



Les progestatifs en cancérologie mammaire Isoformes du récepteur de la progestérone : rôle dans la cancérogenèse mammaire

Progesterone receptor isoforms: role in breast cancer

Mots-clés : Progestatifs - Estrogènes - Cellules mammaires.

Keywords: *Progestin - Estrogens - Mammary cells.*

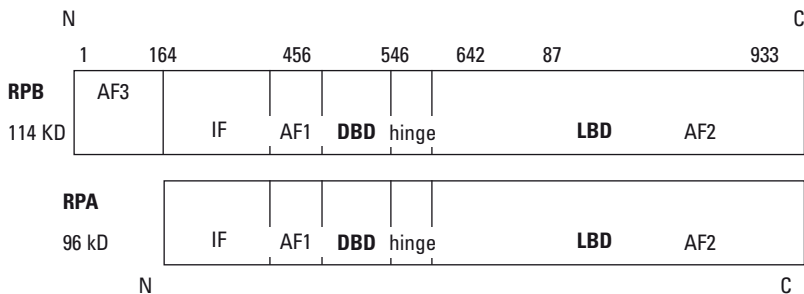
A. Gompel*, **, P. Forgez**, A. Courtin**

Le rôle de la progestérone et des progestatifs dans le cancer du sein reste incomplètement compris. Ce sont des hormones auxquelles est exposée la glande mammaire pendant de longues années (progestérone endogène, contraceptifs oraux et traitements de ménopause). L'action des progestatifs de synthèse et de la progestérone semble être différente lorsqu'ils sont employés dans le traitement substitutif de ménopause puisqu'il apparaît dans une étude d'observation française que l'association estradiol et progestérone n'augmenterait pas le risque de cancer du sein, contrairement à l'estradiol combiné avec des progestatifs de synthèse (cohorte E3N) [1]. Les raisons de ces différences ne sont pas encore comprises.

La progestérone agit par l'intermédiaire de son récepteur (PR), dont il existe deux isoformes (PRA/B), transcrites à partir de deux promoteurs différents d'un même gène. Le taux global niveau d'expression des PR est un élément connu de pronostic du cancer du sein mais le rôle des isoformes est mal connu, notamment du fait que les modèles pertinents sont difficiles à obtenir. Elles sont transcrites à partir de deux promoteurs d'un gène commun (promoteur B de -711 à +31 et le promoteur A de +464 à +1105) [2] et diffèrent dans leur structure du côté N-terminal d'une longueur de 164 acides aminés, la forme B étant la plus longue.

* Unité de gynécologie, Hôtel-Dieu, Paris.

** INSERM U 673, hôpital Saint-Antoine, Paris.



La forme B contient trois zones d'activation de la transcription (AF1, AF2, AF3), ce qui expliquerait qu'elle soit la plus active dans le contrôle de la transcription ; la troisième zone d'activation (AF3) lèverait l'inhibition de la région IF (zone d'inhibition de la transcription) ; la forme A a été longtemps considérée comme un dominant négatif de B dans des conditions de transfections transitoires notamment, et capable de réprimer la transcription de la plupart des d'autres récepteurs des hormones stéroïdes (gluco-, minéralocorticoïdes, androgènes) [3]. L'activité transcriptionnelle de B s'exercerait sur tous les gènes contenant des éléments de réponse à la progestérone alors que celle de A serait plus spécifique de la cellule et dépendante des éléments de réponse à la progestérone (PRE) [4]. Il est donc vraisemblable que les protéines du complexe de transcription, coactivateurs et corépresseurs puissent être impliquées dans des réponses différentes aux deux isoformes. Cela a été observé dans le cas de molécules antagonistes des progestatifs où des coactivateurs pouvaient transformer un ligand antagoniste en agoniste mais cela pour des activités transcriptionnelles de PRB et non PRA.

Des travaux plus récents tendent à montrer qu'il existe des gènes cibles spécifiques de A et de B et certains communs mais que l'isoforme A n'est pas seulement un dominant négatif de B. Deux publications utilisant des modèles différents ont montré qu'à court et à long termes, des gènes étaient induits ou inhibés suggérant des modes d'action directe et indirecte. Ces études ont été menées dans des cellules de lignées continues de cancer du sein, contenant soit une expression unique de PRA ou PRB [5, 6], soit une expression équivalente, puis prédominante de A/B [7]. Dans ces dernières conditions, il apparaît qu'une augmentation de 2 à 4 fois de ce ratio modifie peu le profil d'expression obtenu à court terme suggérant qu'il faut une grande distorsion du rapport pour éventuellement observer des effets différents des deux formes. Le contrôle de la transcription semblait beaucoup plus dépendant du taux de PR que du ratio des isoformes [7]. En particulier, il n'a pas été observé d'effet dominant négatif de PRA.

Ratio des isoformes

Dans la plupart des modèles, les deux isoformes coexistent dans les mêmes cellules et leur ratio est de 1 [8]. Dans certaines circonstances, cependant, la forme A prédo-

mine, comme dans le stroma endométrial humain et la glande mammaire de souris. La coexistence des deux isoformes en quantité égale dans les tissus humains suggère que la présence des deux isoformes est nécessaire pour un contrôle harmonieux de l'action de la progestérone. Les isoformes agissent sous forme d'hétérodimères et d'homodimères, ce qui pourrait également rendre compte d'effets biologiques différents selon le ratio des isoformes et la prédominance d'homo- ou d'hétérodimères, mais il y a peu de données.

Le rôle respectif des isoformes dans la glande mammaire a été étudié à l'aide de différents modèles.

Souris transgéniques et souris invalidées

Chez les souris transgéniques pour A, une hyperplasie galactophorique avec des galactophores très ramifiés est observée, et pour B, un développement exubérant des lobules et un arrêt du développement galactophorique. Dans les souris invalidées pour A, le développement lobulo-alvéolaire est normal ; dans les souris invalidées pour B, il existe une diminution des ramifications galactophoriques et une différenciation alvéolaire diminuée pendant la grossesse [9, 10]. Ces travaux montrent que chaque forme exerce un rôle différent mais sans doute complémentaire et que l'expression unique d'une des isoformes ne permet pas le développement harmonieux et complet des différents tissus.

Des lignées de cancer du sein modifiées pour étudier le rôle du ratio

Les cellules de cancer du sein T47-D contiennent un ratio PRA/PRB égal à 1. Le groupe de K. Horwitz a obtenu des clones dépourvus de PR, des transfections stables exprimant PRA ou PRB de manière constitutive et des clones comportant des PRA ou des PRB inductibles dans chacun des clones précédents [6]. Le groupe de C. Clarke a obtenu des clones de T47-D contenant un PRA inductible par l'IPTG à un niveau de 2 à 4 fois supérieur à PRB [11]. En utilisant ces lignées, il apparaît qu'une augmentation de A diminue l'adhésion cellulaire [11]. Dans cette étude, il apparaît que l'augmentation du rapport A/B induit des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire, et la forme des cellules [7, 11] est responsable d'un phénotype plus agressif [5] et de la migration des cellules dans des fibroblastes de moelle osseuse [12]. En revanche, l'induction du VEGF est dépendante de B [13], le phénotype des lignées (A ou B exclusives) implantées dans la souris nue est plus agressif pour les clones B [14].

Des tumeurs du sein

Le ratio A/B peut être rompu au cours de la cancérogenèse. La disruption du rapport A/B dans le cancer du sein a d'abord été décrite par le groupe de C. Clarke, qui a utilisé une technique de double marquage avec des anticorps qui se sont révélés spécifiques de chacune des isoformes en immunohistochimie. Il semble que ce puisse être un phénomène précoce puisqu'une disruption du rapport A/B est observée dans le tissu normal des patientes porteuses d'une mutation *BRCA1/2* [15] et dans les hyperplasies mammai-

res, lésions précancéreuses [16]. Dans le tissu normal des patientes porteuses de mutation, il existe aussi une perte du contrôle normal de l'effet estrogénique. Il semble en effet que le produit du gène *BRCA-1* soit un régulateur de ER et diminue l'action transcriptionnelle de PR [17]. L'inactivation de *BRCA-1* est responsable d'un effet prolifératif de la progestérone dans la glande mammaire de souris [17]. De plus, chez les patientes BRCA, l'induction par l'estradiol de PR est moins puissante que normalement [18]. La prédominance d'une des deux isoformes comme facteur de pronostic a été décrite dans les cancers endométriaux (forme A, [19, 20], et ovariens (forme B) [21]). La transfection de l'isoforme B plus que A dans des adénocarcinomes endométriaux restaure une sensibilité à la progestérone [22] et un effet antiprolifératif des progestatifs. Dans le cancer du sein, en utilisant une technique de western-blots à partir de tumeurs primitives du sein, le groupe de K. Horwitz a observé une disruption du rapport A/B dans 50 % des tumeurs et l'existence possible d'un lien entre la résistance au tamoxifène et l'augmentation de l'expression de A/B [23]. En collaboration avec l'équipe de C. Clarke, en utilisant la technique de quantification en double marquage avec des anticorps reconnaissant A ou B, nous avons observé qu'il existait une disruption du rapport A/B dans 50 % environ des tumeurs, plus souvent A>B que B>A, que l'expression de PRA>B était prédominante dans les cancers de grade 3, et que le pronostic des tumeurs N+ était différent en fonction de la prédominance de l'une ou de l'autre isoforme (Mote, Gompel et al., manuscrit soumis). Il existe aussi un lien entre l'expression préférentielle de B et le traitement de ménopause (manuscrit soumis).

Régulation d'expression

Il existe différents sites de régulation des isoformes PRA et B par l'estradiol dans les deux promoteurs : un site ERE/Sp1 dans le promoteur de l'isoforme A, un site AP-1 entre les deux promoteurs, et deux sites Sp1 dans le promoteur B [24].

In vitro, dans les T-47D, l'estradiol induit préférentiellement l'expression de B [25] ; pendant le cycle menstruel, il ne semble pas exister de variation drastique du ratio A/B dans le sein humain [16]. Il n'y a pas d'information sur l'effet des autres stéroïdes sur le ratio des deux isoformes. Nos résultats préliminaires montrent que les différentes molécules de progestatifs ont des effets un peu différents sur le niveau d'expression des isoformes mais pas très différents sur leur ratio.

Influence des progestatifs sur le profil d'expression génique

Une publication a rapporté les profils dans les T47-D traitées par différents progestatifs. Il existe un certain nombre de gènes *up* ou *down* régulés. La conclusion de ces auteurs est qu'il ne semble pas exister de gènes spécifiques de différents progestatifs [26]. Ces expériences ont été réalisées dans un milieu sans estradiol dans des cellules très riches en PR pendant 12 heures. De plus, il existe quelques gènes, peu nombreux,

qui sont régulés par la progestérone et non par d'autres molécules ; il paraît important de travailler à court et à plus long termes et dans des conditions plus proches des situations cliniques. Il serait intéressant de travailler davantage sur les différences de profils obtenus avec la progestérone contre les progestatifs de synthèse.

Conclusion

Le rôle des isoformes du récepteur de la progestérone dans l'eutrophie mammaire commence seulement à être décrit. Il apparaît qu'une distorsion du rapport des deux isoformes est observée dans environ 50 % des cancers du sein et que cela est ou bien le stigmate ou bien la cause d'une biologie particulière des tumeurs. Il reste à en comprendre la genèse. Cela permettrait de mieux cerner les indications thérapeutiques des cancers du sein ainsi que de disposer de ligands mieux adaptés à l'eutrophie mammaire.

Références bibliographiques

- [1] Fournier A, Berrino F, Riboli E et al. Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. *Int J Cancer* 2005;114:448-54.
- [2] P. Kastner, A. Krust, B. Turcotte et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990;9:1603-14.
- [3] Vegeto E, Shabaz MM, Wen DX et al. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 1993;7:1244-55.
- [4] Wen DX, Xu Y-F, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol* 1994;14:8356-64.
- [5] Jacobsen BM, Richer JK, Schittone SA et al. New human breast cancer cells to study progesterone receptor isoform ratio effects and ligand-independent gene regulation. *J Biol Chem* 2002;277:27793-800.
- [6] Jacobsen BM, Schittone SA, Richer JK et al. Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology. *Mol Endocrinol* 2005;19:574-87.
- [7] Graham D, Yager ML, Hill HD et al. Altered progesterone receptor isoform expression remodels progesterin responsiveness of breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* 2005;19:2713-35.
- [8] Mote PA, Balleine RL, McGowan EM et al. Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2963-71.
- [9] Mulac-Jericevic B, Lydon JB, De Mayo FJ et al. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9744-9.
- [10] Shyamala G, Yang X, Silberstein G et al. Transgenic mice carrying an imbalance in the native ratio of A to B forms of progesterone receptor exhibit developmental abnormalities in mammary glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:696-701.
- [11] McGowan EM, Clarke CL. Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progesterin sensitive endpoints in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1999;13:1657-71.

- [12] McGowan EM, Saad S, Bendall LJ et al. Effect of progesterone receptor A predominance on breast cancer cell migration into bone marrow fibroblasts. *Breast Cancer Res Treat* 2004;83:211-20.
- [13] Wu J, Richer J, Horwitz K et al. Progesterin-dependent induction of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells: Preferential regulation by progesterone receptor B. *Cancer Res* 2004;64:2238-44.
- [14] Sartorius CA, Shen T, Horwitz KB. Progesterone receptors A and B differentially affect the growth of estrogen-dependent human breast tumor xenografts. *Breast Cancer Res Treat* 2003;79:287-99.
- [15] Mote PA, Leary JA, Avery KA et al. 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* 2004;39:236-48.
- [16] Mote PA, Bartow S, Tran N et al. Loss of coordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2002;72:163-72.
- [17] Ma YX, Katiyar P, Jones LP et al. The breast cancer susceptibility gene BRCA1 regulates progesterone receptor signaling in mammary epithelial cell. *Mol Endoc* 2005;
- [18] Bramley M, Clarke RB, Howell A et al. Effects of oestrogens and anti-oestrogens on normal breast tissue from women bearing BRCA1 and BRCA2 mutations. *British Journal of Cancer* 2006;94:1021-8.
- [19] Kumar NS, Richer J, Owen G et al. Selective down regulation of progesterone receptor isoform B in poorly differentiated human endometrial cancer cells: implications for unopposed estrogen action. *Cancer Res* 1998;58:1860-5.
- [20] Arnett-Mansfield RL, de Fazio A, Wain GV et al. Relative expression of progesterone receptors A and B in endometrioid cancers of the endometrium. *Cancer Res* 2001;61:4576-82.
- [21] Akahira J, Inoue T, Suzuki T et al. Progesterone receptor isoforms A and B in human epithelial ovarian carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR studies. *Br J Cancer* 2000;83:1488-94.
- [22] Smid-Koopman E, Blok LJ, Kuhne LC et al. Distinct functional differences of human progesterone receptors A and B on gene expression and growth regulation in two endometrial carcinoma cell lines. *J Soc Gynecol Investig* 2003;10:49-57.
- [23] Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG et al. Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-Rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res* 2004;10:2751-60.
- [24] Schultz JR, Petz LN, Nardulli AM. Estrogen receptor A and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2003;201:165-75.
- [25] Graham JD, Roman SD, McGowan E et al. Preferential stimulation of human progesterone receptor B expression by estrogen in T-47D human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1995;270:30693-700.
- [26] Bray JD, Jelinsky S, Ghatge R et al. Quantitative analysis of gene regulation by seven clinically relevant progestins suggests a highly similar mechanism of action through progesterone receptors in T47D breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;97(4):328-41.