutées pour *BRCA1*, il est pensable que l'UPA puisse être un inhibiteur de la croissance tumorale, notamment des tumeurs déjà déclarées chez les femmes *BRCA1*, et plus généralement des tumeurs dans lesquelles la progestérone exerce des actions prolifératives.

REFERENCES

REFERENCES

- (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. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer." *Lancet* **347**(9017): 1713-1727.
- (1999). "Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. The Breast Cancer Linkage Consortium." *J Natl Cancer Inst* **91**(15): 1310-1316.
- (2002). "Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease." *Lancet* **360**(9328): 187-195.
- Abdel-Hafiz, H., G. S. Takimoto, et al. (2002). "The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression." *J Biol Chem* **277**(37): 33950-33956.
- Anbazhagan, R., P. P. Osin, et al. (1998). "The development of epithelial phenotypes in the human fetal and infant breast." *J Pathol* **184**(2): 197-206.
- Anderson, E. (2001). "Ovarian steroids and control of proliferation in the normal human breast." *Breast* **10**(4): 273-278.
- Ascenzi, P., A. Bocedi, et al. (2006). "Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health." *Mol Aspects Med* **27**(4): 299-402.
- Assairi, L., C. Delouis, et al. (1974). "Inhibition by progesterone of the lactogenic effect of prolactin in the pseudopregnant rabbit." *Biochem J* **144**(2): 245-252.
- Attardi, B. J., J. Burgenson, et al. (2004). "In vitro antiprogestational/antiglucocorticoid activity and progestin and glucocorticoid receptor binding of the putative metabolites and synthetic derivatives of CDB-2914, CDB-4124, and mifepristone." *J Steroid Biochem Mol Biol* **88**(3): 277-288.
- Attardi, B. J., J. Burgenson, et al. (2002). "CDB-4124 and its putative monodemethylated metabolite, CDB-4453, are potent antiprogestins with reduced antiglucocorticoid activity: in vitro comparison to mifepristone and CDB-2914." *Mol Cell Endocrinol* **188**(1-2): 111-123.
- Aupperlee, M. D., K. T. Smith, et al. (2005). "Progesterone receptor isoforms A and B: temporal and spatial differences in expression during murine mammary gland development." *Endocrinology* **146**(8): 3577-3588.
- Bakker, G. H., B. Setyono-Han, et al. (1987). "Comparison of the actions of the antiprogestin mifepristone (RU486), the progestin megestrol acetate, the LHRH analog buserelin, and ovariectomy in treatment of rat mammary tumors." *Cancer Treat Rep* **71**(11): 1021-1027.
- Ballare, C., G. Vallejo, et al. (2006). "Progesterone signaling in breast and endometrium." *J Steroid Biochem Mol Biol* **102**(1-5): 2-10.
- Bardon, S., F. Vignon, et al. (1985). "RU486, a progestin and glucocorticoid antagonist, inhibits the growth of breast cancer cells via the progesterone receptor." *J Clin Endocrinol Metab* **60**(4): 692-697.
- Beral, V. (2003). "Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study." *Lancet* **362**(9382): 419-427.
- Beral, V. and G. Reeves (1993). "Childbearing, oral contraceptive use, and breast cancer." *Lancet* **341**(8852): 1102.

- Bernier, M. O., G. Plu-Bureau, et al. (2000). "Breastfeeding and risk of breast cancer: a metaanalysis of published studies." *Hum Reprod Update* **6**(4): 374-386.
- Blind, R. D. and M. J. Garabedian (2008). "Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes." *J Steroid Biochem Mol Biol* **109**(1-2): 150-157.
- Bocchinfuso, W. P. and K. S. Korach (1997). "Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2**(4): 323-334.
- Boonyaratanaakornkit, V., E. McGowan, et al. (2007). "The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle." *Mol Endocrinol* **21**(2): 359-375.
- Boonyaratanaakornkit, V., M. P. Scott, et al. (2001). "Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases." *Mol Cell* **8**(2): 269-280.
- Boulton, S. J. (2006). "Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins." *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 5): 633-645.
- Brache, V., L. Cochon, et al. (2010). "Immediate pre-ovulatory administration of 30 mg ulipristal acetate significantly delays follicular rupture." *Hum Reprod* **25**(9): 2256-2263.
- Brenner, R. M., O. D. Slayden, et al. (2010). "Intrauterine administration of CDB-2914 (Ulipristal) suppresses the endometrium of rhesus macaques." *Contraception* **81**(4): 336-342.
- Brisken, C., S. Kaur, et al. (1999). "Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms." *Dev Biol* **210**(1): 96-106.
- Brunet, J. S., P. Ghadirian, et al. (1998). "Effect of smoking on breast cancer in carriers of mutant BRCA1 or BRCA2 genes." *J Natl Cancer Inst* **90**(10): 761-766.
- Brzovic, P. S., J. R. Keeffe, et al. (2003). "Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10): 5646-5651.
- Brzozowski, A. M., A. C. Pike, et al. (1997). "Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor." *Nature* **389**(6652): 753-758.
- Buxant, F., C. Engohan-Aloghe, et al. (2010). "Estrogen receptor, progesterone receptor, and glucocorticoid receptor expression in normal breast tissue, breast in situ carcinoma, and invasive breast cancer." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **18**(3): 254-257.
- Cadepond, F., A. Ulmann, et al. (1997). "RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses." *Annu Rev Med* **48**: 129-156.
- Calvo, V. and M. Beato (2011). "BRCA1 counteracts progesterone action by ubiquitination leading to progesterone receptor degradation and epigenetic silencing of target promoters." *Cancer Res* **71**(9): 3422-3431.
- Campbell, M. J., N. Y. Tonlaar, et al. (2011). "Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome." *Breast Cancer Res Treat* **128**(3): 703-711.
- Cavailles, V., A. Gompel, et al. (2002). "Comparative activity of pulsed or continuous estradiol exposure on gene expression and proliferation of normal and tumoral human breast cells." *J Mol Endocrinol* **28**(3): 165-175.
- Cavalli, L. R., B. Singh, et al. (2004). "Loss of heterozygosity in normal breast epithelial tissue and benign breast lesions in BRCA1/2 carriers with breast cancer." *Cancer Genet Cytogenet* **149**(1): 38-43.

- Chabbert-Buffet, N., G. Meduri, et al. (2005). "Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications." *Hum Reprod Update* **11**(3): 293-307.
- Chabbert-Buffet, N., A. Pintiaux-Kairis, et al. (2007). "Effects of the progesterone receptor modulator VA2914 in a continuous low dose on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and endometrium in normal women: a prospective, randomized, placebo-controlled trial." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(9): 3582-3589.
- Chalbos, D., C. Joyeux, et al. (1990). "Progestin-induced fatty acid synthetase in breast cancer. From molecular biology to clinical applications." *Ann N Y Acad Sci* **595**: 67-73.
- Chalbos, D., C. Joyeux, et al. (1990). "Regulation of fatty acid synthetase by progesterone in normal and tumoral human mammary glands." *Rev Esp Fisiol* **46**(1): 43-46.
- Chalbos, D., C. Joyeux, et al. (1992). "Progestin-induced fatty acid synthetase in human mammary tumors: from molecular to clinical studies." *J Steroid Biochem Mol Biol* **43**(1-3): 223-228.
- Chan, W. K., G. Klock, et al. (1989). "Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia." *J Virol* **63**(8): 3261-3269.
- Chang, K. J., T. T. Lee, et al. (1995). "Influences of percutaneous administration of estradiol and progesterone on human breast epithelial cell cycle in vivo." *Fertil Steril* **63**(4): 785-791.
- Charafe-Jauffret, E., M. Chaffanet, et al. (2007). "[Towards an integrated cellular and molecular: definition of breast cancers]." *Med Sci (Paris)* **23**(6-7): 626-632.
- Chauchereau, A., L. Amazit, et al. (2003). "Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1." *J Biol Chem* **278**(14): 12335-12343.
- Chen, C. F., S. Li, et al. (1996). "The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor." *J Biol Chem* **271**(51): 32863-32868.
- Chen, D., P. E. Pace, et al. (1999). "Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization." *Mol Cell Biol* **19**(2): 1002-1015.
- Chen, J. D. and R. M. Evans (1995). "A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors." *Nature* **377**(6548): 454-457.
- Chen, W., T. Dang, et al. (2008). "Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression." *Mol Endocrinol* **22**(8): 1754-1766.
- Chwalisz, K., M. C. Perez, et al. (2005). "Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis." *Endocr Rev* **26**(3): 423-438.
- Cibula, D., A. Gompel, et al. (2010). "Hormonal contraception and risk of cancer." *Hum Reprod Update* **16**(6): 631-650.
- Clarke, C. L., J. Sandle, et al. (2006). "Mapping loss of heterozygosity in normal human breast cells from BRCA1/2 carriers." *Br J Cancer* **95**(4): 515-519.
- Clarke, R. B., A. Howell, et al. (1997). "Estrogen sensitivity of normal human breast tissue in vivo and implanted into athymic nude mice: analysis of the relationship between estrogen-induced proliferation and progesterone receptor expression." *Breast Cancer Res Treat* **45**(2): 121-133.
- Claus, E. B., N. Risch, et al. (1991). "Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study." *Am J Hum Genet* **48**(2): 232-242.

- Clemm, D. L., L. Sherman, et al. (2000). "Differential hormone-dependent phosphorylation of progesterone receptor A and B forms revealed by a phosphoserine site-specific monoclonal antibody." *Mol Endocrinol* **14**(1): 52-65.
- Clemons, M. and P. Goss (2001). "Estrogen and the risk of breast cancer." *N Engl J Med* **344**(4): 276-285.
- Condon, J. C., D. B. Hardy, et al. (2006). "Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function." *Mol Endocrinol* **20**(4): 764-775.
- Condon, J. C., P. Jeyasuria, et al. (2003). "A decline in the levels of progesterone receptor coactivators in the pregnant uterus at term may antagonize progesterone receptor function and contribute to the initiation of parturition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(16): 9518-9523.
- Cooper, A. (1840). *On the anatomy of the breast*. London,, Longman, Orme, Green, Brown, and Longmans.
- Cortez, D., Y. Wang, et al. (1999). "Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks." *Science* **286**(5442): 1162-1166.
- Courtin, A., L. Communal, et al. (2011). "Glucocorticoid receptor activity discriminates between progesterone and medroxyprogesterone acetate effects in breast cells." *Breast Cancer Res Treat*.
- Cramer, D. W. and O. J. Finn (2011). "Epidemiologic perspective on immune-surveillance in cancer." *Curr Opin Immunol* **23**(2): 265-271.
- Daniel, A. R., E. J. Faivre, et al. (2007). "Phosphorylation-dependent antagonism of sumoylation derepresses progesterone receptor action in breast cancer cells." *Mol Endocrinol* **21**(12): 2890-2906.
- Daniel, A. R., M. Qiu, et al. (2007). "Linkage of progestin and epidermal growth factor signaling: phosphorylation of progesterone receptors mediates transcriptional hypersensitivity and increased ligand-independent breast cancer cell growth." *Steroids* **72**(2): 188-201.
- Dannecker, C., K. Possinger, et al. (1996). "Induction of TGF-beta by an antiprogestin in the human breast cancer cell line T-47D." *Ann Oncol* **7**(4): 391-395.
- den Elzen, N. and J. Pines (2001). "Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase." *J Cell Biol* **153**(1): 121-136.
- Deng, C. X. and S. G. Brodrie (2000). "Roles of BRCA1 and its interacting proteins." *Bioessays* **22**(8): 728-737.
- Dewar, R., O. Fadare, et al. (2011). "Best practices in diagnostic immunohistochemistry: myoepithelial markers in breast pathology." *Arch Pathol Lab Med* **135**(4): 422-429.
- Di Lorenzo, D., M. Gianni, et al. (1993). "Progesterone induced expression of alkaline phosphatase is associated with a secretory phenotype in T47D breast cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* **192**(3): 1066-1072.
- Dontu, G., W. M. Abdallah, et al. (2003). "In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells." *Genes Dev* **17**(10): 1253-1270.
- Dorgan, J. F., C. Longcope, et al. (1996). "Relation of prediagnostic serum estrogen and androgen levels to breast cancer risk." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **5**(7): 533-539.

- Dulbecco, R., M. Henahan, et al. (1982). "Cell types and morphogenesis in the mammary gland." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(23): 7346-7350.
- Easton, D. F., D. T. Bishop, et al. (1993). "Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium." *Am J Hum Genet* **52**(4): 678-701.
- Easton, D. F., D. Ford, et al. (1995). "Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium." *Am J Hum Genet* **56**(1): 265-271.
- Eirew, P., J. Stingl, et al. (2008). "A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability." *Nat Med* **14**(12): 1384-1389.
- Eisinger, F., C. Nogues, et al. (1999). "Novel indications for BRCA1 screening using individual clinical and morphological features." *Int J Cancer* **84**(3): 263-267.
- Elledge, S. J. and A. Amon (2002). "The BRCA1 suppressor hypothesis: an explanation for the tissue-specific tumor development in BRCA1 patients." *Cancer Cell* **1**(2): 129-132.
- Engman, M., L. Skoog, et al. (2008). "The effect of mifepristone on breast cell proliferation in premenopausal women evaluated through fine needle aspiration cytology." *Hum Reprod* **23**(9): 2072-2079.
- Evans, R. M. (1988). "The steroid and thyroid hormone receptor superfamily." *Science* **240**(4854): 889-895.
- Fabbro, M., K. Savage, et al. (2004). "BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage." *J Biol Chem* **279**(30): 31251-31258.
- Faivre, E. J., A. R. Daniel, et al. (2008). "Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors." *Mol Endocrinol* **22**(4): 823-837.
- Fan, S., Y. X. Ma, et al. (2001). "Role of direct interaction in BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity." *Oncogene* **20**(1): 77-87.
- Fan, S., Y. X. Ma, et al. (2002). "p300 Modulates the BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity." *Cancer Res* **62**(1): 141-151.
- Fan, S., J. Wang, et al. (1999). "BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells." *Science* **284**(5418): 1354-1356.
- Fata, J. E., Y. Y. Kong, et al. (2000). "The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development." *Cell* **103**(1): 41-50.
- Faus, H. and B. Haendler (2006). "Post-translational modifications of steroid receptors." *Biomed Pharmacother* **60**(9): 520-528.
- Feigelson, H. S., E. E. Calle, et al. (2001). "Alcohol consumption increases the risk of fatal breast cancer (United States)." *Cancer Causes Control* **12**(10): 895-902.
- Ferguson, D. J. and T. J. Anderson (1981). "Morphological evaluation of cell turnover in relation to the menstrual cycle in the "resting" human breast." *Br J Cancer* **44**(2): 177-181.
- Foidart, J. M., C. Colin, et al. (1998). "Estradiol and progesterone regulate the proliferation of human breast epithelial cells." *Fertil Steril* **69**(5): 963-969.
- Foidart, J. M., J. Desreux, et al. (2007). "Hormone therapy and breast cancer risk." *Climacteric* **10 Suppl 2**: 54-61.
- Ford, D., D. F. Easton, et al. (1998). "Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium." *Am J Hum Genet* **62**(3): 676-689.

- Forster, C., S. Makela, et al. (2002). "Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15578-15583.
- Fournier, A., F. Berrino, et al. (2008). "Unequal risks for breast cancer associated with different hormone replacement therapies: results from the E3N cohort study." *Breast Cancer Res Treat* **107**(1): 103-111.
- Fournier, A., F. Berrino, et al. (2005). "Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort." *Int J Cancer* **114**(3): 448-454.
- Fung, T. K. and R. Y. Poon (2005). "A roller coaster ride with the mitotic cyclins." *Semin Cell Dev Biol* **16**(3): 335-342.
- Furuta, S., X. Jiang, et al. (2005). "Depletion of BRCA1 impairs differentiation but enhances proliferation of mammary epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(26): 9176-9181.
- Futreal, P. A., Q. Liu, et al. (1994). "BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas." *Science* **266**(5182): 120-122.
- Gabet, Y., T. Noh, et al. (2011). "Developmentally regulated inhibition of cell cycle progression by glucocorticoids through repression of cyclin A transcription in primary osteoblast cultures." *J Cell Physiol* **226**(4): 991-998.
- Gainer, E. E. and A. Ulmann (2003). "Pharmacologic properties of CDB(VA)-2914." *Steroids* **68**(10-13): 1005-1011.
- Galliher-Beckley, A. J. and J. A. Cidlowski (2009). "Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease." *IUBMB Life* **61**(10): 979-986.
- Garraway, L. A. and W. R. Sellers (2006). "Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(8): 593-602.
- Ghosh, S., Y. Lu, et al. (2007). "Tumor suppressor BRCA1 inhibits a breast cancer-associated promoter of the aromatase gene (CYP19) in human adipose stromal cells." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**(1): E246-252.
- Giangrande, P. H., E. A. Kimbrel, et al. (2000). "The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding." *Mol Cell Biol* **20**(9): 3102-3115.
- Giangrande, P. H. and D. P. McDonnell (1999). "The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene." *Recent Prog Horm Res* **54**: 291-313; discussion 313-294.
- Giangrande, P. H., G. Pollio, et al. (1997). "Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor." *J Biol Chem* **272**(52): 32889-32900.
- Ginestier, C., M. H. Hur, et al. (2007). "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome." *Cell Stem Cell* **1**(5): 555-567.
- Ginsburg, E. S., B. W. Walsh, et al. (1995). "The effects of ethanol on the clearance of estradiol in postmenopausal women." *Fertil Steril* **63**(6): 1227-1230.
- Going, J. J., T. J. Anderson, et al. (1988). "Proliferative and secretory activity in human breast during natural and artificial menstrual cycles." *Am J Pathol* **130**(1): 193-204.
- Gompel, A., C. Malet, et al. (1986). "Progesterin effect on cell proliferation and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in normal human breast cells in culture." *J Clin Endocrinol Metab* **63**(5): 1174-1180.

- Gompel, A., S. Somai, et al. (2000). "Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues." *Steroids* **65**(10-11): 593-598.
- Gonzalez-Suarez, E., D. Branstetter, et al. (2007). "RANK overexpression in transgenic mice with mouse mammary tumor virus promoter-controlled RANK increases proliferation and impairs alveolar differentiation in the mammary epithelia and disrupts lumen formation in cultured epithelial acini." *Mol Cell Biol* **27**(4): 1442-1454.
- Gorski, J. J., R. D. Kennedy, et al. (2009). "The complex relationship between BRCA1 and ERalpha in hereditary breast cancer." *Clin Cancer Res* **15**(5): 1514-1518.
- Gouilleux, F., B. Sola, et al. (1991). "Cooperation between structural elements in hormono-regulated transcription from the mouse mammary tumor virus promoter." *Nucleic Acids Res* **19**(7): 1563-1569.
- Graham, J. D., P. A. Mote, et al. (2009). "DNA replication licensing and progenitor numbers are increased by progesterone in normal human breast." *Endocrinology* **150**(7): 3318-3326.
- Graham, J. D., M. L. Yager, et al. (2005). "Altered progesterone receptor isoform expression remodels progestin responsiveness of breast cancer cells." *Mol Endocrinol* **19**(11): 2713-2735.
- Gronwald, J., N. Tung, et al. (2006). "Tamoxifen and contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers: an update." *Int J Cancer* **118**(9): 2281-2284.
- Gudjonsson, T., M. C. Adriance, et al. (2005). "Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**(3): 261-272.
- Gudjonsson, T., L. Ronnov-Jessen, et al. (2002). "Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition." *J Cell Sci* **115**(Pt 1): 39-50.
- Guiochon-Mantel, A., K. Delabre, et al. (1996). "The Ernst Schering Poster Award. Intracellular traffic of steroid hormone receptors." *J Steroid Biochem Mol Biol* **56**(1-6 Spec No): 3-9.
- Guiochon-Mantel, A., H. Loosfelt, et al. (1989). "Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers." *Cell* **57**(7): 1147-1154.
- Gusterson, B. A., D. T. Ross, et al. (2005). "Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer." *Breast Cancer Res* **7**(4): 143-148.
- Hall, J. M., J. F. Couse, et al. (2001). "The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling." *J Biol Chem* **276**(40): 36869-36872.
- Hall, J. M., M. K. Lee, et al. (1990). "Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21." *Science* **250**(4988): 1684-1689.
- Hall, J. M. and D. P. McDonnell (1999). "The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens." *Endocrinology* **140**(12): 5566-5578.
- Han, S. J., F. J. DeMayo, et al. (2006). "Steroid receptor coactivator (SRC)-1 and SRC-3 differentially modulate tissue-specific activation functions of the progesterone receptor." *Mol Endocrinol* **20**(1): 45-55.

- Han, S. J., J. Jeong, et al. (2005). "Dynamic cell type specificity of SRC-1 coactivator in modulating uterine progesterone receptor function in mice." *Mol Cell Biol* **25**(18): 8150-8165.
- Hankinson, S. E., W. C. Willett, et al. (1995). "Alcohol, height, and adiposity in relation to estrogen and prolactin levels in postmenopausal women." *J Natl Cancer Inst* **87**(17): 1297-1302.
- Haslam, S. Z., A. Drolet, et al. (2008). "Progestin-regulated luminal cell and myoepithelial cell-specific responses in mammary organoid culture." *Endocrinology* **149**(5): 2098-2107.
- Hermes, G., N. Li, et al. (2011). "Post-weaning chronic social isolation produces profound behavioral dysregulation with decreases in prefrontal cortex synaptic-associated protein expression in female rats." *Physiol Behav* **104**(2): 354-359.
- Herrmann, W., R. Wyss, et al. (1982). "[The effects of an antiprogestrone steroid in women: interruption of the menstrual cycle and of early pregnancy]." *C R Seances Acad Sci III* **294**(18): 933-938.
- Herschkowitz, J. I., K. Simin, et al. (2007). "Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors." *Genome Biol* **8**(5): R76.
- Hild, S. A., J. R. Reel, et al. (2000). "CDB-2914: anti-progestational/anti-glucocorticoid profile and post-coital anti-fertility activity in rats and rabbits." *Hum Reprod* **15**(4): 822-829.
- Hinkula, M., E. Pukkala, et al. (2001). "Grand multiparity and the risk of breast cancer: population-based study in Finland." *Cancer Causes Control* **12**(6): 491-500.
- Hinohara, K. and N. Gotoh (2010). "Inflammatory signaling pathways in self-renewing breast cancer stem cells." *Curr Opin Pharmacol* **10**(6): 650-654.
- Holland, R., J. L. Peterse, et al. (1994). "Ductal carcinoma in situ: a proposal for a new classification." *Semin Diagn Pathol* **11**(3): 167-180.
- Holstege, H., S. A. Joosse, et al. (2009). "High incidence of protein-truncating TP53 mutations in BRCA1-related breast cancer." *Cancer Res* **69**(8): 3625-3633.
- Holt, J. T., M. E. Thompson, et al. (1996). "Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1." *Nat Genet* **12**(3): 298-302.
- Horlein, A. J., A. M. Naar, et al. (1995). "Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor." *Nature* **377**(6548): 397-404.
- Hosey, A. M., J. J. Gorski, et al. (2007). "Molecular basis for estrogen receptor alpha deficiency in BRCA1-linked breast cancer." *J Natl Cancer Inst* **99**(22): 1683-1694.
- Howard, B. A. and B. A. Gusterson (2000). "Human breast development." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**(2): 119-137.
- HRA-pharma (2010). Ulipristal acetate. B. d. f. M. o. A. C. f. r. h. drugs, FDA.
- Hu, Y., S. Ghosh, et al. (2005). "Modulation of aromatase expression by BRCA1: a possible link to tissue-specific tumor suppression." *Oncogene* **24**(56): 8343-8348.
- Hudelist, G., K. Czerwenka, et al. (2003). "Expression of sex steroid receptors and their co-factors in normal and malignant breast tissue: AIB1 is a carcinoma-specific co-activator." *Breast Cancer Res Treat* **78**(2): 193-204.
- Huen, M. S., S. M. Sy, et al. (2010). "BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(2): 138-148.
- Ignar-Trowbridge, D. M., M. Pimentel, et al. (1995). "Cross talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling systems." *Environ Health Perspect* **103 Suppl 7**: 35-38.

- Ince, T. A., A. L. Richardson, et al. (2007). "Transformation of different human breast epithelial cell types leads to distinct tumor phenotypes." *Cancer Cell* **12**(2): 160-170.
- Jackson, T. A., J. K. Richer, et al. (1997). "The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT." *Mol Endocrinol* **11**(6): 693-705.
- Jacobsen, B. M., S. A. Schittone, et al. (2005). "Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology." *Mol Endocrinol* **19**(3): 574-587.
- Jang, G. R., S. A. Wrighton, et al. (1996). "Identification of CYP3A4 as the principal enzyme catalyzing mifepristone (RU 486) oxidation in human liver microsomes." *Biochem Pharmacol* **52**(5): 753-761.
- Jeffy, B. D., J. K. Hockings, et al. (2005). "An estrogen receptor-alpha/p300 complex activates the BRCA-1 promoter at an AP-1 site that binds Jun/Fos transcription factors: repressive effects of p53 on BRCA-1 transcription." *Neoplasia* **7**(9): 873-882.
- Jin, S., H. Zhao, et al. (2000). "BRCA1 activation of the GADD45 promoter." *Oncogene* **19**(35): 4050-4057.
- Jones, L. P., M. T. Tilli, et al. (2008). "Activation of estrogen signaling pathways collaborates with loss of Brca1 to promote development of ERalpha-negative and ERalpha-positive mammary preneoplasia and cancer." *Oncogene* **27**(6): 794-802.
- Joshi, P. A., H. W. Jackson, et al. (2010). "Progesterone induces adult mammary stem cell expansion." *Nature* **465**(7299): 803-807.
- Joukov, V., J. Chen, et al. (2001). "Functional communication between endogenous BRCA1 and its partner, BARD1, during *Xenopus laevis* development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(21): 12078-12083.
- Kadouri, L., A. Hubert, et al. (2007). "Cancer risks in carriers of the BRCA1/2 Ashkenazi founder mutations." *J Med Genet* **44**(7): 467-471.
- Kandouz, M., M. Siromachkova, et al. (1996). "Antagonism between estradiol and progestin on Bcl-2 expression in breast-cancer cells." *Int J Cancer* **68**(1): 120-125.
- Kao, C. Y., K. Nomata, et al. (1995). "Two types of normal human breast epithelial cells derived from reduction mammoplasty: phenotypic characterization and response to SV40 transfection." *Carcinogenesis* **16**(3): 531-538.
- Kastner, P., A. Krust, et al. (1990). "Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B." *EMBO J* **9**(5): 1603-1614.
- Katiyar, P., Y. Ma, et al. (2009). "Mechanism of BRCA1-mediated inhibition of progesterone receptor transcriptional activity." *Mol Endocrinol* **23**(8): 1135-1146.
- Kato, S. (2001). "Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways." *Breast Cancer* **8**(1): 3-9.
- Kato, S., H. Endoh, et al. (1995). "Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase." *Science* **270**(5241): 1491-1494.
- Kato, S., T. Kitamoto, et al. (1998). "Molecular mechanism of a cross-talk between estrogen and growth-factor signaling pathways." *Oncology* **55 Suppl 1**: 5-10.

- Kehrl, J. H. and S. Sinnarajah (2002). "RGS2: a multifunctional regulator of G-protein signaling." *Int J Biochem Cell Biol* **34**(5): 432-438.
- Keller, P. J., L. M. Arendt, et al. (2011). "Defining the cellular precursors to human breast cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Kelsey, J. L., M. D. Gammon, et al. (1993). "Reproductive factors and breast cancer." *Epidemiol Rev* **15**(1): 36-47.
- Keshava, C., E. C. McCanlies, et al. (2004). "CYP3A4 polymorphisms--potential risk factors for breast and prostate cancer: a HuGE review." *Am J Epidemiol* **160**(9): 825-841.
- Key, T. J. and M. C. Pike (1988). "The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer." *Eur J Cancer Clin Oncol* **24**(1): 29-43.
- Khan, J. A., L. Amazit, et al. (2011). "p38 and p42/44 MAPKs Differentially Regulate Progesterone Receptor A and B Isoform Stabilization." *Mol Endocrinol* **25**(10): 1710-1724.
- Kim, M. Y., E. M. Woo, et al. (2006). "Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor." *Mol Endocrinol* **20**(7): 1479-1493.
- King, M. C., S. Wieand, et al. (2001). "Tamoxifen and breast cancer incidence among women with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP-P1) Breast Cancer Prevention Trial." *JAMA* **286**(18): 2251-2256.
- King, T. A., M. L. Gemignani, et al. (2004). "Increased progesterone receptor expression in benign epithelium of BRCA1-related breast cancers." *Cancer Res* **64**(15): 5051-5053.
- Klijn, J. G., F. H. de Jong, et al. (1989). "Antiprogestins, a new form of endocrine therapy for human breast cancer." *Cancer Res* **49**(11): 2851-2856.
- Klijn, J. G., B. Setyono-Han, et al. (2000). "Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer." *Steroids* **65**(10-11): 825-830.
- Klijn, J. G., B. Setyono-Han, et al. (1994). "Pre-clinical and clinical treatment of breast cancer with antiprogestins." *Hum Reprod* **9 Suppl 1**: 181-189.
- Koonin, E. V., S. F. Altschul, et al. (1996). "BRCA1 protein products ... Functional motifs." *Nat Genet* **13**(3): 266-268.
- Kuhajda, F. P. (2006). "Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway." *Cancer Res* **66**(12): 5977-5980.
- Kuperwasser, C., T. Chavarria, et al. (2004). "Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(14): 4966-4971.
- Kushner, P. J., D. A. Agard, et al. (2000). "Estrogen receptor pathways to AP-1." *J Steroid Biochem Mol Biol* **74**(5): 311-317.
- Laidlaw, I. J., R. B. Clarke, et al. (1995). "The proliferation of normal human breast tissue implanted into athymic nude mice is stimulated by estrogen but not progesterone." *Endocrinology* **136**(1): 164-171.
- Lakhani, S. R., R. Chaggar, et al. (1999). "Genetic alterations in 'normal' luminal and myoepithelial cells of the breast." *J Pathol* **189**(4): 496-503.
- Lane, T. F., C. Deng, et al. (1995). "Expression of Brca1 is associated with terminal differentiation of ectodermally and mesodermally derived tissues in mice." *Genes Dev* **9**(21): 2712-2722.

- Lange, C. A. (2008). "Challenges to defining a role for progesterone in breast cancer." *Steroids* **73**(9-10): 914-921.
- Lange, C. A., T. Shen, et al. (2000). "Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3): 1032-1037.
- Lange, C. A. and D. Yee (2008). "Progesterone and breast cancer." *Womens Health (Lond Engl)* **4**(2): 151-162.
- Lannigan, D. A. (2003). "Estrogen receptor phosphorylation." *Steroids* **68**(1): 1-9.
- Layde, P. M., L. A. Webster, et al. (1989). "The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer. Cancer and Steroid Hormone Study Group." *J Clin Epidemiol* **42**(10): 963-973.
- Leo, J. C. and V. C. Lin (2008). "The activities of progesterone receptor isoform A and B are differentially modulated by their ligands in a gene-selective manner." *Int J Cancer* **122**(1): 230-243.
- Lessey, B. A., P. S. Alexander, et al. (1983). "The subunit structure of human breast cancer progesterone receptors: characterization by chromatography and photoaffinity labeling." *Endocrinology* **112**(4): 1267-1274.
- Levens, E. D., C. Potlog-Nahari, et al. (2008). "CDB-2914 for uterine leiomyomata treatment: a randomized controlled trial." *Obstet Gynecol* **111**(5): 1129-1136.
- Levy-Lahad, E. and E. Friedman (2007). "Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers." *Br J Cancer* **96**(1): 11-15.
- Li, L. B., M. C. Louie, et al. (2008). "Proto-oncogene ACTR/AIB1 promotes cancer cell invasion by up-regulating specific matrix metalloproteinase expression." *Cancer Lett* **261**(1): 64-73.
- Li, W., C. Xiao, et al. (2007). "A role of estrogen/ERalpha signaling in BRCA1-associated tissue-specific tumor formation." *Oncogene* **26**(51): 7204-7212.
- Li, X., J. Wong, et al. (2003). "Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification." *Mol Cell Biol* **23**(11): 3763-3773.
- Lien, H. C., Y. S. Lu, et al. (2006). "Differential expression of glucocorticoid receptor in human breast tissues and related neoplasms." *J Pathol* **209**(3): 317-327.
- Lim, E., F. Vaillant, et al. (2009). "Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers." *Nat Med* **15**(8): 907-913.
- Lin, V. C., C. T. Woon, et al. (2003). "Distinct molecular pathways mediate progesterone-induced growth inhibition and focal adhesion." *Endocrinology* **144**(12): 5650-5657.
- Linger, R. J. and P. A. Kruk (2010). "BRCA1 16 years later: risk-associated BRCA1 mutations and their functional implications." *FEBS J* **277**(15): 3086-3096.
- Liu, S., C. Ginestier, et al. (2008). "BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(5): 1680-1685.
- Liu, Z., D. Auboeuf, et al. (2002). "Coactivator/corepressor ratios modulate PR-mediated transcription by the selective receptor modulator RU486." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 7940-7944.
- Lowery, M. A., D. P. Kelsen, et al. (2011). "An Emerging Entity: Pancreatic Adenocarcinoma Associated with a Known BRCA Mutation: Clinical Descriptors, Treatment Implications, and Future Directions." *Oncologist*.

- Lydon, J. P., F. J. DeMayo, et al. (1995). "Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities." *Genes Dev* **9**(18): 2266-2278.
- M. Espié, E. G. (2007). *Le sein*.
- Ma, X. J., R. Salunga, et al. (2003). "Gene expression profiles of human breast cancer progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10): 5974-5979.
- Ma, Y., P. Katiyar, et al. (2006). "The breast cancer susceptibility gene BRCA1 regulates progesterone receptor signaling in mammary epithelial cells." *Mol Endocrinol* **20**(1): 14-34.
- Madauss, K. P., E. T. Grygielko, et al. (2007). "A structural and in vitro characterization of asoprisnil: a selective progesterone receptor modulator." *Mol Endocrinol* **21**(5): 1066-1081.
- Malet, C., A. Gompel, et al. (1988). "Tamoxifen and hydroxytamoxifen isomers versus estradiol effects on normal human breast cells in culture." *Cancer Res* **48**(24 Pt 1): 7193-7199.
- Malet, C., A. Gompel, et al. (1991). "Estradiol and progesterone receptors in cultured normal human breast epithelial cells and fibroblasts: immunocytochemical studies." *J Clin Endocrinol Metab* **73**(1): 8-17.
- Malhotra, G. K., X. Zhao, et al. (2010). "Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers." *Cancer Biol Ther* **10**(10): 955-960.
- Manie, E., A. Vincent-Salomon, et al. (2009). "High frequency of TP53 mutation in BRCA1 and sporadic basal-like carcinomas but not in BRCA1 luminal breast tumors." *Cancer Res* **69**(2): 663-671.
- Marino, M., P. Ascenzi, et al. (2006). "S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions." *Steroids* **71**(4): 298-303.
- Marino, M., P. Galluzzo, et al. (2006). "Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription." *Curr Genomics* **7**(8): 497-508.
- Mark, W. Y., J. C. Liao, et al. (2005). "Characterization of segments from the central region of BRCA1: an intrinsically disordered scaffold for multiple protein-protein and protein-DNA interactions?" *J Mol Biol* **345**(2): 275-287.
- Marquis, S. T., J. V. Rajan, et al. (1995). "The developmental pattern of Brca1 expression implies a role in differentiation of the breast and other tissues." *Nat Genet* **11**(1): 17-26.
- Masters, J. R., J. O. Drife, et al. (1977). "Cyclic Variation of DNA synthesis in human breast epithelium." *J Natl Cancer Inst* **58**(5): 1263-1265.
- Mc Cormack, O., W. Y. Chung, et al. (2008). "Progesterone receptor B (PRB) promoter hypermethylation in sporadic breast cancer: progesterone receptor B hypermethylation in breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* **111**(1): 45-53.
- McEwan, I. J. and A. M. Nardulli (2009). "Nuclear hormone receptor architecture - form and dynamics: The 2009 FASEB Summer Conference on Dynamic Structure of the Nuclear Hormone Receptors." *Nucl Recept Signal* **7**: e011.
- McGowan, E. M. and C. L. Clarke (1999). "Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoints in breast cancer cells." *Mol Endocrinol* **13**(10): 1657-1671.
- McKenna, N. J. and B. W. O'Malley (2002). "Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators." *Cell* **108**(4): 465-474.
- McKenna, N. J. and B. W. O'Malley (2002). "Minireview: nuclear receptor coactivators--an update." *Endocrinology* **143**(7): 2461-2465.

- McManus, M. J. and C. W. Welsch (1984). "The effect of estrogen, progesterone, thyroxine, and human placental lactogen on DNA synthesis of human breast ductal epithelium maintained in athymic nude mice." *Cancer* **54**(9): 1920-1927.
- Medina, D. and F. S. Kittrell (2003). "p53 function is required for hormone-mediated protection of mouse mammary tumorigenesis." *Cancer Res* **63**(19): 6140-6143.
- Metcalfe, K., H. T. Lynch, et al. (2004). "Contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers." *J Clin Oncol* **22**(12): 2328-2335.
- Michael, Y. L., N. E. Carlson, et al. (2009). "Influence of stressors on breast cancer incidence in the Women's Health Initiative." *Health Psychol* **28**(2): 137-146.
- Migliaccio, A., D. Piccolo, et al. (1998). "Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor." *EMBO J* **17**(7): 2008-2018.
- Mihm, M., S. Gangooly, et al. (2011). "The normal menstrual cycle in women." *Anim Reprod Sci* **124**(3-4): 229-236.
- Miki, Y., J. Swensen, et al. (1994). "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." *Science* **266**(5182): 66-71.
- Miller, A. L., M. S. Webb, et al. (2005). "p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211." *Mol Endocrinol* **19**(6): 1569-1583.
- Molyneux, G., F. C. Geyer, et al. (2010). "BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells." *Cell Stem Cell* **7**(3): 403-417.
- Monninkhof, E. M., S. G. Elias, et al. (2007). "Physical activity and breast cancer: a systematic review." *Epidemiology* **18**(1): 137-157.
- Monteiro, A. N. (2003). "BRCA1: the enigma of tissue-specific tumor development." *Trends Genet* **19**(6): 312-315.
- Monteiro, A. N., A. August, et al. (1996). "Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 13595-13599.
- Moran, T. J., S. Gray, et al. (2000). "The glucocorticoid receptor mediates a survival signal in human mammary epithelial cells." *Cancer Res* **60**(4): 867-872.
- Mote, P. A., S. Bartow, et al. (2002). "Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis." *Breast Cancer Res Treat* **72**(2): 163-172.
- Mote, P. A., J. A. Leary, et al. (2004). "Germ-line mutations in BRCA1 or BRCA2 in the normal breast are associated with altered expression of estrogen-responsive proteins and the predominance of progesterone receptor A." *Genes Chromosomes Cancer* **39**(3): 236-248.
- Moutsatsou, P. and A. G. Papavassiliou (2008). "The glucocorticoid receptor signalling in breast cancer." *J Cell Mol Med* **12**(1): 145-163.
- Mulac-Jericevic, B., J. P. Lydon, et al. (2003). "Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(17): 9744-9749.
- Mulac-Jericevic, B., R. A. Mullinax, et al. (2000). "Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform." *Science* **289**(5485): 1751-1754.
- Mullan, P. B., J. E. Quinn, et al. (2006). "The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control." *Oncogene* **25**(43): 5854-5863.

- Murtagh, J., E. McArdle, et al. (2004). "Organization of mammary epithelial cells into 3D acinar structures requires glucocorticoid and JNK signaling." *J Cell Biol* **166**(1): 133-143.
- Musgrove, E. A., L. J. Hunter, et al. (2001). "Cyclin D1 overexpression induces progestin resistance in T-47D breast cancer cells despite p27(Kip1) association with cyclin E-Cdk2." *J Biol Chem* **276**(50): 47675-47683.
- Naccarato, A. G., P. Viacava, et al. (2000). "Bio-morphological events in the development of the human female mammary gland from fetal age to puberty." *Virchows Arch* **436**(5): 431-438.
- Narod, S. A., J. S. Brunet, et al. (2000). "Tamoxifen and risk of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a case-control study. Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group." *Lancet* **356**(9245): 1876-1881.
- Narod, S. A. and W. D. Foulkes (2004). "BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond." *Nat Rev Cancer* **4**(9): 665-676.
- Newman, B., M. A. Austin, et al. (1988). "Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(9): 3044-3048.
- Nieman, L. K., W. Blocker, et al. (2011). "Efficacy and tolerability of CDB-2914 treatment for symptomatic uterine fibroids: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIb study." *Fertil Steril* **95**(2): 767-772 e761-762.
- O'Donovan, P. J. and D. M. Livingston (2010). "BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair." *Carcinogenesis* **31**(6): 961-967.
- Onate, S. A., S. Y. Tsai, et al. (1995). "Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily." *Science* **270**(5240): 1354-1357.
- Ouchi, T., A. N. Monteiro, et al. (1998). "BRCA1 regulates p53-dependent gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2302-2306.
- Owen, G. I., J. K. Richer, et al. (1998). "Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin- dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300." *J Biol Chem* **273**(17): 10696-10701.
- Page, M. J., B. Amess, et al. (1999). "Proteomic definition of normal human luminal and myoepithelial breast cells purified from reduction mammoplasties." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22): 12589-12594.
- Palijan, A., I. Fernandes, et al. (2009). "Ligand-dependent corepressor LCoR is an attenuator of progesterone-regulated gene expression." *J Biol Chem* **284**(44): 30275-30287.
- Pang, D., M. Kocherginsky, et al. (2006). "Dexamethasone decreases xenograft response to Paclitaxel through inhibition of tumor cell apoptosis." *Cancer Biol Ther* **5**(8): 933-940.
- Pao, G. M., R. Janknecht, et al. (2000). "CBP/p300 interact with and function as transcriptional coactivators of BRCA1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3): 1020-1025.
- Park, J. J., R. A. Irvine, et al. (2000). "Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) is a coactivator of the androgen receptor." *Cancer Res* **60**(21): 5946-5949.
- Parker, M., G. Leonardsson, et al. (2003). "Identification of RIP140 as a nuclear receptor cofactor with a role in female reproduction." *FEBS Lett* **546**(1): 149-153.
- Paull, T. T., D. Cortez, et al. (2001). "Direct DNA binding by Brca1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 6086-6091.

- Perou, C. M., T. Sorlie, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* **406**(6797): 747-752.
- Petersen, O. W. and B. van Deurs (1988). "Growth factor control of myoepithelial-cell differentiation in cultures of human mammary gland." *Differentiation* **39**(3): 197-215.
- Petit-Topin, I., N. Turque, et al. (2009). "Met909 plays a key role in the activation of the progesterone receptor and also in the high potency of 13-ethyl progestins." *Mol Pharmacol* **75**(6): 1317-1324.
- Petz, L. N. and A. M. Nardulli (2000). "Sp1 binding sites and an estrogen response element half-site are involved in regulation of the human progesterone receptor A promoter." *Mol Endocrinol* **14**(7): 972-985.
- Petz, L. N., Y. S. Ziegler, et al. (2002). "Estrogen receptor alpha and activating protein-1 mediate estrogen responsiveness of the progesterone receptor gene in MCF-7 breast cancer cells." *Endocrinology* **143**(12): 4583-4591.
- Poller, D. N., M. J. Silverstein, et al. (1994). "Ideas in pathology. Ductal carcinoma in situ of the breast: a proposal for a new simplified histological classification association between cellular proliferation and c-erbB-2 protein expression." *Mod Pathol* **7**(2): 257-262.
- Ponglikitmongkol, M., S. Green, et al. (1988). "Genomic organization of the human oestrogen receptor gene." *EMBO J* **7**(11): 3385-3388.
- Poole, A. J., Y. Li, et al. (2006). "Prevention of Brca1-mediated mammary tumorigenesis in mice by a progesterone antagonist." *Science* **314**(5804): 1467-1470.
- Prat, A., J. S. Parker, et al. (2010). "Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer." *Breast Cancer Res* **12**(5): R68.
- Preston, D. L., A. Mattsson, et al. (2002). "Radiation effects on breast cancer risk: a pooled analysis of eight cohorts." *Radiat Res* **158**(2): 220-235.
- Proia, T. A., P. J. Keller, et al. (2011). "Genetic predisposition directs breast cancer phenotype by dictating progenitor cell fate." *Cell Stem Cell* **8**(2): 149-163.
- Pujol, P., S. G. Hilsenbeck, et al. (1994). "Rising levels of estrogen receptor in breast cancer over 2 decades." *Cancer* **74**(5): 1601-1606.
- Ramakrishnan, R., S. A. Khan, et al. (2002). "Morphological changes in breast tissue with menstrual cycle." *Mod Pathol* **15**(12): 1348-1356.
- Raouf, A., Y. Zhao, et al. (2008). "Transcriptome analysis of the normal human mammary cell commitment and differentiation process." *Cell Stem Cell* **3**(1): 109-118.
- Reale, M. G., D. Santini, et al. (1995). "Skeletal alkaline phosphatase as a serum marker of bone metastases in the follow-up of patients with breast cancer." *Int J Biol Markers* **10**(1): 42-46.
- Redig, A. J. and H. G. Munshi (2010). "Metabolic syndrome after hormone-modifying therapy: risks associated with antineoplastic therapy." *Oncology (Williston Park)* **24**(9): 839-844.
- Reedy, M. B., T. Hang, et al. (2001). "Antisense inhibition of BRCA1 expression and molecular analysis of hereditary tumors indicate that functional inactivation of the p53 DNA damage response pathway is required for BRCA-associated tumorigenesis." *Gynecol Oncol* **81**(3): 441-446.
- Reel, J. R., S. Hild-Petito, et al. (1998). "Antiovulatory and postcoital antifertility activity of the antiprogestin CDB-2914 when administered as single, multiple, or continuous doses to rats." *Contraception* **58**(2): 129-136.
- Reid, G., S. Denger, et al. (2002). "Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation." *Cell Mol Life Sci* **59**(5): 821-831.

- Rennstam, K., A. Ringberg, et al. (2010). "Genomic alterations in histopathologically normal breast tissue from BRCA1 mutation carriers may be caused by BRCA1 haploinsufficiency." *Genes Chromosomes Cancer* **49**(1): 78-90.
- Ritzke, C., P. Stieber, et al. (1998). "Alkaline phosphatase isoenzymes in detection and follow up of breast cancer metastases." *Anticancer Res* **18**(2B): 1243-1249.
- Rodriguez, J. A. and B. R. Henderson (2000). "Identification of a functional nuclear export sequence in BRCA1." *J Biol Chem* **275**(49): 38589-38596.
- Romieu, G., T. Maudelonde, et al. (1987). "The antiprogestin RU486 in advanced breast cancer: preliminary clinical trial." *Bull Cancer* **74**(4): 455-461.
- Rosen, E. M., S. Fan, et al. (2003). "BRCA1 gene in breast cancer." *J Cell Physiol* **196**(1): 19-41.
- Rosen, J. M., D. L. O'Neal, et al. (1978). "Progesterone-mediated inhibition of casein mRNA and polysomal casein synthesis in the rat mammary gland during pregnancy." *Biochemistry* **17**(2): 290-297.
- Rosen, J. M., S. L. Wyszomierski, et al. (1999). "Regulation of milk protein gene expression." *Annu Rev Nutr* **19**: 407-436.
- Rosen, J. M., C. Zahnow, et al. (1998). "Composite response elements mediate hormonal and developmental regulation of milk protein gene expression." *Biochem Soc Symp* **63**: 101-113.
- Rossouw, J. E., G. L. Anderson, et al. (2002). "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial." *JAMA* **288**(3): 321-333.
- Rowan, B. G. and B. W. O'Malley (2000). "Progesterone receptor coactivators." *Steroids* **65**(10-11): 545-549.
- Ruan, W., M. E. Monaco, et al. (2005). "Progesterone stimulates mammary gland ductal morphogenesis by synergizing with and enhancing insulin-like growth factor-I action." *Endocrinology* **146**(3): 1170-1178.
- Rudel, R. A., K. R. Attfield, et al. (2007). "Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention." *Cancer* **109**(12 Suppl): 2635-2666.
- Ruffner, H. and I. M. Verma (1997). "BRCA1 is a cell cycle-regulated nuclear phosphoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7138-7143.
- Russo, J., X. Ao, et al. (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**(3): 217-227.
- Russo, J., D. Mailo, et al. (2005). "Breast differentiation and its implication in cancer prevention." *Clin Cancer Res* **11**(2 Pt 2): 931s-936s.
- Russo, J., R. Moral, et al. (2005). "The protective role of pregnancy in breast cancer." *Breast Cancer Res* **7**(3): 131-142.
- Russo, J. and I. H. Russo (2004). "Development of the human breast." *Maturitas* **49**(1): 2-15.
- Russo, J., L. K. Tay, et al. (1982). "Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis." *Breast Cancer Res Treat* **2**(1): 5-73.
- Safe, S. and K. Kim (2008). "Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways." *J Mol Endocrinol* **41**(5): 263-275.
- Sandhu, S. K., T. A. Yap, et al. (2011). "The Emerging Role of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors in Cancer Treatment." *Curr Drug Targets*.

- Sartorius, C. A., M. Y. Melville, et al. (1994). "A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform." *Mol Endocrinol* **8**(10): 1347-1360.
- Schneider, M. R., H. Michna, et al. (1992). "The tumour-inhibiting potential of the progesterone antagonist Onapristone in the human mammary carcinoma T61 in nude mice." *J Cancer Res Clin Oncol* **118**(3): 187-189.
- Schultz, J. R., L. N. Petz, et al. (2003). "Estrogen receptor alpha and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression." *Mol Cell Endocrinol* **201**(1-2): 165-175.
- Scully, R., S. F. Anderson, et al. (1997). "BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(11): 5605-5610.
- Scully, R., J. Chen, et al. (1997). "Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage." *Cell* **90**(3): 425-435.
- Scully, R., S. Ganesan, et al. (1999). "Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line." *Mol Cell* **4**(6): 1093-1099.
- Sengupta, S., J. L. Vonesch, et al. (2000). "Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells." *EMBO J* **19**(22): 6051-6064.
- Sentis, S., M. Le Romancer, et al. (2005). "Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity." *Mol Endocrinol* **19**(11): 2671-2684.
- Shantakumar, S., M. B. Terry, et al. (2007). "Reproductive factors and breast cancer risk among older women." *Breast Cancer Res Treat* **102**(3): 365-374.
- Shen, L., J. Guo, et al. (2006). "Distinct domains for anti- and pro-apoptotic activities of IEX-1." *J Biol Chem* **281**(22): 15304-15311.
- Shen, S. X., Z. Weaver, et al. (1998). "A targeted disruption of the murine Brca1 gene causes gamma-irradiation hypersensitivity and genetic instability." *Oncogene* **17**(24): 3115-3124.
- Shen, T., K. B. Horwitz, et al. (2001). "Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294." *Mol Cell Biol* **21**(18): 6122-6131.
- Silver, D. P., S. D. Dimitrov, et al. (2007). "Further evidence for BRCA1 communication with the inactive X chromosome." *Cell* **128**(5): 991-1002.
- Silverstein, M. J., D. N. Poller, et al. (1995). "Prognostic classification of breast ductal carcinoma-in-situ." *Lancet* **345**(8958): 1154-1157.
- Simard, J., J. Feunteun, et al. (1993). "Genetic mapping of the breast-ovarian cancer syndrome to a small interval on chromosome 17q12-21: exclusion of candidate genes EDH17B2 and RARA." *Hum Mol Genet* **2**(8): 1193-1199.
- Smith, C. L. and B. W. O'Malley (2004). "Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators." *Endocr Rev* **25**(1): 45-71.
- Smith, D. F., L. Whitesell, et al. (1995). "Progesterone receptor structure and function altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent." *Mol Cell Biol* **15**(12): 6804-6812.
- Smith, G. H. and D. Medina (1988). "A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland." *J Cell Sci* **90** (Pt 1): 173-183.
- Soldin, O. P., K. H. Makambi, et al. (2011). "Steroid hormone levels associated with passive and active smoking." *Steroids* **76**(7): 653-659.

- Somasundaram, K., H. Zhang, et al. (1997). "Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/Cip1." *Nature* **389**(6647): 187-190.
- Sorlie, T., C. M. Perou, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10869-10874.
- Sorlie, T., R. Tibshirani, et al. (2003). "Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8418-8423.
- Spillman, M. A. and A. M. Bowcock (1996). "BRCA1 and BRCA2 mRNA levels are coordinately elevated in human breast cancer cells in response to estrogen." *Oncogene* **13**(8): 1639-1645.
- Spitz, I. M. (2003). "Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators: an overview." *Steroids* **68**(10-13): 981-993.
- Spitz, I. M., H. B. Croxatto, et al. (1996). "Antiprogestins: mechanism of action and contraceptive potential." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**: 47-81.
- Stingl, J., C. J. Eaves, et al. (1998). "Phenotypic and functional characterization in vitro of a multipotent epithelial cell present in the normal adult human breast." *Differentiation* **63**(4): 201-213.
- Stingl, J., C. J. Eaves, et al. (2001). "Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue." *Breast Cancer Res Treat* **67**(2): 93-109.
- Stratton, P., E. D. Levens, et al. (2010). "Endometrial effects of a single early luteal dose of the selective progesterone receptor modulator CDB-2914." *Fertil Steril* **93**(6): 2035-2041.
- Stull, M. A., M. M. Richert, et al. (2002). "Requirement for IGF-I in epidermal growth factor-mediated cell cycle progression of mammary epithelial cells." *Endocrinology* **143**(5): 1872-1879.
- Tanenbaum, D. M., Y. Wang, et al. (1998). "Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 5998-6003.
- Thakur, S., H. B. Zhang, et al. (1997). "Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal." *Mol Cell Biol* **17**(1): 444-452.
- Thompson, D. and D. F. Easton (2002). "Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers." *J Natl Cancer Inst* **94**(18): 1358-1365.
- Tirkkonen, M., O. Johannsson, et al. (1997). "Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations." *Cancer Res* **57**(7): 1222-1227.
- Tora, L., J. White, et al. (1989). "The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions." *Cell* **59**(3): 477-487.
- Turner, N., A. Tutt, et al. (2004). "Hallmarks of 'BRCAne' in sporadic cancers." *Nat Rev Cancer* **4**(10): 814-819.
- Vaughn, J. P., P. L. Davis, et al. (1996). "BRCA1 expression is induced before DNA synthesis in both normal and tumor-derived breast cells." *Cell Growth Differ* **7**(6): 711-715.
- Vicent, G. P., C. Ballare, et al. (2008). "Convergence on chromatin of non-genomic and genomic pathways of hormone signaling." *J Steroid Biochem Mol Biol* **109**(3-5): 344-349.

- Vicent, G. P., C. Ballare, et al. (2006). "Chromatin remodeling and control of cell proliferation by progestins via cross talk of progesterone receptor with the estrogen receptors and kinase signaling pathways." *Ann N Y Acad Sci* **1089**: 59-72.
- Vilasco, M., L. Communal, et al. (2011). "Glucocorticoid receptor and breast cancer." *Breast Cancer Res Treat*.
- Visvader, J. E. (2009). "Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis." *Genes Dev* **23**(22): 2563-2577.
- Visvader, J. E. (2011). "Cells of origin in cancer." *Nature* **469**(7330): 314-322.
- W.J. Kovacs, D. N. O. (1998). *The Adrenal Cortex*.
- Wagner, B. L., J. D. Norris, et al. (1998). "The nuclear corepressors NCoR and SMRT are key regulators of both ligand- and 8-bromo-cyclic AMP-dependent transcriptional activity of the human progesterone receptor." *Mol Cell Biol* **18**(3): 1369-1378.
- Wagner, B. L., G. Pollio, et al. (1999). "The novel progesterone receptor antagonists RTI 3021-012 and RTI 3021-022 exhibit complex glucocorticoid receptor antagonist activities: implications for the development of dissociated antiprogestins." *Endocrinology* **140**(3): 1449-1458.
- Wagner, B. L., G. Pollio, et al. (1996). "16 alpha-substituted analogs of the antiprogestin RU486 induce a unique conformation in the human progesterone receptor resulting in mixed agonist activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8739-8744.
- Wan, Y. and S. K. Nordeen (2002). "Overlapping but distinct gene regulation profiles by glucocorticoids and progestins in human breast cancer cells." *Mol Endocrinol* **16**(6): 1204-1214.
- Wang, C., S. Fan, et al. (2005). "Cyclin D1 antagonizes BRCA1 repression of estrogen receptor alpha activity." *Cancer Res* **65**(15): 6557-6567.
- Wang, R. H., H. Yu, et al. (2004). "A requirement for breast-cancer-associated gene 1 (BRCA1) in the spindle checkpoint." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(49): 17108-17113.
- Warburton, M. J., S. A. Ferns, et al. (1982). "Enhanced synthesis of basement membrane proteins during the differentiation of rat mammary tumour epithelial cells into myoepithelial-like cells in vitro." *Exp Cell Res* **137**(2): 373-380.
- Ward, R. D. and N. L. Weigel (2009). "Steroid receptor phosphorylation: Assigning function to site-specific phosphorylation." *Biofactors* **35**(6): 528-536.
- Wargon, V., L. A. Helguero, et al. (2009). "Reversal of antiprogestin resistance and progesterone receptor isoform ratio in acquired resistant mammary carcinomas." *Breast Cancer Res Treat* **116**(3): 449-460.
- Wei, L. L., C. Gonzalez-Aller, et al. (1990). "5'-Heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages." *Mol Endocrinol* **4**(12): 1833-1840.
- Wei, L. L., P. Hawkins, et al. (1996). "An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity." *Mol Endocrinol* **10**(11): 1379-1387.
- Wei, L. L., B. M. Norris, et al. (1997). "An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding." *J Steroid Biochem Mol Biol* **62**(4): 287-297.
- Weigelt, B., A. M. Glas, et al. (2003). "Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15901-15905.

- Whitfield, G. K., P. W. Jurutka, et al. (1999). "Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function." *J Cell Biochem Suppl* **32-33**: 110-122.
- Williams, S. P. and P. B. Sigler (1998). "Atomic structure of progesterone complexed with its receptor." *Nature* **393**(6683): 392-396.
- Williamson, E. A., F. Dadmanesh, et al. (2002). "BRCA1 transactivates the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1)." *Oncogene* **21**(20): 3199-3206.
- Wintermantel, T. M., D. Bock, et al. (2005). "The epithelial glucocorticoid receptor is required for the normal timing of cell proliferation during mammary lobuloalveolar development but is dispensable for milk production." *Mol Endocrinol* **19**(2): 340-349.
- Wood, J. R., V. S. Likhite, et al. (2001). "Allosteric modulation of estrogen receptor conformation by different estrogen response elements." *Mol Endocrinol* **15**(7): 1114-1126.
- Wu, M. X. (2003). "Roles of the stress-induced gene IEX-1 in regulation of cell death and oncogenesis." *Apoptosis* **8**(1): 11-18.
- Xiong, J., S. Fan, et al. (2003). "BRCA1 inhibition of telomerase activity in cultured cells." *Mol Cell Biol* **23**(23): 8668-8690.
- Xu, J., S. Fan, et al. (2005). "Regulation of the estrogen-inducible gene expression profile by the breast cancer susceptibility gene BRCA1." *Endocrinology* **146**(4): 2031-2047.
- Xu, X., W. Qiao, et al. (2001). "Genetic interactions between tumor suppressors Brca1 and p53 in apoptosis, cell cycle and tumorigenesis." *Nat Genet* **28**(3): 266-271.
- Xue, F., W. C. Willett, et al. (2011). "Cigarette smoking and the incidence of breast cancer." *Arch Intern Med* **171**(2): 125-133.
- Yi, P., M. D. Driscoll, et al. (2002). "The effects of estrogen-responsive element- and ligand-induced structural changes on the recruitment of cofactors and transcriptional responses by ER alpha and ER beta." *Mol Endocrinol* **16**(4): 674-693.
- Yoshida, K. and Y. Miki (2004). "Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage." *Cancer Sci* **95**(11): 866-871.
- Yoshida, S., N. Ohara, et al. (2010). "Cell-type specific actions of progesterone receptor modulators in the regulation of uterine leiomyoma growth." *Semin Reprod Med* **28**(3): 260-273.
- Zhang, H., K. Somasundaram, et al. (1998). "BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity." *Oncogene* **16**(13): 1713-1721.
- Zhang, R. R., Y. G. Man, et al. (2003). "A subset of morphologically distinct mammary myoepithelial cells lacks corresponding immunophenotypic markers." *Breast Cancer Res* **5**(5): R151-156.
- Zheng, L., L. A. Annab, et al. (2001). "BRCA1 mediates ligand-independent transcriptional repression of the estrogen receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17): 9587-9592.

ANNEXES

ANNEXES

Durant ma thèse, j'ai contribué au niveau expérimental et rédactionnel à un article et à une revue insérés dans ces annexes :

- Courtin A., Communal L., *et al.* (2011). "Glucocorticoid receptor activity discriminates between progesterone and medroxyprogesterone acetate effects in breast cells." *Breast Cancer Res Treat.*
- Vilasco M., Communal L., *et al.* (2011). "Glucocorticoid receptor and breast cancer." *Breast Cancer Res Treat.*

Glucocorticoid receptor activity discriminates between progesterone and medroxyprogesterone acetate effects in breast cells

Aurélie Courtin · Laudine Communal · Myriam Vilasco · Daniela Cimino ·
Najat Mourra · Michele de Bortoli · Daniela Taverna · Anne-Marie Faussat ·
Marc Chaouat · Patricia Forgez · Anne Gompel

Received: 20 September 2010/Accepted: 4 February 2011
© Springer Science+Business Media, LLC. 2011

Abstract The purpose of this article is to determine the tumorigenic potential of estradiol treatment (E2) when combined with either progesterone (P4) or medroxyprogesterone acetate (MPA) in normal luminal human breast cells (HBE) and in human breast cancer cells (T47-D, MCF-7). Proliferation profiles were evaluated, along with the gene transactivation activity between the progesterone and glucocorticoid receptors (PR, GR) in HBE, T47-D, and MCF-7 cells treated by E2 + P4 or E2 + MPA. High throughput transcriptome analysis was performed on RNA from HBE cells treated by E2, E2 + MPA and E2 + P4. GR content was analyzed in normal breast cells as well. In HBE cells, E2 + P4 treatment was antiproliferative and promoted cellular differentiation. In contrast, E2 + MPA displayed mitogenic, antiapoptotic effects in HBE cells and

did not influence cellular differentiation. The effect of P4 and MPA on cell proliferation was, however, variable in breast cancer cells. In cells containing GR or/and PR, MPA decreased proliferation whereas P4 antiproliferative effect needed the presence of PR. In HBE cells, the regulation of genes by E2 + P4, and E2 + MPA was significantly different, particularly in cell proliferation and cell death gene families. Further analysis revealed a modulation of the glucocorticoid receptor gene expression pathway by E2 + MPA. Predominant MPA glucocorticoid activity in normal and breast cancer cells was demonstrated using a glucocorticoid antagonist and the down-regulation of the GR by RNA interference. In normal luminal breast cells and in breast cancer cells, P4 and MPA combined with E2 treatment have opposing mitogenic effects due to GR. The consequences of MPA glucocorticoid potencies as well as the importance of GR in breast tissue merit a reappraisal.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:[10.1007/s10549-011-1394-5](https://doi.org/10.1007/s10549-011-1394-5)) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Courtin · L. Communal · M. Vilasco · N. Mourra ·
P. Forgez · A. Gompel
INSERM-UPMC, UMRS 938, Hôpital Saint-Antoine, Paris,
France

D. Cimino · M. de Bortoli · D. Taverna
Center for Molecular Systems Biology and Department of
Oncological Sciences, University of Torino, c/o Institute for
Cancer Research and Treatment (IRCC), Candiolo, Italy

D. Cimino · D. Taverna
Molecular Biotechnology Center, University of Torino, Turin,
Italy

N. Mourra
Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, AP-HP, Hôpital
Saint-Antoine, Paris, France

A.-M. Faussat
Plateforme de Cytométrie, IFR 65-St Antoine UPMC, Paris,
France

M. Chaouat
Université Paris Diderot, AP-HP, Hôpital Saint-Louis,
Service de Chirurgie Plastique, Paris, France

A. Gompel (✉)
Université Paris Descartes, AP-HP, Hôtel-Dieu,
UF de Gynécologie, 1 Place du Parvis Notre-Dame,
75004 Paris, France
e-mail: anne.gompel@htd.aphp.fr

Keywords Proliferation · Differentiation · Microarrays · Normal breast cells · Glucocorticoid · Glucocorticoid receptor silencing · Antiglucocorticoid · Antiprogestin · VA-2914 · FAS · IEX-1

Introduction

Hormonal replacement therapy (HRT) is commonly used to treat climacteric symptoms and prevent postmenopausal disorders. This treatment often combines estradiol (E2) or estradiol derivatives with progestogens. Progestogens were included to protect the endometrium against the development of estrogen-induced neoplasia. Today, several progestogen compounds are commercially available, and depending on the structure of these molecules, progestogens can exert additional hormonal effects in addition to their progestogenic and antiestrogenic activities. These activities are suspected to alter the risk of breast cancer. For example, the Women Health initiative randomized trial reported a small increase in breast cancer risk with HRT, including conjugated estrogens and medroxyprogesterone acetate (MPA) [1]. In a large French cohort ($>80,000$ women), treatment with E2 combined with progesterone (P4), or E2 combined with dydrogesterone did not increase the relative risk of breast cancer [2]. However, HRT composed of E2 in combination with different synthetic progestogens were associated with a significant increase in the breast cancer risk [2], suggesting that the use of P4 or components with pure progestogen activity, do not influence the relative risk. Presently, with the exception of France, most countries are using predominantly synthetic progestogens in HRT, occulting the comparison and analysis from studies in different countries [3].

The analysis of the proliferative activities of progestogens from published data is complicated by a number of factors. Foremost, progestogen research has occurred under different testing conditions and notably with different molecules. In addition, in a number of cases the terms progesterone and synthetic progestogens were interchangeably used despite tangible differences in their biochemistry [4].

Progesterone and synthetic progestogens have diverse steroid specificities, and consequently different pharmacological properties [5]. Studies comparing the impact of P4 and MPA combined with E2 on proliferation and differentiation in normal human breast cells and breast cancer cells are sparse. In mammary tissues collected from ovariectomized cynomolgus macaques female adults, Wood et al. [6, 7] reported that E2 combined with MPA was mitogenic and activated growth factor signalization. This effect was not seen with E2 combined with P4 treatment. The major pharmacological differences between P4

and MPA are the glucocorticoid and androgenic properties of MPA. While P4 and glucocorticoids (GC) bind to identical DNA recognition sites, the two hormones mediate very distinct biological functions [8]. Few reports have noted the importance of GC in breast cancer progression [9, 10] while in breast cancer cell lines, they were characterized for their antiproliferative and antiapoptotic activities [11, 12]. Most recently, GR activation was proposed to explain an enhanced tumor growth in rats submitted to recurrent stress [9]. However, only a few studies have reported to date on GR expression in breast cancers and no link has been reported between GR expression levels and breast cancer prognosis [13].

Breast cells are constantly exposed to estrogens, either exogenously administrated in combination with progestogens, secreted from the ovaries before menopause, or locally produced by aromatization of circulating androgens. Moreover, progestogens cellular responses and PR expression are modulated by E2 in normal and cancer breast cells. In this article, we evaluated the impact of the GC properties of MPA on normal and breast cancer cells in equivalent conditions of female hormonal plasma levels undergoing HRT. We, therefore, only compared the effects of P4 and MPA in the presence of E2. Under these conditions, we detected opposing effects of MPA and P4 on cell proliferation and gene regulation in different breast cell models. Using a glucocorticoid antagonist and GR silencing by RNA interference, we demonstrated that these effects were related to the activation of the glucocorticoid receptor of MPA in normal cells and in breast cancer cells expressing GR.

Materials and methods

Reagents and steroids

17β estradiol (E2), Progesterone (P4), medroxyprogesterone acetate (MPA), dexamethasone (DEX), insulin, Epidermal Growth Factor (EGF), transferrin, cholera toxin, cortisol, hyaluronidase, thymidine, mevinolin, ribonuclease A, were purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France). The progesterone receptor antagonist VA-2914 (VA) was kindly provided by HRA Pharma (Paris, France). The glucocorticoid receptor antagonist ORG-34116 (AG) was kindly provided by Dr HJ Kloosterboer ex-Organon (Oss, The Netherlands).

Cell culture procedures

T47-D and MCF-7 cell lines were, respectively, maintained in RPMI 1640 and in DMEM medium (Invitrogen, Cergy-

Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum. In some experiments, cortisol (5 ng/ml) was added.

Normal human breast epithelial cell (HBE) cultures resulting from specimens of normal breast, obtained from 16 women (aged 15–25 years) undergoing surgery for reduction mammoplasty, with their informed consent according to the Ethical National rules and processed according to the French law on clinical experimentation. The patients had no reported history of breast disease and pathological studies showed only normal breast tissue. The procedure used for the HBE culture has been described elsewhere [14]. HBE cells were maintained in HAM F10 medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) containing NaHCO_3 (0.24%), penicillin–streptomycin (1%), cortisol (5 ng/ml), T3 (6.5 ng/ml), cholera toxin (10 ng/ml), transferrin (5 mg/ml), insulin (0.016 U/ml) and EGF (10 ng/ml), and 5% human serum.

The steroid receptor content of the three cell types used was measured by ER-EIA (Laboratory of Hormone Biochemistry Hôpital Bicêtre). The relative amount of ER and PR between HBE and breast cancer cells was about 50–100 times different (personal data). We previously demonstrated the presence and hormonal regulation of PR and ER in our model of HBE cells [14, 15]. Nonetheless, we reconfirmed the presence of ER and PR using cytospin analysis and further characterized HBE cells as keeping a luminal differentiation using labelling positive for cytokeratine 18 (CK18) (Supplementary Fig. 1). Cytospins were then incubated with ER (6F11 Novocastra) (1:50) or PR (PGR-312 Novocastra) (1:200) (antibodies for 24 h at 4°C and a streptavidin–biotin–peroxidase method (Vectastain kit, Abcys, Paris, France).

The presence and hormonal regulation of PR and ER were verified by RT-PCR in each experiment. The Ct values corresponding to ER in HBE cells were 29.8 ± 1.6 (mean \pm SEM) as compared to 25 ± 1.45 in MCF-7 cells and 21.9 ± 0.5 in T47-D cells. For PR, the Ct values were 27.0 ± 1.7 , 28.7 ± 2.0 and 22.4 ± 0.9 for HBE, MCF-7 and T47-D cells, respectively (Fig. 1 Supplementary data).

Steroid treatments

After seeding, cells were starved for 24 h in serum-free and phenol red-free medium. Then cells were treated with progesterone (100 nM) or MPA (100 nM), alone or in combination with estradiol (10 nM) or with DEX (100 nM), VA (100 nM), AG (1 μ M). Control cells were treated with ethanol as vehicle (1:1000). Treatments were carried out in a phenol red-free medium containing 5% dextran–charcoal-stripped serum for a period of 48 h in breast cancer cells and 96 h in HBE cells due to difference in doubling time and optimal conditions as previously reported [16–19]. Steroid concentrations were chosen

according to two criteria. First, previous experiments have shown that the maximal antiproliferative effects of synthetic progestogens were observed at 100 nM [20]. Secondly, it corresponds to the plasmatic levels reported after administration of 5 mg of MPA/day (5 nM) [21]. Moreover, during the luteal phase, the level of progesterone is from 10 to 40 ng/ml.

Microarray analysis

Gene expression analysis was carried out using Illumina BeadArray Technology for Whole Genome Gene Expression (Illumina, Inc., USA). Three RNA preparations from HBE cells were used for each experimental point. The cultures were obtained from three different women. Cells were treated for 6 h with hormones then total RNA were extracted using Trizol reagent. 10 μ g aliquots of total RNA was treated with DNase I, using the “DNA free” kit (Ambion, Inc., USA) to eliminate genomic DNA contamination. Total RNA quality and quantity were assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer and the RNA 6000 Nano Assay kit (Agilent Technologies, USA). Only high-quality RNA, having an RNA integrity (RIN) scores above 8.0, was used for subsequent analysis.

Labelling was performed using the Illumina TotalPrep RNA Amplification kit (Ambion). Briefly, a first strand cDNA was synthesized from 500 ng of each RNA samples, than a second strand cDNA synthesis step was performed. Double-stranded cDNA was purified and biotin-labeled by in vitro transcription reaction of 12 h. The biotinylated cRNA targets were then purified and the concentration in vitro transcription products was determined using the NanoDrop 1000A Spectrophotometer (Ambion). The cRNA size distribution was evaluated by the Agilent 2100Bioanalyzer.

750 ng of amplified cRNA was hybridized to Human-HT-12 v3 Expression BeadChip arrays (Illumina, Inc., USA), according to manufacturer directions. Hybridized BeadChip arrays were stained with Amersham fluorolink streptavidin-Cy3 (GE Healthcare). BeadChip arrays were scanned with the Illumina BeadStation Scanner. The BeadStudio software v3.4.0 (Illumina, USA) was used to perform a Rank invariant normalization and to compile data values with detection scores.

Data preprocessing was performed using the R statistical package ONE CHANNEL GUY (<http://www.bioconductor.org/>). Filtering procedure was done employing IQR filtering function using as cut an interquartile range within the various samples lower than 0.25. Because of the small sample size, the selection step of differentially expressed genes was done using a TTest between subjects with Welch approximation and Alpha (overall threshold P value) = 0.01; the P value was based on permutation and

the significance was determined by the Adjusted Bonferroni Correction (TIGR MeV, www.tigr.org).

On each list of differentially expressed genes, we performed a gene ontology (GO) analysis to assess enrichment in GO categories.

For functional pathways analysis we used a more stringent approach. Differential gene lists were crossed and only genes modulated specifically by each treatment with a fold change cut of ± 1.2 , were retained for successive analyses.

Statistical analyses of gene ontology (GO) terms and functional pathways analysis were performed using the web-based tool IPA (Ingenuity System, inc., <http://www.ingenuity.com>). This tool provides GO terms and functional pathways with their significant probabilities of enrichment (p-values from Fisher Exact test) compared with the reference gene list (Illumina HumanHT-12 v3 BeadChip arrays list). The *P* value accepted for significant enrichment was lower than 0.05.

Raw data and intensity values are available in GEO (record no: GSE23500).

Western blots

Cell lysates (30–80 μ g) were subjected to a 10% polyacrylamide gel electrophoresis and proteins were transferred and detected using a chemoluminescence procedure. GR expression was analyzed with the human anti-GR polyclonal primary antibody (1:1000) (GR (H300), sc-8992, Santa Cruz, Heidelberg, Germany) and with an anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody (1:5000) (Santa Cruz, Heidelberg, Germany). Quantification of the relative expression of GR was performed using ExploraNova Morpho Expert software.

Reporter enzyme assays

Cells were transfected with MMTV-LUC and GRE-LUC plasmid reporters by using Lipofectamine Reagent or Lipofectamine LTX Reagent, respectively, in breast cell lines or HBE cells (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Transfection was performed according to the manufacturer instructions. 24 h after transfection, breast cell lines and HBE cells were treated with hormones for 24 h or 48 h, respectively. At the end of the experiment, cells were lysed and luciferase activity was determined using the Luciferase Assay System (Promega, Charbonnières-les-bains, France).

GR silencing and siRNA transient transfections

MCF-7 cells and HBE cells were transiently transfected with 10 nM of either siRNA control or siRNA GR using the HiPerFect Reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France) in MCF7 or the Lipofectamine LTX Reagent in HBE cells

according to the manufacturer instructions. SiRNA GR transfection consisted in a transfection of four siRNA GR/NR3C1 sequences from Qiagen Flexitube Gene Solution GS2908 (NR3C1_5, NR3C1_6, NR3C1_1, NR3C1_2) which recognised the α -, β - and γ -GR isoforms. Cells were washed 48 h after transfection and harvested after 96 h for MCF-7 cell line and 120 h for HBE cells for experiments. For reporter transactivation experiments, cells were washed 48 h after siRNA transfection and then transfected with the GRE-LUC plasmid reporter using Lipofectamine Reagent for MCF-7 cells or Lipofectamine LTX Reagent for HBE cells. 24 h after the reporter transfection and 72 h after the siRNA transfection, cells were treated with hormones for 24 or 48 h, respectively in MCF-7 and HBE cells.

Proliferation assays

Flow cytometry analysis

Cells were synchronized with a 40 h of mevinolin at 20 μ M treatment for HBE cells or with a double thymidine block for MCF-7 cells [22]. After release of synchronization, cells were washed in PBS, trypsinized and centrifuged 5 min at 1350 rpm. Cells were fixed with 70% ethanol overnight and before analysis, cells were washed in PBS and stained with 10 μ g/ml propidium iodide in PBS (containing 0.835 U/ml ribonuclease A). For each sample at least 10,000 cells were counted on a BD LSR II flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). After gating out doublets and debris, cycle distribution and subG1 phase were analyzed using the ModFit LT software (Verity Software House).

Tritiated thymidine incorporation

Quantification of MCF-7 and T47-D cell proliferation was determined using thymidine incorporation under various treatments. 24 h after the beginning of hormonal treatment, cells were incubated with 2 μ Ci of [methyl- 3 H] Thymidine for 20 h for T47-D and for MCF-7 cells at 37°C. After incubation cells were washed twice with PBS 1× and once with 5% TCA (Trichloroacetic acid). Cells were incubated in 5% TCA for 15 min at 4°C and lysed in NaOH 0.1 N for 15 min at 37°C. The total cell lysate was added to 5 ml of scintillation liquid (Optiphase Hisafe 2, Perkin Elmer) and radioactivity was counted with a β counter (Beckman, LS-5000-CE).

The cell proliferation was also alternatively analysed using 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporation with the BrdU Cell Proliferation Assay kit (Merck, Nottingham, UK) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 10⁴ cells were seeded into 96 well culture dishes and treated with hormones. 24 h after treatments, the BrdU Label

(1:2000) was added to the media culture for 20 h. After fixing and denaturing, cells were successively incubated with Anti-BrdU antibody (1:100), the peroxydase goat anti-mouse IgG HRP conjugate and substrate and then absorbances were measured.

Real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted using Trizol Reagent. 2 µg of total RNA was subjected to reverse transcription (RT) by using random primers for 1 h at 37°C. 2 µl of RT product was diluted (1:10) and subjected to quantitative PCR using sequence specific primers (300 nM) and Brilliant SYBR GREEN QPCR master mix on an Mx3000P apparatus (Agilent Technologies, Massy, France). Sequence Primers for target genes were: FAS, upper, 5'-tacatcgactgcatcg gca-3'; lower, 5'-gatacttccgtcgatac-3'; IEX-1, upper, 5'-cggccctgagatttcac-3'; lower, 5'-accctttcagccatcagg-3'; 36B4, upper, 5'-gattggctaccaactgtt-3'; lower, 5'-cagggg cagcagccacaaa-3'. Thermocycling conditions: 1 cycle at 95°C for 10 min and 40 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 1 min, and 72°C for 30 s. Gene expression values were normalized to the housekeeping gene 36B4.

For microarray validation, RealTime qRT-PCR were performed on cDNA corresponding to 10 ng of RNA and with the sequence-specific primers assay mix (Qiagen, Stanford, CA). Qiagen assays used in validation analysis were for: BLVRA, TMEM44, STARD13, IL6, IL33, FKBP5, FGF18, KCNN4 and IL10. Fourteen validations were done using these genes: 7 in E2 + MPA-treated cells, 5 in E2 + P4 and 2 in E2-treated cells.

Immunohistochemistry

Paraffin sections were de-waxed and rehydrated and antigens sites were retrieved by treating sections in sodium citrate buffer overnight in the Retriever 2100 apparatus (PickCell Laboratories, The Netherlands). Sections were incubated with a primary polyclonal antibody against human GR (1:75) and a streptavidin–biotin–peroxidase method (Vectastain kit, Abcys, Paris, France). A negative control (omitting the first antibody) and a positive control (normal appendix) were included in the series.

Immunofluorescence staining

Cells were grown on coverslips for 2 days. Cells were fixed successively with PFA 4% for 5 min at room temperature, with methanol and acetone at -20°C for 4 min each. Then cells were permeabilized with 1% PBS-Triton X-100 for 30 min. Cells were then incubated 2 h at 37°C with the human primary polyclonal GR (1:200) (Santa Cruz

Biotechnologies) and CK18 (Sigma, St Quentin Fallavier, France) (1:800) antibodies followed by the fluorescent Cyanine 3 conjugated rabbit anti-human IgG (1:200) (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) or Alexa Fluor 488 conjugated mouse anti-human IgG (1:400) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) secondary antibodies for 20 min at 37°C. Then cells were stained with DAPI and the coverslips were mounted with the Prolong Gold reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

Statistical analysis

To determine the statistical significance of treatments, the data were analysed using One-way ANOVA tests and multiple range Student–Newman–Keuls tests were performed to compare the relative efficiency of each treatment with the InStat 3 software (GraphPad, USA). $P < 0.05$ was considered as significant.

Results

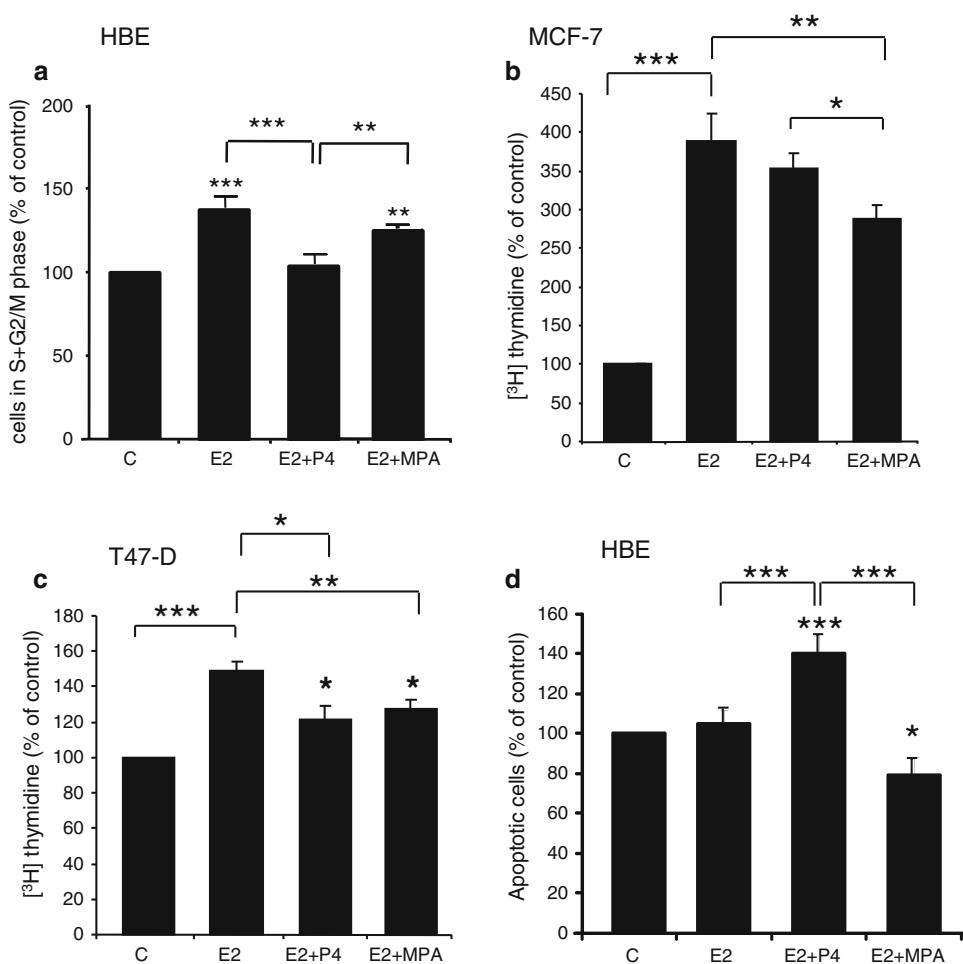
Differential effect of P4 and MPA on cell proliferation

Cellular proliferation was compared in HBE, MCF-7, and T47-D cells treated with E2 alone or combined with P4 or MPA (Figs. 1a, b, c). In agreement with the known effects of E2 on breast cells, an increase of $139 \pm 8\%$ ($P < 0.001$), $389 \pm 35\%$ ($P < 0.001$), and $149 \pm 19\%$ ($P < 0.001$), in cell DNA content was observed in HBE, MCF-7 cells, and T47-D, respectively.

In HBE cells, P4 counteracted the E2 proliferative effects (Fig. 1a). A significant reduction in the number of cells in S and G2 phase was observed, as compared to cells treated only with E2 ($P < 0.001$). Consequently, a similar cellular proliferation rate occurred in cells treated with P4 in combination with E2 than in untreated cells. In contrast, MPA much less altered the E2-mediated cell proliferation (Fig. 1a). The number of apoptotic cells was also significantly increased by E2 + P4 ($140 \pm 10\%$; $P < 0.001$) as compared to the control whereas apoptosis was decreased in E2 + MPA treated cells ($79 \pm 9\%$; $P < 0.05$) (Fig. 1d).

In breast cancer cells, differential cellular growth regulation is observed. In MCF-7 cells, P4 did not counteract the effect of E2 on cell proliferation, as the proliferation rate was identical to those cells treated by E2 alone (Fig. 1b). In T47-D cells, the combined treatment of P4 with E2 resulted in a decrease of cell proliferation as compared to E2 treatment alone ($22.1 \pm 6.9\%$; $P < 0.05$) (Fig. 1c). In contrast to HBE cells, in MCF-7 and T47-D cells, MPA reduced the cell proliferation induced by E2 by $26.1 \pm 3.6\%$ ($P < 0.01$) and $15.7\% \pm 2.0\%$ ($P < 0.05$), respectively (Figs. 1b, c). Interestingly, in MCF-7 cells,

Fig. 1 P4 and MPA on cell proliferation. Cell proliferation (a) and apoptosis (d) were measured by flow cytometry in HBE cells treated for 96 h with 10 nM E2 alone or combined with 100 nM P4 or 100 nM MPA (mean \pm SEM, $n = 5$, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$). Cell proliferation was measured by [3 H] thymidine incorporation in MCF-7 (b) and T47-D (c) after 48 h treatment with E2 (10 nM) alone or combined with P4 (100 nM) or MPA (100 nM) (results are expressed as % of control in mean \pm SEM, $n = 3$ for T47-D, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$)



MPA was more efficient to neutralize cellular proliferation than P4. This differential effect of P4 and MPA was not seen in T47-D cells (Fig. 1c). Moreover, apoptosis analysis in MCF-7 cells demonstrated that addition of P4 or MPA did not significantly modify the apoptosis induced by E2 (data not shown). This indicates that MPA combined with E2 in MCF-7 can oppose the proliferative effects of E2, but does not act as a pro apoptotic agent in these cells.

These results suggest that P4 and MPA potencies on proliferative E2 activities are different depending if treatment is administrated to normal or breast cancer cells. In contrast, P4 and MPA induce opposite effects of apoptosis independent of the cell type.

Differential effect of P4 and MPA on cell differentiation

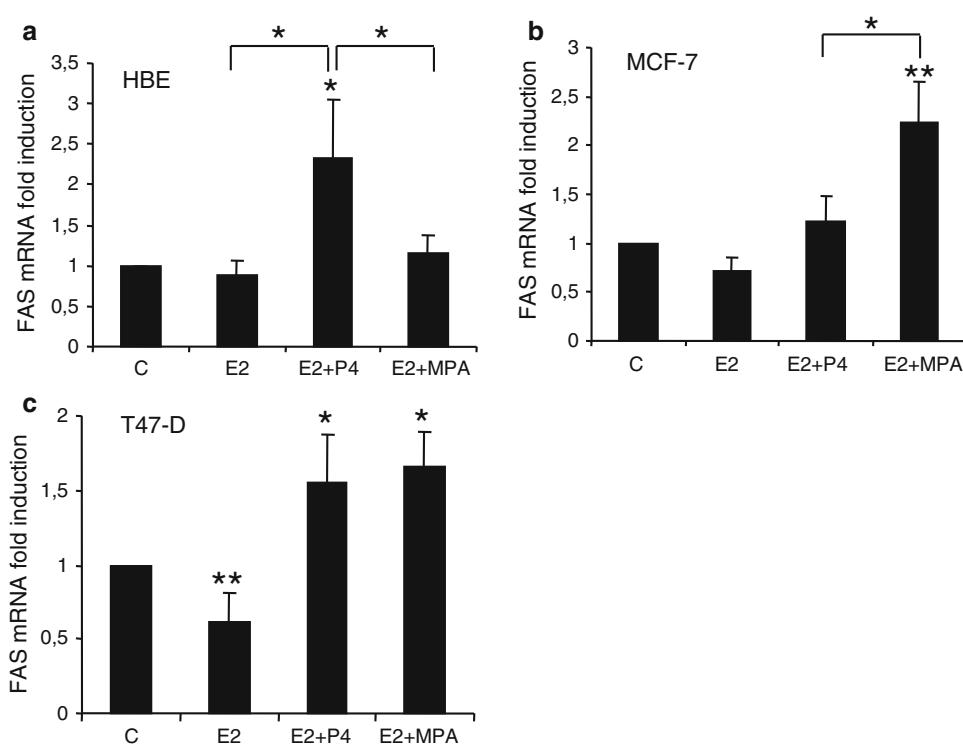
The differentiation state as well as the presence of factors maintaining differentiation, foretells the onset of cell transformation and neoplastic progression. If the role of P4 on mammary epithelium differentiation is well known, those of MPA are less detailed. We analyzed the expression

levels of fatty acid synthetase (FAS), known to be associated with differentiation in normal breast tissue [23]. The role of FAS in breast cancer remains ambiguous since it has been associated with invasion and is negatively correlated with PR expression level [24, 25]. In HBE cells, only P4 induced FAS expression (Fig. 2a). While in MCF-7 cells, only MPA increased FAS mRNA levels (Fig. 2b), in T47-D cells both treatments P4 and MPA similarly increased FAS mRNA levels (Fig. 2c). These results suggested that in normal epithelial cells, MPA does not exhibit cellular differentiation potency. In contrast, in MCF-7, the FAS induction observed under MPA treatment could suggest a potential deleterious effect of MPA.

Differential gene regulation by P4 and MPA in normal breast cells

The data above described an opposite effect of MPA and P4 on cellular proliferation and differentiation in HBE cells. These observations suggest that MPA treatment could be associated with a loss of the protective effect usually conferred by P4 to normal epithelial breast cells. In

Fig. 2 P4 and MPA on FAS transcription. FAS mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR in HBE (a), MCF-7 (b), and T47-D (c). Cells were treated with E2 (10 nM) alone or combined with P4 (100 nM) or MPA (100 nM) for 48 h. Normalization was performed as indicated in “Materials and methods” section and the basal expression in untreated cells was normalized to 1 (mean \pm SEM, $n = 7$ (MCF-7 and HBE), $n = 4$ (T47-D), $*P < 0.05$, $**P < 0.01$)



order to clarify this observation, gene expression profiles of HBE cells treated with P4 and MPA in combination with E2, or by E2 alone, and compared to untreated cells was performed. As shown in Fig. 3a, only 39 genes were commonly regulated by P4 and MPA treatments, and only nine were regulated by all three treatments, suggesting that the cellular responses to these treatments are divergent. Indeed, 257 genes were regulated exclusively by E2 and P4, 204 by E2 and MPA, and 132 specific genes by E2 alone treatment (Fig. 3a).

We performed a GO analysis (Fig. 3b). We found significant enrichment in many categories linked to development, cellular growth and cancer in the three gene lists examined. GO analysis showed that gene families associated with cell death ($P = 0.0000272$) and cell growth and proliferation ($P = 0.00119$) were the most highly enriched by E2. After combination with P4, the profile was quite different: cell morphology and cellular function and maintenance were both highly significantly modulated ($P = 0.000358$ for each). In cells treated by E2 + MPA, cell death and small molecular biochemistry involved genes were the most significantly altered (Fig. 3b) ($P = 0.000593$ for each) in accordance with the results on apoptosis shown in Fig. 1b.

Moreover, taking into account only those genes specifically modulated by each treatment we observed significant enrichment in different pathways. In particular, E2-modulated genes were related to signalling and metabolism, taking part in RhoA signalling ($P = 0.0158$), lysine

degradation ($P = 0.0380$), and glutathione metabolism ($P = 0.0372$). The combination of P4 with E2 mostly regulated molecules associated with metabolic functions and immune responses such as pentose phosphate pathways ($P = 0.0479$), galactose metabolism ($P = 0.00166$), folate biosynthesis (0.0138), and granzyme-A signalling ($P = 0.0138$). Finally, the combination of MPA with E2 regulated genes involved either in signalling or in metabolic pathways such as G-protein coupled receptor signalling ($P = 0.0191$), cAMP-mediated signalling ($P = 0.00646$), pyruvate metabolism ($P = 0.0182$), PXR/RXR activation ($P = 0.0138$), and glucocorticoid receptor signalling ($P = 0.0389$).

Microarray results were validated on 71% of genes (10/14) in the analysed conditions by real-time PCR (data not shown).

Effect of natural and synthetic progestogens on gene transactivation

MPA treatment modulated significantly the GR signalling pathways in HBE cells microarrays analysis. MPA has known mixed steroid properties, such as GR gene binding and transactivation, whereas P4 has no significant glucocorticoid activity [5, 26]. In order to elucidate if their opposite effects on cellular proliferation and differentiation were due to their different steroidal potencies, we further looked at the transactivation efficacy of the two progestogens on PR and GR-dependent reporter genes.

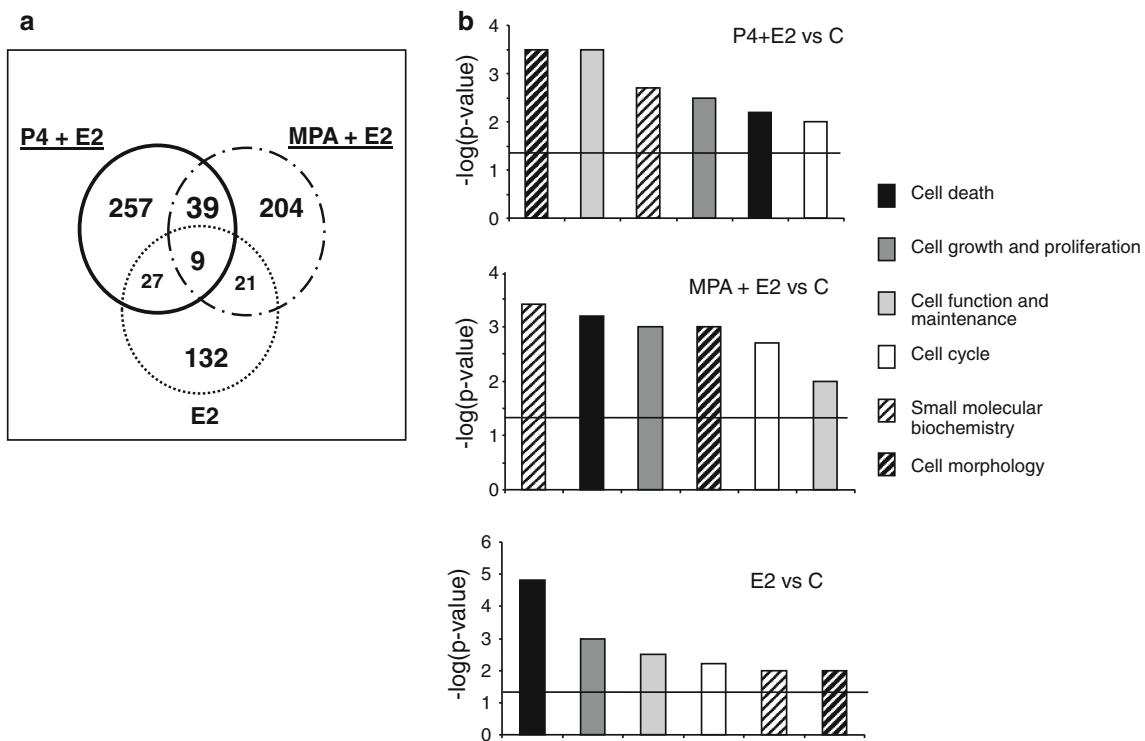


Fig. 3 Gene expression profiles in HBE cells treated with E2 + P4 and E2 + MPA. cDNA from three HBE cell preparations treated for 6 h with 10 nM E2 alone or combined with 100 nM P4 or 100 nM MPA were hybridized on microarrays. The gene expression profiles

were analyzed and compared to untreated HBE cells. **a** Number of genes significantly regulated by each treatment. **b** Gene expression analysis sorted by major function. Statistical analyses were performed using the web-based tool DAVID Resource

Normal and breast cancer cells were transiently transfected with the MMTV-LUC reporter vector containing both progestogen and glucocorticoid-responsive elements. In HBE and T47-D cells, P4 and MPA induced reporter transcription, (Figs. 4a, b). These effects were inhibited by the antiprogestogen, VA and the anti-glucocorticoid AG [27] (Figs. 4a, b). In contrast, we observed that only MPA-induced reporter transcription in MCF-7 cells. P4 treatment had no effect even when cells were co-treated by E2 in order to stimulate progesterone receptor (PR) expression (Fig. 4c). This latter result suggested that the induction of MPA-mediated reporter vector was not dependent on the PR cell content in MCF-7 cells. MPA MMTV-LUC reporter induction was totally counteracted by AG, and partially by VA. However, it is known that anti-progestogen also exhibits anti-glucocorticoid activities [28]. These data show that in MCF-7 cells, nuclear PR is inactive, suggesting that the MMTV-LUC reporter induction by MPA is mediated by its glucocorticoid properties.

GR content in normal and cancerous breast cells

GR has been reported to be present in breast cancer cell lines [13, 29, 30]. However, very little information in normal breast tissue is available [29]. We analyzed the GR

content to better correlate the results obtained with MPA in our cellular models. As shown in Fig. 5a, GR expression was detected in HBE cells in the nuclei from cells expressing the luminal marker CK18. We confirmed the expression of GR in luminal epithelial and myoepithelial cells from ductal and lobular structures, as GR staining was observed in the cytoplasm and most of the nuclei when studied by immunohistochemistry in normal breast tissues from 16 patients who underwent mammoplasties (Fig. 5b). Stromal cells and adipocytes were also stained predominantly in their nuclei (not shown). Using western blot analysis, we noticed that GR was clearly expressed in normal breast cells, strongly in MCF-7 cells, but absent in T47-D cells (Fig. 5c). The ratio of GR expression was fivefold between MCF-7 cells and HBE (Fig. 5c).

The MPA cellular response is mediated via its glucocorticoid activity in MCF-7 cells

The GR localization studies revealed that only HBE and MCF-7 cells contained significant amount of this steroid receptor. We compared the transcription efficacy of MPA and a potent glucocorticoid, dexamethasone (DEX), on a reporter vector containing six GR-responsive elements, GRE-LUC, in normal and MCF-7 cells. MPA and DEX,

Fig. 4 P4 and MPA ability to activate transcription is cell type dependent. HBE (a), T47-D (b), and MCF-7 (c), cells were transfected with a murine mammary tumor virus-luciferase reporter construct (MMTV-LUC) and treated with E2 (10 nM), P4 (100 nM), MPA (100 nM), VA (100 nM), and AG (1 μ M). Luciferase assays were performed 24 h after treatments. Basal luciferase activity in untreated cells was normalized to 1 for each cell type (mean \pm SEM, $n = 3$)

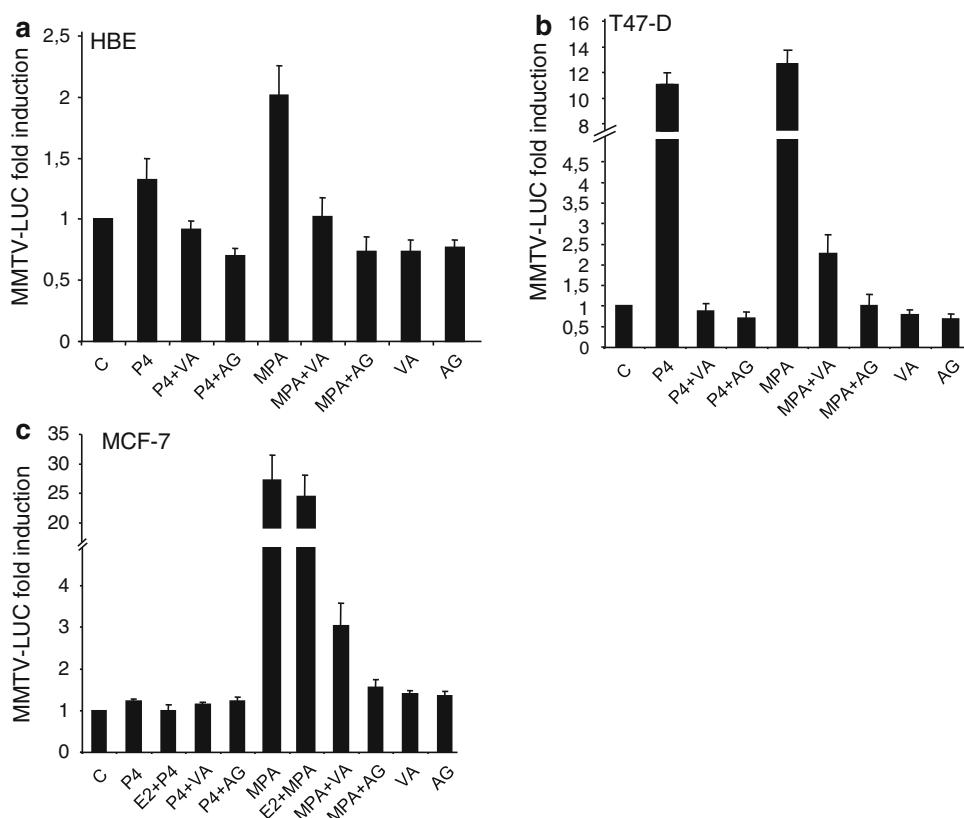
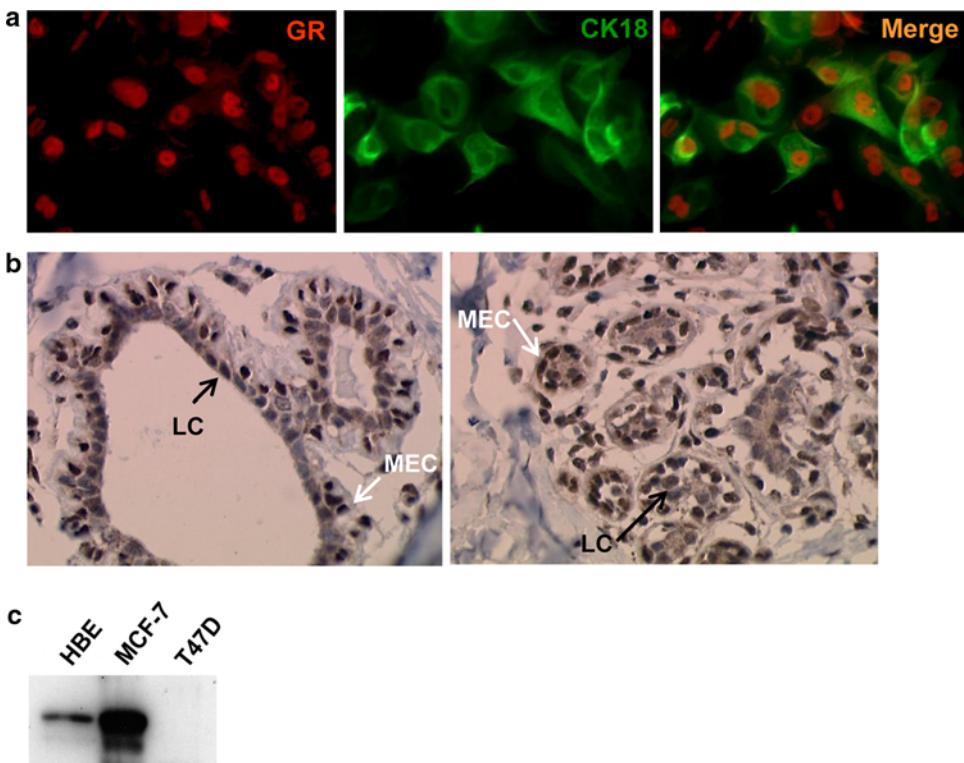


Fig. 5 Glucocorticoid receptor expression in mammary cells. Expression of GR and CK18 by immunofluorescence in HBE cells (a). Immunocytochemistry of GR labelling in red (left), CK18 in green (middle), merge (right) ($\times 600$).

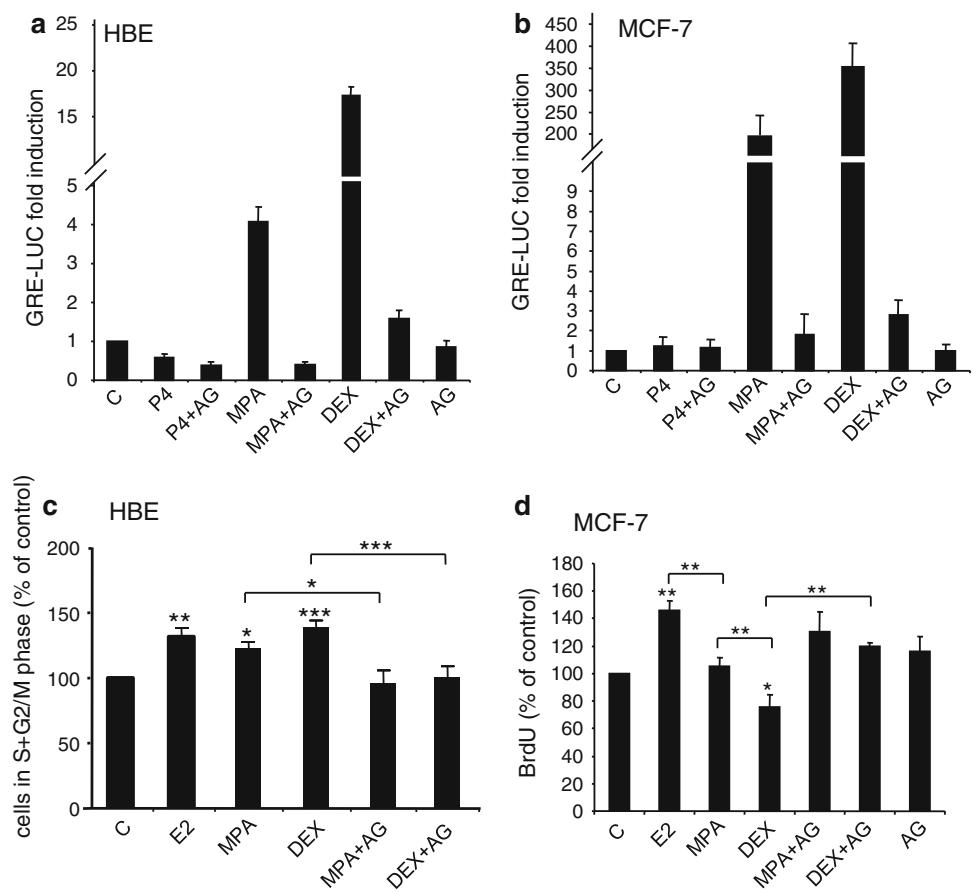
Immunodetection of GR in luminal (LC) and myoepithelial cells (MEC) in ductal (left) and alveolar (right) structures of normal human breast tissues (original magnification $\times 400$). Representative images of tissues from 16 different mammoplasties (b). Detection of GR expression by western blot in HBE, MCF-7 and T47-D cells (c). 30 μ g of proteins were loaded in each well



but not P4, induced a strong GRE-LUC transactivation, in both HBE and MCF-7 cells (Figs. 6a, b). This promoter based activation was inhibited by AG (Figs. 6a, b). In T47-

D cells, DEX and MPA had no significant effect on GRE-LUC activity (data not shown). Since T47-D cells are lacking GR (Fig. 5c), these results showed that there is no

Fig. 6 MPA mimics the effect of dexamethasone on transcription activity and cell proliferation. HBE (a) and MCF-7 (b) cells were transfected with a luciferase reporter construct containing glucocorticoid receptor element in the promoter (GRE-LUC) and then treated with P4 (100 nM), MPA (100 nM), DEX (100 nM), and AG (1 μ M). Luciferase assays were performed 24 h after treatments (mean \pm SEM, $n = 3$). Cell proliferation was determined by flow cytometry in HBE cells (c) and by BrdU incorporation in MCF-7 (d) cells treated with E2 (10 nM), MPA (100 nM), DEX (100 nM), and AG (1 μ M) (mean \pm SEM, $n = 5$ (HBE), $n = 2$ (MCF-7), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)



cross-activity between GR and PR for the binding and activation of GRE-LUC using a pure glucocorticoid (DEX) but also a mixed steroid (MPA) in these cells.

We next examined the glucocorticoid effects on cell proliferation. In HBE cells, DEX and MPA significantly induced cell proliferation by $139 \pm 5\%$ ($P < 0.001$) and $123 \pm 5\%$ ($P < 0.05$) as compared to control (Fig. 6c). AG reversed the mitogenic effects of DEX and MPA (Fig. 6c). However, in MCF-7 cells, DEX significantly decreased cell proliferation as compared to control and E2 treated cells, by $29.2 \pm 7.8\%$ ($P < 0.05$) and $44.0 \pm 8.6\%$ ($P < 0.001$), respectively (Fig. 6d). Co-treatment of MPA and DEX with AG restored cell proliferation to the control level ($P < 0.01$) (Fig. 6d). These results indicated that, in HBE and MCF-7 cells, the cellular responses on cell proliferation are induced by the glucocorticoid activity of MPA.

These results strongly suggest that the difference in the P4 and MPA effects on proliferation, apoptosis and FAS expression previously observed (Figs. 1a, b, 2a, c) can be related, at least in part, to the glucocorticoid activity of MPA. In this light, we studied the MPA effects on FAS transcription. In MCF-7 cells, the level of FAS transcription induced by MPA and DEX were similar and both were inhibited by AG (Fig. 7a). To confirm the glucocorticoid-

like activity of MPA in this cellular system, we studied the IEX-1 gene. This gene is implicated in cell proliferation and reported to be repressed by glucocorticoids [8]. The IEX-1 mRNA levels were decreased by MPA and DEX, and this effect was counteracted by AG (Fig. 7b).

In order to confirm the participation of GR on MPA-induced cellular responses in the S phase of HBE and MCF-7 cells, GR protein content was abolished when cells were transiently transfected with GR-specific siRNA (siGR) as compared to control siRNA (siCONT) (Figs. 8a, e). In cells silenced for GR, GRE-LUC transcription activation induced by MPA was not detected (Figs. 8b, f). Similarly, DEX and MPA effects on FAS and IEX-1 mRNA levels were abolished when cell were lacking GR compared to control cells (Figs. 8c, g). We confirmed that cell proliferation induced by MPA was equally mediated by GR, since in absence of GR, MPA as DEX could not exert their proliferative or antiproliferative effects in HBE as well as MCF-7 cells (Figs. 8d, h).

GR gene expression in breast cancer microarray studies

Glucocorticoid receptor expression regulation in breast tissue has been relatively ignored. As shown herein using breast cancer cells, their GR content may vary. We

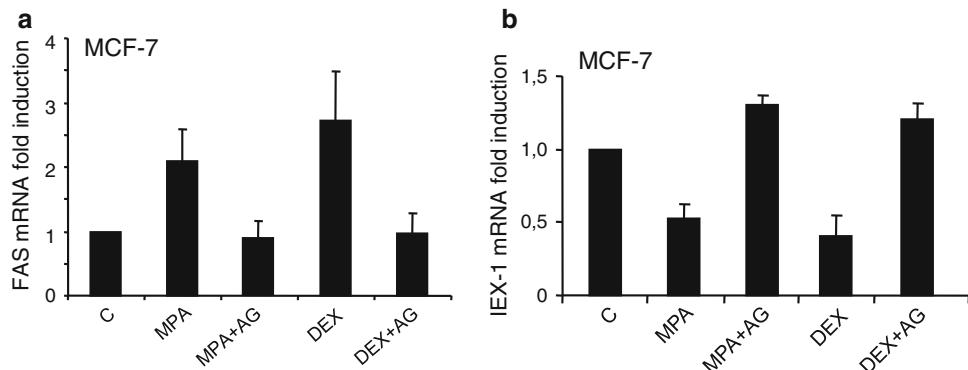


Fig. 7 Glucocorticoid effect of MPA on gene transcription. FAS mRNA (a) and IEX-1 mRNA (b) levels were determined by quantitative RT-PCR in MCF-7 cells treated with E2 (10 nM) alone or combined with P4 (100 nM) or MPA (100 nM) for 48 h.

Normalization was performed as indicated in “Materials and methods” section and the basal expression in untreated cells was normalized to 1. Results were expressed as the mean \pm SEM of at least four independent experiments

searched from the publically available information from breast gene array data bases for potential GR gene regulation within the breast tissue using OncomineTM (Compendia Bioscience, Ann Arbor, MI). Glucocorticoid receptor was less expressed in ductal breast carcinomas than in normal breast tissues ($P = 0.003$, $5.31E-10$ and $3.26E-6$) in Sorlie et al., Perou et al.; and Richardson et al. databases, respectively [31–33]. In order to increase the number of samples, an outlier analysis was used to calculate GR gene expression variability within all genes studied in available seven datasets. GR expression was shown to be amongst the more variably expressed genes. Based on a threshold at the 5th percentile from an analysis of 731 expressed genes representing between 4,643 and 19,574 microarray experiments, the GR gene expression scored a median rank of 486 [34–40]. Globally, GR gene expression was extremely variable within breast tumors. In addition, GR gene expression variability was found within the breast carcinomas subtypes, such as in situ ductal carcinomas, invasive ductal carcinomas, and lobular carcinomas. No correlation with GR and ER or PR expression was detected, as well as with the triple negative breast carcinomas.

Discussion

The increase of breast cancer risk by combined HRT has been related to the mixed progestogen pharmacological properties [2]. The findings of this article explain some of the reasons behind this observation. Our findings demonstrate that MPA glucocorticoid properties induce opposing mitogenic, and cellular differentiation effects on normal and cancerous mammary luminal cells.

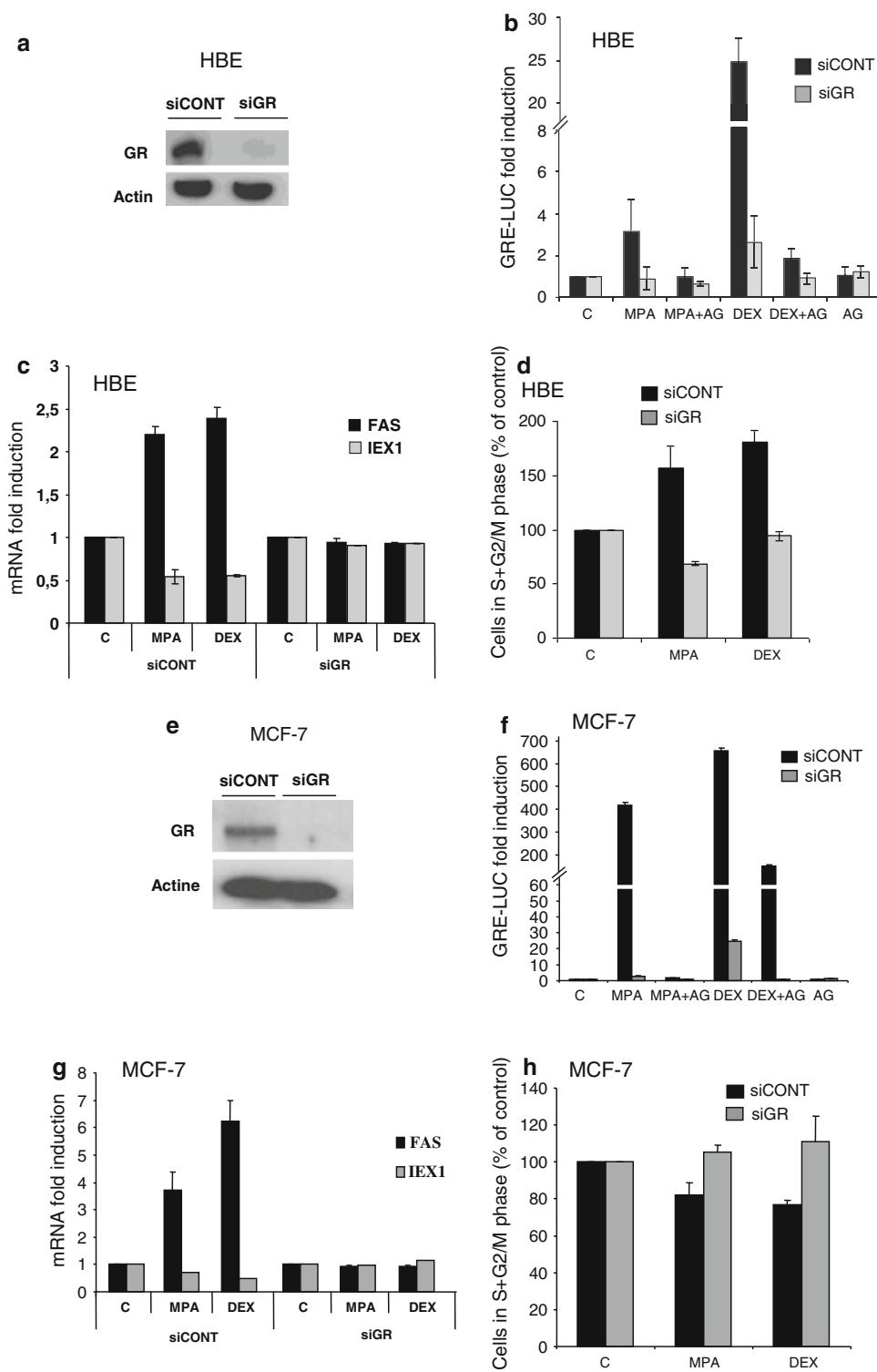
Despite an abundant literature, the role of progestogens on the breast remains controversial. Unlike most studies on progestogen effects, this study compared two combined

treatments used in clinics, which differently altered the breast cancer risk, E2 + P4 and E2 + MPA. We believed that the evaluation of progestogens impact on cellular responses should be performed in presence of estradiol, because of the concomitant presence of estrogens and progesterone or progestogen in normal human breast cells. Furthermore, ER and PR can be co-expressed in breast tumors, and both exhibit biological interactions. To approach this question we used a specific cellular model of human primary luminal epithelial cells, for which the cellular responses to hormones remain similar to what is observed in normal mammary gland [14, 20, 41]. Our model shows that E2 + MPA displayed mitogenic and antiapoptotic effects in HBE cells but that P4 was able to inhibit the E2 mitogenic effect and to be proapoptotic. This result is consistent with the in vivo data, demonstrating that P4 was able to reverse the proliferative effect of E2 after topical application on breast skin [42], whereas in postmenopausal women treated with estrogen plus MPA, proliferation was increased compared to the estrogen alone in the terminal duct-lobular units of the breast [43].

Similarly, in breast tissues of *Cynomolgus macaques*, MPA was proliferative and stimulated the expression of EGFR ligands and its downstream targets, with a higher efficiency than P4 [6, 7]. The *Cynomolgus macaque* is a proper model for hormonal study response because of its close relationship on microanatomy, mammary gland development, and sexual steroid receptor expression responses to exogenous hormones compared with human [6].

These results were supported by the microarray experiments in HBE cells. We observed that E2, E2 + P4, and E2 + MPA induced different sets of genes compared to untreated cells. GO analysis showed that E2 mostly modified the gene families associated with cell death and cell growth and proliferation. Combined treatment with P4 modified the profile of genes mainly involved in cell

Fig. 8 GR silencing inhibited the glucocorticoid properties of MPA. HBE (a) or MCF-7 (e) cells were transfected with specific siRNA directed against GR (siGR) for 120 or 96 h, respectively. GR expression was detected by immunoblotting. Inhibition of MPA-mediated transcription by GR silencing. HBE (b) or MCF-7 (f) cells were first transfected with control siRNA (siCONT) or siGR, secondly with GRE-LUC reporter construct and then treated with MPA (100 nM), DEX (100 nM) and AG (1 μ M). Luciferase assays were performed 48 or 24 h after treatments. GR silencing inhibited the gene regulation by MPA (100 nM) and DEX (100 nM) in HBE (c) or MCF-7 (g) cells. Results were expressed as the mean \pm SEM of at least three and two experiments in duplicate, respectively, in MCF-7 and HBE cells. GR silencing inhibited the proliferative or antiproliferative effects of DEX and MPA, respectively, in HBE (d) and MCF-7 (h) cells. Cells were transfected with siCONT or siGR and treated with DEX (100 nM) or MPA (100 nM) for 96 or 48 h and cell proliferation was determined by flow cytometry. Results were expressed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments for MCF7, and one in triplicate for HBE



differentiation and cell morphology, whereas E2 + MPA modified predominantly cell metabolism and cell death regulation gene sets. These data corroborated our own results on proliferation and cell death as well as the known data on cellular proliferation, differentiation, motility, and morphology regulated by estrogen and progestogens

[33, 34]. The data were extracted upon hormone regulation of three individual phenotypes; the convergence of the gene regulations within the category strengthens our finding and validates our cellular model.

The modulation of the GR pathway genes by MPA is important. MPA is known to exhibit a strong relative

binding affinity for GR, shown to be 45% of the DEX in ZR75-1 cells [26, 44]. We were also able to demonstrate the importance of this pharmacological aspect, as T47-D cells are lacking GR and no difference between MPA and P4 combined with E2 was observed. In the MCF-7 cells used in this study, PR gene expression was up-regulated by E2 (data not shown). However, P4 did not reverse the proliferative effects induced by E2, the MMTV reporter gene was not activated by P4 and P4 was not more quickly metabolized in a 5 α -derivative as using Dutasteride, a potent 5 α reductase inhibitor (data not shown). These observations suggest that PR is not functional in these MCF-7 cells indicating that the observed MPA effects should be related to its GC activity.

Our results are in agreement with the GC antiproliferative and antiapoptotic effects observed in breast cancer cell lines [11, 12]. The impact of GC on tumors remains unknown because only few reports are available on the presence of GR in breast cancers. A recent publication reported GR expression in 40% of invasive ductal carcinomas, but whereas a link between GR expression level and the age of the patients was seen, no correlation with the prognosis was observed [13]. Another publication showed that GR nuclear expression decreased with the progression of breast cancers, but GR cytoplasmic expression remained the same [30].

The contribution of GC on normal tissue is only partially documented and mostly in animal models. Glucocorticoids are involved in the proliferative phase of mice and rats mammary gland development [44]. Despite the lack of direct experimental evidence, GC are considered to induce similar effects in the human breast development. More recently, the role of GR in enhancing mammary tumor growth in rats submitted to recurrent stress was shown. Social isolation dysregulates glucocorticoid stress responses across the life span and increases glucocorticoid receptor activity in the nuclei of mammary tumor cells. This result was associated with an increase in the size, the number, and the malignancy of spontaneous mammary tumors [9].

GR expression in normal breast tissue was studied so far only in one publication [29]. In this study we observed GR labelling in the cytoplasm and the nuclei of luminal epithelial and myoepithelial cells as well as in the nuclei of stromal cells and adipocytes. Similar labeling was observed in the nuclei of ductal and lobular cells in benign breast diseases, in the stromal cell nuclei and in the nuclei of myoepithelial cells surrounding breast ducts in benign breast diseases [29]. The presence of GR in breast cancer cells irrespective of the type of breast cancer, and its widespread location to the epithelial, myoepithelial, stromal, and adipocytes as we observed in the normal tissues, suggest that the role of GC in breast cancer can be complex and unpredictable.

The role of GR expression in breast carcinogenesis has not been deeply investigated. Breast cancer microarray studies show that GR expression globally decreases between normal and tumoral tissues. But in tumoral tissues, GR expression was extremely heterogeneous and not correlated with PR or ER, as also reported in rat mammary tumors [9]. This is in accordance with the results from the clinical studies on HRT and breast cancer risk [1]. In these studies, the relative risk of breast cancer is increased to a relative low level and by a promoter effect concerning only a subset of women exposed to the treatment. The low or high expression of GR could explain that MPA independently of ER and PR could promote or repress breast tumorigenesis. This suggests that its expression level could help to define other therapeutic strategies including glucocorticoid receptor modulation.

In our study using cells containing endogenous steroid receptors, cross talk between GR and PR was not detected (Figs. 4a, c, 6a, b) suggesting that GR cannot mimic PR responses in normal and breast cancer cells. GR and PR preferentially bind specific steroids, but cross-over bindings between the specific DNA responsive elements and hormone/receptor complex have been described [45]. Despite these reported effects, PR and GR regulate different genes and encounter for very different physiological roles. How the specific action of PR and GR occurs is still not fully understood. The different physiological concentrations of P4 (10–20 ng/ml) and cortisol (100–200 ng/ml) could contribute to their different effects, as well as is the different set and sensitivity of co-modulators in their tissue specificities [46].

The limitations of this study is that the *in vitro* model cannot take into account the *in vivo* metabolism of pharmacological agents, and the interaction with the various histological components of the breast tissues. Equally, only luminal cells are contained in the culture system whereas interactions with luminal surrounded cells as stromal and myoepithelial cells might play a predominant role in GC regulation of breast tissue as these cells also express GR. Glucocorticoid effects on precancerous lesions should also be considered. More data is needed to complete the understanding of GC effects in breast carcinogenesis.

The increased risk in breast cancer under combined HRT is considered to be a promoter effect on pre-existing cancer or transformed cells [47]. We have shown that the glucocorticoid receptor is differentially expressed in breast cancer cells and its expression may modulate the MPA progestogen response. In normal breast cells, P4 is a more potent estrogen antagonist than MPA, and is a differentiation factor, whereas MPA lacks this effect. Our results suggest that MPA could promote tumorigenesis by increasing proliferation in normal cells and cancer progression in cancer cells according to PR and GR levels.

MPA combined with E2 was antiproliferative, antiapoptotic, and promoted FAS expression in MCF-7 cells. The exact result of these effects is difficult to predict. This observation indicates that in healthy tissue, MPA may exert deleterious effects and could promote cancer emergence, while in cancer cells the rates of GR and PR would modulate the effects of MPA. Our results will contribute to promote complementary studies to understand the GR involvement in breast cancer development.

Acknowledgments We thank Drs. Michèle Resche-Rigon (HRA Pharma, Paris) for helpful discussions and providing the anti-progestogen VA-2914, Steve K. Nordeen (University of Colorado, Denver) for kindly providing sequences of IEX-1 primers, Helenius J. Kloosterboer (Organon, Part of Shering-Plough, Oss) for providing antiglucocorticoid ORG-34116, Ramiro Castro Urology Medical Director (GSK, UK) for the generous gift of Dutasteride and Sylvie Dumont for her excellent technical assistance in immunohistochemistry experiments. We are grateful to Niel Insdorf for his kind help in editing the manuscript. This research was supported by grants from INSERM-UPMC, the Association pour la Recherche sur le Cancer, HRA Pharma and Novartis (France). Aurélie Courtin was a recipient of a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer, Laudine Communal is a recipient for a grant from HRA Pharma. Myriam Vilasco is a recipient of a post-doc fellowship (Institut National Contre le Cancer-INCA). Daniela Taverna was supported by grants from the University of Torino (Local Research Funding 2007/DT, 2008/DT), Regione Piemonte Ricerca Scientifica Applicata (CIPE2004/DT) and Compagnia di San Paolo, Torino. Daniela Cimino is a fellow of the Regione Piemonte.

References

- Rossoouw JE, Anderson GL, Prentice RL et al (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestogen in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288:321–333
- Fournier A, Berrino F, Clavel-Chapelon F (2008) Unequal risks for breast cancer associated with different hormone replacement therapies: results from the E3N cohort study. *Breast Cancer Res Treat* 107:103–111
- Bakken K, Fournier A, Lund E et al (2011) Menopausal hormone therapy and breast cancer risk: Impact of different treatments. The European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 128:144–156
- Calle EE, Feigelson HS, Hildebrand JS et al (2009) Postmenopausal hormone use and breast cancer associations differ by hormone regimen and histologic subtype. *Cancer* 115:936–945
- Sitruk-Ware R (2008) Pharmacological profile of progestogens. *Maturitas* 61:151–157
- Wood CE, Register TC, Lees CJ et al (2007) Effects of estradiol with micronized progesterone or medroxyprogesterone acetate on risk markers for breast cancer in postmenopausal monkeys. *Breast Cancer Res Treat* 101:125–134
- Wood CE, Register TC, Cline JM (2009) Transcriptional profiles of progestogen effects in the postmenopausal breast. *Breast Cancer Res Treat* 114:233–242
- Wan Y, Nordeen SK (2002) Overlapping but distinct gene regulation profiles by glucocorticoids and progestogens in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 16:1204–1214
- Hermes GL, Delgado B, Tretiakova M et al (2009) Social isolation dysregulates endocrine and behavioral stress while increasing malignant burden of spontaneous mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:22393–22398
- Moutsatsou P, Papavassiliou AG (2008) The glucocorticoid receptor signalling in breast cancer. *J Cell Mol Med* 12:145–163
- TKaSR Amsterdam A (2002) Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol* 64:843–850
- Lippman M, Bolan G, Huff K (1976) The effects of glucocorticoids and progesterone on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res* 36:4602–4609
- Belova L, Delgado B, Kocherginsky M, Melhem A, Olopade OI, Conzen SD (2009) Glucocorticoid receptor expression in breast cancer associates with older patient age. *Breast Cancer Res Treat* 116:441–447
- Malet C, Gompel A, Yaneva H et al (1991) Estradiol and progesterone receptors in cultured normal human breast epithelial cells and fibroblasts: immunocytochemical studies. *J Clin Endocrinol Metab* 73:8–17
- Malet C, Gompel A, Spritzer P et al (1988) Tamoxifen and hydroxytamoxifen isomers versus estradiol effects on normal human breast cells in culture. *Cancer Res* 48:7193–7199
- Cavailles V, Gompel A, Portois MC et al (2002) Comparative activity of pulsed or continuous estradiol exposure on gene expression and proliferation of normal and tumoral human breast cells. *J Mol Endocrinol* 28:165–175
- Rochefort H (1995) Oestrogen- and anti-oestrogen-regulated genes in human breast cancer. *Ciba Found Symp* 191:254–265 (discussion 265–258)
- May FE, Johnson MD, Wiseman LR et al (1989) Regulation of progesterone receptor mRNA by oestradiol and antiestrogens in breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem* 33:1035–1041
- Westley B, May FE, Brown AM et al (1984) Effects of antiestrogens on the estrogen-regulated pS2 RNA and the 52- and 160-kilodalton proteins in MCF7 cells and two tamoxifen-resistant sublines. *J Biol Chem* 259:10030–10035
- Gompel A, Malet C, Spritzer P et al (1986) Progestogen effect on cell proliferation and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in normal human breast cells in culture. *Journal Clin Endocrinol Metab* 63:1174–1180
- Svensson LO, Johnson SH, Olsson SE (1994) Plasma concentrations of medroxyprogesterone acetate, estradiol and estrone following oral administration of Klimaxil, Trisequence/Provera and Divina. A randomized, single-blind, triple crossover bioavailability study in menopausal women. *Maturitas* 18:229–238
- Somai S, Chaouat M, Jacob D et al (2003) Antiestrogens are proapoptotic in normal human breast epithelial cells. *Int J Cancer* 105:607–612
- Chalbos D, Joyeux C, Galtier F et al (1992) Progestogen-induced fatty acid synthetase in human mammary tumors: from molecular to clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:223–228
- Kuhajda FP (2006) Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res* 66:5977–5980
- Esslimani-Sahla M, Thezenas S, Simony-Lafontaine J, Kramar A, Lavaill R, Chalbos D, Rochefort H (2007) Increased expression of fatty acid synthase and progesterone receptor in early steps of human mammary carcinogenesis. *Int J Cancer* 120:224–229
- Poulin R, Baker D, Poirier D et al (1991) Multiple actions of synthetic 'progestogens' on the growth of ZR-75-1 human breast cancer cells: an in vitro model for the simultaneous assay of androgen, progestogen, estrogen, and glucocorticoid agonistic and antagonistic activities of steroids. *Breast Cancer Res Treat* 17:197–210

27. Karst H, de Kloet ER, Joels M (1997) Effect of ORG 34116, a corticosteroid receptor antagonist, on hippocampal Ca²⁺ currents. *Eur J Pharmacol* 339:17–26
28. Attardi BJ, Burgeson J, Hild SA et al (2004) In vitro anti-progestational/antiglucocorticoid activity and progestogen and glucocorticoid receptor binding of the putative metabolites and synthetic derivatives of CDB-2914, CDB-4124, and mifepristone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 88:277–288
29. Lien HC, Lu YS, Cheng AL, Chang WC, Jeng YM, Kuo YH, Huang CS, Chang KJ, Yao YT (2006) Differential expression of glucocorticoid receptor in human breast tissues and related neoplasms. *J Pathol* 209:317–327
30. Conde IP, Fraile B, Lucio J, Arenas MI (2008) Glucocorticoid receptor changes its cellular location with breast cancer development. *Histol Histopathol* 23:77–85
31. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10869–10874
32. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747–752
33. Richardson AL, Wang ZC, De Nicolo A et al (2006) X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* 9:121–132
34. Boersma BJ, Reimers M, Yi M et al (2008) A stromal gene signature associated with inflammatory breast cancer. *Int J Cancer* 122:1324–1332
35. Bonnifoi H, Potti A, Delorenzi M et al (2007) Validation of gene signatures that predict the response of breast cancer to neoadjuvant chemotherapy: a substudy of the EORTC 10994/BIG 00-01 clinical trial. *Lancet Oncol* 8:1071–1078
36. Chin K, DeVries S, Fridlyand J et al (2006) Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiology. *Cancer Cell* 10:529–541
37. Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C et al (2007) Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *J Clin Oncol* 25:1239–1246
38. Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C et al (2008) Predicting prognosis using molecular profiling in estrogen receptor-positive breast cancer treated with tamoxifen. *BMC Genomics* 9:239
39. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM et al (2003) Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10393–10398
40. Yu K, Ganesan K, Miller LD et al (2006) A modular analysis of breast cancer reveals a novel low-grade molecular signature in estrogen receptor-positive tumors. *Clin Cancer Res* 12: 3288–3296
41. Gompel A, Somaï S, Chaouat M et al (2000) Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues. *Steroids* 65:593–598
42. Foidart JM, Colin C, Denoo X et al (1998) Estradiol and progesterone regulate the proliferation of human breast epithelial cells. *Fertil Steril* 69:963–969
43. Hofseth LJ, Raafat AM, Osuch JR et al (1999) Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4559–4565
44. Wintermantel TM, Bock D, Fleig V, Greiner EF, Schutz G (2005) The epithelial glucocorticoid receptor is required for the normal timing of cell proliferation during mammary lobuloalveolar development but is dispensable for milk production. *Mol Endocrinol* 19:340–349
45. Leo JC, Guo C, Woon CT et al (2004) Glucocorticoid and mineralocorticoid cross-talk with progesterone receptor to induce focal adhesion and growth inhibition in breast cancer cells. *Endocrinology* 145:1314–1321
46. Szapary D, Song LN, He Y et al (2008) Differential modulation of glucocorticoid and progesterone receptor transactivation. *Mol Cell Endocrinol* 283:114–126
47. Foidart JM, Desreux J, Pintiaux A et al (2007) Hormone therapy and breast cancer risk. *Climacteric* 10(Suppl 2):54–61

Glucocorticoid receptor and breast cancer

Myriam Vilasco · Laudine Communal ·
Najat Mourra · Aurélie Courtin · Patricia Forgez ·
Anne Gompel

Received: 29 June 2011 / Accepted: 18 July 2011
© Springer Science+Business Media, LLC. 2011

Abstract Stress enhances glucocorticoid (GC) synthesis, which alters inflammation and immune responses, as well as cellular proliferation and apoptosis in a number of tissues. Increasingly, stress has been associated with cancer progression, and in particular in breast cancer. Consequently, an operational glucocorticoid receptor system in breast tissue influences breast cancer development. In this review, we summarize the data on the GC/GR system in normal and tumoral breast tissue. We also review the molecular mechanisms by which GCs control apoptosis and proliferation in breast cancer models and how GCs alter the chemotherapy of breast cancer treatment when used in combination. Finally, we discuss the participation of GR in breast tumorigenesis under hormone replacement therapy.

Keywords Normal breast tissue · Proliferation · Apoptosis · Medroxyprogesterone acetate · Progesterone receptor

P. Forgez and A. Gompel have contributed equally to the Review.

M. Vilasco · L. Communal · A. Courtin · P. Forgez ·
A. Gompel
INSERM-UPMC, UMRS 938, Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du
Faubourg Saint Antoine, 75012 Paris, France

N. Mourra
Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, AP-HP,
Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint Antoine,
75012 Paris, France

A. Gompel (✉)
Université Paris Descartes, APHP, UF de Gynécologie, Hôtel-Dieu, 1 place du Parvis Notre-Dame, 75004 Paris, France
e-mail: anne.gompel@htd.aphp.fr

Introduction

Breast cancer is the leading cause of cancer-related death in women worldwide. In the recent years, approximately 200,000 and 421,000 annual new cases of breast cancer were registered in the United States and in Europe, respectively [1] (<http://www.invs.sante.fr/applications/cancers/projections2010/>). In the last decade, a significant reduction in cancer-associated death rates was observed, suggesting that major progress in screening and treatment has been made. Nevertheless, 40,000 and 129,000 related deaths are registered in the United States and in Europe, respectively, suggesting that further improvement is needed. Increasingly, stress has been associated with one of the causes for cancer. Glucocorticoids (GCs) synthesis is enhanced following stressful conditions leading and acting mostly through the glucocorticoid receptor (GR) to regulate inflammatory and immune responses, as well as cellular proliferation and apoptosis [2–5].

In breast tissue, physiological processes are mainly regulated by sexual hormones, such as estradiol (E2) and progesterone (P). Recent observations on the contribution of glucocorticoids (GCs) in the physiology and the pathology of breast tissue show that GCs are involved in the development of the mammary gland at puberty and during pregnancy [6, 7]. GR expression was observed in all stages from normal to cancerous breast tissue, with a decline from normal to precancerous lesions and to invasive breast carcinoma [8–14]. However, no correlation between GR expression and breast cancer prognosis or aggressiveness has been noted. GCs also exert anti-proliferative and anti-apoptotic activity in mammary epithelial breast cancer cell lines [15–22].

In this review, we summarize the data on GCs/GR system in relation to breast development and GR

expression in normal and tumoral breast tissue. We also review the molecular mechanisms by which GCs control apoptosis and proliferation in breast cancer models and how GCs alter the chemotherapy of breast cancer treatment when used in combination [15–18, 23–27]. Finally, we discuss GR participation in breast tumorigenesis.

GR and mechanisms of action

GCs are synthesized in the adrenal cortex according to a nycthemeral cycle and delivered through systemic circulation. In addition, it was shown that stress induced the raise of GCs concentration in blood to a much higher level. They can regulate several biological functions, such as inflammatory responses, cell growth and apoptosis [5]. GCs easily diffuse across cell membranes and once inside the cytoplasm, can interact with the glucocorticoid receptor (GR) to mediate most of the known GCs-induced actions [5, 28].

The GR belongs to the nuclear receptor superfamily and displays three functional domains. While rat GR was cloned in 1984, human GR was initially isolated from the breast cancer cell line MCF-7 by the group of P. Chambon in 1985 [29, 30]. The N-terminal domain contains a constitutive transcriptional activation function 1. The internal region is constituted by a DNA-binding domain including two highly conserved zinc finger domains that are crucial for DNA-binding specificity, GR homodimerization and cofactors recruitment. The C-terminus region contains a ligand-binding domain and a ligand-dependent transcriptional activation function 2 involved in protein–protein interactions with either cytoplasmic chaperones or nuclear co-regulators. In addition, two nuclear localization signal sequences are found in the DNA-binding domains and ligand-binding domains [28]. Five different splice variants of GR have been described: GR- α , GR- β , GR- γ , GR-P and GR-A. As the GR- α isoform is responsible for most GC-mediated transcriptional activities, this review focuses on this predominant isoform [28].

Phosphorylation is a key posttranslational modification that plays a significant role in the regulation of many cellular events. On GCs binding, GR- α undergoes several interdependent phosphorylation modifications on different specific residues that determine GR activity in the cell [31]. The activation or repression of GR transcription is determined by its phosphorylation status. The original major discoveries arose from rat and mouse studies identifying at least seven phosphorylation sites [32, 33]. The four predominant phosphorylation residues of mouse GR (Serine [Ser] 212, 220, 234 and 412) and rat GR (Ser224, 232, 246 and 424) correspond to the four most characterized phosphorylation sites of the human GR protein Serine 203, 211,

226 and 404. These four Ser are preferentially phosphorylated by mitogen-activated protein kinases (MAPK) ERK 1/2, p38, JNK and the glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β), respectively [31, 33–38]. Phosphorylated GR at Ser-203 is maintained in the cytoplasm and fails to bind glucocorticoid response elements (GRE) within the promoters of target genes, suggesting that phosphorylated-Ser-203-GR is an inactive form of GR [38, 39]. Phosphorylation at the residue Ser-404 alters GR cofactor recruitment and decreases the half-life of the receptor; thus, leading to attenuated GR signaling [36]. Both phosphorylated-Ser-211 and Ser-226 GR can enter into the nucleus and bind GRE. Whereas phosphorylated-Ser-211 GR is crucial for maximal efficacy transactivation, phosphorylated-Ser-226 GR abrogates GC-dependent signaling because of enhanced GR nuclear export [37–40]. Finally, in addition to being implicated in GR direct function, phosphorylation events play a role in the stability and half-life of GR by orientating the receptor toward proteasomal degradation following ubiquitination [41, 42].

GR phosphorylation creates interdependence between the phosphorylated sites leading to enhanced or repressed GR-dependent signaling. Despite the importance of GR phosphorylated forms in GC activity, data are unavailable on GR phosphorylation status in breast tissues as GR total expression has only been observed in a few studies [8, 43, 44].

GR expression in breast tissue

Expression and role of GR in normal breast tissue

As GR was initially identified and characterized in breast cancer cell lines by the groups of W.L. McGuire and M. Lippman [19, 45], its expression in normal breast tissue has been scarcely studied (Table 1) [8, 43, 44]. Lien and colleagues did find GR strongly expressed in the nuclei of myoepithelial cells surrounding lobular and duct units and occasionally expressed in the nuclei of stromal and endothelial cells [43]. Similar observations have been indeed confirmed. GR was also detected in the nuclei of adipocytes and also in the nuclei and the cytoplasm of luminal epithelial cells (Fig. 1) [8, 44].

GR exerts a predominant role in mammary physiology and development, as shown in mouse models. These functions have been extrapolated to human breast development because of its relative strong expression in human breast tissue [44]. Because GR knockout mice were not viable, mutagenesis and Cre-LoxP recombination targeting mammary glands were used to explore the role of GR in mammary gland development and function in adult mice [6, 46]. GR was shown to be essential for cell proliferation

Table 1 GR expression in breast tissues

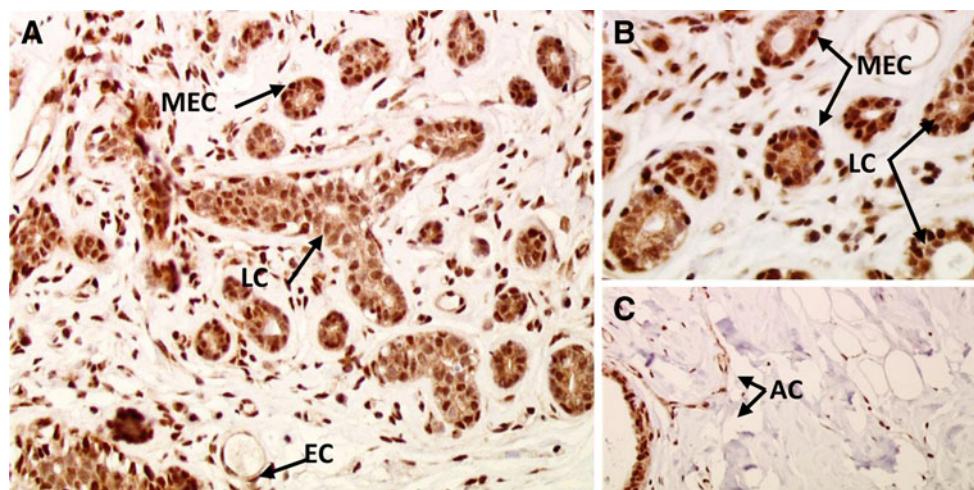
Breast tissues	<i>N</i>	GR positivity %	References
Normal tissue	8	100	[43]
Benign breast diseases	78	100	
CIS	25	0	
IDC	218	2	
ILC	18	0	
Metaplastic carcinoma	18	100	
BBD	24	100	[48]
CIS	38	70 (N); 16 (C)	
IDC	46	40 (N); 26 (C)	
ILC	34	30 (N); 30 (C)	
DCIS	48	27	[49]
IDC	227	18	
Normal breast	49	100	[44]
DIN 1a	9	80	
DIN 1b–1c	15	100	
DIN 2–3	21	35	
Invasive carcinoma	39	40	
Normal breast	70	100	[8]

This table summarizes the data available on GR expression in normal or tumoral breast tissues

BBD breast benign diseases (ductal and lobular hyperplasia, apocrine metaplasia, fibroadenoma and fibrocystic changes), *DIN* ductal intraepithelial neoplasia, *CIS* carcinoma in situ, *DCIS* ductal carcinoma in situ, *IDC* invasive ductal carcinoma, *ILC* invasive lobular carcinoma, *N* nucleus, *C* cytoplasm

during the lobuloalveolar development but not for the lobuloalveolar differentiation [6, 47]. GR also contributed to mammary lobular unit spatial formation, through its ability to stimulate the expression of the $\beta 4$ integrin, an extracellular matrix-cell contact protein essential for the spatial organization of the acini [7].

Fig. 1 Glucocorticoid receptor expression in normal breast tissue. Immunodetection of GR in luminal (LC) and myoepithelial cells (MEC) in ductal and lobular structures of normal human breast tissues (panels **a** and **b**) (original magnification $\times 200$ and $\times 400$). GR expression was also observed in the nuclei of stromal cells, endothelial cells (EC) and adipocytes (AC) (panel **c**) (original magnification $\times 200$)



GR expression in breast cancer

GR labeling has been reported in breast samples, from benign and precancerous to cancerous lesions. Either a presence or an absence of GR in breast tumors is described in the literature. In normal tissues and in benign breast diseases, GR is expressed in most of the nuclei myoepithelial, but also in epithelial cells of ductal and lobular cells (Table 1) [43, 44, 48, 49]. In human breast tumors, GR expression has first been quantified between 55 and 51% by using biochemical quantification techniques [12–14]. More recently, GR expression was monitored by immunohistochemical methods. In situ lesions, GR nuclear staining results were ambiguous, as GR was found expressed in 70% of tumoral cell nuclei by Condé et al. [48] but at 0 and in 27% of cell nuclei by Lien et al. [43] and Belova et al. [49], respectively. Finally, only 20–40% of tumoral cells in invasive ductal and lobular carcinoma expressed GR. Globally, these studies showed that the intensity of GR nuclear staining decreases from normal breast tissues to invasive carcinoma [9–11, 43, 44, 48]. This was also correlated with a shift of GR labeling from the nuclei to the cytoplasm in tumoral tissue compared with normal tissues [48]. The decrease of GR in the tumoral cell nuclei might be attributed to a reduced representation of the most efficient phosphorylated form of GR, the phosphorylated-Ser211 GR, compared with the other phosphorylated forms that are less active. Alternatively, it could also be because of GR mitochondrial translocation that has been associated with a strong inhibition of apoptosis and therefore participating in cancer progression [9–11, 43, 44, 48, 50].

GR is considered as mediator of the GCs acute release related with stress. A growing body of research and clinical studies suggest that stress contributes to cancer emergence and progression [51, 52]. As GR was found significantly expressed in breast cells and known to be activated by

stress-induced GCs, GR might play a role in cancer development following stressful conditions [5].

Conflicting data have been published on the link between breast cancer and stress, with both positive and negative correlation being described [2–4, 51, 53, 54]. Assessing the impact of stressful events on physiological conditions is extremely difficult as the evaluation and quantification of stress throughout life is complex. In addition, it is unknown if stress might be active for a continuous or a limited period of time to influence cancer emergence. A recent publication from the Women Health Initiative study illustrated these controversies [3]. Whereas repeated stressful life events have been shown to naturally decrease breast cancer incidence, one acute stress event has been associated with increased breast cancer risk [3]. Interestingly, a recent important preclinical study strengthens the deleterious implication of stress in breast cancer [4]. In rats stressed by chronic social isolation, higher levels of corticosterone were associated with a deregulated GR distribution favoring its nuclear concentration in tumor cells [4]. In correlation with GR localized in the nuclei of tumoral cells, these rats experienced larger and more aggressive mammary tumors [4]. This GR activation might contribute to tumor initiation and growth probably predominantly through anti-apoptotic actions of GCs in mammary cells as discussed in the following paragraph [24, 25, 28].

GR and breast cancer biology

Among the numerous cellular processes disrupted in breast cancer are control of apoptosis and cell proliferation. Extensive data established that GR significantly interferes with these cellular processes [28, 55, 56].

GR and cell apoptosis

GCs were shown to exert anti-apoptotic actions in pre-clinical human breast models [15–18, 22]. In breast and other origin cancer cells, the synthetic glucocorticoid, dexamethasone (DEX), induces the expression of genes frequently associated with protection against cell apoptosis, such as *Bcl-xL*, *Bak*, *SGK-1* and *MKP-1* [16, 17, 23, 24, 57]. Concomitantly, DEX also reinforces its survival effect by the downregulation of pro-apoptotic genes, such as *Bid*, *TRAIL* and GR-dependent gene tissue plasminogen activator (tPa) [24]. In parallel to this dual action, the GC/GR system interacts with the activity of transcription factors [56, 58–60]. In breast cancer cell lines, GR exerts anti-apoptotic actions through the activation of NF- κ B signaling. GR indirectly activates the IKK kinases that phosphorylate and orientate *IκB* protein, an inhibitor of

NF- κ B, toward proteasomal-mediated degradation, leading to NF- κ B activation and induction of anti-apoptotic genes, such as inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) [56, 61, 62]. GR survival action was also mediated by its interaction with the AP-1 transcription factor family, which were mostly investigated in mice mammary gland model [63]. DEX was shown to inhibit the programmed cell death associated with the gland involution during post lactational mammary gland. This process was correlated to an increase of mRNA levels of several AP-1 factors, as well as their DNA-binding capacities. However, despite this enhanced DNA-binding capacities, AP-1-responsive genes involved in mammary cell apoptosis were found reduced following DEX treatment [63].

GR has been described to interact with c-Fos or c-Jun when both factors are already bound to the AP-1 consensus DNA-binding site. GR binding to c-Jun homodimers led to gene transactivation, whereas GR binding with c-Jun/c-Fos heterodimers resulted in gene trans-repression [56, 64]. Therefore, the response of DEX on individual genes may be repressive, and the global effect on the mammary gland is anti-apoptotic.

The undetermined role of AP-1 factors has also been observed in human pathology. A dimer composed of Jun and Fos family members is able to either suppress or induce apoptosis [65]. AP-1 signaling contributes to breast cancer progression as the use of a c-Jun dominant negative mutant, a defective in AP-1 signaling, suppressed breast cell growth induced by growth factors [66]. In addition, AP-1 proteins expression has also been correlated with a more differentiated breast tumor phenotype and enhanced invasion and motility [66–68]. The precise contribution of GCs on AP-1 factor expression and activation, and the consequences in human breast carcinogenesis, is a field of a major importance under intense study.

Finally, GR also disrupts p53 cell survival regulation. P53 is a tumor suppressor that is activated following numerous cellular stress signals, such as DNA damage or hypoxia. P53 mediates its effects through the activation of gene transcription, leading to cell growth arrest and apoptosis. Loss of p53 activity has been associated with various human cancers, including breast cancer [69]. Several cross-talk mechanisms between p53 and GR have been described that result in complex mutual inhibition [70]. Following DEX treatment, GR exerts its anti-apoptotic action through p53 sequestration in the cytoplasm by preventing p53 from inducing cell apoptosis [71, 72]. This cytoplasmic sequestration promotes GR and degrades p53 leading to a mutual inhibition [71]. In addition, GR and p53 independently induced the anti-apoptotic gene, *SGK* (serum and GC-inducible protein kinase) [73, 74]. P53 is able to inhibit GR-mediated SGK induction through the disruption of GR DNA binding to GRE sites on the SGK

promoters [73, 74]. Globally, cross-talk between GR and p53 causes the inhibition or enhancement of apoptosis, depending on which protein is predominantly expressed in the cells. In summary, the GCs/GR system preferentially acts as anti-apoptotic factor in breast cancer cells by gene activation on GRE sequences, or through NF- κ B-signaling and the inhibition of AP-1-related pro-apoptotic genes.

GR and cell proliferation in breast cancer

GCs have been shown to exert anti-proliferative effects in cancerous breast cell lines through a direct inhibitory effect or through inhibition of insulin or insulin growth factor-induced cell growth [18–21]. DEX treatment blocks the cell cycle at the G1 phase [18, 75] by interfering with p53 phosphorylation and p21 upregulation that promotes cell growth arrest [71, 76]. GCs also interact with epidermal growth factor (EGF) and its receptor (EGFR) system with opposing effects [77, 78]. Following binding to EGFR, EGF triggers specific genes comprising SK-1 known to activate sphingosine-1-phosphate implicated the regulation of cell proliferation [79]. DEX treatment inhibited EGF-induced SK-1 expression and activity, as well as increase of EGFR expression and EGF binding to its receptor in breast cells, consequently leading to the decrease of cell proliferation [80, 81].

Cross-activation between EGF/EGFR and GR is crucial for GR activation. GCs are known to activate ERK1/2, p38 and the JNK cascade. These activated MAPKs are able to phosphorylate GR at several serine residues (203, 211 and 226) resulting in the modulation of GR signaling pathways and mostly leading to cell survival [31] (see previous paragraph). Nevertheless, the anti-proliferative action of GCs/GR is correlated to high concentration of GCs and GR expression levels [18], because it was shown that at low concentrations, DEX significantly stimulated cell growth. Recent data from our laboratory have confirmed this effect. In the MCF-7 breast cancer cell line, DEX inhibited cell proliferation, but in normal human luminal cells, which contains about fivefold less GR than MCF-7, DEX stimulated cell proliferation [8]. The effects of DEX on proliferation and apoptosis can contribute and explain the unpredictable impact when used as adjuvant to chemotherapy.

GCs and breast cancer therapy

GCs have been extensively used in supportive care to treat several types of cancer, including breast cancer [82, 83], because of their benefit in improving patient life conditions and their anti-emetics effects. These hormones help to reduce nausea and emesis, protect healthy tissue from

cytotoxic side effects and reduce tissue reactions, such as inflammation against invasive malignant growth. These properties strengthen the importance to use GCs in combination with chemotherapy and radiation of patients with solid tumors [77, 78]. However, GCs exert complex and divergent biological functions and can enhance chemotherapy sensitivity by inhibiting cell proliferation while also increasing chemotherapeutic resistance through GR's ability to disrupt cell apoptosis.

GC-induced chemosensitivity in breast cancer

In cancer cell lines, including breast cancer cell lines, DEX has been shown to act as a chemosensitizer [84, 85]. Pharmacokinetic studies using breast cancer cell lines xenografts demonstrated that DEX pretreatment significantly increased anti-tumor activity of carboplatin, gemcitabine and adriamycin through an enhanced drug uptake in the tumor that led to a significant decrease in tumor volume and cell proliferation as well as an increase in apoptosis [27, 85]. This effect is supposedly correlated to GCs-induced TNF α production. High doses of TNF α induce apoptosis, and necrosis, and enhance chemotoxic reagents effects on tumoral cells [86]. DEX treatment also acts as an anti-angiogenic factor that enhances the tumor reduction. DEX reduces the expression of the NF- κ B responsive gene *VEGF* by stimulating the NF- κ B inhibitor, I κ B [27, 56].

GC-induced chemoresistance in breast cancer

GCs also induce chemoresistance, mostly because of interference with cell survival and proliferation as reported above. GCs have been shown to specifically inhibit chemotherapeutic anti-tumor activities in human breast pre-clinical model by decreasing cellular apoptosis resulting in larger tumor volumes [15–18, 23, 24]. mRNA expression analysis in xenograft tumors, excised from mice exposed to systemic GCs treatment, demonstrated an upregulation of anti-apoptotic genes, such as *Bcl-xL*, *Bak*, *SGK-1*, or *MKP-1* [16, 17, 23, 25, 57]. Interestingly, *MKP-1* overexpression has also been observed in primary human breast and prostate tumors context [87, 88].

The combination of specific drugs and time course of GC administration appears to be crucial for its effect. It has been demonstrated that sequential administration of DEX and chemotherapeutic agents in vivo resulted in the inhibition of cell proliferation and tumor growth [89]. Several studies suggested that an enhanced therapeutic effect is observed when DEX was administrated at least 12 h before the administration of the chosen therapeutic agents [27, 85, 90], whereas concomitant administration could be deleterious or have a weak effect [23–25].

GR cross-talks with other steroid receptors in breast cancer

In addition to its direct effects on proliferation and apoptosis, an interaction of GR with the other steroid receptors is involved in the control of breast tissue homeostasis. Extensive cross-talks between GR signaling and other steroid receptor-dependent pathways, including ER and PR in breast cancer, have been described.

GR and ER

Reciprocal inhibitory actions between ER and GR signaling were described. Several groups demonstrated that GR mRNA levels were higher in ER-negative breast cancer cell lines than in ER-positive cells [91, 92]. A proposed mechanism is the downregulation of GR mRNA and protein expression by estradiol (E2) in the breast cancer cell line, MCF-7 [93]. In addition, estrogens inhibit GCs action through a de-phosphorylation of GR-Ser-211 by the estrogen-induced protein phosphatase 5 [94]. The reciprocal inhibitory action was shown by the decrease of free-estrogens by GCs through the GR-mediated activation of estrogen sulfotransferase [95].

The conclusion on the effect of both hormones is premature, because the negative relationship between ER and GR was performed on breast cancer cell lines and as only one study clearly demonstrated a correlation between ER and GR expression [96] versus several others reporting no significant correlation [44, 49]. Furthermore, because both hormones can interact on cell survival and proliferation, the consequences of the combination of E2 and GCs on breast cell growth need to be further elucidated.

GR and PR

GR and PR are closely related members of the nuclear receptor family. They share similar structural characteristics, such as their DNA-binding and ligand-binding domains leading to overlapping functional characteristics including recognition of the same DNA sequence or responsive elements [97–99]. While PR specifically binds progesterone, GR recognizes both GCs and progesterone, suggesting common effects, but GR was not able to mediate progesterone inhibitory actions [19]. Interestingly, DEX and medroxyprogesterone acetate (MPA), both possess GC activity, induced PR expression downregulation suggesting a modulation of PR through GR [100]. When both receptors are comparably expressed, such as in T47D breast cancer cells, treatment with either DEX or the progestogen R5020 resulted in a large overlap of their respective gene regulation. Half of the analyzed genes were

modulated by both hormones, whereas the other half was hormone specific, suggesting that despite their similarity, PR and GR possess a distinct spectrum of actions [101]. The variations in PR and GR target genes may be related to the differential recruitment of activators following the diverse treatments. Following stimulation, while PR recruited SRC-3/SRC-1/CBP/p300, GR interacted with SRC-3/SRC-2/pCAF/p300, influencing a diverse gene expression [99].

Negative cross-talk between PR and GR was also demonstrated by their opposite action during lactation in in vitro models. β -Casein and α -lactalbumin, major milk proteins, are stimulated by prolactin (PRL) but repressed by progesterone. In contrast, GR has been shown to enhance β -casein gene expression in combination with PRL action. Opposing actions on β -casein induction are mediated by two distinct mechanisms exerted on the β -casein promoter: PR competes with GR for DNA responsive elements and PR sequesters inactive STAT5 [102]. It has been invoked that a similar mechanism occurred implicating GR/PR competition for GRE sites of the α -lactalbumin transcription regulation [103].

Progesterogens as glucocorticoids and the risk of breast cancer

Some pharmacological agents have glucocorticoid potencies. Medroxyprogesterone acetate (MPA) is a derivative of the 17α -hydroxyprogesterone and is weakly metabolized. MPA binds to PRs but can also bind to the androgen and glucocorticoid receptors conferring some androgenic and glucocorticoid properties [104]. MPA glucocorticoid properties were established by MPA's ability to bind GR with a high relative affinity in comparison with glucocorticoid DEX in breast cells [105]. MPA and megestrol acetate have been used as adjuvant therapies in breast cancer metastatic patients [106, 107]. Both display suppressive effects on adrenal steroids highlighting their glucocorticoid properties [108]. MPA is also used for treating climacteric symptoms in association with estrogens administration during hormonal replacement therapy (HRT). Recent studies from the Women Health Initiative (WHI) and several European observational studies established an increased relative risk of invasive breast cancer in post-menopausal women under HRT containing synthetic progestins [109, 110]. This conclusion of a negative impact of MPA treatment on breast tissues was confirmed by several preclinical studies. Exposure to E2 and MPA caused an increase of mammary epithelium proliferation. It was monitored in post-menopausal women and in breast tissues of *Cynomolgus* macaques [111, 112]. Similarly, MPA enhanced E2-mediated proliferation in the terminal

duct-lobular units of the breast in postmenopausal women treated with estrogens and MPA [111]. Interestingly, in a recent randomized study using post-menopausal women, E2 and progesterone did not increase the proliferation index, whereas conjugated-E2 and MPA were proliferative [113]. Similarly, in breast tissues of *Cynomolgus* macaques, MPA was proliferative and stimulated the expression of EGFR ligands and downstream targets with a higher efficiency than progesterone [112, 114]. These observations might be taken into account when E2 + MPA are administrated to post-menopausal women taking HRT.

Conclusions

The role of GR in breast is complex and unpredictable as many contradictions have been demonstrated. To clarify and specify this action of GC/GR system, the level of GR expression, as well as the GC properties of the compound, should highly be taken into account and defined in the studies. Interaction with major oncogenic pathways (EGF/EGFR, p53) should be better characterized, in terms of cellular and tumoral context, to use GCs in a more appropriate manner for patient during cancer treatment or for other purposes.

References

1. Jemal A et al (2010) Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 60(5):277–300
2. Kricker A et al (2009) Effects of life event stress and social support on the odds of a $>$ or $= 2$ cm breast cancer. Cancer Causes Control 20(4):437–447
3. Michael YL et al (2009) Influence of stressors on breast cancer incidence in the women's health initiative. Health Psychol 28(2):137–146
4. Hermes GL et al (2009) Social isolation dysregulates endocrine and behavioral stress while increasing malignant burden of spontaneous mammary tumors. Proc Natl Acad Sci USA 106(52):22393–22398
5. Baschant U, Tuckermann J (2010) The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. J Steroid Biochem Mol Biol 120(2–3):69–75
6. Wintermantel TM et al (2005) The epithelial glucocorticoid receptor is required for the normal timing of cell proliferation during mammary lobuloalveolar development but is dispensable for milk production. Mol Endocrinol 19(2):340–349
7. Murtagh J et al (2004) Organization of mammary epithelial cells into 3D acinar structures requires glucocorticoid and JNK signaling. J Cell Biol 166(1):133–143
8. Courtin A et al. (2011) Glucocorticoid receptor activity discriminates between progesterone and medroxyprogesterone acetate effects in breast cells. Breast Cancer Res Treat. PMID:21336598
9. Perou CM et al (2000) Molecular portraits of human breast tumours. Nature 406(6797):747–752
10. Sorlie T et al (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci USA 98(19):10869–10874
11. Richardson AL et al (2006) X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. Cancer Cell 9(2):121–132
12. Teulings FA, van Gilse HA (1977) Demonstration of glucocorticoid receptors in human mammary carcinomas. Horm Res 8(2):107–116
13. Allegra JC et al (1978) An association between steroid hormone receptors and response to cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. Cancer Res 38(11 Pt 2):4299–4304
14. Allegra JC et al (1979) Distribution, frequency, and quantitative analysis of estrogen, progesterone, androgen, and glucocorticoid receptors in human breast cancer. Cancer Res 39(5):1447–1454
15. Moran TJ et al (2000) The glucocorticoid receptor mediates a survival signal in human mammary epithelial cells. Cancer Res 60(4):867–872
16. Schorr K, Furth PA (2000) Induction of bcl-xL expression in mammary epithelial cells is glucocorticoid-dependent but not signal transducer and activator of transcription 5-dependent. Cancer Res 60(21):5950–5953
17. Mikosz CA et al (2001) Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, sgg-1. J Biol Chem 276(20):16649–16654
18. Mattern J, Buchler MW, Herr I (2007) Cell cycle arrest by glucocorticoids may protect normal tissue and solid tumors from cancer therapy. Cancer Biol Ther 6(9):1345–1354
19. Lippman M, Bolan G, Huff K (1976) The effects of glucocorticoids and progesterone on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. Cancer Res 36(12):4602–4609
20. Osborne CK et al (1979) Direct inhibition of growth and antagonism of insulin action by glucocorticoids in human breast cancer cells in culture. Cancer Res 39(7 Pt 1):2422–2428
21. Huff KK et al (1988) Multihormonal regulation of insulin-like growth factor-I-related protein in MCF-7 human breast cancer cells. Mol Endocrinol 2(3):200–208
22. Harris RA et al (1995) The induction of apoptosis in human mammary luminal epithelial cells by expression of activated c-neu and its abrogation by glucocorticoids. Br J Cancer 72(2):386–392
23. Wu W et al (2004) Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. Cancer Res 64(5):1757–1764
24. Wu W et al (2005) Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. J Biol Chem 280(6):4117–4124
25. Pang D et al (2006) Dexamethasone decreases xenograft response to Paclitaxel through inhibition of tumor cell apoptosis. Cancer Biol Ther 5(8):933–940
26. Wang H et al (2004) Dexamethasone as a chemoprotectant in cancer chemotherapy: hematoprotective effects and altered pharmacokinetics and tissue distribution of carboplatin and gemcitabine. Cancer Chemother Pharmacol 53(6):459–467
27. Wang H et al (2007) Dexamethasone as a chemosensitizer for breast cancer chemotherapy: potentiation of the antitumor activity of adriamycin, modulation of cytokine expression, and pharmacokinetics. Int J Oncol 30(4):947–953
28. Zhou J, Cidlowski JA (2005) The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. Steroids 70(5–7):407–417
29. Miesfeld R et al (1984) Characterization of a steroid hormone receptor gene and mRNA in wild-type and mutant cells. Nature 312(5996):779–781
30. Govindan MV et al (1985) Cloning of the human glucocorticoid receptor cDNA. Nucleic Acids Res 13(23):8293–8304

31. Galliher-Beckley AJ, Cidlowski JA (2009) Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life* 61(10):979–986
32. Bodwell JE et al (1991) Identification of phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 266(12):7549–7555
33. Krstic MD et al (1997) Mitogen-activated and cyclin-dependent protein kinases selectively and differentially modulate transcriptional enhancement by the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* 17(7):3947–3954
34. Takabe S, Mochizuki K, Goda T (2008) De-phosphorylation of GR at Ser203 in nuclei associates with GR nuclear translocation and GLUT5 gene expression in Caco-2 cells. *Arch Biochem Biophys* 475(1):1–6
35. Miller AL et al (2005) p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. *Mol Endocrinol* 19(6):1569–1583
36. Galliher-Beckley AJ et al (2008) Glycogen synthase kinase 3beta-mediated serine phosphorylation of the human glucocorticoid receptor redirects gene expression profiles. *Mol Cell Biol* 28(24):7309–7322
37. Itoh M et al (2002) Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Mol Endocrinol* 16(10):2382–2392
38. Wang Z, Frederick J, Garabedian MJ (2002) Deciphering the phosphorylation “code” of the glucocorticoid receptor in vivo. *J Biol Chem* 277(29):26573–26580
39. Chen W et al (2008) Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Mol Endocrinol* 22(8):1754–1766
40. Blind RD, Garabedian MJ (2008) Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109(1–2):150–157
41. Wallace AD, Cidlowski JA (2001) Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem* 276(46):42714–42721
42. Webster JC et al (1997) Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J Biol Chem* 272(14):9287–9293
43. Lien HC et al (2006) Differential expression of glucocorticoid receptor in human breast tissues and related neoplasms. *J Pathol* 209(3):317–327
44. Buxant F, Engohan-Aloghe C, Noel JC (2010) Estrogen receptor, progesterone receptor, and glucocorticoid receptor expression in normal breast tissue, breast in situ carcinoma, and invasive breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 18(3):254–257
45. Horwitz KB, Costlow ME, McGuire WL (1975) MCF-7: a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids* 26(6):785–795
46. Tronche F et al (1998) Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice. *Curr Opin Genet Dev* 8(5):532–538
47. Reichardt HM et al (1998) DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93(4):531–541
48. Conde I et al (2008) Glucocorticoid receptor changes its cellular location with breast cancer development. *Histol Histopathol* 23(1):77–85
49. Belova L et al (2009) Glucocorticoid receptor expression in breast cancer associates with older patient age. *Breast Cancer Res Treat* 116(3):441–447
50. Chen JQ, Brown TR, Yager JD (2008) Mechanisms of hormone carcinogenesis: evolution of views, role of mitochondria. *Adv Exp Med Biol* 630:1–18
51. Lillberg K et al (2003) Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 women: a cohort study. *Am J Epidemiol* 157(5):415–423
52. Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK (2004) Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol* 5(10):617–625
53. Roberts FD et al (1996) Self-reported stress and risk of breast cancer. *Cancer* 77(6):1089–1093
54. Kruk J, Aboul-Enein HY (2004) Psychological stress and the risk of breast cancer: a case–control study. *Cancer Detect Prev* 28(6):399–408
55. Morrison N, Eisman J (1993) Role of the negative glucocorticoid regulatory element in glucocorticoid repression of the human osteocalcin promoter. *J Bone Miner Res* 8(8):969–975
56. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G (2003) The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* 24(4):488–522
57. Messmer UK et al (2000) Suppression of apoptosis by glucocorticoids in glomerular endothelial cells: effects on proapoptotic pathways. *Br J Pharmacol* 129(8):1673–1683
58. Kerppola TK, Luk D, Curran T (1993) Fos is a preferential target of glucocorticoid receptor inhibition of AP-1 activity in vitro. *Mol Cell Biol* 13(6):3782–3791
59. Scheinman RI et al (1995) Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 15(2):943–953
60. Imai E et al (1993) Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. *J Biol Chem* 268(8):5353–5356
61. Lin A, Karin M (2003) NF-kappaB in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol* 13(2):107–114
62. Herr I et al (2007) Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids. *Apoptosis* 12(2):271–291
63. Feng Z et al (1995) Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland. *J Cell Biol* 131(4):1095–1103
64. Diamond MI et al (1990) Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* 249(4974):1266–1272
65. Shaulian E, Karin M (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4(5):E131–E136
66. Lu A et al (2002) Blockade of AP1 transactivation abrogates the abnormal expression of breast cancer-specific gene 1 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 277(35):31364–31372
67. Bamberger AM et al (1999) Expression pattern of the AP-1 family in breast cancer: association of fosB expression with a well-differentiated, receptor-positive tumor phenotype. *Int J Cancer* 84(5):533–538
68. Milde-Langosch K (2005) The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur J Cancer* 41(16):2449–2461
69. Ozaki T, Nakagawara A (2011) p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *J Biomed Biotechnol* 2011: 603925
70. Sengupta S, Waslylyk B (2001) Ligand-dependent interaction of the glucocorticoid receptor with p53 enhances their degradation by Hdm2. *Genes Dev* 15(18):2367–2380
71. Sengupta S et al (2000) Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells. *EMBO J* 19(22):6051–6064
72. Moll UM, Riou G, Levine AJ (1992) Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(15):7262–7266
73. Maiyar AC et al (1997) Repression of glucocorticoid receptor transactivation and DNA binding of a glucocorticoid response

- element within the serum/glucocorticoid-inducible protein kinase (sgk) gene promoter by the p53 tumor suppressor protein. *Mol Endocrinol* 11(3):312–329
74. Maiyar AC et al (1996) p53 stimulates promoter activity of the sgk, serum/glucocorticoid-inducible serine/threonine protein kinase gene in rodent mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 271(21):12414–12422
75. Goya L et al (1993) Glucocorticoids induce a G1/G0 cell cycle arrest of Con8 rat mammary tumor cells that is synchronously reversed by steroid withdrawal or addition of transforming growth factor-alpha. *Mol Endocrinol* 7(9):1121–1132
76. Urban G et al (2003) Identification of a functional link for the p53 tumor suppressor protein in dexamethasone-induced growth suppression. *J Biol Chem* 278(11):9747–9753
77. Gutierrez MC et al (2005) Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol* 23(11):2469–2476
78. Whyte J et al (2009) Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast Cancer Res* 11(5):209
79. Kee TH, Vit P, Melendez AJ (2005) Sphingosine kinase signalling in immune cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32(3):153–161
80. Ewing TM et al (1989) Regulation of epidermal growth factor receptor by progestins and glucocorticoids in human breast cancer cell lines. *Int J Cancer* 44(4):744–752
81. Doll F, Pfeilschifter J, Huwiler A (2005) The epidermal growth factor stimulates sphingosine kinase-1 expression and activity in the human mammary carcinoma cell line MCF7. *Biochim Biophys Acta* 1738(1–3):72–81
82. Grunberg SM et al (2009) Effectiveness of a single-day three-drug regimen of dexamethasone, palonosetron, and aprepitant for the prevention of acute and delayed nausea and vomiting caused by moderately emetogenic chemotherapy. *Support Care Cancer* 17(5):589–594
83. Herrington JD, Jaskiewicz AD, Song J (2008) Randomized, placebo-controlled, pilot study evaluating aprepitant single dose plus palonosetron and dexamethasone for the prevention of acute and delayed chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Cancer* 112(9):2080–2087
84. Lu YS et al (2005) Effects of glucocorticoids on the growth and chemosensitivity of carcinoma cells are heterogeneous and require high concentration of functional glucocorticoid receptors. *World J Gastroenterol* 11(40):6373–6380
85. Wang H et al (2004) Pretreatment with dexamethasone increases antitumor activity of carboplatin and gemcitabine in mice bearing human cancer xenografts: in vivo activity, pharmacokinetics, and clinical implications for cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 10(5):1633–1644
86. Balkwill F (2002) Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev* 13(2):135–141
87. Loda M et al (1996) Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis. *Am J Pathol* 149(5):1553–1564
88. Magi-Galluzzi C et al (1997) Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is overexpressed in prostate cancers and is inversely related to apoptosis. *Lab Invest* 76(1):37–51
89. Braunschweiger PG, Schiffer LM (1981) Antiproliferative effects of corticosteroids in C3H/HeJ mammary tumors and implications for sequential combination chemotherapy. *Cancer Res* 41(9 Pt 1):3324–3330
90. Stuhr LE et al (2006) High-dose, short-term, anti-inflammatory treatment with dexamethasone reduces growth and augments the effects of 5-fluorouracil on dimethyl-alpha-benzanthracene-induced mammary tumors in rats. *Scand J Clin Lab Invest* 66(6):477–486
91. Hall RE et al (1990) Steroid hormone receptor gene expression in human breast cancer cells: inverse relationship between oestrogen and glucocorticoid receptor messenger RNA levels. *Int J Cancer* 46(6):1081–1087
92. de Fazio A et al (1997) Antisense estrogen receptor RNA expression increases epidermal growth factor receptor gene expression in breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 8(8):903–911
93. Krishnan AV, Swami S, Feldman D (2001) Estradiol inhibits glucocorticoid receptor expression and induces glucocorticoid resistance in MCF-7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 77(1):29–37
94. Zhang Y et al (2009) Estrogen inhibits glucocorticoid action via protein phosphatase 5 (PP5)-mediated glucocorticoid receptor dephosphorylation. *J Biol Chem* 284(36):24542–24552
95. Gong H et al (2008) Glucocorticoids antagonize estrogens by glucocorticoid receptor-mediated activation of estrogen sulfotransferase. *Cancer Res* 68(18):7386–7393
96. Allegra JC et al (1979) Relationship between the progesterone, androgen, and glucocorticoid receptor and response rate to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Cancer Res* 39(6 Pt 1):1973–1979
97. Wan Y et al (2001) Separable features of the ligand-binding domain determine the differential subcellular localization and ligand-binding specificity of glucocorticoid receptor and progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 15(1):17–31
98. Deroo BJ, Archer TK (2001) Glucocorticoid receptor-mediated chromatin remodeling in vivo. *Oncogene* 20(24):3039–3046
99. Li X et al (2003) Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol Cell Biol* 23(11):3763–3773
100. van den Berg HW, Lynch M, Martin JH (1993) The relationship between affinity of progestins and antiprogestins for the progesterone receptor in breast cancer cells (ZR-PR-LT) and ability to down-regulate the receptor: evidence for heterospecific receptor modulation via the glucocorticoid receptor. *Eur J Cancer* 29A(12):1771–1775
101. Wan Y, Nordeen SK (2003) Overlapping but distinct profiles of gene expression elicited by glucocorticoids and progestins. *Recent Prog Horm Res* 58:199–226
102. Buser AC et al (2007) Progesterone receptor repression of prolactin/signal transducer and activator of transcription 5-mediated transcription of the beta-casein gene in mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 21(1):106–125
103. Quirk SJ et al (1985) Progestins specifically suppress alpha-lactalbumin synthesis and secretion. *J Steroid Biochem* 23(6A):901–905
104. Wiegratz I, Kuhl H (2004) Progestogen therapies: differences in clinical effects? *Trends Endocrinol Metab* 15(6):277–285
105. Poulin R et al (1991) Multiple actions of synthetic “progestins” on the growth of ZR-75-1 human breast cancer cells: an in vitro model for the simultaneous assay of androgen, progestin, estrogen, and glucocorticoid agonistic and antagonistic activities of steroids. *Breast Cancer Res Treat* 17(3):197–210
106. Kontula K et al (1983) Binding of progestins to the glucocorticoid receptor. Correlation to their glucocorticoid-like effects on in vitro functions of human mononuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol* 32(9):1511–1518
107. Parazzini F et al (1993) Treatment with tamoxifen and progestins for metastatic breast cancer in postmenopausal women: a quantitative review of published randomized clinical trials. *Oncology* 50(6):483–489

108. Willemse PH et al (1990) Adrenal steroids as parameters of the bioavailability of MA and MPA. *Eur J Cancer* 26(3):359–362
109. Foidart JM et al (2007) Hormone therapy and breast cancer risk. *Climacteric* 10(Suppl 2):54–61
110. Chlebowski RT et al (2010) Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. *JAMA* 304(15):1684–1692
111. Hofseth LJ et al (1999) Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. *J Clin Endocrinol Metab* 84(12):4559–4565
112. Wood CE et al (2007) Effects of estradiol with micronized progesterone or medroxyprogesterone acetate on risk markers for breast cancer in postmenopausal monkeys. *Breast Cancer Res Treat* 101(2):125–134
113. Murkes D et al (2011) Effects of percutaneous estradiol-oral progesterone versus oral conjugated equine estrogens-medroxyprogesterone acetate on breast cell proliferation and bcl-2 protein in healthy women. *Fertil Steril* 95(3):1188–1191
114. Wood CE, Register TC, Cline JM (2009) Transcriptional profiles of progestogen effects in the postmenopausal breast. *Breast Cancer Res Treat* 114(2):233–242