

**“25 ans d’évolution” :**  
**Récepteurs hormonaux et pathologie**  
**mammaire (Marseille, 1980)**  
**Hormones et sein (Paris, 1990)**  
**Sein, hormones et antihormones**  
**(Nancy, 2004)**



Transfer of fundamental bases to clinical applications

Hormones and cancer (Marseille, 1980) – Hormone receptors and breast diseases

(Paris, 1990) – Hormones and cancer: advances knowledge evolution (Nancy, 2004)

**Mots clés :** Récepteurs des estrogènes, Récepteurs nucléaires classe 1, Isoforme ER, Transmission du signal intracellulaire, Cofacteur régulateur, Coactivateur, Corépresseur, SERM, BRCA1 NcoR1, ER mutant, Matrice nucléaire, Récepteurs membranaires, Interaction stroma-épithélium, Métabolisme tissulaire estrogène, Métabolisme oxydatif, catéchol-estrogène, Concept unifié de carcinogenèse mammaire.

**Keywords :** Estrogen receptors, Nuclear receptors 1, Isoform ER, Coactivato, Coinhibitor.

P.M. Martin <sup>(1)</sup>

**L**es premiers dosages des récepteurs ont été développés dans les années 1970-1972 [1] pour sélectionner les patientes susceptibles de répondre à une endocrinothérapie de castration qui était alors la seule thérapeutique accessible avec l’hormonothérapie à dose pharmacologique dans le cadre d’un traitement palliatif [2-5].

1. Laboratoire de transfert en oncologie biologique, APHM, faculté de médecine Nord, 13916 Marseille Cedex.

De très nombreuses études, réalisées sur des séries importantes de patientes, ont mis en évidence, d'une part l'étroite corrélation entre la présence de récepteurs hormonaux et la réponse à l'hormonothérapie antiestrogénique et/ou à des protocoles de chimiothérapie intratumoraux de type CMF, et d'autre part, la durée de réponse à ces thérapeutiques est corrélée aux taux des récepteurs [6-7].

L'utilisation systématique de ces dosages et l'étude de la survie des patientes en 1979 ont ensuite permis au groupe de W.L. McGuire de montrer leur valeur pronostique. Cependant, l'interférence des protocoles de thérapeutique adjuvante n'avait pas été prise en compte dans cette analyse princeps. L'utilisation des récepteurs des estrogènes (RO et/ou ER) seuls, permet une prédiction de la réponse au traitement dans environ 75 % des cas. L'imprécision relative dans la prédiction de la réponse est principalement due à l'absence de réponse de certaines tumeurs ER +. Cela peut provenir de l'hétérogénéité d'expression des ER dans les cellules tumorales ou à la présence d'un ER dépourvu d'action biologique. Le récepteur de progestérone (RP) [6-8] ou PS2 [9] dont la synthèse est induite par les ER, ont été proposés secondairement pour améliorer la valeur prédictive des ER.

Sur le plan technique, la détection des récepteurs hormonaux a été rendue possible par la synthèse et la mise à disposition de deux molécules radiomarquées, ces molécules de synthèse se liant avec une très haute affinité aux récepteurs hormonaux. La fiabilité de cette technique, applicable en clinique, a été largement validée [10-13]. La détection des ligands spécifiques a permis de réaliser une mesure intratissulaire des récepteurs hormonaux. Cette technique a fait l'objet d'une évolution, d'une évaluation et d'une validation internationale avec mise en place de protocoles méthodologiques standardisés et de contrôles qualité [11-25]. Cette standardisation a permis d'établir des seuils spécifiques précis au-delà desquels on peut escompter une réponse clinique ou établir un pronostic [2-4, 26-29].

Les méthodes biochimiques-biologiques impliquent la préparation d'un extrait tissulaire (sur-nageant 105 000 G) après homogénéisation du tissu. Une efficacité supérieure des thérapeutiques endocriniennes a été démontrée et corrélée aux taux en récepteurs les plus élevés [2, 3, 30, 31]. Elle permet de visualiser l'hétérogénéité tumorale et nécessite la mise en place de protocoles standardisés et contrôlés. Les deux approches méthodologiques sont en fait complémentaires, chacune ayant ses avantages relatifs [32-34], sous réserve d'une validation technique complète des méthodes et utilisation régulière de contrôles de qualité évaluant toutes les étapes techniques.

L'importance clinique des récepteurs a été établie à une époque où seuls les dosages biochimiques traditionnels étaient disponibles. On a aussi montré l'évolution péjorative des patientes dont les tumeurs étaient dépourvues de récepteurs [35-37]. Il est cependant difficile, d'après les études initiales incluant des patientes ayant reçu divers protocoles thérapeutiques, de distinguer leur valeur pronostique propre de leur valeur d'indicateur thérapeutique [2, 7, 37]. Dans les études univariées, les estimations de risque relatif sont de l'ordre de 1,5 à 2, et elles sont souvent inférieures dans les études multivariées. Un apparent paradoxe a été décrit concernant les tumeurs en postménopause ayant des taux très élevés de ER. Ces tumeurs évoluent spontanément relativement rapidement, mais répondent extrêmement bien aux protocoles d'hormonothérapie, suggérant une stimulation de ces tumeurs par des facteurs endocriniens endogènes, associés à une activité aromatase tissulaire péri-tumorale [38-40]. La production d'anticorps antirécepteurs a ouvert de nouvelles perspectives techniques, dosages immunoenzymatiques ou détection sur des coupes histologiques. Une bonne corrélation en termes de positivité a été généralement rapportée entre les techniques biochimiques et immunohistochimiques. La limitation de l'immunohistochimie réside dans le manque d'une expression quantitative objective du contenu en récepteur.

Dès les premiers congrès à Marseille, en 1980, puis à Paris, en 1990, la Société de sénologie a été le terrain du développement et de l'évaluation des récepteurs hormonaux et leur impact dans la pathologie cancéreuse mammaire.

Le consensus actuel dans le cancer du sein est que les récepteurs hormonaux sont des paramètres à prendre en compte sous deux aspects : pronostiques et prédictifs.

L'absence d'expression des récepteurs hormonaux ER - dans les cancers du sein est le témoin d'une entité biopathologique associée à un pronostic évolutif péjoratif. En clinique, la première ligne décisionnelle nécessite l'utilisation de facteurs pronostiques permettant de sélectionner les patientes pour lesquelles il y a indication d'un traitement adjuvant ou complémentaire au traitement locorégional. Ces facteurs pronostiques sont plutôt liés à des paramètres associés à l'agressivité et à l'invasivité tumorales tels que les facteurs UPAPAI1, évalués et validés sur le plan européen, fortement corrélés à une réceptivité hormonale tissulaire dissociée ou négative [43-45].

Sur le plan prédictif, ils sont corrélés, en premier lieu, à la réponse thérapeutique (essentiellement hormonothérapie). Ils sont liés à l'évolutivité des patientes sous deux aspects à savoir que leur valeur pronostique est influencée par la mise ou non en route de protocoles thérapeutiques. De ce fait, les récepteurs hormonaux sont plutôt des facteurs prédictifs que pronostiques.

Pour comprendre et mieux cerner le pourcentage de tumeurs primitives (ER +), mais répondant mal aux protocoles d'hormonothérapie, il a été suggéré une hétérogénéité tissulaire secondaire à temps de doublement rapide [41]. Cela justifierait, pour certains auteurs, la détermination séquentielle des RH au niveau de la tumeur primitive, mais également des métastases pour mieux ajuster les protocoles thérapeutiques à la biologie réelle des récidives et métastases [41, 42].

Les récepteurs hormonaux ont été les premiers paramètres tissulaires caractérisés de façon systématique dans les cancers du sein. Ils sont un modèle de travail pour les techniques d'analyse de biopathologie tissulaire, cela sur un plan de la démarche normalisée, de la validation clinique, de la standardisation des techniques et de la mise en place de contrôles de qualité.

## L'évolution de nos connaissances : Nancy, 2004

Les récepteurs aux hormones stéroïdiennes modulent l'expression de gènes codant pour des fonctions cellulaires précises, en réponse à la stimulation hormonale dans l'ensemble de l'organisme et dans les tissus hormonosensibles, en particulier.

Les récepteurs cellulaires aux hormones stéroïdes font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires qui regroupe des facteurs de transcription activés par leur liaison avec les ligands spécifiques de chaque classe (dont les hormones stéroïdiennes : estrogène, progestérone...)

À ce jour, plus de 100 récepteurs nucléaires ont été identifiés. Ils se définissent en plusieurs classes de récepteurs nucléaires (NR) :

- Classe I NR : qui regroupe les récepteurs stéroïdiens activés par la liaison des molécules hormonales stéroïdiennes et qui s'homodimérisent.
- Classe II NR : qui regroupe des récepteurs nucléaires dont l'activation est ligand-indépendante et peuvent s'homo- ou s'hétérodimériser.
- Classe des récepteurs orphelins dont les ligands n'ont été qu'en partie, et que très récemment, caractérisés.

## ***Le récepteur des estrogènes (ER ou RO) modèle classique de récepteurs nucléaires classe I***

Le récepteur ER n'interagit qu'avec les estrogènes (phytoestrogènes, xénoestrogènes) ou molécules à potentiel estrogénique SERM (Steroid Estrogene Receptor Modulators). ER est le modulateur d'un spectre très large d'activités biologiques cellulaires, tissus spécifiques, mais également sexe et âge dépendants.

En l'absence d'estrogènes, ER est séquestré dans le noyau et maintenu dans une conformation inactive par son association à des protéines du choc thermique [46-50].

La pénétration et liaison des estrogènes ou molécules assimilées (ligands) dans le site de liaison des récepteurs nucléaires induit un changement conformationnel tridimensionnel dont la conséquence est une modification de l'accessibilité à une reconnaissance d'épitopes, les interactions macromoléculaires ou antigéniques [51].

Cette transconformation permet l'homodimérisation du récepteur et une liaison de haute affinité avec un site spécifique de l'ADN, l'élément de réponse estrogénique (ERE). Cette liaison au ERE est la première étape par laquelle le complexe associé au ER module l'expression de gènes spécifiques hormonorégulés. Les récepteurs de classe I, dont les ER font partie, se lient à l'ADN sur un motif palindromique répétitif avec un arrangement en épingle. Le motif consensus ERE minimal étant : 5'-GGTCAnnnTGACC-3'(n : nucléotide quel qu'il soit).

### **A. Isoformes du ER**

Depuis la description d'un modèle classique dans les années 1970, le mode d'action des ER s'est peu à peu complexifié.

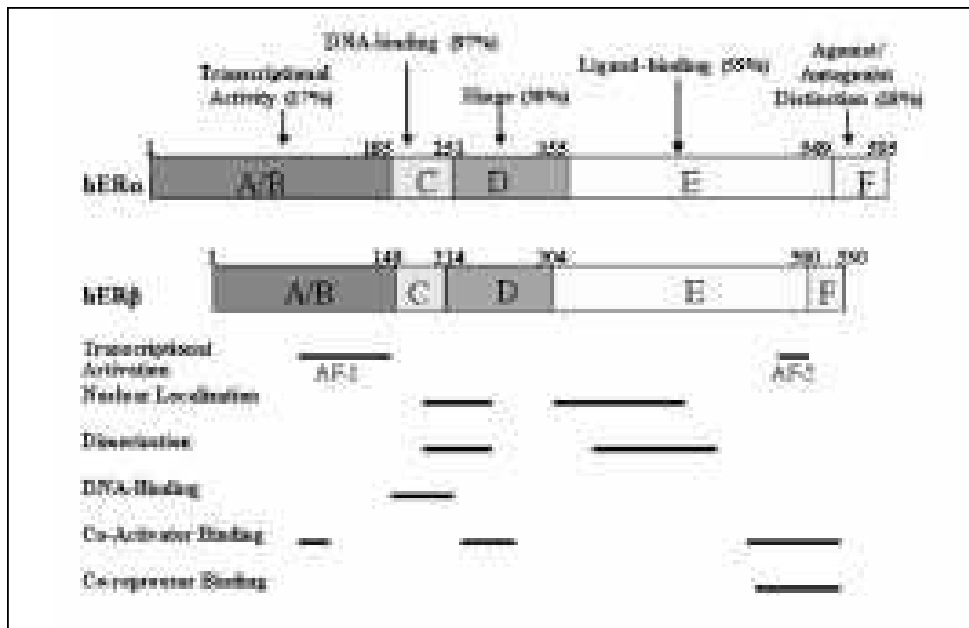
Dans un premier temps, seule la reconnaissance des récepteurs, par sa fonction de liaison de molécules hormonales radiomarquées, était accessible. Le clonage du premier récepteur aux estrogènes où ER $\alpha$  a permis de démontrer que la plus grande partie des gènes hormonorégulés par les estrogènes chez les mammifères était associée à ce récepteur. Mais certaines particularités étaient encore difficilement explicables car modulées par les estrogènes en l'absence de ER $\alpha$ .

En 1996, une seconde isoforme récepteur ER $\beta$  a été clonée. Son rôle reste encore actuellement mal caractérisé, mais elle semblerait avoir en partie un rôle de modulation tissulaire de l'activation associée au ER $\alpha$ . ER $\alpha$  et ER $\beta$ , génétiquement et fonctionnellement distincts apparaissent comme complémentaires et non redondants. Dans les domaines structurels et fonctionnels, les deux isoformes ER $\alpha$  et ER $\beta$  présentent des pourcentages de forte homologie. Les deux isoformes lient avec une haute affinité les estrogènes naturels ainsi que les éléments de réponse ERE de l'ADN. Cependant, on observe des différences dans leur structure, la répartition de leur expression tissulaire et des phénotypes observés expérimentalement dans les modèles de souris "knockout" pour les gènes ER $\alpha$  ou ER $\beta$ .

### ***Domaines fonctionnels des ER $\alpha$ et ER $\beta$ (figure 1)***

ER $\alpha$  a son gène localisé sur le bras long du chromosome 6, codant pour une protéine de 595 amino-acides présentant trois domaines essentiels :

- Un domaine N-terminal de modulation (AF1).
- Un domaine central ou domaine de liaison à l'ADN (DNABinding Domain [DBD]).
- Un domaine C-terminal comportant le site de liaison des hormones (Ligand Binding Domain



**Figure I.** Schéma des récepteurs aux estrogènes  $\alpha$  et  $\beta$ . (%) : d'homologie entre des domaines fonctionnels de ER- $\alpha$  et ER- $\beta$ .

[LBD]). Le ligand étant la molécule de faible poids moléculaire se liant dans le site récepteur (E1, E2, SERM...). Ce domaine C-terminal comporte également un domaine de modulation AF2.

ER $\beta$  a son gène localisé en q22-24 du chromosome 14 codant pour un récepteur plus court de 530 amino-acides. ER $\beta$  présente les mêmes domaines que ER $\alpha$ , mais diffère par la perte d'une portion du domaine C-terminal qui est important pour les effets associés à certains antiestrogènes.

Les pourcentages d'homologie les plus grands sont de 97 % pour le DBD et de 60 % pour le LBD. En revanche, ER $\alpha$  et ER $\beta$  présentent une très faible homologie de 17 % pour leur région N terminale et diffèrent dans leur affinité de liaison avec des structures moléculaires potentiellement estrogéniques tels les phytoestrogènes et les SERM [52-55].

Enfin, certaines activités transcriptionnelles non reliées aux ERE ont été décrites. Actuellement plusieurs gènes régulés par ER $\alpha$  le sont grâce à l'interaction de l'ADN au site Sp1. Par ailleurs, ER $\alpha$  et ER $\beta$  peuvent interagir avec les facteurs de transcription cjun et cfos, liés avec l'ADN au site AP1. Ces interactions récepteurs/sites spécifiques de l'ADN mettent en jeu des complexes supramoléculaires associant ER et des cofacteurs.

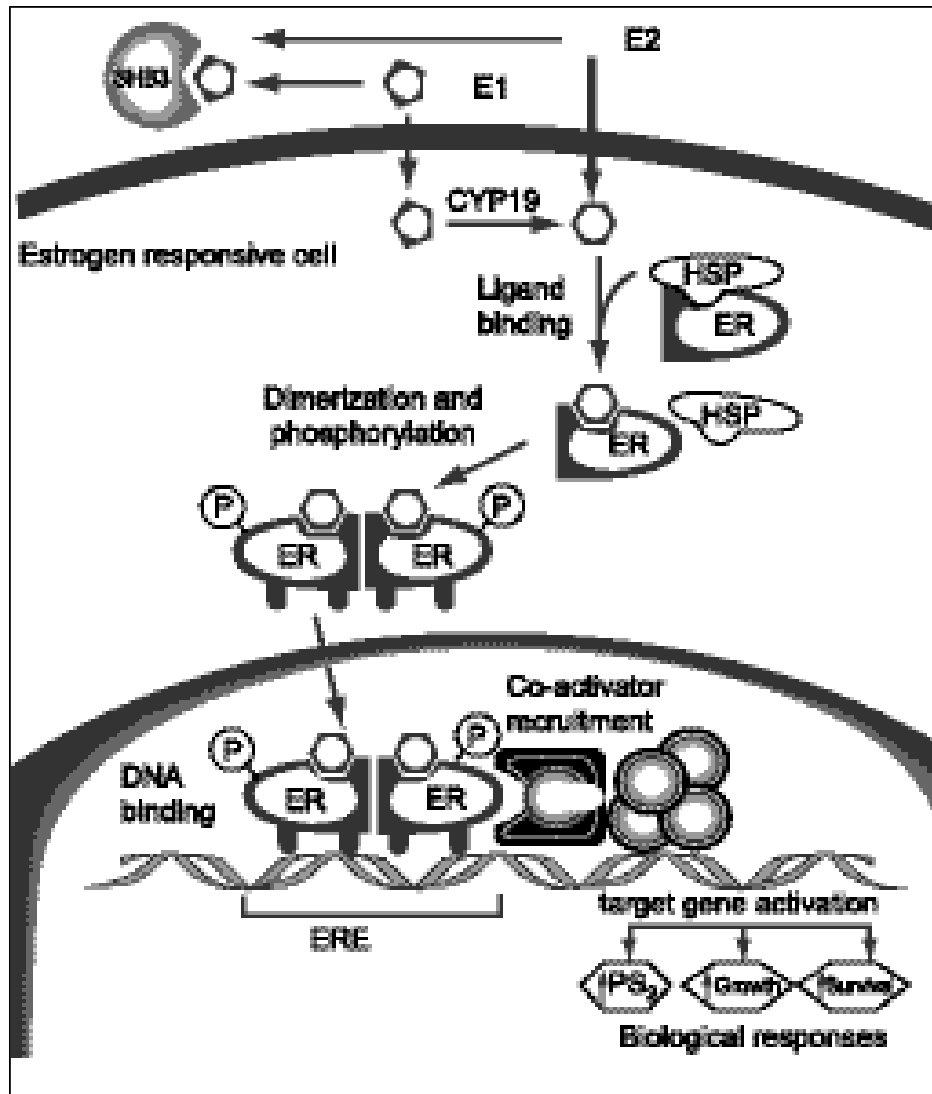
## B. Mécanismes associés à la transmission du signal intracellulaire associé aux ER (figure 2)

Les ER synthétisés mais inactifs, liés à des protéines chaperonnes (protéines du choc thermique) HSP 90, sont séquestrés en équilibre dans le cytoplasme et dans le noyau grâce à un motif peptidique d'assignation situé dans le domaine DBD [47-50].

La liaison dans le site actif du récepteur LBD des ligands, que représentent les molécules hormonales, transconforme de façon spatiale le récepteur modifiant le positionnement des différents motifs moléculaires (dont les hélices - et entre autre les hélices 10-11-12).

Cette transconformation permet l'inhibition de l'interaction ER-HSP90, l'accessibilité des sites de phosphorylation associés à des acides aminés spécifiques (sérine 104, 106, 118 et tyrosine) la dimérisation du récepteur, la liaison de dimère au ERE.

Le changement conformationnel de structure des ER, induit par la liaison du ligand, expose



**Figure 2.** Les différents systèmes impliqués dans l'action des estrogènes au niveau des cellules épithéliales hormonosensibles.

ER : récepteur aux androgènes

E1 : estrone

E2 : estradiol

ER : récepteur aux estrogènes

CYP P19 : aromatasé cytochrome P450/19.

HSP : (heat Shock protein) protéine du choc thermique.

P : site de phosphorylation.

ERE : (Estrogène Responsive Element) palindrome ADN, site de liaison récepteur activé/ADN.

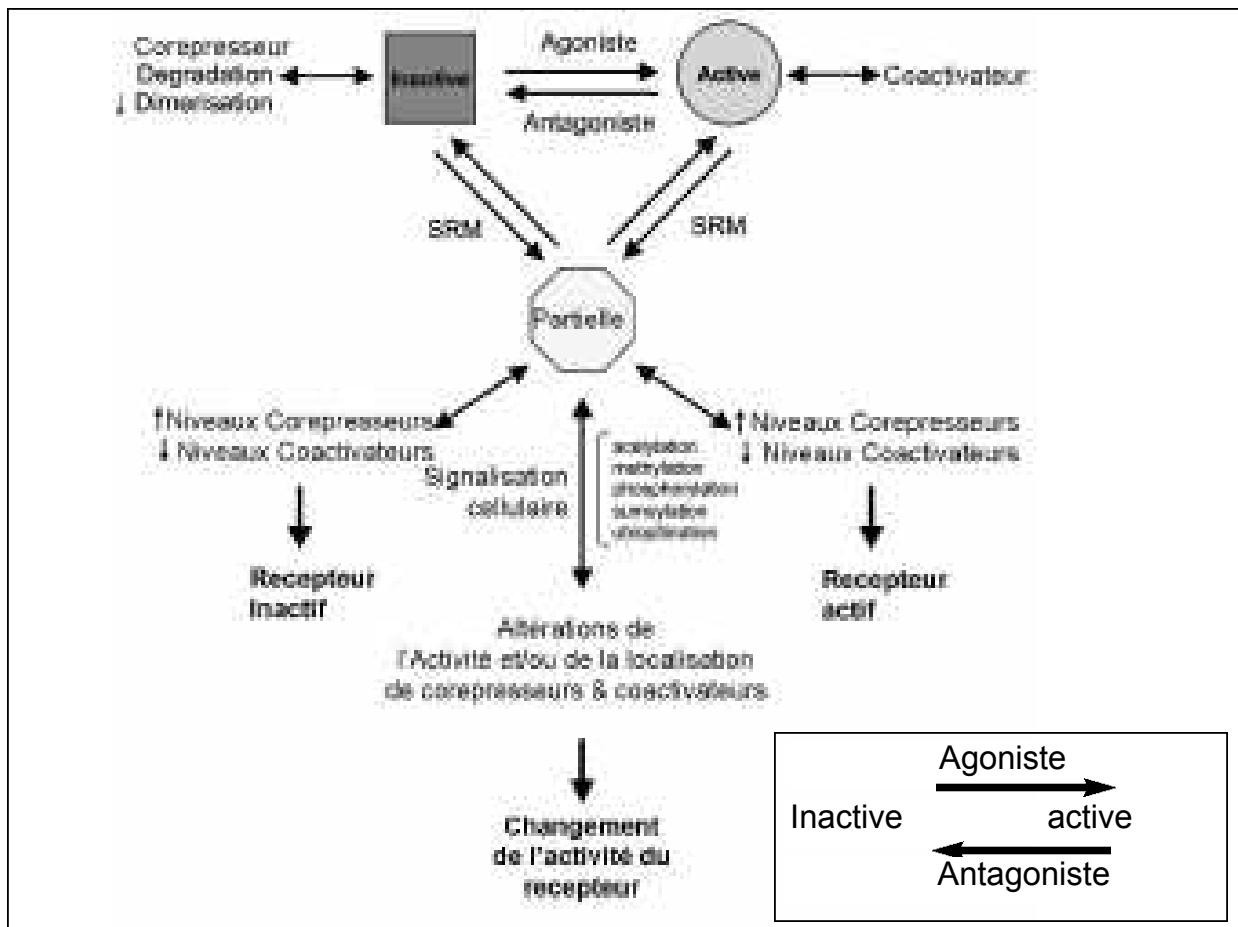
**Ligand** : molécule de faible poids moléculaire se liant au site actif du récepteur.

SHBP : protéine sérique liant l'estradiol et la testostérone, nommée également TeBG (Testosterone estradiol binding globulin).

par ailleurs différents amino-acides qui sont critiqués pour les interactions avec d'autres macromolécules que sont les cofacteurs associés en structure supramoléculaire [51, 52].

Le recrutement de ces cofacteurs (co-activateurs ou co-répresseurs) joue un rôle déterminant dans l'activation et la promotion ou la répression des pools enzymatiques (kinase, phosphorylase) liés à l'activité transcriptionnelle et se traduisant, à terme, par l'expression fonctionnelle de certaines macromolécules spécifiques. Ce recrutement est mis en jeu non seulement par les estrogènes naturels, mais également par des molécules végétales à potentiel estrogénique apporté par l'alimentation les phytoestrogènes [53] et des molécules de synthèse appelées stéroïdes estrogènes récepteur modulateurs (SERM).

Généralement les coactivateurs ont



**Figure 3.** Modèle de contribution des co-activateurs corépresseurs pour déterminer l'activité agoniste/antagoniste des SERM "Selective Estrogen Receptor Modulators". Adapté d'après C.L. Smith, B.W. O'Malley. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocrine Reviews* 2004;25:45-71.

□ ○ ◇ = structures macromoléculaires tridimensionnelles adoptées par les récepteurs ER après leur liaison avec des ligands spécifiques agonistes/antagonistes ou ambivalents. Ces conformations structurales permettent l'association avec des coactivateurs ou corépresseurs. Par ailleurs, le taux intracellulaire des corépresseurs ou coactivateurs peut dans le cas d'une structure ambivalente diriger la voie de signalisation vers une voie d'activation ou d'inactivation.

une activité intrinsèque histone acétylase qui permet l'activation de la transcription par exposition des séquences spécifiques d'ADN. Les corépresseurs ont une activité inverse déacétylase qui maintient la chromatine dans un état condensé ne permettant pas l'activation de la transcription.

Il est à noter, comme nous le verrons plus loin, que les voies de transmission associées aux récepteurs membranaires des facteurs de croissance peuvent directement phosphoryler (activer) les récepteurs indépendamment de toute liaison avec un ligand.

### C. L'interaction avec les cofacteurs (coactivateurs, corépresseurs)

De nombreuses protéines cofacteurs (coactivateurs-corépresseurs) interagissent avec les récepteurs NR classe I, dont ER fait partie, sur différents domaines [53-56]. On compte à ce jour plus de 70 molécules interagissant avec le récepteur aux estrogènes (ER). Beaucoup inter-

agissent dans plusieurs classes de récepteurs, récepteurs aux estrogènes (ER), aux progestatifs (PR) et glucocorticoïdes (GR) tels **HMG1**, **HMG2** (High Mobility group protein 1 et 2) ou également avec d'autres molécules modulatrices telle OCT1-2 (octamer transcription factors 1 et 2) qui interagit avec les récepteurs RP, RG et SRC1 (stéroïde récepteur classe 1).

La **figure 3** schématise la distribution des molécules coactivatrices ou corépressives relatives à l'activité agoniste ou antagoniste des ligands. Les ligands représentent des molécules de faible poids moléculaire telles que les estrogènes, phytoestrogènes, xénoestrogènes et SERM (environ 300) se liant au site actif du récepteur. Les molécules dénommées modulatrices spécifiques des récepteurs nucléaires (Selective Receptor Modulator ou SRM), dont les SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) sélectives du récepteur aux estrogènes sont des molécules ambivalentes.

*En présence d'un ligand agoniste* dans le site de liaison, le récepteur des estrogènes se transforme spatialement, interagit avec les molécules coactivatrices, et ce complexe supramoléculaire active la transcription spécifique régulée par les estrogènes [53].

*En présence d'un ligand antagoniste* (antiestrogène pur) dans le site de liaison, le récepteur adopte une conformation spatiale qui interagit préférentiellement avec les molécules corépressives avec, comme conséquence, l'impossibilité d'activer la transcription.

*En présence de molécules ambivalentes* modulatrices spécifiques du récepteur des estrogènes (SERM) dans le site de liaison, le récepteur adopte une conformation intermédiaire entre forme active ou inactive et, de ce fait, peut interagir également avec les molécules co-activatrices ou corépressives dont dépend une forme supramoléculaire intermédiaire (partiellement activée ou inactive). De ce fait, l'activité des récepteurs des estrogènes liés aux SERM dépend essentiellement de l'expression tissulaire environnementale relative des coactivateurs et des corépresseurs.

De la régulation ou dysrégulation de l'expression et de la localisation subcellulaire des molécules coactivatrices/corépressives découlent en cascade les changements d'activité cellulaire dépendante des récepteurs aux estrogènes. En plus des interactions intermoléculaires au sein d'un complexe supramoléculaire, certaines de ces molécules interactives possèdent une activité enzymatique spécifique (acétylase, kinase, méthylase, phosphatase, sumoïlase, ubiquitinease...) dont les cibles sont d'autres molécules corépressives, coactivatrices ou des séquences spécifiques des récepteurs eux-mêmes.

Les études expérimentales d'animaux dépourvus d'expression (knock out) de coactivateurs ou corépresseurs des récepteurs aux hormones stéroïdes montrent des différences dans l'action biologique des différents coactivateurs avec une expression tissulaire spécifique. Les coactivateurs jouent un rôle spécifique spatial (tissus spécifiques et structure tissulaire définie) et également, dans le temps, une action à des moments privilégiés du développement ou de la fonction tissulaire. Enfin, les études des animaux "knock out" démontrent que ces différentes molécules, coactivateurs, corépresseurs, ne sont pas redondantes même au sein d'une même famille moléculaire (SRC1, SRC2, SRC3 par exemple) et ces molécules peuvent intervenir dans plusieurs voies d'activation indépendante des voies liées au ER [58].

Les cofacteurs, coactivateurs, corépresseurs forment des familles dont la nomenclature est actuellement en cours de normalisation. Mais une même molécule peut être désignée encore actuellement par plusieurs abréviations.

❖ **Les coactivateurs** se regroupent globalement en 12 familles dont :

La famille *p160* regroupe *SRC1*, *SRC2*, *SRC3* (Steroid Receptor Coactivator 1, 2 et 3) SRC étant également désigné par NCoA1 (Nuclear Co-Activator) ou ERAP160. Ces cofacteurs



sont exprimés à des taux variables dans les tissus cibles normaux et pathologiques. Pour être activés, ils doivent être phosphorylés par des kinases spécifiques dont l'activité est stimulée par les hormones stéroïdes, facteurs de croissance, AMPcycloique ou TNF $\beta$ . Les interactions de SRC1, SRC2, SRC3 activés avec ER s'établissent entre AF2 dans le LBD de ER (*figure 1*) et un motif NR (Nuclear Receptor) interaction domain ou NID des coactivateurs SRC. Le motif NID est formé des séquences de 5 aminoacides (aa) riches en leucim (L) soit LXXLL (X étant aa indifférent). Les NID des hélices - 3-4-5 et 12 sont impliqués pour ER-, SCR1 et ER-, SCR2.

La dynamique d'interaction du domaine d'activation (AF) du récepteur avec les coactivateurs se fait en deux temps : un premier rapide d'interaction via de faibles liaisons électrostatiques de contact qui évoluent, dans le second, plus lentement vers une structure d'interaction hydrophobique plus stable du domaine d'activation [54, 58].

SRC1 activé interagit d'une part avec ER via le motif NID et d'autre part avec d'autres coactivateurs ambivalents tels :

- CBPp300-cAMP response element binding protein- (CREB) binding protein.
- pCAF p300/CBP-associated factor.
- CARM-1 formant un complexe supramoléculaire.

#### *Différents assemblages supramoléculaires s'établissant successivement dans le temps [56]*

Dans un premier temps, SRC et CBP p300 ont une activité propre histone acétylase qui modifie la condensation de la chromatine. Cela obtenu, le récepteur ER interagit secondairement avec un autre ensemble supramoléculaire dont font partie SWI/SNF (BRG-1/BAFS7). Ce complexe remodèle la chromatine avec une activité acétyltransférase, provoque la rupture locale de la structure du nucléosome et permet le déroulement séquentiel de l'ADN.

Par la suite, un dernier complexe se forme associant ER avec TR associated protein (TRAP), vitamin D receptor interactive protein (DRIP). Complexe qui se forme par recrutement en contact avec les promoteurs des gènes spécifiques hormonomodulés et les éléments de base de la machinerie de transcription (TATA binding protein TBPet TBP associated factor, RNA polymerase II). Ce dernier complexe permet la mise en route d'une transcription spécifique des gènes hormonorégulés.

Une fois la transcription réalisée, le complexe coactivateur récepteur est bloqué dans son activité par un processus moléculaire de dégradation du protéasome. Ce processus associe des ubiquitines ligases, telles E6 AP et MDM2 qui polyubiquitinent les protéines du complexe ER-cofacteur et cible ainsi leur dégradation par le protéasome 26S [56].

Ce processus multifactoriel dans le temps contrôle un turnover de régulation négative du complexe ER- cofacteur permettant ainsi une transcription parfaitement contrôlée des gènes hormonorégulés.

❖ **Les corépresseurs** de ER actuellement connus sont en nombre plus restreint et regroupés en six familles. Certains présentent plusieurs nombres ou isoformes et sont communs à plusieurs familles de récepteurs telles NcoR codant pour des protéines d'environ 270 Kda interagissant avec le LBD de ER $\alpha$ , PR, mais également avec d'autres familles telles TR, RAR, RXR, DAX1.

D'autres sont restreints à une seule représentant une même famille et sont spécifiques de ER tel **BRCA1** [53-59].

BRCA1 code pour une nucléophosphoprotéine de 220 Kda, ayant deux particularités struc-

turales, un *ring finger* en N-terminal un domaine d'activation en C-terminal, et dans la fonction est l'interaction protéine/protéine. BRCA1 régule la progression dans le cycle cellulaire (fonction *gate keeper*), participe à un ensemble macromoléculaire de réparation de l'ADN (fonction *caretaker*), régule certains processus moléculaires de déclenchement de l'apoptose, enfin agit comme corépresseur dans la régulation de la transcription des gènes ER/E2 induits (tels PS2 ou cathepsine D). L'interaction protéine/protéine met en jeu le domaine N-terminal de BRCA1 (aa 1 à 301) et le domaine AF2 (aa 282-420) de ER $\alpha$ , bloquant l'activation du domaine AF2 de ER $\alpha$ .

À la différence des coactivateurs qui ont une activité intrinsèque histone acétylase (HAT) intrinsèque, la fonction corépressive s'exerce par le recrutement secondaire de complexe moléculaire ayant une activité histone déacétylase (HDAC), activité qui entraîne la répression de la transcription des gènes et le maintient d'un état plus condensé de la chromatine, empêchant la formation successive des complexes d'activation que nous avons précédemment décrit.

Ainsi BRCA1 réprime l'expression des protéines kinases induites par E2 et impliquées dans la transmission du signal telles ERK et P1.3 kinase, réduit la prolifération cellulaire induite par EGF et IGF par induction d'une phosphatase spécifique de ERK - MKP1.

Cependant, BRCA1 peut être inactivé par l'amplification de HER2 ou par mutation germinale de BRCA1 observée dans 8 % environ des cancers du sein de forme familiale ou par mutation somatique observée dans 30 à 40 % des cancers du sein au cours de leur évolution. L'inactivation de BRCA1 entraîne une perte de contrôle de la prolifération cellulaire induite par E2, EGF ou IGF avec augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la transduction du signal mitogénique ou cycle cellulaire tel l'augmentation d'expression protéique des gènes codant pour cycline D, AKT, P1.3 kinase, cMyc et l'on observe également une augmentation de fréquence des mutations de RAS.

Certaines habitudes alimentaires modifient l'expression de BRCA1, une forte consommation alimentaire d'indol 3 carbinol ou génistéine induit une augmentation d'expression de BRCA1. En revanche, une forte consommation d'alcool diminue l'expression protéique de BRCA1 et augmente la transcription des gènes ER-/E2 induits ou régulés.

**NCOR1.** Contrairement à BRCA1, NCOR1 interagit avec un grand nombre de récepteurs nucléaires ER $\alpha$ -PR, TR, RAR, RYR, et DAX1. il interagit dans la région du LBD. C'est une protéine de 270 Kda qui est indispensable à l'effet antagoniste de l'OH-tamoxifène. Se liant à ER $\alpha$ , il réprime l'activité partiellement agoniste de l'OH-tamoxifène [53]. De nombreux travaux sur le plan international évaluent l'importance ou non de paramètres complémentaires à la détermination de ER $\alpha$  dans le domaine clinique de la prédictivité à la réponse aux thérapeutiques antihormonales. Le travail d'une équipe du centre René-Huguenin [60, 61] met en évidence la valeur prédictive de la transcription de NCOR1, valeur associée à une meilleure réponse à SERM en cas de taux élevé.

#### **D. Évolution de la réponse cellulaire à la stimulation hormonale**

Sur le plan expérimental, la réponse aux estrogènes, mais également aux antiestrogènes se fait de façon biphasique avec une première phase rapide, et une seconde phase après plusieurs heures de stimulation. Deux travaux récents montrent que ces phases décrites sur le plan physiopathologique expérimental sont réelles et, de plus, mettent en jeu la transcription sélective de gènes en fonction du temps [63], et que ces transcriptions sélectives mettent en jeu des complexes interactifs corégulateurs spécifiques quant à leur interaction macromoléculaire [64].

L'évaluation de l'expression spécifique d'un pattern de nombre limité de gènes ( $n = 17$ ) peut, de ce fait, permettre la sélection de processus tumoraux très sensibles ou non au traitement antiestrogénique sachant que 80 % des tumeurs sont ER+ mais que seulement 30 à 37 % des tumeurs bénéficient à long terme d'une thérapeutique par SERM [65]. Associée à l'étude de la balance coactivateurs/corépresseurs, une telle approche pourrait être un excellent reflet de la sensibilité des cancers du sein aux thérapeutiques antihormonales ou par SERM.

### **E. Isoformes et formes mutantes de ER**

Après le clonage du ER $\alpha$ , des anomalies de structure de ce gène ont été recherchées pour tenter d'expliquer certains dysfonctionnements. Des ER $\alpha$ , ayant des exons manquants par épissage alternatif retrouvés dans les cancers du sein, ont aussi été détectés dans des tissus normaux (sein, endomètre...) associés au type sauvage, ce qui rend incertain leur signification pathologique. Un variant de ER $\alpha$  sans l'exon 5 a été retrouvé prédominant dans des cancers RE-RP+ [66, 67].

Dans les cancers RE-RP+ une forme tronquée de ER $\alpha$  a été retrouvée, forme tronquée par délétion de l'exon 7 incapable d'induire la transcription, ce qui empêche la fonction normale de ER $\alpha$ . D'autres formes mutantes avec délétions des exons 2, 3, 4 ou 6 ont été également décrites. Une activation non régulée des homodimères de la forme mutante ou des hétérodimères de la forme mutante/sauvage ont été suggérées. La forme mutante étant alors dominante [66-69].

La découverte plus récente de l'isoforme  $\alpha$  de ER $\beta$  a relancé le débat, tant sur le plan clinique que sur le plan expérimental [70-72]. Par ailleurs, en plus du clonage de ER $\beta$ , il a été démontré une famille de récepteurs nucléaires, les "Estrogen Related Receptors" (ERR $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ ) interagissant avec des corégulateurs de ER $\alpha$  et les "Estrogen Responsive Elements" aux estrogènes ERE de l'ADN [73, 74].

Cependant, aucun travail de transfert clinique d'importance n'a eu comme sujet l'évaluation de cette famille ERR.

## **Autres voies d'activation des ER non liés aux ligands spécifiques**

Les récepteurs nucléaires ER peuvent interférer avec la voie de transmission du signal des facteurs de croissance transmembranaire tyrosine kinase type. La famille des Heryuline (HER, récepteur de EGF, HER2, HER3, HER4), soit par induction de la transcription E2 stimulée via ER- du ligand EGF... soit du récepteur REGF (HER1...). Plus récemment, des interactions directes réciproques d'activation ont été décrites, les sérines/thréonine kinases associées aux récepteurs des facteurs de croissance phosphorylant les sérines entre 104, 106 et 118 directement ou indirectement, indépendamment de la présence du ligand estrogénique spécifique [75-78], mais également les coactivateurs de ER-.

La phosphorylation du récepteur ER sur les résidus sérine augmente les capacités de liaison. Une deuxième activation a lieu après la liaison des agonistes, mais pas des antagonistes. Une activation du récepteur indépendant des estrogènes par HER-2/neu et des effets synergiques à de faibles concentrations d'estrogènes ont été mis en évidence dans la lignée cellulaire MCF7 tamoxifène résistante. Comme pour HER-2/neu, IL6 potentialise l'activité du récepteur nucléaire. De la même manière KGF et EGF activent le récepteur ER en l'absence

d'estrogènes. Cette activation (phosphorylation) hormono-indépendante du ER est une des voies activées dans le phénomène d'échappement thérapeutique énoncé plus loin [75-78] (*figure 4, voie contrevenante/outlaw*).

## La matrice nucléaire

C'est un élément fondamental complémentaire des voies d'action génomique des hormones stéroïdiennes. La matrice nucléaire associe les éléments moléculaires et structuraux des pores nucléaires, de la lamina des réseaux intranucléaires et nucléoles. Ces éléments déterminent l'organisation et la forme tridimensionnelle du noyau. Ainsi, bien que l'ADN contenu dans chaque cellule d'un organisme soit identique, sa disposition spatiale peut être différente dans les noyaux de tissus différents d'un même organisme et expliquer une spécificité et une régulation proprement tissulaires de l'action des hormones stéroïdiennes.

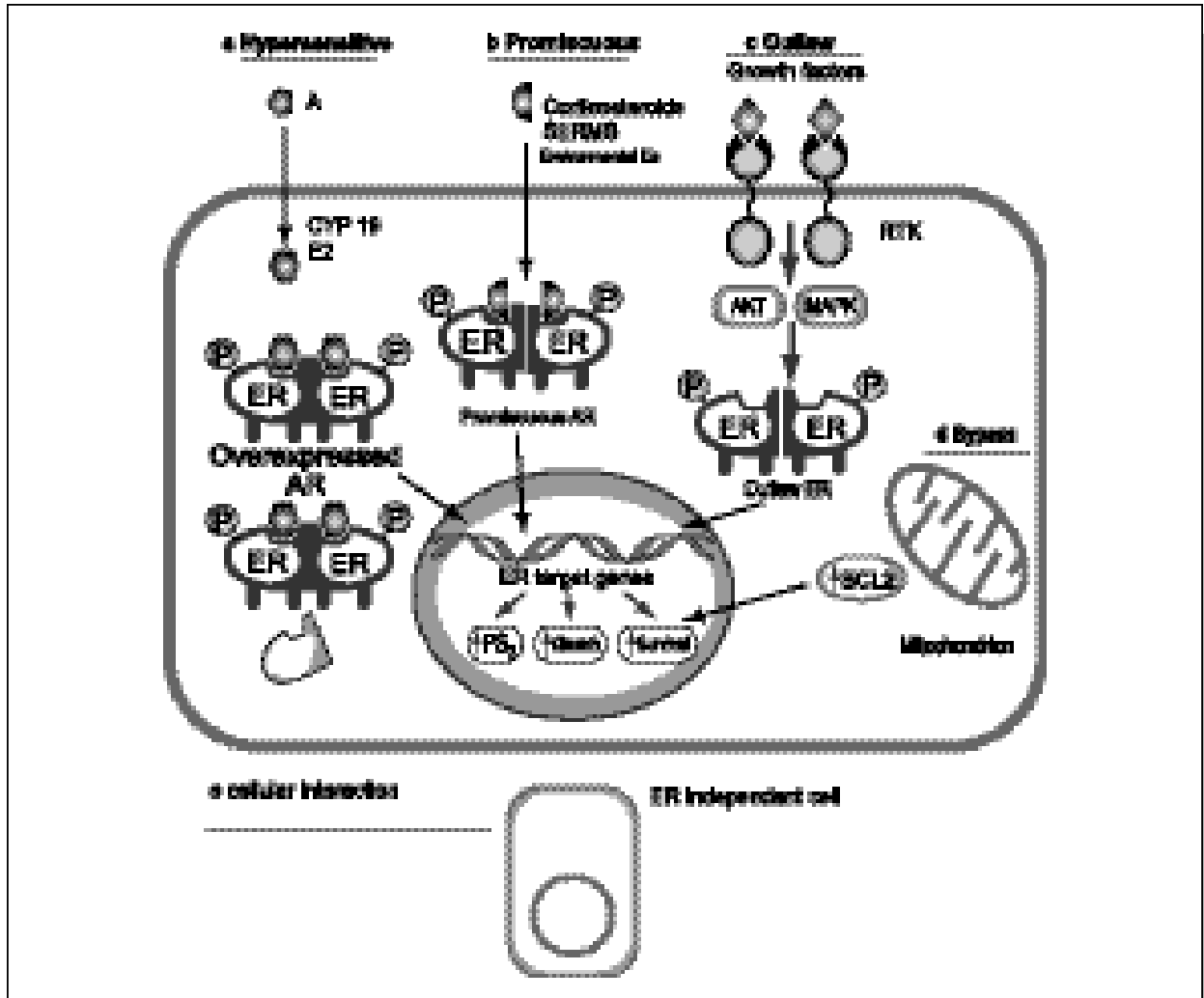
La matrice nucléaire joue un rôle important dans l'organisation spatiale de l'ADN, sa réplication et la transcription. Dans l'ADN nucléaire il y a approximativement 50 000 boucles d'ADN contenant 60 000 paires de bases (60 kbp). Chacune de ces boucles est attachée par ses bases à la matrice nucléaire et interagit avec les enzymes associés à la matrice nucléaire, telles la topoisomérase II, la DNA polymérase, etc. La matrice nucléaire fixe les sites de réplication de l'ADN. Par ailleurs, les gènes activement transcrits sont associés à la matrice nucléaire, alors que les gènes inactifs ne le sont pas. La régulation des macromolécules associées à la matrice nucléaire se fait par phosphorylation.

Barrack et Coffey furent les premiers à montrer que la matrice nucléaire était une cible majeure pour la liaison des récepteurs des hormones stéroïdiennes. Dans les tissus cibles hormonodépendants, plus de 60 % de l'ensemble des récepteurs nucléaires aux androgènes sont associés à la matrice nucléaire [79, 80]. Cette association intermacromoléculaire spécifique est une des étapes capitales de régulation de l'action hormonale, via les récepteurs nucléaires, sur l'expression génomique spécifique, sachant par ailleurs qu'il y a une interaction forte et fonctionnelle entre matrice nucléaire et centrosomes chromosomiques [81-83].

Ces interactions macromolécule/matrice nucléaire peuvent être perturbées par de multiples modifications d'activation ou perte de fonctions (mutations) des molécules interactives et être une des étapes précoces importantes de la transformation cellulaire cancéreuse [84].

## Voie d'action non génomique des estrogènes et des hormones stéroïdiennes

La voie des activations génomiques que nous venons de décrire contrôle l'expression des gènes et la synthèse de novo des protéines. Cette voie contrôle également les programmes cellulaires à moyen et long terme, ainsi que l'organisation et les réseaux cellulaires pour des fonctions complexes. Cette voie a comme inconvénient un temps de latence certain entre son activation et la réalisation effective du produit. Une voie alternative existe, la voie d'activation cellulaire non génomique, qui intervient sur l'activation ou répression de molécules pré-existantes dans la cellule (phosphorylation/déphosphorylation – méthylation/déméthylation – acétylation-déacétylation). L'activation de cette voie vers son produit effectif est rapide, permettant une adaptation cellulaire au micro environnement, et permet une modulation des programmes cellulaires à long terme.



**Figure 4.** Les voies moléculaires associées au développement d'une hormono-indépendance aux estrogènes. ER : récepteur aux estrogènes. A : précurseur androgénique d'origine essentiellement corticosurrénalien. CYP P19 : aromatase cytochrome P450/19. SERM : Steroid Estrogen Receptor Modulators (*cf figure 3*). Environnemental Es : Estrogènes environnementaux. Phytoestrogènes : Isoflavones... Fungoestrogènes : zéaranol... Xénoestrogènes : certains pesticides et dérivés de dégradation des plastiques...

**Voies d'hormonoindépendance ou échappement à la castration.**

- a. voie d'hypersensibilité** associée à une surexpression du récepteur des estrogènes.
- b. voie de proximité :** la transformation, l'activation du récepteur est obtenue par l'activité agoniste de certains SERM ou des estrogènes environnementaux.
- a et b sont modulés par l'expression des coactivateurs ou par inhibition des corépresseurs.
- c. voie contrevenante** (hors de la règle) : c'est l'activation phosphorylation du récepteur ER non par la liaison de ligands E2/SERM mais directement par les kinases associées à la voie de transmission du signal intracellulaire des récepteurs aux facteurs de croissance.
- d : voie de contournement par dérégulation** des voies contrôlant l'apoptose cellulaire (augmentation de BCL2) et donc augmentant la survie cellulaire et, de ce fait, la croissance tumorale.
- e. voie d'interaction** ER indépendant mettant en jeu les interactions paracrine-télochrine tissulaires qui stimulent la croissance et la survie des cellules tumorales ER+ indépendamment de E2 1 $\beta$  avec entre autre : interaction stroma-épithélium, interaction intraépithéliale population (ER+/ER- et normal), développement de l'angiogenèse stromale péri-tumorale.

Décrites pour la première fois dans les années 1970 par Szego [85], les voies d'action non génomiques des hormones stéroïdiennes ont été confirmées par des techniques indirectes pour leurs actions sur les canaux membranaires ioniques [86, 87] et pour l'interaction directe des récepteurs avec des macromolécules des voies de signalisation ou transmission du signal intracellulaire [88], puis leur participation à des activités tissulaires globales intégrées telle la résorption osseuse [89]. Certains de ces récepteurs membranaires aux hormones stéroïdiennes ont été récemment clonés [90].

Cette voie d'action cellulaire directe non génomique pourrait jouer un rôle physiopathologique important, mais reste mal évaluée à l'heure actuelle. Elle s'intègre dans un réseau complexe d'interactions.

Le mode d'action non génomique s'intègre dans un réseau complexe d'interactions. Les voies de transduction intracellulaires du signal peuvent être actives, soit par les hormones stéroïdiennes via les récepteurs membranaires couplés aux protéines G ou Src-kinases, soit par les facteurs de croissance via leurs récepteurs spécifiques, le TNF $\beta$  ou une élévation intracellulaire de l'AMP cyclique consécutive à une stimulation par neurotransmetteurs ou agent pharmacologique. Ces voies activées peuvent interagir avec les coactivateurs ou les corépresseurs du récepteur des androgènes en les activant par phosphorylation dans leur localisation cytoplasmique ou nucléaire. La phosphorylation cytoplasmique, entre autre pour SRC3, a pour conséquence sa localisation nucléaire et l'interaction avec le ER et d'autres facteurs de transcription.

## Interaction stroma/épithélium (figure 3)

La glande mammaire est constituée d'une composante épithéliale se développant au sein d'une composante stromale. Ces deux composantes sont étroitement liées.

- Les copules glandulaires, formés par l'épithélium mammaire assemblé en lobule et système ramifié de canaux de la glande, se drainent dans les canaux galactophoriques. Ceux-ci présentent un épithélium sécrétoire polarisé par son association à son pôle basal à une matrice extracellulaire via des molécules d'adhésions cellulaires. La matrice extracellulaire sépare l'épithélium glandulaire de la composante stromale complexe (fibrillaire et cellulaire) au sein de laquelle se développe l'angiogenèse tissulaire indispensable à la croissance et à la fonction mammaire.
- Des interactions cellulaires réciproques entre stroma et épithélium sont impliquées dans le développement et la différenciation de la glande fœtale puis dans la croissance secondaire péripubertaire, et la maintenance d'un statut tissulaire différencié hormonosensible. Ces mêmes interactions épithélium-stroma interviennent également dans les phénomènes de vieillissement et de sénescence de la glande mammaire.
- La présence d'une réceptivité aux estrogènes (ER) et aux androgènes dans les cellules stromales fœtales est fondamentale pour la réponse aux stimuli hormonaux régulant l'organisation, la différenciation de la composante épithéliale et le développement ou non du bourgeon mammaire fœtal [91, 92]. Les récepteurs aux estrogènes ER $\alpha$  ER $\beta$  présents dans la composante épithéliale adulte sont nécessaires pour la sensibilité et la régulation par les estrogènes de la croissance glandulaire ainsi que la fonction tissulaire spécifique de la glande mammaire adulte et cela en associant avec un ensemble d'autres stimuli et réceptivité hormonale qui varient en fonction de l'activité gonadique et hypothalamohypophysaire ainsi qu'en fonction du cycle de reproduction-grossesse-allaitement (progestérone, prolactine...).

- Deux aspects de ces interactions stroma-épithélium doivent être pris en compte : l'un concerne le métabolisme des estrogènes, l'autre est la prise en compte des boucles auto- ou paracrines intratissulaires mettant en jeu cytokines, facteurs de croissance et leurs récepteurs spécifiques.

## Le métabolisme intratissulaire mammaire

Du fait de l'interaction stroma-épithélium, ce métabolisme met en jeu un réseau d'activités enzymatiques complexes dont l'une des plus importantes est l'activité irréversible aromatasase CYP 19, mais associe les sulfatases, déshydrogénases et enzymes du métabolisme oxydatif. L'estrogène biologiquement le plus actif dans le tissu mammaire est l'estradiol  $17\beta$  (E2).

Les estrogènes circulant chez la femme en préménopause sont essentiellement d'origine ovarienne. En postménopause, ils sont secondaires à l'aromatation périphérique des précurseurs androgéniques d'origine corticosurrénalienne. L'importance de la stéroïdogénèse dans la genèse des cancers du sein a été clairement démontrée avec la réduction du risque individuel du cancer du sein associé à une ménopause précoce, avant l'âge de 40 ans.

Toutefois, l'impact de l'estradiol  $17\beta$  circulant ne semble pas contribuer significativement au taux global des estrogènes tissulaires intratumoraux, car la majorité des estrogènes présents dans les cancers du sein dérivent de la biosynthèse in situ. En fait, la concentration de E2 intratumoral ne diffère pas en pré- et postménopause alors que les taux plasmiqes décroissent de 90 % en postménopause [93-94]. La conversion périphérique intratissulaire des précurseurs androgéniques en estrogènes contribue à 75 % des estrogènes globaux intratissulaires en préménopause et à 100 % en postménopause.

Trois classes enzymatiques sont impliquées dans le métabolisme des estrogènes dans le tissu mammaire : aromatasase, estrome sulfatase et l'estradiol  $17\beta$ -hydroxydéshydrogénase [93-95].

❖ **L'aromatasase** est un cytochrome p450-CYP19 qui aromatise de façon irréversible les stéroïdes C19 en C18 soit androsténédione en estrone, la testostérone en estradiol. Cette enzyme est présente majoritairement dans le stroma tissulaire normal ou péri-tumoral, comprenant plusieurs sources : les cellules stromales du tissu adipeux mammaires, certains macrophages activés [93, 96]. L'efficacité enzymatique de cette cytochrome P19 est variable en fonction d'un polymorphisme génétiquement transmis s'exprimant sur le plan individuel [97]. Des activités aberrantes ont été décrites dans les tissus pathologiques [98].

❖ **L'estrone sulfatase** : l'activité estrone sulfatase libère une molécule biologiquement active l'oestrone à partir d'un métabolite conjugué circulant, l'estrone sulfate. La sulfatation de l'estrone par l'enzyme sulfotransférase est un processus important dans le métabolisme et turnover des stéroïdes, car les métabolites sulfoconjugués représentent des formes physiologiques retard circulantes libérées in situ par l'estrone sulfatase tissulaire. L'activité estrone sulfatase dans les tissus mammaires est 10 à 100 fois supérieure à l'activité aromatasase [99, 100].

❖ **Hydroxystérol-déshydrogénases (HSD)**. L'activité  $17\beta$ -hydroxystérol déshydrogénase [93] fait partie de la famille des hydroxystérol-déshydrogénases (HSD) comportant également les activités :  $3\beta$ -HSD qui convertit la prégnénolone en progestérone, et la  $11\beta$ -HSD qui intervient dans le métabolisme des glucocorticoïdes. La  $17\beta$ -HSD a une activité réversible d'oxydoréduction de fonctions portées par les carbones C17, C18, C19 des stéroïdes. Il y a à ce jour sept types de  $17\beta$ -HSD. La  $17\beta$ -HSD type I est présente dans le stroma épithélium mammaire, de l'ovaire et du placenta et convertie E1 en E2. Dans le cancer du sein, l'activité

17 $\beta$ -HSD du tissu normal est très supérieure à celle observée dans le tissu tumoral. L'ensemble des molécules hormonales issues de ce métabolisme intervient dans la prolifération et fonction cellulaire via les voies des récepteurs nucléaires et les ensembles macromoléculaires qui les modulent.

### **Enzyme du métabolisme oxydatif des estrogènes**

En revanche, un aspect capital dans le tissu mammaire est la participation du **métabolisme oxydatif des estrogènes** à la carcinogenèse mammaire, et ce dans le cadre des interactions stroma-épithélium.

Les complexes moléculaires représentés par les CYPp450 impliqués dans le métabolisme oxydatif des estrogènes sont la source de radicaux libres et de métabolites intermédiaires réactifs qui causent directement un stress oxydatif cellulaire et des interactions directes avec les macromolécules dont l'ADN. Les interactions covalentes entre métabolites, réactifs et ADN sont des adduits source de mutations en cas de non-réparation ou réparation défectueuse lors de la duplication ou transcription de l'ADN.

Le métabolisme oxydatif pour l'estrone (E1) et l'estradiol (E2) est polymorphe en fonction des différentes CYP mises en jeu. Ainsi CYP 1A1 hydrolyse E1 E2 sur les carbones C2/C15-/C16-, CYP 1A1 les hydrolyse sur le carbone C2.

Les isoformes CYP1B hydrolysent en C4, CYP3A4 et 3A5 hydrolysent en C16- [93, 101]. Les estrogènes hydrolysés en C2, C4 sont des catéchol-estrogènes (CE) car le cycle A est identique à celui des catécholaminés. Ces catéchol-estrogènes sont susceptibles d'auto-oxydation spontanée rapide donnant des dérivés semi quinones et quinones ou peuvent être méthylés sous une forme inactive en 2 Me E2 ou 4 Me E2, en ce qui concerne E2 par catéchol-ométhyltransférase (COMT).

Il est à noter que les CYP, entre autre la CYP1B1, présente un polymorphisme génétiquement transmissible, polymorphisme portant sur l'acide aminé en position 119 qui soit une sérine soit une alanine [102].

Ce polymorphisme n'est pas silencieux, mais se traduit par des activités enzymatiques différentes. Ainsi la CYP1B1, ayant une alanine en 119, a une activité de base relative à 100 %, en revanche, l'isoforme CYP1B1 ayant une sérine en 119 a en comparaison une activité de 300 %.

Il en est de même pour les isoformes de la COMT pour l'acide aminé en position 158. La présence d'une méthionine en 158 se traduit par une activité réduite à un tiers de celle observée dans les isoformes ayant une valine en 158.

La transmission familiale des isoformes CYP1B1 et COMT définit des individus fortement métaboliseurs en catéchol-estrogène (4 OH-E2 ou 4CE), à savoir ceux porteurs de CYP1B1 (119 ser.) et/ou de faibles cataboliseurs, ceux porteurs de la COMT (158 met.).

La combinaison individuelle de ces deux isoformes isole **un groupe d'individus à haut risque métabolique** ayant un taux tissulaire de 4 OH-E2 le plus élevé. Le haut risque potentiel est la conséquence de l'autoxydation rapide des catéchol-estrogènes en semi quinone, quinone, ce qui produit des métabolites électrophyls, les catéchol-estrogènes quinone ou CEQ dont le 4 CE donnant les CE3-4 Q. Ces métabolites électrophyls sont capables d'interagir par liaison covalente avec les groupes nucléophyls de l'ADN, base purique pyrimidique par la réaction Michael dont le résultat est la formation d'adduits [103-109].



Ces adduits doivent être excisés et remplacés par des bases adéquates grâce aux complexes de réparation de l'ADN avant toute réplication ou transcription. Si cette excision-remplacement n'intervient pas correctement, ces adduits sont à l'origine de mutations qui peuvent intervenir dans la transformation cellulaire ou carcinogénèse, tumorigénèse.

Les taux intratissulaires de catéchol-estrogènes et en particulier 4 OH-E2 mais également 16 OH-E2 ont été corrélés dans plusieurs études avec une augmentation individuelle du risque de cancer du sein [110, 111].

À l'activation peroxydique des catéchol-estrogènes catalysée par les CYPp450 microsomiales, s'associe la production de superoxydes et de radicaux hydroxyles pouvant occasionner des dommages additionnels à l'ADN. Enfin, à cette voie métabolique existe deux actions synergiques : la production de radicaux oxydomitriques dans les tissus graisseux mammaires et l'activité lacto peroxydase présente dans la glande mammaire épithéliale et sécrétion lactée. Cette enzyme catalyse le métabolisme de E2 17β- en métabolite phénoxy avec production de métabolite superoxyde et hydrogène peroxydique, molécule impliquée dans le stress oxydatif cellulaire [112].

La prise en compte de ces interactions stroma-épithélium sur le plan du métabolisme et du mode d'action des estrogènes que nous avons précédemment décrit via ER et cofacteurs conduit à **un concept unifié de la carcinogénèse mammaire** [102-106].

Le métabolisme oxydatif des estrogènes conduit à des métabolites réactifs pouvant provoquer des mutations dans les cellules épithéliales mammaires quel que soit leur statut (ER+/ER-). En revanche, les estrogènes peuvent jouer un rôle de promoteur direct seulement dans les cellules épithéliales (ER+) mais un rôle promoteur indirect via les facteurs de croissance, cytokines sécrétées par l'épithélium et cellules stromales hormonosensibles qui vont stimuler, promouvoir les cellules épithéliales transformées ayant des récepteurs spécifiques à ces facteurs quel que soit leur statut (ER+/ER-) [107, 108].

Ce rôle a été mis en évidence dans des modèles expérimentaux avec induction par les estrogènes catéchol-estrogènes d'une instabilité microsatellitaire et accumulation de mutations [109-119], ensemble de lésions retrouvées en pathologie humaine [120-128].

La mise en évidence de l'importance du métabolisme oxydatif conduit, en plus de son expertise spécifique pour caractériser les individus à haut risque, à la recherche de molécules thérapeutiques ou de prévention dont l'impact serait une diminution non seulement de l'activité de CYP P19, mais plus spécifiquement des CYP 1B1, CYP 1A1, ou augmentation des activités catéchol-o-méthyltransférase (COMT) et quinone réductase [129].

Un point très particulier, mais important par son impact, est l'interférence des **phytoestrogènes** et **xénoestrogènes** [52, 130]. Ces molécules à potentiel estrogénique variable mais généralement faible peuvent se retrouver à des concentrations importantes dans l'alimentation ou certains environnements. Ces molécules ont par ailleurs de multiples points d'interférences : récepteurs des estrogènes, enzymes du métabolisme cellulaire, enzymes d'activation tels les kinases..

**Ces phyto- et xénoestrogènes** pourraient :

- avoir une influence dès la vie intra-utérine et dans la vie prépubertaire, par l'empreinte estrogénique qui pourrait modifier la réponse ultérieure aux facteurs de croissance [52] ;
- expliquer les variations de fréquence des cancers du sein associées à certaines alimentations ou conditions environnementales grâce à une action faible et complexe antiestrogénique ou

plus exactement modulatrice sélective des récepteurs (SRM), également inhibitrice d'activités enzymatiques. Sont concernés les enzymes du métabolisme des oestrogènes Les isoflavones et la génistéine en particulier (aromatase [CYP19]), les activités enzymatiques (tyrosine kinase) associées à l'activation des récepteurs aux facteurs de croissance et des voies de transduction du signal qui leur sont associées (par exemple, angiogenèse tissulaire et néo-angiogenèse pathologique) [52].

## Facteurs de croissance impliqués dans la régulation de la croissance épithéliale et les interactions stroma-épithélium

### *Facteurs de croissance impliqués dans la régulation de la croissance épithéliale*

De nombreux travaux démontrent que sous stimulation estrogénique, le compartiment stromal produit des facteurs tels le KGF (Keratinocyte Growth Factor ou FGF7) ou EGF, qui exercent par paracrine sur les cellules épithéliales, une induction de la croissance et de la différenciation. L'homéostasie glandulaire normale est maintenue par un équilibre entre sécrétion de facteurs stimulant la croissance, et facteurs contrôlant la prolifération cellulaire tels le TGF $\beta$ , facteur qui induit l'apoptose cellulaire via des récepteurs membranaires spécifiques. Le TGF $\beta$  est produit en grande partie par les cellules stromales musculaires lisses [131].

L'homéostasie tissulaire résulte d'un équilibre actif entre ces différents segments, prolifératifs, apoptotiques ou différenciés. L'administration d'estrogènes à des rats et souris immatures entraîne une croissance mammaire accélérée, mais qui ne dépasse pas la taille d'une glande mammaire adulte même si l'administration d'estrogènes est poursuivie. La castration induit l'apoptose de 90 % du total des cellules épithéliales et d'environ 40 % des cellules stromales. L'instauration, après castration, d'un traitement estrogénique provoque 24 heures plus tard une reprise de la synthèse d'ADN et de la prolifération cellulaire qui atteint un pic maximal après 2 à 3 jours pour revenir à un taux normal, même avec la poursuite des estrogènes.

Le rôle du TGF $\beta$ , facteur majeur de l'homéostasie tissulaire normale est complexe dans le cadre d'un développement d'un processus tumoral épithélial mammaire puisqu'il serait plutôt inhibiteur dans la phase initiale, mais pourrait agir plus tardivement comme promoteur [132]. C'est aussi un facteur de l'angiogenèse qui peut agir sur la néovascularisation, facteur essentiel de la croissance tumorale [133].

Par ailleurs, les actions synergétiques des estrogènes et de l'estradiol sur la composante stromale tissulaire, aboutissent à la production de facteurs de croissance tels le FGF2 (FGF basique), intervenant dans des boucles de contrôle autocrine et paracrine [134].

Le facteur KGF (ou FGF7) est sécrété par les fibroblastes du stroma sous régulation estrogénique et stimule par boucle paracrine la prolifération de cellules épithéliales et non celle des fibroblastes eux-mêmes [135]. Les cellules épithéliales expriment un récepteur membranaire spécifique du FGF7, le FGF récepteur R2, en revanche, les cellules stromales (fibroblastes) sont sensibles au FGF2 via le récepteur membranaire FGF R1 [51].

La prolifération de cellules épithéliales, mais également stromales, est rétro-contrôlée par le TGF $\beta$  sécrété par les cellules myofibroblastiques [137].

## Autres facteurs hormonaux intervenant dans la croissance épithéliale et interaction stroma-épithélium

Deux autres classes de facteurs interviennent dans la régulation de croissance de la composante épithéliale.


Les Insuline Growth Factor (IGF's) et leurs protéines de liaison et transport IGFBP's (binding protéine). Les IGF/IGFBP sont des facteurs d'interaction stroma épithélium, mais également des marqueurs intégrateurs du métabolisme énergétique global de l'individu.

Dans des modèles expérimentaux *in vitro/in vivo* l'IGF1 est mitogène pour les cellules de l'épithélium mammaire normal ou cancéreux. Dans un modèle murin de cancer hormonosensible, IGF1 est produit par les cellules stromales et exerce un effet régulateur de la croissance des cellules épithéliales [138]. En revanche, lors du développement du processus tumoral, une production épithéliale d'IGF1 est mise en jeu dans des boucles autocrines et paracrines touchant les cellules porteuses du récepteur membranaire spécifique (IGFR) à IGF1.

Plusieurs études ont rapporté une relation entre poids élevé à la naissance et taux IGF1 circulant élevé corrélé à une augmentation du risque relatif secondaire du cancer du sein, montrant l'importance de la période prénatale dans la régulation ultérieure du développement mammaire. Des travaux expérimentaux ont montré une protection secondaire vis-à-vis des cancers mammaires chimio induits par une alimentation ante- et périnatale riche en génistéine. Par ailleurs, sur le plan épidémiologique, plusieurs études ont porté sur la relation possible IGF/IGFBP et cancer du sein. Certaines études retrouvent une augmentation du risque relatif de l'ordre de 1,9 pour une augmentation de 60 ng/ml d'IGF1. Ce risque relatif est porté à 4,3 pour des taux d'IGF1 compris dans le quartile supérieur de la distribution des valeurs dans la population féminine pour une même tranche d'âge. Cependant, d'autres études ne retrouvent pas cette relation, IGF1/cancer.

Il est important de noter que les techniques de dosage entre autre IGF1 libre et IGF1 total, varient d'une équipe à l'autre et que ces facteurs sont très sensibles aux conditions de prélèvement et stockage des échantillons.

Comme nous le verrons plus tard, les protéines de liaison et transport des IGF (IGFBP) sont des prédicteurs indépendants de la progression de la maladie cancéreuse. Les IGFBP2 et IGFBP5 sont produites par les cellules épithéliales et l'IGFBP3 est la protéine majeure de transport sérique qui module le taux IGF1 libre [139, 140].

Un autre facteur important dans la différenciation et la régulation de croissance estrogénostimulée de l'épithélium mammaire est la vitamine D. La vitamine D participe à la différenciation de l'épithélium mammaire, régule négativement l'effet stimulant des estrogènes et interfère également dans la voie associée à l'IGF1. 

### Références bibliographiques

- [1] Jensen E.V., Jacobson HI, Smith S, Jungblut PW, De Sombre ERU. The use of estrogen antagonists in hormone receptor studies. *Hormones and antagonists. Gynec Invest* 1972;3:108-23.
- [2] McGuire WL. Steroid hormone receptors in breast cancer treatment strategy. In: *Recent progress in hormone research*. New York: Ed. R.O. Greep, Academic Press, 1980;30:135-58.
- [3] Heusson JC, Mattheiem WH, Longeval E, Deboel MC, Leclercq G. Clinical significance of the quantitative assessment of estrogen receptors in breast cancer. In: *Hormones and breast cancer*. Paris: M Namer, CM Lalanne ed., INSERM Pub, 1976;55:57-70.

- [4] McGuire WL. Hormone receptors; their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy. *Semin Oncol* 1978;5:428-33.
- [5] Nomura Y, Miura S, Koyama H, Enomoto K, Kasumi F, Yamamoto H, Kimura M, Tominaga T, Lino H, Morimoto T, Tashiro H. Relative effect of steroid hormone receptors on the prognosis of patients with operable breast cancer. *Cancer* 1992;69:153-64.
- [6] Raemaekers JMM, Beex IVAM, Pieters GFFM, Smals AGH, Benraad Th J, Kloppenborg PWC and the Breast Cancer Study Group. Progesterone receptor activity and relapse-free survival in patients with primary breast cancer: the role of adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res. Treat* 1987;9:191-9.
- [7] Spyrtos F, Hacene K, Tubiana-Hulin M, Pallud C, Brunet M. Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in primary infiltrating ductal breast cancer. A sequential multivariate analysis of 1262 patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989;25:1233-40.
- [8] Ravdin PM, Green S, Dorr TM, McGuire WL, Fabian C, Pugh RP et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of prospective. Southwest oncology group study. *J Clin Oncol* 1992;10:1284-91.
- [9] Gion M, Mione R, Pappagallo GL et al. PS2 in breast cancer – alternative or complementary tool to steroid receptor status? Evaluation of 446 cases. *Br J Cancer* 1993;68:374-9.
- [10] EORTC XIII: Steroid receptor distribution in 47892 breast cancers. A collaborative study of 7 European laboratories. Romain S, Lainé-Bidron C, Martin PM, Magdelenat H, on behalf of the EORTC Receptor Study group. *Europ J Cancer* 1995;31A:411-7.
- [11] EORTC XIV: Improvement of quality control for steroid receptor measurements: analysis of distribution in more than 40 000 primary breast cancers. Romain S, Spyrtos F, Goussard J, Formento JL, Magdelenat H, on behalf of French Study Group on Tissue and Molecular Biopathology. *Breast Cancer Treat* 1996 (in press).
- [12] Martin PM, Rolland PH, Jacquemier J, Rolland AM, Toga M. Multiple steroid receptors in human breast cancer. II/Estrogen and progestin receptors of 672 primary tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol* 1979;2:107-13.
- [13] Martin PM, Rolland PH, Jacquemier J, Rolland AM, Toga M. Multiple steroid receptors in human breast cancer. III/Relationships between steroid receptors and the state of differentiation and the activity of carcinomas throughout the pathologic features. *Cancer Chemother Pharmacol* 1979;2:115-20.
- [14] EORTC I: Standards for the assessment of estrogen receptors. Report of a workshop on September 29, 1972, at the Antoni Van Leeuwenhoek-Huis, Amsterdam. *Europ J Cancer* 1973;2:379-81.
- [15] EORTC II: Revision of the standards for the assessments of hormone receptors in human breast cancer; report of the second EORTC. Workshop, held on 16-17 March, 1979, in the Netherlands Cancer Institute. *Europ J Cancer* 1980.
- [16] EORTC III: Standardisation of steroid receptor assays in human breast cancer I) Reproducibility of estradiol and progesterone receptor assays. Koenders A., Thorpe S.M. (on behalf of the EORTC Receptor Group). *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983;19:1221-9.
- [17] EORTC IV: Standardisation of steroid receptor assays in human breast cancer. II) Samples with low receptor content. Thorpe S.M. (on behalf of the EORTC Receptor Group). *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983;19:1467-72.
- [18] EORTC V: Standardisation of steroid receptor assays in human breast cancer. III) Selection of reference material for intra- and inter-laboratory quality control. Thorpe SM, Koenders A. (on behalf of the EORTC Receptor Group). *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986;22:939-44.
- [19] EORTC VI: Standardisation of steroid receptor assays in human breast cancer. IV) Long-term within- and between-laboratory variation of estrogen and progesterone receptor assays. Koenders A, Thorpe SM. (on behalf of the EORTC Receptor Group). *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986;22:945-52.
- [20] EORTC VII: Impact of standardization of estrogen and progesterone receptor assays of breast cancer biopsies in Denmark. Thorpe SM, Pousen HS, Pedersen KO, Rose C. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;24:1263-9.
- [21] EORTC VIII: Comparison of ligand binding assay (LBA) and enzyme immunoassay (EIA) for assessment of the oestrogen receptor content of human breast cancer cytosols. Experience of the EORTC Receptor Group. Blackenstein M.A. (on behalf of the EORTC Receptor Group). *Br Cancer Res Treatm* 1990;17:91-8.
- [22] EORTC IX: Determination of estrogen receptors: application of the passing-bablok linear regression technique for comparison of enzyme immunoassay and radioligand binding assay in 1841 breast cancer tumours. Romain S, Dussert C, Martin PM. *Eur J Cancer* 1991;27:715-20.
- [23] EORTC X: Quality control of cathepsin-D measurement by the EORTC receptors study group. Benraad TJ, Geuts-Moespot A, Sala M, Piffanelli A, Ross A, Foekens JA (on behalf of the EORTC Receptor Group). *Eur J Cancer* 1992;28:72-5.
- [24] EORTC XI: Multilaboratory assessment of tissue prognostic factors in breast cancer: the EORTC receptor study group experience. Blackenstein M.A., Benraad T. JH. *Breast Cancer* 1992, Proceedings of the 1st International Breast Conference, London Regional Cancer Centre (18-19 Sept. 1992, London, Ontario), K.S. Tonkin and A.M. Smith Edit. Rodard Publis, Montreal 1992:58-64.
- [25] EORTC XII: Interlaboratory comparison of estrogen receptor data. Thorpe SM. *Eur J Cancer* 1994;30A:730-2.
- [26] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Systemic Treatment involving 31 000 recurrences and 24 000 deaths among 75 000 women. *The Lancet* 1992;339:1-15:71-85.
- [27] Brown M. Estrogen receptor molecular biology. *Breast Cancer* 1994;8:101-12.
- [28] Clarke R, Dickson RB, Lippman ME. Hormonal aspects of breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 1992;12:1-23.

- [29] Osborne CK. Receptors. In: "Breast Diseases" Harris JR eds., Lippincott JB. Philadelphia 1991:301-25.
- [30] Ravclin PM, Green S, Dorr TM et al. Prognostic significance of progesterone levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology group study. *J Clin Oncol* 1992;10:1284-92.
- [31] Leclercq G, Bojar M, Goussard J et al. Abbott monoclonal enzyme immunoassay measurement of estrogen receptors in human breast cancer: a European multicenter study. *Cancer Res* 1986;(46):42335-405.
- [32] Allred DC. Should immunohistochemical examination replace biochemical hormone receptor assays in breast cancer? *Am J Clin Pathol* 1993;99:1-2.
- [33] Bakin R.E., et al., Constitutive activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway promotes androgen hypersensitivity in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 2003;63(8):1981-9.
- [34] Charpin C, Martin PM, De Victor B, Lavant MN, Mabib MC, Andrac L, Toga M. Multiparametric study (samba 200) of estrogen receptor immunocytochemical assay in 400 human breast carcinomas: analysis of estrogen receptor distribution heterogeneity in tissues and correlations with dextran coated charcoal assays and morphological data. *Cancer Res* 1998; 48):1578-86.
- [35] Blanco G, Holli K, Heikkinen M, Kallioniemi OP, Taskinen P. Prognostic factors in recurrent breast cancer : relationship to site of recurrence, disease-free interval, female sex steroid receptors, ploidy and histological malignancy grading. *Br J Cancer* 1990;62(1):142-6.
- [36] Sheikh MS, Garcia M, Pujol P, Fontana JA, Rochefort M. Why are estrogen receptor negative cancers more aggressive than the estrogen receptor positive breast cancer? *Invasion Metastasis* 1994;14:329-36.
- [37] Klijn JGM, Berns EMJJ, Foekens JA. Prognostic and Predictive Factors and Targets for Therapy in Breast Cancer. Dr Daniel den Hoed Cancer Center and Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands. In 'Breast Cancer: Prognostic Treatment and Prevention, edited by Jorge R. Pasqualini, Marcel Dekker inc 2002:93-124.
- [38] Romain S, Chinot O, Guirou O, Soullière M, Martin PM. Biological heterogeneity of ER-positive breast cancers in the post-menopausal population *Int J Cancer* 1994;59:17-9.
- [39] Rose C, Thorpe SM, Andersen KW (on behalf the Danish Breast Cancer Cooperative Group). Beneficial effect of adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients with high oestrogen receptor values. *Lancet* 1985:16-20.
- [40] Thorpe SM, Christensen IbJ, Rasmussen BB, Rose C. Short recurrence-free survival associated with high estrogen receptor levels in the natural history of postmenopausal, primary breast cancer. *Eur J Cancer* 1993;29A:971-7.
- [41] Meyer JS, Wittliff JL. Regional heterogeneity in breast carcinoma : thymidine labelling index, steroid hormone receptors, DNAPloidy.
- [42] Sparato VS, Price K, Glodhirsh A et al. For the International Breast Cancer Study Group. Sequential estrogen receptor determinations from primary breast cancer ant at relapse: prognostic and therapeutic relevance. *Ann Oncol* 1992;3:733-40.
- [43] Cheung KL, Nicholson RI, Blamey RW, Robertson JF. Selection of primary breast cancer patients for adjuvant endocrine therapy – is oestrogen receptor alone adequate? *Breast Cancer Res Treat* 2001; 65(2):155-62.
- [44] Barrack ER, Coffey DS. The specific binding of estrogens and androgens to the nuclear matrix of sex hormone responsive tissues. *J Biol Chem* 1980;255(15):7265-75.
- [45] Barrack ER. Steroid hormone receptor localization in the nuclear matrix: interaction with acceptor sites. *J Steroid Biochem* 1987;27(1-3):115-21.
- [46] Sheridan JP, Buchanan JM, Anselmo VC, Martin PM. Equilibrium: the intra-cellular distribution of steroid receptors. *Nature* 1979;282:579-82.
- [47] Edward D, Martin PM, Horwitz K, Chamness GC, Mc Guire WL. Subcellular compartmentalization of estrogen receptors in human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 1980;127:197-213.
- [48] Sheridan PJ, Buchanan JM, Anselmo VC, Martin PM. Unbound progesterone receptors are in equilibrium between the nucleus and cytoplasm in cells of the rat uterus. *Endocrinol* 1981;108:1533-17.
- [49] Martin PM, Sheridan PJ. Towards a new model for mechanism of action of steroids. *J Steroid Biochem* 1982; 16:215-30.
- [50] Sheridan PJ, Martin PM. Autoradiographic localization of steroid hormone receptor. In *Steroid Hormone Receptors*, Ed. Clark CR, Horwood E. Publishers (RFA) 1986;8:188-211.
- [51] Martin PM, Berthois Y, Jensen E.V. Binding of antiestrogens exposes an occult antigenic determinant in the human estrogen receptor. *PNAS* 1988;85:2533-7.
- [52] Martin PM. Phyto-estrogènes: actions biologiques/application en clinique humaine. *Références en Gynécologie Obstétrique* 2001;5:345-53.
- [53] Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 2000;65:227-51.
- [54] Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogens Receptors-an overview. *J Intern Med* 1999;246(2):133-8. Review.
- [55] Osborne CK, Zhao H, Fuqua SA. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J Clin Oncol* 2000;18(17):3172-86. Review.
- [56] Smith CL, O'Malley BWY. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocrine Reviews* 2004;25:45-71.

- [57] White R, Lees JA, Needham M, Ham J, Parker M. Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1987;1:735-44.
- [58] Tamrazi A, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. Molecular sensors of estrogen receptor conformations and dynamics. *Mol Endocrinol* 2003;17(12):2593-602.
- [59] Rosen EM, Fan S, Ma Y. BRCA1 and ER. Abstracts MS3-4.
- [60] Krasnickas Keeton E, Brown M. Coregulator expression and breast cancer: improving the predictive power of estrogen receptor alpha. *Clin Cancer Res* 2003;9(4):1229-30.
- [61] Girault I, Lerebours F, Amarir S, Tozlu S, Tubiana-Hulin M, Lidereau R, Bieche I. Expression analysis of estrogen receptor alpha coregulators in breast carcinoma: evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen. *Clin Cancer Res* 2003;9(4):1259-66.
- [62] Hewitt SC, Deroo BJ, Hansen K, Collins J, Grissom S, Afshari CA, Korach KS. Estrogen receptor-dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen. *Mol Endocrinol* 2003; 17(10):2070-83.
- [63] Frasier J, Stossi F, Danes JM, Komm B, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Selective estrogen receptor modulators: discrimination of agonistic versus antagonistic activities by gene expression profiling in breast cancer cells. *Cancer Res* 2004;15;64(4):1522-33.
- [64] Iannone MA, Simmons CA, Kadwell SH, Svoboda DL, Vanderwall DE, Deng SJ, Consler TG, Shearin J, Gray JG, Pearce KH. Correlation between in vitro peptide binding profiles and cellular activities for estrogen receptor-modulating compounds. *Mol Endocrinol* 2004;18(5):1064-81.
- [65] Hayashi SI. Prediction of hormone sensitivity by DNAmicroarray. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004;58(1):1-9.
- [66] McGuire WL, Chamness GC, Fuqua S. Abnormal estrogen receptor in clinical breast cancer. *Eur J Cancer* 1992;28:309-10.
- [67] Fuqua S.A.W. Estrogen and progesterone receptors and breast cancer. In: *Diseases of the breast*. Ed. J.R. Harris, M.E. Lippman, M. Morrow, S. Hellman, Lippincott Raven 1996:261-71.
- [68] Fuqua SAW, Wolf DW. Molecular aspect of estrogen receptor variants in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1995;35:233-41.
- [69] Pfeiffer U, Fecarotta E, Vidali G. Coexpression of multiple estrogen receptor variant messenger RNAs in normal and neoplastic breast tissues and in MCF7 cells. *Cancer Res* 1995;55:2158-65.
- [70] Zheng SL, Zheng W, Chang BL, Shu XO, Cai Q, Yu H, Dai Q, Xu J, Gao YT. Joint effect of estrogen receptor beta sequence variants and endogenous estrogen exposure on breast cancer risk in Chinese women. *Cancer Res* 2003; 63(22):7624-9.
- [71] Palmieri C, Lam EW, Mansi J, MacDonald C, Shousha S, Madden P, Omoto Y, Sunter A, Warner M, Gustafsson JA, Coombes RC. The expression of ER beta cx in human breast cancer and the relationship to endocrine therapy and survival. *Clin Cancer Res* 2004;10(7):2421-8.
- [72] Ramsey TL, Risinger KE, Jernigan SC, Mattingly KA, Klinge CM. Estrogen receptor beta isoforms exhibit differences in ligand-activated transcriptional activity in an estrogen response element sequence-dependent manner. *Endocrinology* 2004;145(1):149-60.
- [74] Liu D, Zhang Z, Gladwell W, Teng CT. Estrogen stimulates estrogen-related receptor alpha gene expression through conserved hormone response elements. *Endocrinology* 2003;144(II):4894-904.
- [75] Sanyal S, Matthews J, Bouton D, Kim HJ, Choi HS, Treuter E, Gustafsson JA. Deoxyribonucleic acid response element-dependent regulation of transcription by orphan nuclear receptor estrogen receptor-related receptor gamma. *Mol Endocrinol* 2004;18(2):312-25.
- [76] Lichtner RB. Estrogen/EGF receptor interactions in breast cancer: rationale for new therapeutic combination strategies. *Biomed Pharmacother* 2003;57(10):447-51.
- [76] Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res* 2004;10(1 Pt 2):331S-6S.
- [77] Hoffman GE, Zup SL. Good Versus Evil: Changing the Approach to Hormone Replacement Therapy. *Endocrinology* 2003;144:4698-9.
- [78] Lange CA. Making Sense of Cross-Talk between Steroid Hormone Receptors and Intracellular Signaling Pathways: Who Will Have the Last Word? *Mol Endocrinol* 2004;18:269-78.
- [79] Barrack ER, Coffey DS. The specific binding of estrogens and androgens to the nuclear matrix of sex hormone responsive tissues. *J Biol Chem* 1980;255(15):7265-75.
- [80] Barrack ER. Steroid hormone receptor localization in the nuclear matrix: interaction with acceptor sites. *J Steroid Biochem* 1987;27(1-3): 115-21.
- [81] Wilson EM, Colvard DS. Factors that influence the interaction of androgen receptors with nuclei and nuclear matrix. *Ann NY Acad Sci* 1984;438:85-100.
- [82] Getzenberg RH, Pienta KJ, Coffey DS. The tissue matrix: cell dynamics and hormone action. *Endocr Rev* 1990;11(3):399-417.
- [83] Dutertre M, Smith CL. Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor-alpha: regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains. *Mol Endocrinol* 2003;17(7):1296-314.
- [84] Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, Dowsey SJ. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* 1998;58:3974-85.

- [85] Pietras R.J, Szego CM. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 1977;265(5589):69-72.
- [86] Berthois Y, Pourreau-Schneider N, Gandilhon P, Mittre H, Tubiana N, Martin PM. Estradiol membrane binding sites on human breast cancer cell lines. 1/Use of a fluorescent estradiol conjugate to demonstrate plasma membrane binding system. *J Steroid Biochem* 1986;25:963-72.
- [87] Pourreau-Schneider N, Berthois Y, Gandilhon P, Cau P, Martin PM. Early alterations at line plasma membrane of breast cancer target cells in response to estradiol and hydroxytamoxifen. *Molecular and Cellular Endocrinol* 1986;48:77-88.
- [88] Simoncini T, Genazzani AR. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* 2003;148(3):281-92.
- [89] Kousteni S et al. Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science* 2002;298(5594):843-6.
- [90] Xu Y, Traystman RJ, Hurn PD, Wang MM. Membrane Restraint of Estrogen Receptor Enhances Estrogen-Dependent Nuclear Localization and Genomic Function. *Mol. Endocrinol* 2004;18:86-96.
- [91] Russo J, Russo IM. The Breast as a developing organ. In: *Molecular Basis of Breast Cancer. Prevention and treatment*. Ed Springer 2004:11-8.
- [92] Russo J, Russo IM. The Breast as a developing organ. In: *Molecular Basis of Breast Cancer. Prevention and treatment*. Ed Springer 2004:49-88.
- [93] Hu Y-F, Russo IH, Russo J. Estrogen and Human Breast Cancer. In: *Endocrine disruptors (M. Matzler Ed.)*. Springer Verlag, heidelberg 2001:1-26.
- [94] van Landeghem AAJ, Poortman J, Nabuurs M, Thijssen JHH. Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res* 1985;45:2900-6.
- [95] Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Rev* 1994;15:342-55.
- [96] Sasano H, Ozaki M. Aromatase expression and its localization in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997;61:293-8.
- [97] Dowsett M. Future uses for aromatase inhibitors in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997;61:262-6.
- [98] Miller WR, O'Neill J. The importance of local synthesis of estrogen within the breast. *Steroids* 1997;50:537-48.
- [99] Pasqualini JR, Chetrite G, Nguyen BL, Maloche C, Talbi M, Blacker C, Botella J, Paris J. Estrogene sulfate-sulfatase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities: e hypothesis for their role in the evolution of human breast cancer from hormone-dependence to hormone-independence. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;53:407-12.
- [100] Utsumi T, Yoshimura N, Takeuchi D, Ando J, Maruta M, Maeda K, Harada N. Steroid sulfatase expression is an independent predictor of recurrence in human breast cancer. *Cancer Res* 1999;59:377-81.
- [101] Parl FF. Estrogen Action. In: *Estrogens, Estrogen Receptor and Breast Cancer* 1999:11-34.
- [102] Parl FF. Estrogens, Estrogen Receptor and Breast Cancer – a Unified Model. In: *Estrogens, Estrogen Receptor and Breast Cancer* 1999:243-8.
- [103] Khan SA, Rogers MA, Khurana KK, Meguid MM, Numann PJ. Estrogen receptor expression in benign breast epithelium and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:37-42.
- [104] Li JJ, Li SA. Estrogen carcinogenesis in Syrian hamster tissue : role of metabolism. *Fed Proc* 1987;46:1858-63.
- [105] Furth J. Hormones as etiological agents in neoplasia. In: Becker FF (ed) *Cancer. AComprehensive Treatise. 1. Etiology: Chemical and Physical Carcinogenesis*. Plenum Press, New York 1982;4:89-134.
- [106] Chakravarti D, Pelling DC, Cacalieri E, Roan EG. Relating aromatic hydrocarbon-induced DNAadducts and c-Havey-ras mutations in mouse skin papillomas: the role of apurinic sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10422-6.
- [107] Cavalieri EL, Rogan EG. The approach to under-standing aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacol The.* 1992;55:183-99.
- [108] Cavalieri EL, Rogan EG. Mechanisms of tumor initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons in mammals. In: *The handbook of Environmental Chemistry: PAHs and Related Compounds (Neilson, A.H., Ed)* 1988;3J:81-117, Springer, Heidelberg, Germany.
- [109] Cavalieri E, Frenkel K, Liehr JG, Rogan E, Roy D. Estrogens as endogenous genotoxic agents-DNAadducts and mutations. *JNatl Cancer Inst Monograph* 2000;27:75-93.
- [110] Osborne MP, Bradlow HL, Wong GYC, Telang NTU. Up-regulation of estradiol C16 alpha-hydroxylation in human breast tissue: a potential biomarker of breast cancer risk. *Natl Cancer Inst* 1993;85:1917-20.
- [111] Sipe HJ, Jordan SJ, Hanna PM, Mason RP. The metabolism of 17 beta-estradiol by lactoperoxidase: a possible soue of oxidative stress in breast cancer. *Carcinogenesis* 1994;15:37-43.
- [112] Malins DC, Holmes EH, Polissar NL, Gunselman SJ. The etiology of breast cancer. Characteristic alteration in hydroxyl radical-induced DNAbase lesions during oncogenesis with potential for evaluating incidence risk. *Cancer* 1993;71:3036-43.
- [113] Liehr JG. Genotoxicity of estrogens: a role in cancer development? *Human reproduction Update* 2001;7:1-9.
- [114] Rajah TT, Pento JT. The mutagenic potential of anti estrogens at the HPRTlocus in V79 cells. *Res Comm Molecul Pathol & Pharmacol* 1995;89:85-92.
- [115] Kong L-Y, Szaniszló P, Albrecht T, Liehr JG. Frequency and molecular analysis of HPRTmutations induced by estradiol in Chinese hamster V79 cells. *Intl J Oncol* 2000;17:1141-9.

- [116] Russo J, Hu YF, Tahin Q, Mihaila D, Slater C, Lareef MH, Russo IH. Carcinogenicity of estrogens in human breast epithelial cells. *Acta Pathologica, Microbiologica Immunologica Scandinavica (APMIS)* 2001;109:39-52.
- [117] Thibodeau PA, Bissonnette N, Bedard SK et al. Induction by estrogens of methotrexate resistance in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 1998;19:1545-52.
- [118] Hodgson AV, Ayala-Torres S, Thompson EB, Liehr JG. Estrogen-induced microsatellite DNA alterations are associated with Syrian hamster kidney tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1988;19:2169-72.
- [119] Loeb LA. Amutator phenotype in cancer. *Perspec In Can Res* 2001;61:3230-9.
- [120] Boyd J, Takahashi H, Waggoner SE, Jones LA, Hajek RA, Wharton JT, Liu FS, Fujino T, McLachlan JA. Molecular genetics analysis of clear cell adenocarcinomas of the vagina associated and unassociated with diethylstilbestrol exposure in utero. *Cancer* 1996;77:507-13.
- [121] Richard SM, Bailliet G, Paez GL, Bianchi MS, Peltomaki P, Bianchi NO. Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer. *Cancer Res* 2000;60:4231-7.
- [122] Forgacs E, Wren JD, Kamibayashi C, Kondo M, Xu XL, Markowitz S, Tomlinson GE, Muller CY, GazdarAF, Garner HR, Minna JD. Searching for microsatellite mutations in coding regions in lung, breast, ovarian and colorectal cancers. *Oncogene* 2001;20:1005-9.
- [123] Piao Z, Lee KS, Kim H, Perucho M, Malkhosyan S. Identification of novel deletion regions of chromosome arms 2q and 6p in breast carcinomas by amplotype analysis. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2001;30:13-22.
- [124] Caldes T, Perez-Segura P, Tosar A, de La Hoya M, Diaz-Rubio E. Microsatellite instability correlates with negative expression of estrogen and progesterone receptors in sporadic breast cancer. *Teratogenesis, Carcinogenesis & Mutagenesis* 2000;20:283-91.
- [125] Miyazaki M, Tamaki Y, Sakita I, Fujiwara Y, Kodta M, Masuda N, Ooka M et al. Detection of microsatellite alterations in nipple discharge accompanied by breast cancer. *Breast Cancer Research & Treatment* 2000;60:35-41.
- [126] Ando Y, Iwase H, Ichihara S, Toyoshima D, Nakamura T, Yamashita H et al. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Letters* 2000;156:207-14.
- [127] Tokunaga E, Oki E, Oda S, Kataoka A, Kitamura K, Ohno S, Maehara Y, Sugimachi K. Frequency of microsatellite instability in breast cancer determined by high-resolution fluorescent microsatellite analysis. *Oncology* 2000;59:44-9.
- [128] Shaw JA, Smith BM, Walsh T, Johnson S, Promrose L, Slade MJ, Walker RA, Coombes RC. Microsatellite alteration plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 2000;6:1119-24.
- [129] Badawi AF, Devanesan PD, Edney JA, West WW, Higginbotham S, Rogan EG, Cavalieri EL. Estrogen metabolites and conjugates: Biomarkers of susceptibility to human breast cancer. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2001;42:664.
- [130] Martin PM, Horwitz KB, Ryan DS, Mc Guire WL. Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinol* 1978;103:1860-7.
- [131] Kim IY et al. Expression and localization of transforming growth factor-beta receptors type I and type II in the rat ventral prostate during regression. *Mol Endocrinol* 1996;10(1): 107-15.
- [132] Derynck R, Akhurst R, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001;29:117-29.
- [133] Coffey D. The molecular biology of the prostate. In: Prostate diseases. Philadelphia: H. Lepor, R. Lawson Eds. WB. Saunders Cie 1993:28-56.
- [134] Sherwood E et al. Basic fibroblast growth factor: a potential mediator of stromal growth in the human prostate. *Endocrinology* 1992;130:2955-63.
- [135] Sugimura Y et al. Keratinocyte growth factor (KGF) is a mediator of testosterone induced prostatic development. *J Urol* 1994;151:381(abstract 616).
- [136] Miki T et al. Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(1):246-50.
- [137] Kyprianou N, Isaacs J. Expression of transforming growth factor-beta in the rat ventral prostate during castration-induced programmed cell death. *Mol Endocrinol* 1989;3:1515-22.
- [138] Wang Y, Wong Y. Sex hormone-induced prostatic carcinogenesis in the noble rat: the role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the development of prostate cancer. *Prostate* 1998;35(3):165-77.
- [139] Baxter R. Signaling pathways involved in antiproliferative effects of IGFBP-3: a review. *Mol Pathol* 2001;54(3): 145-8.
- [140] Shariat SF et al., Association of preoperative plasma levels of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding proteins-2 and -3 with prostate cancer invasion, progression, and metastasis. *J Clin Oncol* 2002;20(3):833-41.