

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier
Laval, Québec

ÉVALUATION DU POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE D'UNE COMBINAISON DE GÉNISTÉINE ET DE DÉCITABINE DANS LE CANCER DU SEIN

Natasha Mercier

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
27 février 2015

Jury d'évaluation

Présidente du jury et
examinatrice interne

Géraldine Delbès
Institut National de la Recherche Scientifique,
Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Noël Raynal
Université de Montréal/CHU/Ste-Justine

Directrice de recherche

Isabelle Plante
Institut National de la Recherche Scientifique,
Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Pour commencer, ma gratitude va à mon directeur de recherche Michel Charbonneau, qui m'a d'abord accueilli dans son équipe de recherche en tant que stagiaire d'étude puis en tant qu'étudiante de maîtrise. Je remercie ce directeur de grandes expériences de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé. Sa gentillesse, sa patience et sa rigueur scientifique m'ont été d'une aide précieuse et ont contribué à alimenter ma réflexion. Je remercie Isabelle Plante, ma deuxième directrice de recherche de maîtrise. Isabelle, merci de m'avoir rapidement accueilli dans ton équipe de recherche. Merci pour ton écoute attentive et ininterrompue, ton encouragement soutenu, de toujours être à la disposition de tes étudiantes ainsi que ton aide compétente dans la conception d'études scientifiques, dans le choix des techniques statistiques, dans l'analyse des résultats obtenus et la mise en page de ce mémoire. Tu as grandement contribué au développement de mes compétences scientifiques.

Je remercie également Guylaine Lassonde et Martine Caplette, techniciennes en laboratoire, avec qui j'ai développé de belles relations. Merci pour votre aide dans les techniques de manipulation en laboratoire qui m'ont permis de réaliser de nombreuses procédures expérimentales. Je remercie les professeurs Géraldine Delbès et Jacques Bernier d'avoir consacré un peu de leur temps afin de me venir en aide avec leurs conseils rigoureux et leur sens critique, tant pour l'avancement de mon projet de recherche que pour mes cours universitaires. Je remercie Jessy Tremblay pour son aide en conception de protocole et analyse de résultats en microscopie confocale. Je dois des remerciements au Dr Louis Gaboury, pathologiste à l'unité de recherche en histologie et pathologie moléculaire de l'Université de Montréal pour sa contribution de connaissances scientifiques et pour rendre disponible son appareil d'immunohistochimie automatisé et de sa base de données de tissus provenant de biopsies de cancer du sein. Je remercie Michel Courcelles, bibliothécaire de l'université, pour son aide dans la recherche de documents contribuant à mes études et l'avancement de mon projet de recherche. Je remercie mes collègues de laboratoire, Marjolaine Miclette, Mélanie Busby, Elham Dianati, Élise Kolasa, Charlotte Robichon, Debbie Lim et Bruno Johnston pour leur aide et conseil en laboratoire, avec qui j'ai partagé des expériences professionnelles et personnelles des plus captivantes et enrichissantes. Je dois également mentionner l'importance qu'a eu l'ensemble des étudiants, chercheurs et les membres du personnel de l'université, avec qui j'ai eu des relations de travail très agréables.

Enfin, au terme de ces remerciements, je souhaite rendre hommage à mes amis et aux membres de ma famille, notamment ma mère Monica Martin et mon conjoint Kevin Legault. Merci de toujours avoir cru en mon potentiel et de m'avoir accompagné, aidé, encouragé et de votre soutien lors des obstacles qui se sont présentés.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	xii
SOMMAIRE.....	xiv
INTRODUCTION	xvi
Hypothèse	xvii
Objectifs	xvii
CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE.....	1
1.1 Le cancer.....	1
1.1.1 Les trois étapes de cancer	1
1.1.1.1 Initiation	1
1.1.1.2 La promotion	2
1.1.1.3 La progression.....	2
1.1.2 Les anomalies de l'ADN.....	2
1.1.2.1 Les cancérrogènes mutagéniques	2
1.1.2.2 Les cancérrogènes par altération d'évènements épigénétiques	2
1.2 Le cancer du sein.....	5
1.2.1 Anatomie et rôle de la glande mammaire.....	5
1.2.2 Développement de la glande mammaire.....	6
1.2.2.1 Développement au stade de la puberté.....	6
1.2.2.2 Développement au stade de la grossesse et d'involution	7
1.2.2.3 Développement en fonction des hormones	7
1.2.3 Statistiques (2013) sur le cancer du sein	8
1.2.4 Défis du cancer du sein	9
1.2.5 Les catégories de gènes dans le cancer	11
1.2.5.1 Les oncogènes	11
1.2.5.2 Les gènes suppresseurs de tumeurs	11
1.2.5.3 Les gènes suppresseurs de métastases	11
1.2.6 Les stades du cancer du sein.....	11
1.2.7 Les grades du cancer du sein	12

1.2.8 Les sous-types de cancer du sein	12
1.2.8.1 Cancer de type luminal	13
1.2.8.2 Cancer avec enrichissement en HER2.....	13
1.2.8.3 Cancer de type triple négatif.....	13
1.2.8.4 Cancer de type normal.....	14
1.3 Les récepteurs de facteur de croissance épidermique (EGFRs).....	14
1.3.1 Les membres d'EGFRs et leurs ligands.....	15
1.3.2 Structure et activation des EGFRs	15
1.3.3 Signaux d'EGFRs en fonction du transport cellulaire.....	16
1.3.3.1 Les EGFRs dans les mitochondries	16
1.3.3.2 Les EGFRs dans le noyau	16
1.3.4 Signalisations des EGFRs	16
1.3.4.1 Les signalisations de Ras.....	17
1.3.4.2 Signalisation entre les EGFRs et les ERs	17
1.3.4.3 Les signalisations de la voie de PI3K.....	17
1.3.5 Les EGFRs dans le cancer du sein	18
1.3.5.1 Les HER2 dans le cancer du sein.....	19
1.4 Le récepteur à l'œstrogène (ER)	19
1.4.1 Les isoformes.....	20
1.4.1.1 Les isoformes d'ER α	20
1.4.1.2 Les isoformes d'ER β	20
1.4.2 La signalisation classique des ERs	20
1.4.3 Les signalisations non-classiques des ERs.....	21
1.4.4 Les ERs dans la cancérogenèse mammaire.....	23
1.4.4.1 Influence d'E2 sur la glande mammaire	24
1.4.4.2 Expression d'ER α et ER β dans le cancer du sein	24
1.5 Le récepteur à la progestérone (PR)	24
1.5.1 Les isoformes.....	25
1.5.2 La signalisation classique des PRs	25
1.5.3 Les signalisations non-génomiques des PRs.....	25
1.5.4 Les modifications covalentes	26
1.5.5 Les PRs dans le cancer du sein	27
1.5.5.1 Les PR-A et PR-B dans le cancer du sein	28

1.6 Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR).....	28
1.6.1 Signalisation classique d'AhR	28
1.6.2 Modifications covalentes d'AhR.....	29
1.6.3 Les ligands d'AhR	30
1.6.3.1 Molécules endogènes	30
1.6.3.2 Les ligands exogènes- Contaminants environnementaux	31
1.6.3.3 Les ligands exogènes- Composés naturels	31
1.6.4 AhR dans la cancérogenèse	32
1.6.4.1 Activation d'AhR; effets toxiques	32
1.6.4.2 Activation d'AhR; effets anticancéreux	32
1.6.5 AhR dans le cancer du sein	33
1.5.1.1 Signalisation entre AhR et ER	33
1.6.5.2 Expression d'AhR dans des tissus cancéreux du sein	34
1.6.5.3 Signalisation d'AhR dans des cellules cancéreuses du sein.....	34
1.7 Génistéine.....	35
1.7.1 Le métabolisme de la génistéine	35
1.7.2 Activité estrogénique de la génistéine.....	36
1.7.3 Études épidémiologiques	37
1.7.4 La génistéine au niveau de la glande mammaire	37
1.7.4.1 La génistéine au niveau des cellules du sein.....	38
1.7.5 La combinaison de la génistéine avec la décitabine	39
CHAPITRE 2: A CO-TREATMENT OF GENISTEIN AND DECITABINE DECREASES PROLIFERATION AND ACTIVATES AHR IN BREAST CANCER CELLS	41
2.1 Contributions des auteurs	41
2.1.1 Auteurs	41
2.1.2 Contributions des auteurs	41
2.2 Résumé de l'article.....	41
2.3 Article tel que soumis.....	42
2.3.1 Summary	43
2.3.2 Abstract	43
2.3.3 Introduction	43
2.3.4 Materials and methods	44
2.3.4.1 Compounds.....	44

2.3.4.2 Cell culture conditions	44
2.3.4.3 Cell treatments	45
2.3.4.4 Transcriptional activity of AhR analysis	45
2.3.4.5 Viability assay	45
2.3.4.6 Western blot analysis	46
2.3.4.7 Immunofluorescence	46
2.3.4.8 Reverse cell transfections	46
2.3.4.9 Assessment of viability in real-time using xCELLigence technology	46
2.3.4.10 Statistic	47
2.3.5 Results	47
2.3.5.1 T47-D and MDA-MB-231 cells are representative of the luminal B and triple-negative subtypes, respectively	47
2.3.5.2 Genistein, with or without decitabine, significantly reduces viability of human breast cancer cells without affecting PARP and Caspase 9	48
2.3.5.3 The combination of genistein-decitabine decreases the expression level of PR and HER2 in T47D cells	51
2.3.5.4 Genistein-decitabine co-treatment activates AhR in T47D and MDA-MB-231 cells	53
2.3.5.5 Knocking-down AhR partly rescue the genistein-decitabine induced decrease in proliferation in T47-D cells	56
2.3.6 Discussion	58
2.3.6.1 Genistein treatment results in reduced breast cancer cells viability without having major effects on normal cells	58
2.3.6.2 Genistein effects on proliferation are attenuated by decitabine	59
2.3.6.3 A genistein-decitabine co-treatment allows activation of the transcriptional activity of AhR	60
2.3.7 Conclusion	61
2.3.8 Acknowledgements	61
2.3.9 References	62
Chapitre 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE	64
3.1 Profil protéique des cellules	64
3.2 Un traitement de génistéine avec ou sans une combinaison de décitabine permet une diminution de la viabilité des cellules cancéreuses mammaires	65
3.3 Le traitement de la combinaison de génistéine et de décitabine permet une diminution de la localisation des PRs cytoplasmiques et de l'expression d'HER2 dans les cellules T47D	67

3.4 Un co-traitement de génistéine/décitabine permet l'activation de l'activité transcriptionnelle d'Ahr.....	69
3.5 L'activation d'Ahr pourrait être une nouvelle avenue thérapeutique pour les tumeurs du sein de type triple négatif	70
3.6 CONCLUSION.....	71
CHAPITRE 4 : RÉFÉRENCES	72
ANNEXE I	81
ANNEXE II - Preuve de soumission dans le journal <i>Carcinogenesis</i>	91

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
Ah	Hydrocarbure aromatique (Aryl hydrocarbon)
AhR	Récepteur au hydrocarbure aromatique (Aryl hydrocarbon receptor)
AhRR	Répresseur du récepteur au hydrocarbure aromatique (Aryl hydrocarbon receptor repressor)
Akt	Tyrosine kinase «Akt»
AP-1	Protéine activatrice 1 (Activator protein 1)
AREG	Amphiréguline
ARNT	Translocateur nucléaire du récepteur au hydrocarbure aromatique (Aryl hydrocarbon Receptor nuclear translocator)
ATM	Ataxie téléangiectasie mutée (Ataxia telangiectasia mutated)
BAD	Promoteur de mort associée à Bcl-2 (Bcl-2-associated death promoter)
BAK	Antagoniste/tueur d'homologue de Bcl-2 (Bcl-2 homologous antagonist/killer)
bHLH/PAS	Basique hélice-boucle-hélice- PAS (Basic-helice-loop-helice/P (period circadian protein) A (Aryl hydrocarbon Receptor nuclear translocator)–S (Single-minded protein)
BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BPC	Biphényles polychlorés
BRCA1/2	Cancer du sein 1 et 2 (Breast cancer 1 et 2)
BRMS1	Suppresseur de métastase de cancer du sein 1 (Breast cancer metastasis suppressor 1)
BTC	Bétacelluline
ChIP	Immunoprécipitation de chromatine (chromatin immunoprecipitation)
CDK	Kinase dépendante de cycline (Cycline dependant kinase)
c-Fos	Proto-oncogène «c-Fos»
c-Jun	Proto-oncogène «c-Jun»
c-MYC	Proto-oncogène «c-myc»
CpG	Cytosine-groupement phosphate-guanine
CRM1	Maintenance de région de chromosome 1 (Chromosome region maintenance 1)
CUL4AHR	Cullin 4B ubiquitine ligase du récepteur au hydrocarbure aromatique
Cx43	Connexine 43
CYP	Cytochrome
DLL	Domaine de liaison à un ligand
DNMT	Méthyltransférases de l'ADN (DNA methyltransferase)
E2	Estradiol (17- β estradiol)
E2F1	Facteur de transcription E2F1
EGF	Facteur de croissance épidermique (Epidermal growth factor)

EGFR	Récepteur de facteur de croissance épidermique (Epidermal growth factor receptor)
EPG	Épigène
ER	Récepteur à l'estrogène (Estrogen receptor)
ERBB	Facteur de croissance épidermique
ERE	Élément de réponse à l'estrogène (Estrogen response element)
ERK	Kinase régulatrice par signaux extracellulaires (Extracellular signal-regulated kinase)
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (US Food and Drug Administration)
FGF	Facteur de croissance de fibroblaste (Fibroblast growth factors)
FICZ	6-formylindolo (3,2 b)carbazole
FOX	Boîte forkhead (Forkhead box)
GDP	Guanine-diphosphate
Grb2	Protéine 2 liée au récepteur de facteur de croissance (Growth factor receptor-bond protein 2)
GTP	Guanine triphosphate
HAH	Hydrocarbures aromatiques halogénés
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques non-halogénés
HAT	Histone acétyltransférase
HDAC	Histone désacétylase
HER	Facteur de croissance épidermique
HMEC	Cellules de la glande mammaire saine de l'humain (Normal human mammary epithelial cell)
HSP	Protéine de choc thermique (Heat shock protein)
Htert	Transcriptase inverse de la télomérase de l'humain (Human telomerase reverse transcriptase)
I3C	Indole-3-carbinol
IGF	Facteur de croissance ressemblant à l'insuline (Insulin-like growth factors)
IGF-IR	Récepteur 1 de facteur de croissance ressemblant à l'insuline (Insulin-like growth factor 1 receptor)
IRS-2	Substrat 2 de récepteur à l'insuline (Insulin receptor substrate 2)
JNK	Jun N-terminale kinase
JNK/SAPK	C-Jun N-terminal/stress-activated protein kinases
MAPK	Protéine kinase activée par des mitogènes (Mitogen-activated protein kinases)
MEK	Protéine kinase kinase activée par des mitogènes (Mitogen-activated protein kinase kinase)

MMP	Métalloprotéinases matricielles (Matrix metalloproteinases)
Mtor	Cible de la rapamycine chez les mammifères (Mammalian target of rapamycin)
NF-KB	Facteur nucléaire KB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
nM	Nanomolaire
Nrg	Neuréguline
P16	Inhibiteur 2A de cycline dépendante de kinase (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)
P21	Inhibiteur 1 de kinase dépendante de cyclin (cyclin-dependent kinase inhibitor 1)
P23	Protéine accessoire qui interagit avec des protéines de choc thermique (HSP-interacting protein)
P27	Protéine inhibitrice de kinase 1
P53	Suppresseur de tumeur p53
PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase
PCDD	Dibenzo-p-dioxines polychlorés (Polychlorinated dibenzodioxins)
PCDF	Dibenzofuranes polychlorés (Polychlorinated dibenzofurans)
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP	Cycle inositol de membrane phosphatidylinositol (Inositol ring of membrane phatidylinositols)
PKC	Protéine kinase C
pM	Picomolaire
PM	Poids moléculaire
POT1	Protéine 1 de protection de la télomérase (Protection of telomeres protein 1)
PR	Récepteur à la progestérone (Progesterone receptor)
PRE	Élément de réponse à la progestérone (Progesterone response element)
PRKD1	Protéine kinase D1 (<i>Protein kinase D1</i>)
PTEN	Protéine homologue de phosphatase et tensin (Phosphatase and tensin homolog protein)
PXXP	Motif riche en proline
Raf-1	Proto-oncogène RAF à activité kinase de sérine /thréonine (RAF proto-ncogene serine/threonine-protein kinase)
RAS	Sarcoma Rat (Rat sarcoma)
Rb	Rétinoblastome
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Espèces réactives à l'oxygène (Reactive oxygen species)
SAM	S-adénosyl-méthionine
SCR	<i>Short consensus repeats</i>)
SEK	Protéine kinase active par le stress (Stress-activated protein kinase)
SERPINB5	Serpin peptidase inhibitor, SERPINB5; Clade B (ovalbumin), member 5

SH3	Scr-homology-3
SLN	Signal de localisation dans le noyau
SOS	Son-of-sevenless guanine nucleotide exchange factor
Sp1	Protéine de spécificité 1 (Specificity protein 1)
Src	Proto-oncogene kinase Src,
STAT	Transducteur de signaux et activateur de transcription (Signal transducers and activators of transcription)
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TGF	Facteur de croissance de transformation (Transforming growth factor)
TIN2	Protéine interagissante avec TRFI1 (TRFI1 (<i>telomeric DNA repeat binding factor 1</i>) interacting protein 2)
µM	Micromolaire
UTR	Régions non traduites (5'-Untranslated region)
XAP2	Protéine 2 associée avec HBS-X (HBV X-associated protein 2)
XRE	Élément de réponse aux xénobiotiques (Xénobiotique response element)

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1. Revue de littérature

- Figure 1** Schéma démontrant les capacités acquises des cellules cancéreuses
- Figure 2** Schéma représentant les modifications de la structure de la chromatine amenant à des promoteurs actifs et inactifs
- Figure 3** Schéma représentant l'anatomie de la glande mammaire
- Figure 4** Schéma démontrant les modifications dans la glande mammaire en fonction de la période de vie
- Figure 5** Vue schématique d'une cellule normale vers la progression d'un carcinome invasif et métastatique
- Figure 6** Schéma démontrant les différents stades de cancer du sein.
- Figure 7** Modèles hypothétiques sur l'origine et les sous-types de tumeurs mammaires.
- Figure 8** Schéma simplifié de la signalisation induite par les EGFRs suite à leur activation par un ligand
- Figure 9** Représentation schématique des différentes voies moléculaires engendrées par les récepteurs à l'œstrogène
- Figure 10** Schéma représentant la signalisation classique et non génomique des PRs
- Figure 11** Représentation schématique de la structure fonctionnelle et la signalisation classique d'Ahr

Chapitre 2. A co-treatment of genistein and decitabine decreases proliferation and activates AhR in breast cancer cells

- Figure 1** T47-D and MDA-MB-231 Cell Marker Profiles are Representative of Luminal B and Triple-negative Subtypes of Breast Cancer, Respectively
- Figure 2** Genistein, with or without decitabine, significantly reduces viability of human breast cancer cells without affecting PARP and Caspase 9, and Has Little Effects on Primary Cells
- Figure 3** An Exposure to a Combination of Genistein-Decitabine Has no Significant Effects in MDA-MB-231 Cells, but Decreases PR-A/B and HER2 Levels in T47-D Cells
- Figure 4** Exposure to a Combination of Genistein-Decitabine Induces Nuclear Translocation of AhR in T47-D and MDA-MB-231 Cells

Figure 5 Exposure to a Combination of Genistein-Decitabine Results in Activation of AhR in T47-D and MDA-MB-231 Cells

Figure 6 Down-regulation of AhR Results in Increased Cells Proliferation and Partially Rescues Cell Proliferation in Genistein-Decitabine Treated T47-D Cells

Annexe I

Figure 1 Un traitement de 20 nM de décitabine permet une diminution de 50 % de formation de clones dans les cellules MDA-MB-231

Figure 2 Profile de marqueurs des cellules MCF-10A et MCF-12A.

Figure 3 Le traitement d'une combinaison de génistéine et de décitabine permet une diminution significative de la viabilité des cellules transformées MCF-12A et MCF-10A

Figure 4 Comparaison du traitement de génistéine avec le traitement de la combinaison de génistéine et de décitabine

Figure 5 Le traitement d'une combinaison de génistéine avec ou sans décitabine n'a pas d'effet sur l'expression des protéines PARP et capspase 9 dans les cellules T47-D et MDA-MB-231.

Figure 6 Le traitement d'une combinaison de génistéine et de décitabine permet de diminuer significativement l'expression des PR-A et des PR-B cytoplasmiques dans les cellules T47-D

Figure 7 Un co-traitement de génistéine et de décitabine n'a pas d'effet significatif sur l'expression de ER α / β dans les cellules T47-D, mais permet une diminution significative de l'expression d'HER2

Figure 8 Un co-traitement de génistéine et de décitabine n'a pas d'effet significatif sur l'expression de ER α / β , de PR-A/B, d'HER2 ou AhR au niveau des lysats entiers des cellules MCF-10A, MCF-12A et HMEC

Figure 9 Un co-traitement de génistéine et de décitabine n'a pas d'effet significatif sur l'expression de Cx43 au niveau des lysats entiers des toutes les cellules en analyses

Figure 10 Contrôle de qualité d'expérience d'immunofluorescence

SOMMAIRE

L'ensemble des études de types épidémiologiques et toxicologiques semble démontrer que la consommation de l'isoflavone génistéine est liée avec la diminution du risque de développement d'un cancer du sein par la diminution de la viabilité des cellules cancéreuses mammaires. Parmi ces nombreuses propriétés anticancéreuses, la génistéine est bien connue pour sa capacité d'altération d'évènements épigénétiques, menant à un changement d'expression des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Plusieurs études démontrent que les effets bénéfiques de la génistéine sont plus puissants lorsque combinée à la décitabine, soit une molécule ayant la propriété d'éliminer les groupes méthyles de l'ADN. À ce jour, les mécanismes impliqués dans la diminution de la viabilité demeurent encore mal compris. L'efficacité du traitement en fonction des différents sous-types de cancer du sein est également inconnue.

La classification du type de cancer du sein est basée en partie sur l'expression de certains récepteurs, dont l'expression du récepteur à l'estrogène (ER), à la progestérone (PR) et le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2). Une surexpression d'une ou plusieurs de ces protéines peut augmenter la probabilité de développer un cancer du sein via, en partie, la hausse de prolifération et la perturbation du contrôle de la progression du cycle cellulaire. Selon le profil moléculaire de la tumeur, elle sera classée comme étant de type luminaire A ou B (ER+, PR+/- et HER2+/-), HER2+ (ER-, PR-, HER2+) ou triple négatif (ER-, PR- et HER2-). Présentement, aucune thérapie ciblée n'est disponible pour les cancers du type triple-négatif.

Il y a une attention grandissante sur le lien entre l'expression du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) et le cancer du sein. D'un côté, la surexpression de ce récepteur a été associée avec le développement de cancer du sein. D'un autre côté, son activation mènerait plutôt à la diminution de la prolifération, par l'arrêt de la progression du cycle cellulaire en phase G1. Parmi les ligands exogènes d'AhR, on compte des polluants environnementaux et différents types d'isoflavones.

Notre objectif était donc de déterminer les effets d'une co-exposition à la génistéine et à la décitabine au niveau de la viabilité et l'expression de certains marqueurs du cancer du sein dans des lignées de cellules humaines cancéreuses mammaires représentant différents sous-types de cancer du sein. Pour répondre à cet objectif, différentes doses de génistéine (10, 25, 50 et 100 μ M) ont été combinées avec une dose de 20nM de décitabine. Des cellules cancéreuses de type luminaire B (T47-D) et triple négatif (MDA-MB-231) et non-tumorales (MCF-12A et MCF10A), ainsi que des cellules primaires saines (HMEC, «humain mammary epithelial cells») ont été utilisées.

L'ensemble de nos résultats a démontré qu'un traitement de 48 heures de 50 μ M de génistéine combinée avec 20 nM de décitabine diminue significativement la viabilité des cellules mammaires cancéreuses humaines T47-D et MDA-MB-231, des cellules mammaires transformées humaines MCF-10A et MCF-12A, sans affecter les cellules primaires provenant de glandes mammaires saine de l'humain. Au niveau des cellules cancéreuses, le traitement a peu d'effets sur l'expression des récepteurs ER ou HER2. Toutefois, il y a eu une diminution

significative de l'expression des PRs cytoplasmiques des T47-D, ainsi qu'une translocation nucléaire et une activation d'Ahr dans les cellules T47-D et MDA-MB-231. Une inhibition des niveaux protéiques d'Ahr restaure partiellement la prolifération, ce qui suggère que l'activation d'Ahr est en partie liée aux effets anti-prolifératifs du traitement. L'implication de PR demeure à être déterminée.

Cette étude démontre qu'un co-traitement de génistéine/décitabine a un potentiel thérapeutique contre le cancer du sein, tant au niveau des tumeurs de type luminal B et triple négatif. De plus, l'étude met en lumière qu'Ahr pourrait devenir une nouvelle cible thérapeutique pour le cancer du sein, et plus particulièrement pour les tumeurs triples négatives, un sous-type de cancer du sein très agressif, pour lequel aucune thérapie ciblée n'est présentement disponible.

INTRODUCTION

Malgré le fait qu'en 2013, le taux de survie d'un cancer du sein relatif à cinq ans est de 88 %, cette maladie reste la deuxième cause de décès due au cancer chez les Canadiennes. Le cancer n'est pas une maladie au sens singulier, mais un ensemble de maladies plutôt hétérogènes au sens moléculaire. Le cancer du sein peut être classifié en différents sous-types (par exemple, un cancer de type luminal A/B, enrichissement d'HER2 et triple négatif), basé sur le profil génétique des cellules constituant la tumeur. Des exemples de marqueurs utilisés pour ce type de classification sont le récepteur à l'œstrogène (ER, «*estrogen receptor*»), à la progestérone (PR, «*progesterone receptor*») et aux facteurs de croissance épidermique II (HER2). Chacun de ces récepteurs permettent la médiation de plusieurs signaux cellulaires impliqués entre autres, dans la prolifération, l'apoptose et le contrôle de la progression du cycle cellulaire. Une surexpression d'une de ces protéines pourrait donc être la source du développement d'un cancer du sein via la perturbation de ces signaux. Si une tumeur est reconnue pour avoir une surexpression d'un de ces récepteurs, le patient pourrait obtenir un médicament approprié pour obtenir un traitement personnalisé, permettant d'augmenter les chances d'éradiquer la maladie. Cependant, les cellules qui n'expriment aucun de ces trois récepteurs (triples négatives) n'ont à ce jour aucun traitement personnalisé disponible par le manque de cible.

Il y a plusieurs études qui démontrent l'intérêt d'étudier le rôle des récepteurs d'hydrocarbures aromatiques (AhR, «*aryl hydrocarbon receptor*») dans les cellules de la glande mammaire. Des études épidémiologiques ont démontré que les femmes les plus exposées à des ligands de types xénobiotiques d'AhR ont une tendance significativement diminuée de développer un cancer du sein. À la suite de ces observations, des analyses en laboratoire ont démontré qu'une surexpression d'AhR non-activé semble augmenter les chances de développer un cancer dans la glande mammaire, probablement dû au fait que sous sa forme latente, AhR est impliqué dans la progression du cycle cellulaire. Une fois activé, AhR peut amener à l'arrêt de cette progression à la phase G1 dans plusieurs types de cellules cancéreuses mammaires. Le récepteur Ah est donc intéressant, car il est présent dans des cellules cancéreuses de la glande mammaire, incluant les cellules de type triple négatif. Il y a donc un intérêt pour la recherche de ligands non toxiques pouvant activer AhR afin de permettre l'arrêt de la prolifération de cellules cancéreuses du sein. Hormis les xénobiotiques, on compte également des isoflavones, soit des molécules généralement sécuritaires pour l'organisme, comme ligands d'AhR.

La génistéine est une isoflavone, soit une molécule à activité estrogénique naturellement retrouvée dans les plantes, dont en grande partie dans le soja. Des études épidémiologiques ont démontré à plusieurs reprises un lien entre la consommation en génistéine et la diminution du risque de développer un cancer du sein. Cette molécule est connue pour avoir plusieurs propriétés anticancéreuses, comme étant un antioxydant, un anti-inflammatoire, ainsi que pour ses capacités à inhiber l'angiogenèse, induire l'apoptose et la différenciation. La génistéine a aussi la capacité de réguler l'expression de gènes par la modulation d'événements épigénétiques amenant à une modulation de l'expression d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs. Plusieurs études ont démontré que l'influence qu'exerce la génistéine au niveau de l'expression de protéines est plus puissante lorsque combinée à la déacétylase.

Cette dernière molécule synthétique est approuvée pour le traitement de divers types de cancers par son action d'inhibition des méthyltransférases de l'ADN afin d'arrêter l'ajout de groupes méthyls sur l'ADN. L'action de la décitabine est souvent accompagnée par l'augmentation d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs.

Hypothèse

L'activation d'Ahr, entre autres par des polluants environnementaux et des isoflavones, est souvent liée à la diminution de la prolifération de plusieurs types de cellules cancéreuses mammaires. Il est connu que la génistéine, une isoflavone, peut moduler l'expression de protéines impliquées dans le cancer du sein et que les effets thérapeutiques semblent être amplifiés lorsque combinée à la décitabine. Nous sommes donc venus à l'hypothèse qu'une combinaison de génistéine/décitabine puisse réduire la viabilité des cellules cancéreuses mammaires par la modification d'expression d'un ou plusieurs récepteurs utilisés pour la classification du cancer sein et/ou par l'activation d'Ahr

Objectifs

1. Déterminer la dose sécuritaire de génistéine pour diminuer la viabilité des cellules cancéreuses mammaires.
2. Déterminer si le traitement génistéine/décitabine peut avoir un effet sur l'expression d'ER α/β , de PR-A/B, d'HER2 ou d'Ahr.
3. Déterminer si le traitement génistéine/décitabine peut activer Ahr dans les cellules cancéreuses de la glande mammaire.

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le cancer

Le terme cancer est utilisé pour désigner des cellules qui se divisent indépendamment des signaux cellulaires. Ce processus souvent connu comme la transformation cellulaire, amène à une perte de leurs fonctions. Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une insensibilité aux signaux relatifs à la prolifération et/ou l'apoptose, une prolifération soutenue et la capacité d'angiogenèse, d'invasion et/ou de diffusion métastatique (Figure 1) (Hanahan *et al.*, 2000).



Figure 1. Schéma démontrant les capacités acquises des cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses présentent une ou plusieurs des caractéristiques suivantes : indépendance vis-à-vis des signaux de croissance, d'anti-croissance et d'apoptose. Ces cellules ont également la capacité d'invasion, de formation de métastases, de division illimitée et d'induction d'angiogenèse. Tiré de (Hanahan *et al.*, 2000).

1.1.1 Les trois étapes de cancer

De manière simple, la maladie du cancer peut être vue comme un déroulement en trois étapes ; l'initiation, la promotion et la progression.

1.1.1.1 Initiation

L'initiation a lieu lorsqu'une cellule unique subit une mutation non réparée (Polyak, 2007). Ce stress altère de manière permanente la cellule via des perturbations au niveau génétique et/ou épigénétique (Polyak, 2007). À ce stade, la cellule n'est pas cancéreuse, mais elle n'a plus la capacité de différenciation (Polyak, 2007). Au niveau de l'initiation des cellules souches, la division cellulaire peut produire deux autres

cellules initiées (Buick *et al.*, 1984). Il y a différentes théories sur le déroulement de l'initiation d'un cancer. Plusieurs scientifiques croient qu'une tumeur va se développer à partir de mutation débutant dans les cellules souches, amenant à la perte de leurs fonctions (Buick *et al.*, 1984). D'autres scientifiques croient plutôt que la transformation débute suite à une mutation dans les cellules différenciées, aboutissant à une division et prolifération soutenue (Buick *et al.*, 1984). Les mutations qui initient le cancer peuvent être héréditaires ou provenir de l'environnement. De plus en plus, des évidences scientifiques démontrent que tous ces facteurs peuvent être une cause de développement d'un cancer.

1.1.1.2 La promotion

La promotion débute lorsque la cellule initiée est exposée à un promoteur de tumeur (Polyak, 2007). Il y aura alors comme conséquence une division soutenue de cette cellule, amenant à une masse de cellules génétiquement altérées (Polyak, 2007). Ce stade est réversible par l'arrêt de l'exposition au promoteur de tumeur (Polyak, 2007).

1.1.1.3 La progression

L'étape de la progression est liée à la prolifération rapide des cellules initiées qui mène à l'accumulation des modifications génétiques vers l'atteinte d'un stade de haute instabilité au niveau génomique (Polyak, 2007). Ce stade de non-retour est caractérisé par des cellules ayant subi des altérations génétiques à un point tel qu'elles ont la capacité de croître de manière complètement indépendante vis-à-vis les signaux cellulaires, et peuvent également développer des capacités accrues de migration et d'invasion (Polyak, 2007).

1.1.2 Les anomalies de l'ADN

Les produits cancérigènes peuvent exercer leurs dommages par mutations et/ou par des modifications d'événements épigénétiques de l'ADN.

1.1.2.1 Les cancérigènes mutagéniques

Les cancérigènes mutagéniques ont le potentiel de causer des mutations directement au niveau de l'ADN (James Watson, 2009). Ces altérations peuvent se faire, entre autres, par une mutation faux-sens (remplacement d'un nucléotide par un autre), une mutation non-sens (remplacement d'un nucléotide par dans le codon "stop" provoquant l'arrêt de la synthèse de la protéine concernée), une délétion (perte de nucléotides) ou l'insertion (gain de nucléotides) (James Watson, 2009). Les dommages peuvent être au niveau du simple ou double brin de l'ADN (James Watson, 2009).

1.1.2.2 Les cancérigènes par altération d'événements épigénétiques

La cancérogenèse peut également être liée à des anomalies complexes d'événements épigénétiques. Ces anomalies n'amènent aucune modification au niveau des nucléotides, mais plutôt «autour» de l'ADN. Parmi plusieurs types de modifications épigénétiques, il y a la méthylation de l'ADN et des modifications d'histones, soit les mécanismes pour ce type de régulation les plus étudiés et compris (Khan *et al.*, 2012).

Ces régulations peuvent avoir comme conséquence d'augmenter ou atténuer l'expression d'un gène dans la région de la chromatine affectée (Khan *et al.*, 2012).

La méthylation de l'ADN est caractérisée par un ajout d'un groupement méthyle au niveau du carbone cinq du cycle aromatique (la pyrimidine) des résidus de cytosine, formant la 5-méthylcytosine (Khan *et al.*, 2012). La méthylation des cytosines est catalysée par les enzymes méthyltransférases de l'ADN (DNMT, «*DNA methyltransferase*») et leur cofacteur S-adénosyl-méthionine (SAM), qui est le donneur du méthyle (Khan *et al.*, 2012). Chez les mammifères, trois DNMTs ayant une activité catalytique sont connus, soit les DNMT1, les DNMT3A et les DNMT3B (Khan *et al.*, 2012). L'enzyme DNMT1 est principalement impliquée dans la conservation du patron de méthylation de l'ADN suite à sa réplication (Virani *et al.*, 2012). Les enzymes DNMT3A et DNMT3B sont plutôt impliquées dans l'ajout de nouveaux groupes méthyls sur l'ADN, jouant donc un rôle important dans l'embryogenèse et le développement des cellules germinales (Virani *et al.*, 2012). Il a été démontré que ces DNMTs peuvent être impliquées dans la tumorigénèse (Virani *et al.*, 2012). Il y a aussi une classe de protéines qui ont comme rôle de se lier aux cytosines méthylées afin de réprimer l'expression d'un gène par l'obstruction d'accès aux facteurs de transcription, soit les «protéines de liaison à l'ADN méthylé» (Virani *et al.*, 2012).

La régulation de la méthylation est souvent perturbée lors de la transformation maligne (Virani *et al.*, 2012). Plus précisément, l'hyperméthylation de l'ADN est considérée par plusieurs scientifiques comme étant un mécanisme impliqué dans l'initiation et la progression de cancer (Virani *et al.*, 2012). La méthylation peut avoir comme conséquence d'atténuer l'expression d'un gène en bloquant l'accès pour la machinerie transcriptionnelle par encombrement stérique (figure 2) (Virani *et al.*, 2012). Malgré le fait que l'ADN de la cellule cancéreuse est globalement hypométhylé (contrairement à la cellule saine), il y a tout de même des régions du génome cancéreux qui sont hyperméthylées (Virani *et al.*, 2012). Ces événements d'hyperméthylations se font via la surexpression des DNMTs (Virani *et al.*, 2012). Les îlots cytosine-groupement-phosphate-guanine (CpG), soit les sites de méthylation de l'ADN, occupent environ 60% des promoteurs des gènes humains (Vu *et al.*, 2000). Les gènes situés dans ces sites ont souvent des promoteurs hypométhylés (Vu *et al.*, 2000). Une méthylation aberrante de ces sites peut donc amener à la progression d'un cancer en réprimant l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (Virani *et al.*, 2012). À l'inverse, le génome de la cellule cancéreuse est souvent caractérisé par l'hyperméthylation des îlots CpG dans les régions des promoteurs (Vu *et al.*, 2000). Bien que les patrons de méthylation de l'ADN soient stables, ils sont également modulables (Virani *et al.*, 2012). En effet, les patrons peuvent varier en fonction de l'environnement, contribuant à la complexité de l'épigénome de la cellule cancéreuse (Virani *et al.*, 2012). De plus, il est à considérer que différentes sections de la tumeur peuvent avoir différents profils de méthylation des îlots CpG (Esteller *et al.*, 2001).

L'euchromatine (chromatine relâchée) représente typiquement des gènes qui sont transcriptionnellement actifs dus à l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle (figure 2) (James Watson, 2009). L'inverse est valide pour l'hétérochromatine (chromatine compacte) (James Watson, 2009). Une altération au niveau de cette conformation via des modifications épigénétiques aberrantes peut être reconnue comme un signe d'initiation et/ou progression d'un cancer (Virani *et al.*, 2012). L'unité principale de la chromatine est le nucléosome, un octamère de protéines contenant une paire des quatre histones centrales, soit H2A, H2B, H3 et H4 (Virani *et al.*, 2012). L'assemblage des nucléosomes est assuré par l'histone H1, soit une protéine de liaison à l'ADN retrouvée à l'extérieur du complexe (Virani *et al.*, 2012). Puisque ce sont des protéines responsables de la maintenance de la structure de la chromatine, leurs modifications post-traductionnelles peuvent amener à des changements au niveau de l'expression de gènes (Virani *et al.*, 2012).

Des exemples de modifications d'histones bien compris sont l'acétylation, la désacétylation et la méthylation, soit des événements pouvant altérer l'activité transcriptionnelle de l'ADN (Khan *et al.*, 2012). L'acétylation d'histone est fortement associée avec une activation transcriptionnelle. Cette action est traduite par l'ajout d'un groupement acétyle au niveau des lysines de la queue amino-terminale d'histones, catalysée par les histones acétyles transférases (HAT) et son cofacteur est l'acétyle coenzyme A (Khan *et al.*, 2012). Les HATs diminuent les interactions électrostatiques entre la charge négative de l'ADN et la charge positive de la lysine de l'histone; il y a donc un relâchement de la chromatine (figure 2) (Travers *et al.*, 2004). La désacétylation est accomplie par les histones désacétylases (HDAC). Les HDACs éliminent les groupements acétyles qui permettent la neutralisation des charges; il y a donc la condensation de la chromatine et l'inactivation génétique (figure 2) (Kouzarides, 2007). Bien que les HATs peuvent affecter plusieurs types d'histones, les impacts les plus considérables au niveau de l'expression de gènes ont lieux lors des modifications sur les queues d'histone H3 et H4 (Khan *et al.*, 2012). Cette activité s'effectue au niveau des résidus d'arginine et de lysine de la queue des histones H3 et H4 (Bronner *et al.*, 2010). Généralement, cette réaction est catalysée par l'histone-lysine N-méthyltransférase, à l'aide de son cofacteur SAM (Khan *et al.*, 2012). L'activité des HATs et des HDACs est souvent altérée dans des cas de cancer résultant d'un phénotype de chromatine anormale (Khan *et al.*, 2012). Ces enzymes peuvent donc être considérées comme des cibles thérapeutiques pour divers types de cancers. Une attention particulière est portée vers les molécules bioactives provenant de l'alimentation (Vitale *et al.*, 2013). Par exemple, la génistéine, une molécule naturellement retrouvée dans le soja, a été démontrée à avoir une capacité de réguler à la baisse différents types de DNMTs dans différents types de cellules humaines cancéreuses mammaires (Vitale *et al.*, 2013).

Aujourd'hui, l'épigénétique est intensément étudiée dans le domaine de l'oncologie. Il y a plusieurs études pour comprendre comment des polluants environnementaux et des perturbateurs endocriniens peuvent contribuer à des changements épigénétiques vers l'initiation et/ou la progression du cancer. Une meilleure compréhension de la régulation épigénétique permettra d'identifier des traitements afin de rétablir une régularité dans les tumeurs.

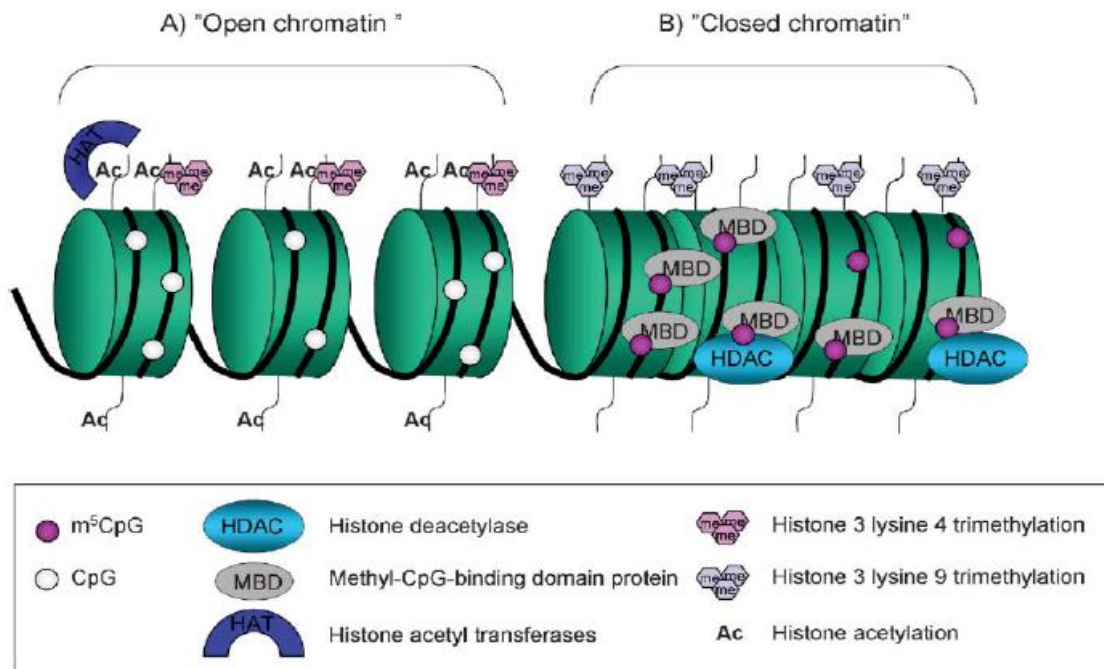


Figure 2. Schéma représentant les modifications de la structure de la chromatine amenant à des promoteurs actifs et inactifs. A) Section d'euchromatine, caractérisée par peu ou pas de groupes méthyls sur les cytosines. À l'inverse, il y a plusieurs groupes acétyles sur les queues d'histones. Les lysines 4 des histones H3 ont trois groupes méthyls (*histone 3 lysine 4 triméthylation*). Les promoteurs de cette section de l'ADN sont actifs. B) Section d'hétérochromatine, caractérisée par des cytosines avec des groupes méthyls et des histones déacétylées. Les protéines qui se lient aux 5-méthylcytosines (MBD) peuvent attirer les HDACs. Les HDACs permettent alors l'élimination du groupement acétyle. Les lysines 9 retrouvées sur les histones H3 qui ont trois groupes méthyls (*histone 3 lysine 9 triméthylation*) représentent des marqueurs de section d'hétérochromatine. Les promoteurs de cette section d'ADN sont inactifs. Tiré de (Gronbaek *et al.*, 2007).

1.2 Le cancer du sein

1.2.1 Anatomie et rôle de la glande mammaire

Le sein est constitué de différentes parties importantes pour assurer ses fonctions, soit principalement la production, le stockage et la sécrétion du lait (figure 3) (Société canadienne du cancer, 2014). Ces fonctions sont en partie assurées par la formation d'un épithélium composé d'un vaste réseau de canaux lactifères (Sternlicht *et al.*, 2006). Ces canaux relient les lobules, qui produisent le lait, au mamelon (Société canadienne du cancer, 2014). Le lait sera expulsé du mamelon par l'effet contractile des cellules myoépithéliales (Programme Québécois De Dépistage Du Cancer Du Sein, 2015). La

surface qui entoure le mamelon, l'aréole, permet la lubrification lors de l'allaitement (figure 3) (Société canadienne du cancer, 2014). Le système des canaux lactifères de la glande mammaire est entièrement tapissé par une couche continue de cellules luminales (Briskin *et al.*, 2010). Ces cellules forment une monocouche d'épithélium autour du lumen des canaux (Briskin *et al.*, 2010). Cette couche luminale est entourée par les cellules basales, ce qui inclut les cellules progénitrices et myoépithéliales (Briskin *et al.*, 2010). Les tissus graisseux et conjonctifs (le stroma) sont principalement importants pour supporter et nourrir les cellules épithéliales (Programme Québécois De Dépitage Du Cancer Du Sein, 2015).

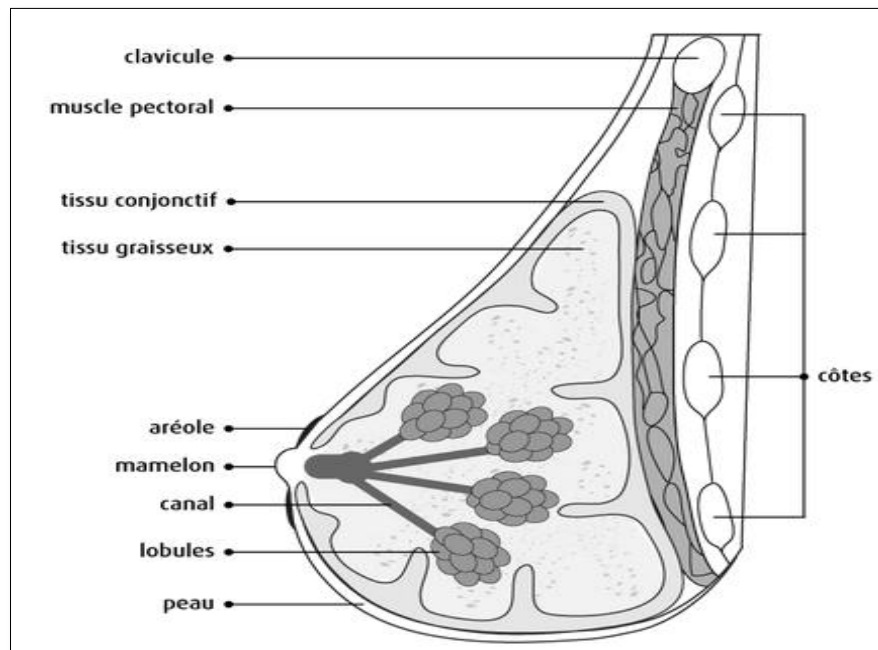


Figure 3. Schéma représentant l'anatomie de la glande mammaire. Tiré de (Société canadienne du cancer, 2014).

1.2.2 Développement de la glande mammaire

Le sein est un organe inhabituel, puisque la majorité de son développement se déroule après la naissance, sous l'effet des hormones (Sternlicht *et al.*, 2006). Le développement de la glande mammaire se fait en deux étapes distinctes de forte croissance, soit la puberté et la grossesse (Soyal *et al.*, 2002).

1.2.2.1 Développement au stade de la puberté

La puberté débute lorsque les ovaires commencent la sécrétion d'estrogènes et autres facteurs de croissances locaux (Ciarloni *et al.*, 2007). La signalisation de l'œstrogène permet, entre autres, la transcription de la progestérone (Briskin *et al.*, 2010). La production d'hormones, majoritairement l'estrogène, permet l'élongation des extrémités des canaux lactifères par les bourgeons terminaux, contenant des cellules ayant un haut potentiel de prolifération (Ciarloni *et al.*, 2007, Lange *et al.*, 2008). Ces bourgeons vont

pénétrer à travers le tissu conjonctif par ramification (Lange *et al.*, 2008). De plus, à chaque cycle menstruel, la hausse de progestérone induira la formation de branches tertiaires, ou bourgeons alvéolaires, qui se résorberont en l'absence de grossesse (Lange *et al.*, 2008).

1.2.2.2 Développement au stade de la grossesse et d'involution

En réponse aux hormones (l'estrogène, la progestérone, la prolactine, les corticostéroïdes, certains facteurs de croissance et autres, dont les concentrations varient en fonction de la phase de développement) induites par le déclenchement de la grossesse (l'implantation), l'épithélium de la glande mammaire subira une deuxième phase de prolifération et de différenciation intense (Lange *et al.*, 2008). Cela permettra de générer des alvéoles qui rempliront progressivement l'espace inter-lobules (Soyal *et al.*, 2002). Subséquemment, les cellules qui constituent les lobules vont se différencier pour devenir des sites de production de lait, un processus contrôlé par la signalisation du récepteur à la prolactine (Ciarloni *et al.*, 2007).

La phase d'involution (arrêt de la production de lait) sera accomplie par l'action des protéinases et une vague d'apoptose permettant d'amorcer le processus de remodelage des canaux et des lobules pour retrouver un phénotype pré-grossesse (Soyal *et al.*, 2002).

1.2.2.3 Développement en fonction des hormones

C'est seulement à partir de la puberté que le développement du sein sera en fonction des hormones (Briskin *et al.*, 2010). Chez les rongeurs, les ER α et ER β sont exprimés dans l'épithélium et dans le stroma de la glande mammaire (Daniel *et al.*, 1987). Dans l'épithélium, la forme α de ce récepteur permet de médier l'action de l'œstrogène, une hormone essentielle pour l'élongation des canaux lactifères et l'alvéologénèse (Mallepell *et al.*, 2006). À ce jour, le rôle physiologique de ER β n'est toujours pas bien compris (Briskin *et al.*, 2010). Toutefois, des études d'extinctions géniques chez les rongeurs démontrent que son absence dans la glande mammaire entraîne un délai d'élongation des canaux lactifères (Antal *et al.*, 2008). Cette observation pourrait être une conséquence d'une diminution de sécrétion de PRs, en lien avec une perturbation de la fonction des ovaires (Antal *et al.*, 2008, Briskin *et al.*, 2010). Les PRs, notamment les isoformes B sont également nécessaire pour ces deux dernières actions (Briskin *et al.*, 2010). Le récepteur à la prolactine est nécessaire pour l'alvéologénèse et la différenciation des cellules épithéliales en cellules productrices de lait (pendant la grossesse)(Briskin, 2002). Plusieurs autres facteurs contribuent au développement de la glande mammaire, incluant les facteurs de croissance ressemblant à l'insuline (IGF, «*insuline-like growth factor*»), les facteurs de croissance épidermiques (EGF, «*epidermal growth factor*»), les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF, «*fibroblast growth factors*»), les facteurs de croissance de transformation (TGF,«*transforming growth factor*») et plusieurs autres (Briskin *et al.*, 2010).

Le taux d'hormones sexuelles sanguin va grandement varier en fonction des stades de la vie (puberté, cycle menstruel, grossesse et ménopause) (Briskin *et al.*, 2010), la glande mammaire est donc un organe très dynamique, subissant plusieurs modifications (figure 4).

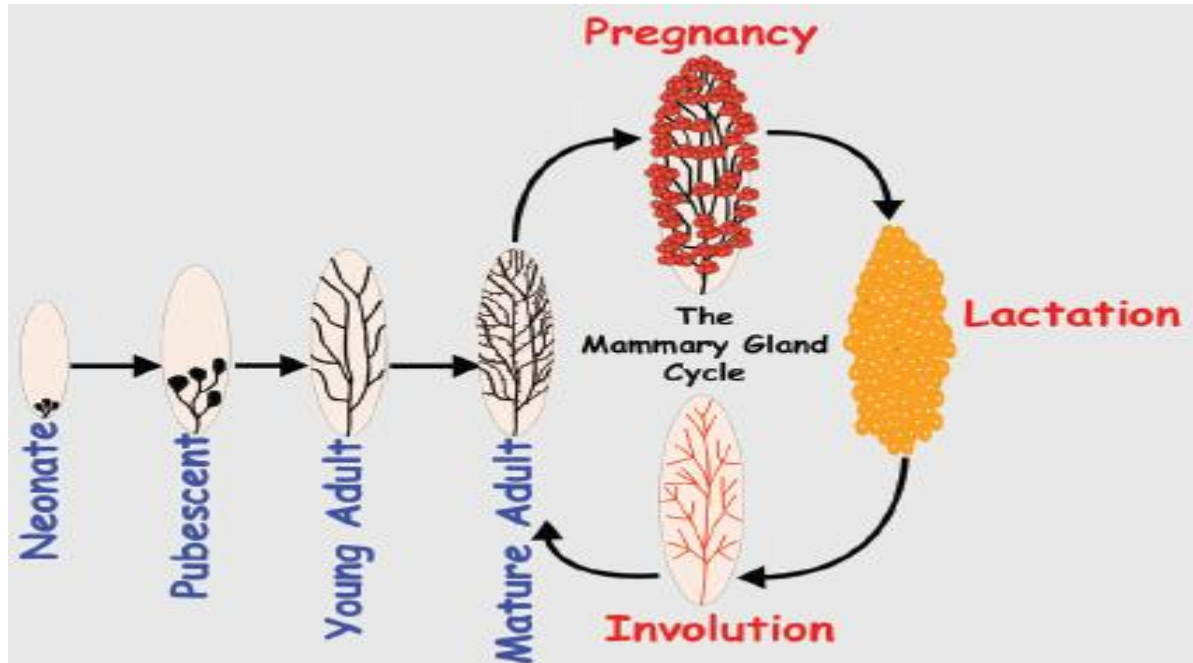


Figure 4. Schéma démontrant les modifications dans la glande mammaire en fonction de la période de la vie. La glande mammaire n'est pas développée à la période de nouveau-né (*neonate*). Le développement débute à la puberté (*pubescent*), lorsque les ovaires commencent la sécrétion en estrogènes et autres facteurs de croissance. À ce stade, les cellules des bourgeons vont subir des mitoses afin d'obtenir une élongation des canaux pour envahir le stroma. En arrivant à l'âge adulte (*young adulte*), il y a la croissance de nouveaux canaux et de bourgeons. Ceux-ci se développent au fil du temps en raison de l'exposition cyclique des stéroïdes ovariens (*mature adult*). À la grossesse, l'épithélium subira une prolifération et différenciation afin de former progressivement des alvéoles qui rempliront l'espace inter-canaux (*lactation*). La phase d'involution est lorsqu'il y a l'arrêt de la production du lait. Il y aura alors le déclenchement du processus de remodelage réductif à l'aide de protéinases et d'apoptose, permettant de retrouver un phénotype pré-grossesse. Modifié de (Soyal *et al.*, 2002).

1.2.3 Statistiques (2013) sur le cancer du sein

Depuis les années 80, le nombre de décès par le cancer du sein a drastiquement diminué au Canada, soit de plus de 42 % (Fondation canadienne du cancer du sein, 2014). Cela peut être en partie attribué aux techniques améliorées de dépistage, l'accès à la mammographie sur une période régulière et l'avancement de la recherche permettant de meilleurs traitements plus adaptés aux besoins du patient (Fondation canadienne du cancer du sein, 2014). En 2013, le taux de survie moyen relatif à cinq ans était de 88 % chez les Canadiennes (Fondation canadienne du cancer du sein, 2014).

Malgré ces données encourageantes, le cancer du sein reste le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les Canadiennes âgées de plus de 20 ans (Fondation canadienne du cancer du sein, 2014). Le cancer du sein est la deuxième cause de décès par cancer, après le cancer du poumon (Fondation canadienne du cancer du sein, 2014). Il est estimé qu'une Canadienne sur neuf développera un cancer du sein (environ 23 800 cas par année) et une sur 29 (environ 5000 cas par année) va décéder suite à cette maladie (Fondation canadienne du cancer du sein, 2014). Le risque de cancer du sein augmente avec l'âge; 82 % des cas sont retrouvés chez les femmes de plus de 50 ans (Fondation canadienne du cancer du sein, 2014). Chez les hommes, il y a moins d'un pourcent (environ 200 cas par année) des Canadiens qui ont été diagnostiqués avec un cancer du sein en 2013, dont la majorité a plus de 68 ans (Fondation canadienne du cancer du sein, 2014). Les types de cancer du sein chez les hommes sont semblables à ceux retrouvés chez les femmes postménopausées (Fondation canadienne du cancer du sein, 2014). Il a été démontré un risque plus élevé de cancer du sein chez les hommes ayant le syndrome de Klinefelter ou une cirrhose du foie, soit des conséquences amenant un plus bas taux d'androgènes et un plus haut taux d'estrogènes (Société canadienne du cancer, 2015). Certaines mutations génétiques, telles au niveau des gènes BRCA1 et BCR2 peuvent aussi être une cause de ce cancer (Fondation canadienne du cancer du sein, 2014).

Depuis la fin des années 1980, il y a eu une augmentation de diagnostic de cancer du sein (Fondation canadienne du cancer du sein, 2014). Cela peut être lié à l'amélioration des techniques de dépistages et/ou d'une population vieillissante (Fondation canadienne du cancer du sein, 2014). Il a été démontré qu'une femme ayant une puberté hâtive et une ménopause tardive aurait un risque plus élevé de développer un cancer du sein; ce risque serait lié à une exposition à l'estrogène sur une plus longue période de temps (Jenkins *et al.*, 2012). De manière inverse, l'incidence de ce cancer sera diminuée lors d'une puberté tardive avec une ménopause qui commence plus tôt (Jenkins *et al.*, 2012). De plus, des observations à long terme semblent indiquer un lien entre la transformation mammaire et une grossesse survenue plus tard dans la vie (Butt *et al.*, 2009). L'hypothèse derrière cette dernière observation serait que les femmes plus âgées ont plus de chances d'avoir des cellules initiées et que les hormones de grossesse favorisent la progression d'un cancer de ces cellules (Butt *et al.*, 2009).

1.2.4 Défis du cancer du sein

Il y a place à l'amélioration des traitements contre le cancer du sein, notamment les traitements personnalisés. De plus, il y a un besoin de plus d'études scientifiques vers une meilleure compréhension sur la prévention, le diagnostic, la progression et la récurrence des tumeurs ainsi que la résistance thérapeutique, afin de développer des outils de plus haute qualité (Polyak, 2007). Des avancés sur ces aspects sont tout un défi scientifique, puisque le cancer n'est pas une maladie au sens singulier, mais plutôt un ensemble de maladies hétérogènes au sens moléculaire et clinique (Polyak, 2007). Les tumeurs peuvent présenter de l'hétérogénéité intra- et inter-tumeurs, ce qui augmente les difficultés liées au traitement du cancer (Polyak, 2007). Ces variations peuvent être dues aux différents types de mutations que peuvent avoir subies une ou

plusieurs cellules au sein d'une même tumeur (Chin *et al.*, 2004). De plus, un nombre croissant d'études démontrent l'importance du microenvironnement entourant les cellules mammaires, telles que les cellules myoépithéliales et endothéliales, les fibroblastes, les myofibroblastes, les leucocytes et la matrice extracellulaire (Elenbaas *et al.*, 2001). Ces facteurs peuvent influencer la croissance, la survie, la polarité et le degré d'invasion des cellules cancéreuses (figure 5) (Bissell *et al.*, 2001, Polyak, 2007). Les signalisations entre les cellules épithéliales et mésenchymales sont importantes pour le bon développement et fonctionnement de la glande mammaire; elles peuvent être compromises et amener à la tumorigénèse (Polyak, 2007).

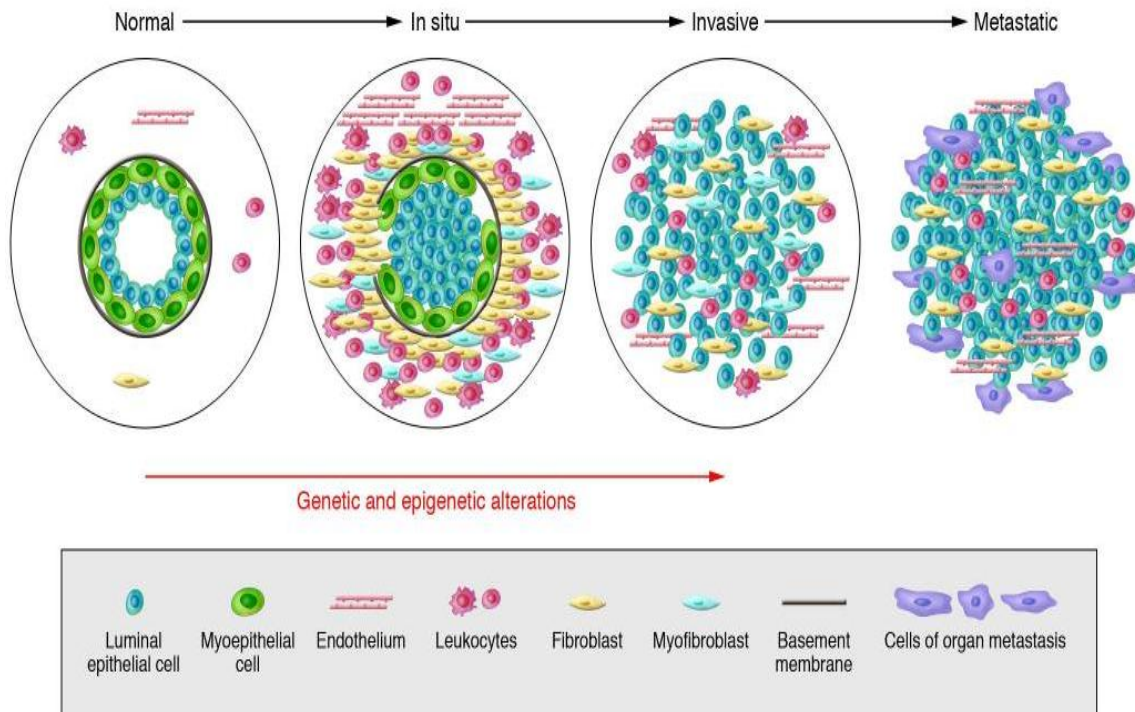


Figure 5. Vue schématique d'une cellule normale vers la progression d'un carcinome invasif et métastatique. Une accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques peut former des cellules cancéreuses *in situ* (dans le lobule). Il est alors possible d'obtenir une dégradation de la membrane basale. La perte de cette membrane aura comme conséquence l'invasion des cellules cancéreuses vers d'autres tissus, formant ainsi des métastases (Polyak, 2007).

Il y a plusieurs facteurs de risques attribuables au développement de cancer du sein, mais seulement 10 à 15 % des cas sont pour des raisons héréditaires (Jenkins *et al.*, 2012). Parmi les autres causes, une attention particulière est portée sur les molécules suspectées d'être des perturbateurs endocriniens. Ces types de perturbateurs peuvent causer des anomalies en mimant des hormones. Par exemple, la génistéine est connue pour son action œstrogénique (Messina *et al.*, 1994). Plusieurs études ont démontré un lien entre l'exposition à la génistéine et une diminution de la viabilité de divers types de cellules cancéreuses mammaires (Messina *et al.*, 1994). Cette molécule est aussi intéressante du fait qu'elle est bien connue pour ses effets d'altérations de mécanismes de régulation d'évènements épigénétiques (Messina *et al.*, 1994).

1.2.5 Les catégories de gènes dans le cancer

Les recherches ont conduit à la découverte de plusieurs gènes reliés au cancer, soit les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs (Osborne *et al.*, 2004).

1.2.5.1 Les oncogènes

Un proto-oncogène est un gène qui est impliqué dans le contrôle de la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire (Osborne *et al.*, 2004). Ces proto-oncogènes deviennent des oncogènes une fois qu'ils subissent une mutation ou donc l'expression a été altérée (Osborne *et al.*, 2004). Les oncogènes augmentent donc le risque de développer un cancer, dû à leurs signalisations aberrantes (Osborne *et al.*, 2004). Le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) (surexprimé dans 20-30% des cancers du sein invasifs), c-MYC (surexprimé dans 15-25% des tumeurs mammaires) et la cycline D1 (surexprimé dans 40-50% des cancers du sein invasifs) sont des exemples de proto-oncogènes qui, lorsqu'ils subissent une mutation, peuvent être impliqués dans le cancer du sein (Osborne *et al.*, 2004).

1.2.5.2 Les gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont importants pour la suppression de la prolifération cellulaire et pour promouvoir la différenciation et l'apoptose (Osborne *et al.*, 2004). Les gènes codant pour les protéines p53 (contrôle dans la progression du cycle cellulaire), p27 (inhibitrice de la kinase 1), *breast cancer 1 et 2* (BRCA1/2, rôle dans la réparation de l'ADN), *phosphatase and tensin homolog* (PTEN, contrôle dans la progression du cycle cellulaire) et rétinoblastome (Rb, contrôle dans la progression du cycle cellulaire) sont des exemples de gènes suppresseurs de tumeurs associés au cancer du sein (Osborne *et al.*, 2004).

1.2.5.3 Les gènes suppresseurs de métastases

Une classe récente a été ajoutée, soit les gènes suppresseurs de métastases. Ce sont des gènes qui inhibent la formation de métastases (sans avoir d'effet sur la croissance de la tumeur primaire) (Bodenshtein *et al.*, 2008). Par exemple, il a été démontré qu'une inhibition du gène suppresseur de métastases de cancer du sein 1 (BRMS1, «*breast cancer metastasis suppressor 1*») favorise la formation de métastases à partir de la tumeur primaire du sein (Bodenshtein *et al.*, 2008).

Une meilleure compréhension du profil génétique et épigénétique des différents types de cancers du sein permettrait de développer des meilleurs outils pour le développement de traitements personnalisés et ainsi d'augmenter l'efficacité thérapeutique.

1.2.6 Les stades du cancer du sein

Le cancer du sein peut être classifié selon cinq stades (figure 6). Le stade zéro est lorsque la tumeur est retrouvée dans le tissu d'origine (dans le canal ou le lobule du sein); c'est alors une tumeur *in situ* (Khan *et al.*, 2012). À ce stade, la tumeur a peu de répercussions néfastes sur les cellules voisines ou le tissu (Khan *et al.*, 2012). Le stade un est lorsque la tumeur a un diamètre inférieur à deux centimètres et se retrouve dans le tissu d'origine, mais sortie du canal ou du lobule (Khan *et al.*, 2012). À ce stade, la

tumeur commence à avoir une plus grande influence sur les cellules voisines et/ou le tissu (Khan *et al.*, 2012). Au stade deux, la tumeur a atteint une grosseur entre deux et cinq centimètres, causant de l'inflammation et/ou a atteint les ganglions lymphatiques (Khan *et al.*, 2012). Le stade trois est défini par l'atteinte aux ganglions lymphatiques et/ou aux tissus voisins (Khan *et al.*, 2012). Finalement, le stade quatre est caractérisé par la présence de métastases provenant de la tumeur primaire (Khan *et al.*, 2012).

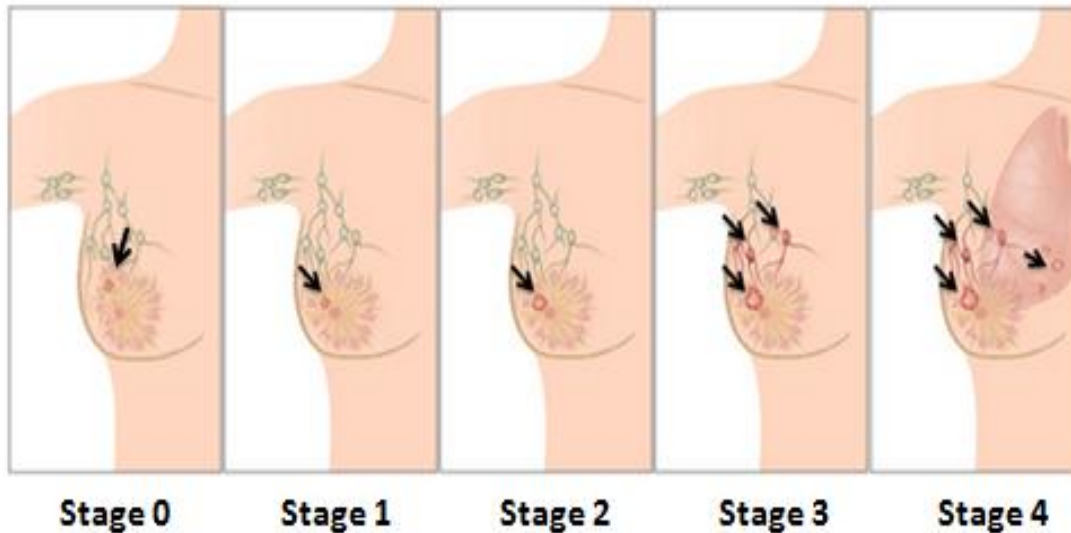


Figure 6. Schéma démontrant les différents stades de cancer du sein. Les flèches noires pointent les tumeurs (rouges). Le stage zéro est lorsque la tumeur est retrouvée dans le lobule ou le canal. Le stade un est lorsque la tumeur a une taille inférieure de deux centimètres et est uniquement retrouvée dans le tissu d'origine. Le stade deux est lorsque la tumeur a atteint un diamètre de deux centimètres ou plus et/ou a atteint les ganglions lymphatiques. Au stade trois, la tumeur a atteint les ganglions lymphatiques. Le stade quatre est lorsqu'il y a la propagation du cancer par la formation de métastases. Modifié de (La société du cancer du sein du Canada, 2014)

1.2.7 Les grades du cancer du sein

Le cancer du sein peut également être classifié en grade un, deux et trois (Fondation cancer du sein du Québec, 2014). Suite à une biopsie des tissus, différentes caractéristiques cellulaires seront analysées (Fondation cancer du sein du Québec, 2014). Le grade un est défini par une atypie nucléaire (index de ploïdie) et des mitoses rares (Fondation cancer du sein du Québec, 2014). Les cellules ont une chance minime de se propager à ce grade. Au grade deux, on observe une atypie nette et une à trois mitoses par champs de vision de microscope (Fondation cancer du sein du Québec, 2014). Les tissus de grade trois ont typiquement des cellules dédifférenciées avec un haut potentiel de propagation (Fondation cancer du sein du Québec, 2014).

1.2.8 Les sous-types de cancer du sein

Bien que les grades et stades soient encore largement utilisés pour fin de diagnostic, on utilise de plus en plus des marqueurs moléculaires pour qualifier les tumeurs. En fonction du profil moléculaire des cellules cancéreuses, le cancer du sein peut être

classé en différents sous-types. Ces marqueurs sont d'ailleurs utilisés afin de sélectionner une thérapie ciblée selon le sous-type de la tumeur. Il a été suggéré que ces différents sous-types puissent être initiés par différents types de cellules ou d'une cellule unique (figure 7) (Khan *et al.*, 2012). Selon cette classification, quatre grands sous-types de tumeurs ont été identifiés.

1.2.8.1 Cancer de type luminal

Les cancers de types luminal A (statistiquement, associés avec le meilleur pronostic) et luminal B, sont dépendant de l'œstrogène (Khan *et al.*, 2012). Les cancers de type luminal A sont caractérisés par une expression des ERs et/ou des PRs et des HER2, ainsi qu'un faible index de Ki67 (Suzan G, 2014). La protéine Ki67 est fortement exprimée dans les cellules en division (phase S), mais absente dans la phase G0, ce qui en fait un bon marqueur de cellules en prolifération (Suzan G, 2014). Les cellules de type luminal B, sont caractérisées comme suit : ER+ et/ou PR+, HER2+ (ou HER2-) et ont un index Ki67 élevé (Suzan G, 2014). Il y a une prévalence de 40 % de femmes ayant un cancer du sein de type luminal A et 20 % de type luminal B (Suzan G, 2014).

Plusieurs médicaments utilisés pour traiter le cancer du sein fonctionnent en perturbant la signalisation de l'œstrogène, tels des inhibiteurs de l'aromatase (anastrozole, letrozole), des antagonistes d'ER (tamoxifène) et des molécules favorisant la dégradation d'ER (fulvestrant) (Fowler *et al.*, 2007). De façon similaire, différents médicaments ciblant les PRs (en empêchant la liaison des co-régulateurs de la voie génomique) ont été testés en étude clinique, tels le *mifepristone* et l'*onapristone* (Lange *et al.*, 2008). Ainsi, les patients présentant des cancers de type luminal peuvent bénéficier d'une thérapie ciblée.

1.2.8.2 Cancer avec enrichissement en HER2

Les sous-types de tumeurs avec un enrichissement en HER2 sont ER-, PR- et HER2+ (Suzan G, 2014). Il y a une prévalence de 10-15% de ce type de cancer (Suzan G, 2014). Des études approfondies supportent le rôle des kinases dans la transduction de signaux et dans l'implication de tumeurs malignes, incluant le cancer du sein (Roskoski, 2014). Depuis 2003, il y a eu le développement de molécules inhibitrices de protéines kinases en aval des signalisations d'EGFRs, telles le lapatinib, le pertuzumab et le trastuzumab, soit toutes des molécules approuvées par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux pour le traitement de cancers (FDA, «*US Food and Drug Administration*») (Roskoski, 2014). Ces molécules se sont avérées très efficaces pour le traitement des cancers HER2+.

1.2.8.3 Cancer de type triple négatif

Les cancers de type triple négatif n'expriment pas ER, PR ou HER2 (Suzan G, 2014). C'est un type de cancer qui est souvent agressif avec un mauvais pronostic et une prévalence de 15-20% (Suzan G, 2014). De plus, aucune thérapie ciblée n'est présentement disponible pour ces patients.

1.2.8.4 Cancer de type normal

Environ 10% des cancers sont de type «normal» (Suzan G, 2014). Ce type de cancer est associé à un bon pronostic (Suzan G, 2014). Il n'est toujours pas clair si ce type de cancer est associé à un type moléculaire distinct (Suzan G, 2014). Souvent, ce sont des tumeurs qui n'ont pas pu être catégorisées par un manque de cellules cancéreuses (Suzan G, 2014).

Puisque les marqueurs ER, PR et HER2 sont utilisés pour catégoriser le cancer du sein, une bonne compréhension de leurs rôles dans cette maladie est importante.

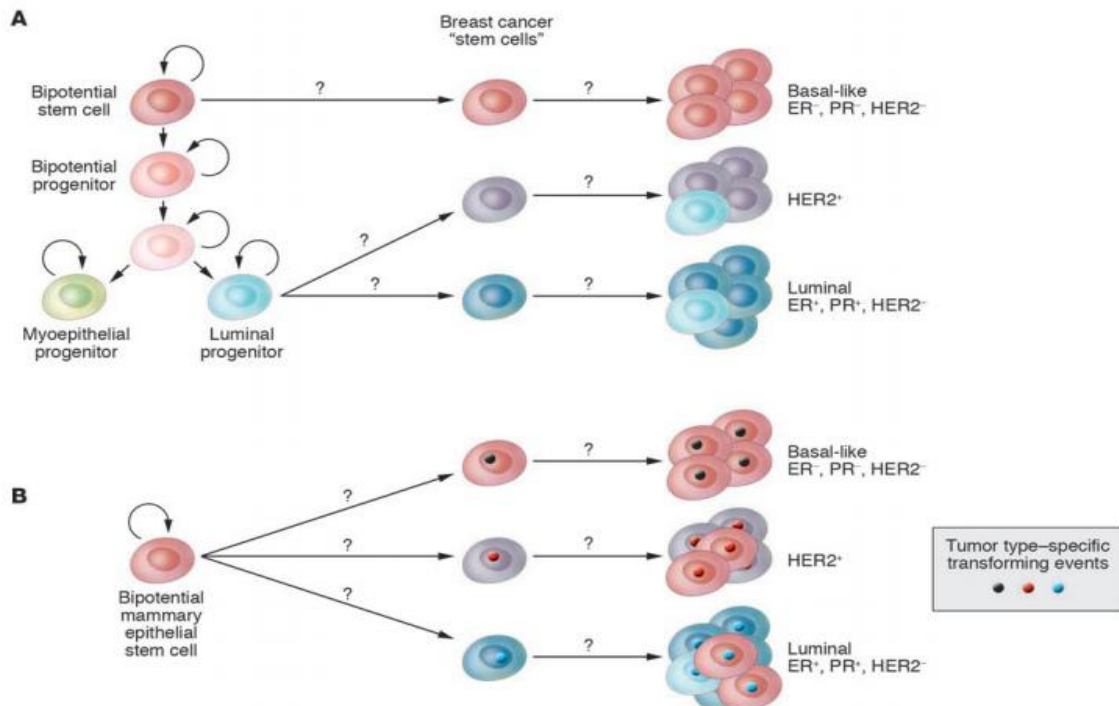


Figure 7. Modèles hypothétiques sur l'origine et le développement des sous-types de tumeurs mammaires. A) Modèle représentant la théorie que chaque sous-type de tumeurs est initié à partir d'un différent type de cellule (souche ou progénitrice). B) Modèle représentant la théorie que différents sous-types de tumeurs peuvent se développer à partir d'une même cellule, mais que leur phénotype découle des variations génétiques et épigénétiques acquises. Le cancer de type normal n'est pas illustré, car peu est connu sur type de cancer. Tiré de (Polyak, 2007).

1.3 Les récepteurs de facteur de croissance épidermique (EGFRs)

Les récepteurs de facteur de croissance épidermique (EGFR, «*epidermal growth factor receptor*») sont exprimés de manière ubiquitaire dans les cellules épithéliales, mésenchymales, cardiaques et neuronales (Roskoski, 2014). L'activation des EGFRs permet le déclenchement d'un grand nombre de signalisations via des kinases (Roskoski, 2014). Ces signalisations permettent la régulation d'un bon nombre de

signaux cellulaires, incluant l'apoptose, la progression du cycle cellulaire, la différenciation et la transcription de gènes (Roskoski, 2014). Les protéines kinases représentent donc une cible thérapeutique importante; leur dérégulation a lieu dans plusieurs maladies, incluant le cancer (Roskoski, 2014).

1.3.1 Les membres d'EGFRs et leurs ligands

La famille des EGFRs est constituée de quatre membres, soit HER1 (EGFR/ERBB1), HER2 (ERBB2/NEU), HER3 (ERBB3) et HER4 (ERBB4) (Roskoski, 2014). À ce jour, onze ligands sous forme de polypeptides ont été identifiés pour ces récepteurs, divisés en quatre groupes (Roskoski, 2014). Le groupe I renferme les ligands qui se lient aux HER1, soit certains EGFs, l'épigène (EPG), le facteur de croissance de transformation α (TGF α) et l'amphiréguline (AREG) (Roskoski, 2014). Les ligands du groupe II, soit la bétacelluline (BTC) et l'épireguline (EPR), ont la capacité de lier les HER1 et HER4 (Roskoski, 2014). Le groupe III inclut les ligands qui peuvent se lier aux HER3 et HER4, tels la neuréguline-1 et 2 (Nrg-1/2) (Roskoski, 2014). Finalement, les ligands du groupe IV ne peuvent que se lier au HER4, comme les Nrg-3/4 (Roskoski, 2014). Avec plusieurs variations, comme le type et le nombre de ligands liés, les nombreuses options de formation d'hétérodimères et l'implication des protéines cytoplasmiques effectrices de signalisations en aval, les EGFRs sont responsables d'une grande diversité de signaux cellulaires (Atalay *et al.*, 2003, Harari *et al.*, 2000).

1.3.2 Structure et activation des EGFRs

Les EGFRs ont un domaine extracellulaire contenant le domaine de liaison à un ligand (DLL), un segment hydrophobe transmembranaire et un domaine intracellulaire avec une activité à tyrosine kinase (Roskoski, 2014). Tous les membres EGFRs possèdent un domaine tyrosine kinase, à l'exception d'HER3 (Shi *et al.*, 2010). Néanmoins, ce dernier possède des sites de liaison pour le phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dans son domaine intracellulaire (Atalay *et al.*, 2003). Le membre HER2 est celui qui est le plus souvent retrouvé en complexe avec un autre membre, fréquemment avec HER3 (Atalay *et al.*, 2003). Il a été suggéré que la dimérisation serait induite par l'interaction d'un ligand avec les deux récepteurs, amenant à une réticulation efficace pour la formation du complexe (Lemmon *et al.*, 2010). Une autre option serait que deux récepteurs et deux ligands contribuent directement à l'interface de dimérisation (Roskoski, 2014). Une fois lié par son ligand, le domaine cytoplasmique catalyse la phosphorylation des résidus tyrosines (Roskoski, 2014). Il y aura alors création des sites d'amarrages pour d'autres protéines adaptatrices ou d'enzymes faisant parties des signalisations en aval (Roskoski, 2014). Cette action de phosphorylation s'effectue en trans; le premier membre du dimère induit la phosphorylation du second et vice-versa (Roskoski, 2014). L'activation de cette famille de récepteurs peut déclencher une myriade de voies de signalisations en aval, tels que l'activation du transducteur de signaux et activateur de transcription (STAT, «*signal transducers and activators of transcription*»), les protéines kinases activées par des mitogènes (MAPKs, «*mitogen-activated protein kinases*») et PI3K (figure 8) (Wang *et al.*, 2012).

1.3.3 Signaux d'EGFRs en fonction du transport cellulaire

Suite à son induction par un ligand, il y aura une endocytose du récepteur/ligand par des vésicules transporteurs de protéines (Wang *et al.*, 2012). Via les endosomes hâtifs, les EGFRs peuvent être recyclés et retournés à la membrane plasmique ou progresser dans les endosomes tardifs afin de se faire dégrader via les lysosomes (Wang *et al.*, 2012). Récemment, il a aussi été démontré que ces récepteurs peuvent se rendre dans la mitochondries et le noyau (Wang *et al.*, 2012).

1.3.3.1 Les EGFRs dans les mitochondries

Dans les mitochondries, les EGFRs peuvent s'associer avec la sous-unité oxydase II du cytochrome c (Boerner *et al.*, 2004, Demory *et al.*, 2009). Le cytochrome c est une composante clé dans la cascade de phosphorylation oxydative pour la régulation de l'apoptose par son relâchement de la mitochondrie (Boerner *et al.*, 2004). Il est donc possible que les EGFRs contribuent à la survie cellulaire en modulant la fonction des mitochondries (Wang *et al.*, 2012).

1.3.3.2 Les EGFRs dans le noyau

Il a été suggéré que le transport rétrograde permet la régulation de la translocation nucléaire des EGFRs par l'intermédiaire de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique (RE) (Wang *et al.*, 2010). De plus, chaque membre a un domaine de signal de localisation dans le noyau (SLN) (Wang *et al.*, 2012). Des évidences démontrent que les EGFRs nucléaires peuvent être impliqués dans la régulation transcriptionnelle, la prolifération, la réplication et la réparation de l'ADN et la résistance aux traitements de chimiothérapie et de radiation (Dittmann *et al.*, 2010). Ces fonctions impliqueraient leur association avec l'ARN polymérase I et des facteurs de transcription (comme E2F1, STAT3, STAT5A) afin d'aider à l'expression des gènes impliqués dans la tumorigénèse, l'instabilité chromosomique et la résistance à la chimiothérapie (Wang *et al.*, 2012). La localisation nucléaire de ces récepteurs est donc considérée comme étant associée avec un mauvais pronostic pour plusieurs types de cancers, incluant le cancer du sein (Wang *et al.*, 2012).

1.3.4 Signalisations des EGFRs

Suite à la phosphorylation des tyrosines des EGFRs, il y a aura recrutement de la protéine 2 liée au récepteur de facteur de croissance (Grb2, «*growth factor receptor-bond protein 2*»), qui permet ensuite le recrutement de la protéine activatrice de *rat sarcoma* (Ras), soit *son-of-sevenless guanine nucleotide exchange factor* (SOS) (Atalay *et al.*, 2003). La protéine SOS pourra recruter Ras en facilitant son changement d'état d'inactif (par une liaison avec guanine-diphosphate (GDP)) à actif (par une liaison avec guanine triphosphate (GTP)) par une hydrolyse à l'aide de l'activité intrinsèque de la GTPase (Atalay *et al.*, 2003). La kinase Ras est une intermédiaire clé dans la transduction de plusieurs signaux cellulaires (Atalay *et al.*, 2003)

1.3.4.1 Les signalisations de Ras

Ras-GTP peut activer plusieurs protéines effectrices de signalisations en aval, dont la kinase proto-oncogène à sérine/thréonine (RAF-1) et la protéine kinase kinase activée par des mitogènes (MEK, «*mitogen-activated protein kinase kinase*») (Atalay et al., 2003). Raf-1 peut phosphoryler MEK-1 et -2, qui à leur tour, phosphorylent d'autres MAPKs, dont la kinase régulatrice par signaux extracellulaires (ERK1 et -2, «*extracellular signal regulated kinases*») (Atalay et al., 2003). Une fois activées, les ERK1 et -2 vont subir une translocation nucléaire afin de phosphoryler une variété de substrats (Atalay et al., 2003). Parmi ces substrats, il y a des facteurs de transcription permettant la transcription de gènes liés à la prolifération cellulaire (Atalay et al., 2003). MEK est une phosphatase de sérines/thréonines qui peut activer un autre membre des MAPKs, soit Jun N-terminale kinase (JNK) via la protéine kinase active par le stress (SEK, «*stress-activated protein kinase*») (Atalay et al., 2003). JNK peut à son tour activer le facteur de transcription nucléaire c-Jun, soit un composant majeur de la protéine activatrice 1 (AP-1, «*activator protein 1*») (Atalay et al., 2003). L'autre composant d'AP-1, soit c-Fos, est activé par autres MAPKs à travers les signalisations des EGFRs (Atalay et al., 2003). Ces cascades d'activation sont associées avec l'induction de l'apoptose et/ou la prolifération (Atalay et al., 2003).

1.3.4.2 Signalisation entre les EGFRs et les ERs

Il a été suggéré que les EGFRs peuvent directement ou indirectement activer les ERs via les MAPKs (Bunone et al., 1996). Les MAPKs en aval des EGFRs activés peuvent activer ER en le phosphorylant de manière ligand-dépendant au niveau des sérines-118 et -167 ou par le recrutement de co-activateurs d'ER (Kato et al., 1995). La forme activée d'ER α peut à son tour se lier avec PI3K et activer la signalisation des kinases PI3K/AKT, soit une signalisation en aval des EGFRs activés (Campbell et al., 2001). Cette rétroaction peut possiblement être le reflet de signaux endocrines et paracrines cruciaux pour le bon développement de la glande mammaire et impliqués dans le processus de la tumorigénèse (Harari et al., 2000).

1.3.4.3 Les signalisations de la voie de PI3K

Les enzymes de la famille de PI3K sont liées à plusieurs aspects de la transformation maligne, incluant la prolifération, la croissance, la motilité, l'invasion, la formation de métastases, l'angiogénèse et la survie cellulaire (Atalay et al., 2003). L'activation de PI3K peut se faire via la stimulation d'EGFRs (Atalay et al., 2003). Suite à son activation, PI3K pourra phosphoryler le *inositol ring of membrane phatidylinositols* (PIP2) en PIP3, ce qui recrutera plusieurs protéines à la membrane cellulaire, dont Akt (ou protéine kinase B) (Atalay et al., 2003). La protéine Akt est impliquée dans la régulation de plusieurs protéines importantes pour le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et la survie cellulaire (Atalay et al., 2003). Par exemple, elle permet de réguler l'activité du facteur nucléaire- KB (NF-KB, «*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*»), de certaines caspases, de la protéine promoteur de mort associée à Bcl-2 (BAD, «*Bcl-2-associated death promoter*») et de *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (Atalay et al., 2003). Ce dernier est une kinase liée à la stimulation mitogénique par l'induction de la synthèse de protéines impliquées dans la régulation de cycle cellulaire

(Atalay *et al.*, 2003). De plus, Akt peut phosphoryler des protéines qui sont reliées de près au cancer du sein, tels BRCA1 et ER α (Atalay *et al.*, 2003). La signalisation d'Akt sera inhibée à l'aide de phosphatases, tel le suppresseur de tumeur PTEN (Atalay *et al.*, 2003).

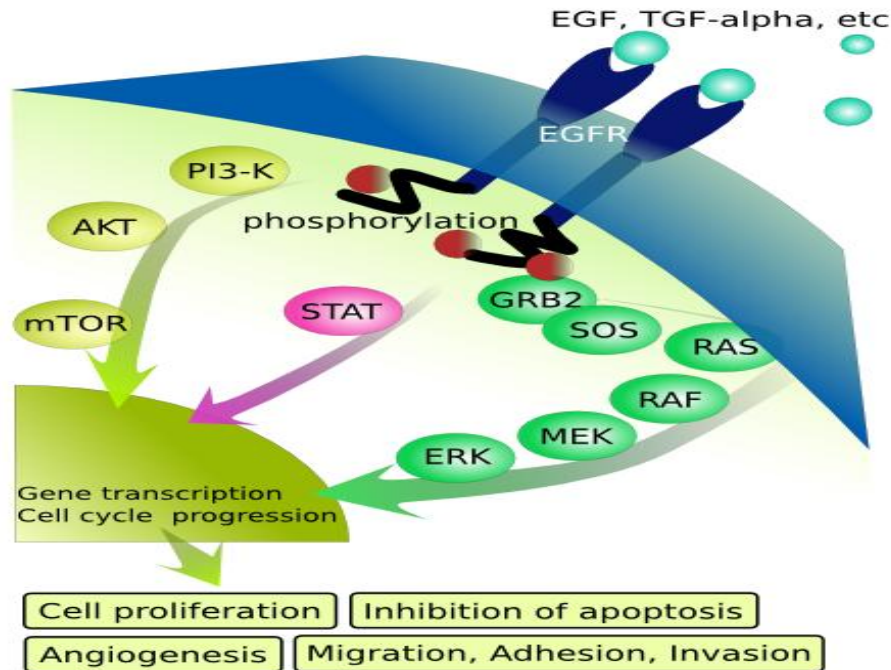


Figure 8. Schéma simplifié des signalisations induites par les EGFRs suite à leur activation par un ligand. Les ligands d'EGFRs peuvent activer les récepteurs par une liaison avec leur domaine extracellulaire. L'activation permettra l'autophosphorylation du domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. Cette activité permettra le recrutement des protéines adaptatrices GRB2 et SOS. Ces deux dernières pourront alors activer la protéine RAS, qui à son tour, activera autres kinases. L'activation de ces récepteurs peut aussi activer la voie de PI3K/AKT. Ces cascades de signalisations aura comme réponse finale la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, l'inhibition de l'apoptose, le déclenchement de l'angiogénèse, la migration, l'invasion et autres processus cellulaires favorisant le cancer. Tiré de (Atalay *et al.*, 2003, Wikipedia, 2014).

1.3.5 Les EGFRs dans le cancer du sein

Les signalisations par la famille des EGFRs sont importantes pour le développement normal de la glande mammaire (Briskin *et al.*, 2010). Lors d'une expérience de mutagenèse ciblée pour inactiver les EGFRs dans les glandes mammaires des souris, il a été démontré que ces protéines sont nécessaires pour l'élongation des canaux lactifères et la formation des branches tertiaires (Wiesen *et al.*, 1999). Un contrôle sur l'expression de ces récepteurs et la durée de signalisation est donc très important afin d'éviter une prolifération soutenue de la cellule.

L'expression aberrante des EGFRs peut mener à des comportements de tumeurs agressives, tels une accélération dans la croissance des cellules, la formation de métastases et la résistance aux traitements de chimiothérapie (Wang *et al.*, 2012).

1.3.5.1 Les HER2 dans le cancer du sein

La protéine HER2 est surexprimée dans 20-30% des tumeurs mammaires (Atalay *et al.*, 2003). La dimérisation d'HER2/3 est associée à un grand potentiel mitogénique (Atalay *et al.*, 2003). Dans le cancer du sein, cet hétérodimère est souvent constitutivement actif (Atalay *et al.*, 2003). Normalement, le signal est rapidement inactivé par plusieurs méthodes : la dissociation du complexe récepteur-ligand, la déphosphorylation du récepteur activé ou l'internalisation rapide dans des endosomes suivi d'une dégradation via les lysosomes (Harari *et al.*, 2000). Cependant, lorsqu'HER2 est surexprimé, des signalisations via les MAPKs sont prolongées significativement (Harari *et al.*, 2000). De plus, une surexpression d'HER2 est souvent accompagnée d'une augmentation d'affinité avec plusieurs ligands et un recyclage accru à la membrane (Harari *et al.*, 2000). Ces événements permettent d'accroître son activité en tant que facteur de transcription. Cette sur-activité peut permettre, entre autres, une surexpression de la cycline D1 (Harari *et al.*, 2000). Cette protéine, une contributrice importante pour la progression du cycle cellulaire, peut être transcrite de manière dépendante à l'activité d'EGFRs (Bartkova *et al.*, 1994) et est surexprimée dans environ 40 % des cas de cancer du sein (Bartkova *et al.*, 1994).

Une signalisation anormale d'HER2 peut être liée à des protéines de signalisations en aval, telles les kinases Rase et Akt. Par exemple, une surexpression en Akt, concordant avec l'amplification d'HER2, a été observée (Atalay *et al.*, 2003). Il a été démontré que les protéines AKT-2 et -3 sont impliquées dans des tissus humains de cancer du sein (Atalay *et al.*, 2003). Un autre exemple est qu'une mutation dans le gène codant pour la protéine Ras menant à la génération de mutants constitutivement actifs, et ce, même en absence de stimulus (Atalay *et al.*, 2003). La présence de ces mutants résulte en une prolifération incontrôlable (Atalay *et al.*, 2003). Il est estimé qu'une mutation de la sorte est retrouvée dans environ 30 % des cancers du sein (Atalay *et al.*, 2003).

1.4 Le récepteur à l'œstrogène (ER)

L'œstrogène joue un rôle clé dans le développement et le maintien des fonctions sexuelles et de reproduction (Heldring *et al.*, 2007). La forme d'œstrogène ayant l'activité la plus puissante est le 17 β -œstradiol (E2) (Heldring *et al.*, 2007). Les signalisations d'E2 se font via deux récepteurs, ER α et ER β (Heldring *et al.*, 2007). ER α est retrouvé dans plusieurs tissus, mais de manière prédominante dans les ovaires, l'hypophyse, l'utérus, les reins, les os, les tissus adipeux, les organes reproducteurs males (l'épididyme et la prostate) et la glande mammaire (Diel, 2002, Paterni *et al.*, 2014). ER α est également important au niveau de la préservation de l'homéostasie du squelette et dans la régulation du métabolisme (Paterni *et al.*, 2014). Une déficience en ER α peut être associée avec l'ostéoporose, l'artériosclérose et le processus de dégénération du système nerveux central (Diel, 2002).

À l'inverse, une expression à la hausse est associée avec le développement de tumeur dans le sein et l'endomètre (Diel, 2002, Paterni *et al.*, 2014). ER β est également retrouvé dans plusieurs tissus, tels la prostate, les ovaires, les poumons, la vessie, la glande mammaire et certains organes reproducteurs mâles (Diel, 2002, Paterni *et al.*, 2014).

1.4.1 Les isoformes

C'est en 1962 que fut découvert ER α par Elwood Jensen (Jensen, 1962). L'isoforme β a été découverte qu'environ trois décennies plus tard (1996) (Kuiper *et al.*, 1996). Les deux formes d'ERs, issues de chromosomes distincts, partagent un haut degré d'homologie, ont une affinité similaire pour E2 et peuvent lier les mêmes éléments de réponse à l'ADN (Heldring *et al.*, 2007).

1.4.1.1 Les isoformes d'ER α

Par l'épissage alternatif, trois isoformes de ER α sont produites chez l'humain, soit ER α , ER α -46 et ER α -36 (Heldring, *et al.*, 2007). La différence se situe au niveau des régions non traduites (UTR, «5'-untranslated region») et non dans une séquence codante (Heldring *et al.*, 2007). L'isoforme d'ER α ayant la forme la plus longue (67kDa) exerce les fonctions médiées par l'E2 (Heldring *et al.*, 2007). Les fonctions des deux plus petites isoformes (46 et 36 kDa) ne sont pas encore bien comprises (Heldring *et al.*, 2007).

1.4.1.2 Les isoformes d'ER β

Il y a cinq isoformes connues d'ER β ; ER β , ER β 2, ER β Δ exon 5, ER β 4 et ER β 5 (Heldring *et al.*, 2007). Bien que chacune d'elles aient été identifiées, leurs fonctions respectives restent à être élucidées (Heldring *et al.*, 2007). Il est connu que ces isoformes modulent différemment la signalisation à l'œstrogène (Heldring *et al.*, 2007). Par exemple, ER β 2 n'a pas de DLL, mais peut se dimériser avec ER α afin de modifier sa signalisation (Heldring *et al.*, 2007).

1.4.2 La signalisation classique des ERs

Les ERs sont membres de la famille des facteurs de transcription nucléaires (Heldring *et al.*, 2007). Suite à sa synthèse dans le cytosol, ER est rapidement amené et entreposé dans le noyau sous forme inactive, mais prête pour l'activation (Diel, 2002). Sa conformation sera maintenue par son association avec des protéines de chocs thermiques (HSP, «*heat shock protein*»), tels les HSP90 et HSP56 (Diel, 2002). Une fois activé par son ligand (E2), ER va rapidement se dissocier des HSPs et des co-répresseurs afin de s'associer avec des co-activateurs (Diel, 2002). Il y aura aussi la formation d'un homodimère par une interaction protéine-protéine entre deux monomères d'ER (Diel, 2002). Ce dimère est requis pour une haute affinité de liaison avec l'ADN au niveau des éléments de réponse à l'œstrogène (ERE, «*estrogen response element*») dans les promoteurs de gènes cibles (Diel, 2002). Avec le recrutement des co-régulateurs, le complexe pourra altérer la structure de la chromatine et ainsi faciliter le recrutement de l'ARN polymérase II (Heldring *et al.*, 2007).

Les structures entre les différents sous-types et isoformes des ERs sont très semblables les unes des autres, notamment au niveau des domaines de liaison à l'ADN et donc aux ligands qu'ils peuvent s'y lier (Heldring *et al.*, 2007). Les différences de structures se situent dans la section N-terminal des récepteurs (Heldring *et al.*, 2007). Il semble que la cavité du DLL d'ER est large, ce qui permet sa liaison avec un éventail de molécules (Bolger *et al.*, 1998). Par exemple, les ERs peuvent lier des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des phtalates et des pesticides (Bolger *et al.*, 1998). La conformation du récepteur sera modifiée en fonction du ligand, ce qui influencera le recrutement d'un patron distinct en co-activateurs/répresseurs (Diel, 2002, Heldring *et al.*, 2007). La réponse transcriptionnelle de ce récepteur est également en fonction du type de cellule, des co-régulateurs disponibles, des caractéristiques des promoteurs des EREs et des autres voies de signalisations activées parallèlement (Heldring *et al.*, 2007). Par exemple, la voie d'ER peut activer la transcription du PR, le récepteur du facteur de croissance de l'insuline (IGF-1R, «*insuline-like 1 growth factor receptor*»), la cycline D1, c-MYC, TGF- β et la protéine inhibitrice 1 de kinases dépendantes de cyclines (p21) (Heldring *et al.*, 2007). De plus, les ERs peuvent être responsables de la transcription de nombreux gènes n'ayant pas d'ERE par leur association avec autres facteurs de transcription (Ap-1, protéine de spécificité 1 (Sp1. «*specificity protein*»), *forkhead box* (Fox), NF-KB et autres) (Heldring *et al.*, 2007).

1.4.3 Les signalisations non-classiques des ERs

Il a été démontré que les réponses à l'E2 peuvent être très rapides, à savoir en quelques secondes ou minutes (Heldring *et al.*, 2007). Ces observations éliminent la possibilité du temps de synthèse de protéines via la voie classique, qui requiert plusieurs heures (Heldring *et al.*, 2007). Bien que controversé, des analyses par spectrométrie de masse indiquent qu'il y a une proportion d'environ trois pourcent d'ER α (67kDa) à la membrane plasmique des cellules épithéliales de la glande mammaire (Diel, 2002, Heldring *et al.*, 2007, Song *et al.*, 2006). Les ERs membranaires semblent induire des signaux cellulaires qui sont traduits par l'activation de plusieurs molécules, telles IGFR-1R, EGFR, p21, RAS, MAPK, AKT et autres (Song *et al.*, 2006).

ER α n'a pas de domaine intrinsèque kinase ou transmembranaire; il doit donc pouvoir stimuler l'activité d'autres kinases, tel c-SRC, afin d'engendrer la phosphorylation de ses cibles (Song *et al.*, 2006). La protéine c-SRC peut se lier avec ER α et agir comme adaptatrice de complexe d'interaction protéine-protéine (Song *et al.*, 2006). En effet, les ER α membranaires se retrouvent dans le centre d'un large complexe protéique (Song *et al.*, 2006). Ce complexe semble avoir un rôle critique dans l'initiation d'actions rapides d'E2 par l'intermédiaire de kinases cytoplasmiques afin d'influencer les actions des protéines co-activatrices en aval (Song *et al.*, 2006). Ces co-activateurs vont ensuite voyager dans le noyau et moduler les événements transcriptionnels dépendants d'ER α via des signalisations croisées avec autres molécules (Song *et al.*, 2006). Il a été démontré que les protéines c-SRC, PI3K et les protéines G font parties du gros complexe d'ER α (Song *et al.*, 2006).

La kinase c-SRC peut, entre autres, agir comme adaptateur pour l'interaction d'ER α et IGF-1R, afin que ce dernier puisse être phosphorylé et activé (Song *et al.*, 2006). Le récepteur IGF-1R est impliqué dans la croissance de cellules cancéreuses du sein et son expression semble être positivement corrélée avec l'expression d'ER α dans ce cancer (Song *et al.*, 2006). Suite à l'activation d'IGF-1R, certaines métalloprotéinases matricielles (MMPs, «*matrix metalloproteinases*») sont activées, ce qui résulte en un relâchement de ligands d'EGFRs, permettant l'activation de leurs récepteurs (Song *et al.*, 2006). L'activation d'EGFRs peut ensuite déclencher la cascade des MAPKs et PI3K, facilitant la croissance et la migration des cellules épithéliales (Heldring *et al.*, 2007, Song *et al.*, 2006). La communication entre les ERs et les EGFRs (dont HER2) est importante entre l'épithélium et le mésenchyme sans quoi, la morphogénèse ne pourra pas se faire (Heldring *et al.*, 2007). De plus, en présence d'E2, ER α peut interagir avec PI3K, agissant donc comme intermédiaire sur l'activation des kinases en aval, dont AKT/PKB (Song *et al.*, 2006).

Il a également été suggéré qu'ER peut se faire activer par d'autres molécules qu'E2, tels des facteurs de croissance pouvant activer des kinases, qui à leur tour, peuvent phosphoryler et activer ER et/ou ses co-régulateurs (Heldring *et al.*, 2007). En effet, de nombreux sites de modifications covalentes ont été répertoriés dans les ER α (Heldring *et al.*, 2007). Ces sites affectent de façon notable les fonctions du récepteur, la plupart résultant en une augmentation de son potentiel transcriptionnel (Singh *et al.*, 2005). Il est donc possible que cette méthode d'activation puisse contribuer à la croissance de certains cancers de type hormono-indépendants (Heldring *et al.*, 2007). ER α peut donc avoir recours à différentes voies de signalisations afin d'accroître la prolifération et d'abaisser l'apoptose dans les cellules cancéreuses du sein (figure 9) (Song *et al.*, 2006).

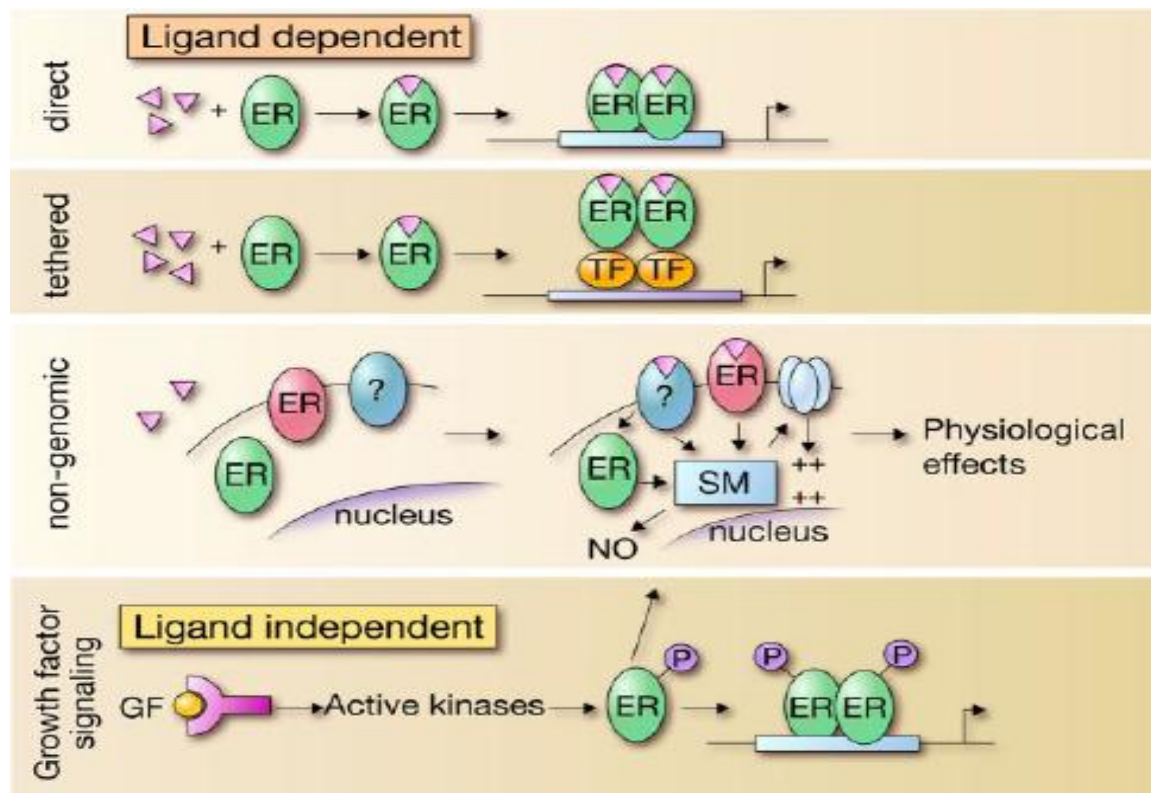


Figure 9. Représentation schématique des différentes voies liées par les ERs. La voie directe ou classique (*direct*) représente l'activation par un ligand et une liaison directe du récepteur à l'ADN afin d'agir comme régulateur de modulation de gènes. La voie par protéines intermédiaires (*tethered*) est par une liaison indirecte à l'ADN via des interactions protéine-protéine avec autres facteurs de transcription (TF) suite à l'activation par un ligand. La voie non-génomique (*non-genomic*) est via l'activation d'ERs membranaires par un ligand ou l'activation d'ERs cytoplasmiques par autres signals. Suite à ce genre d'activation, il y aura le déclenchement de cascades de signalisations via des messagers secondaires (SM). Cela peut ultimement amener à des réponses physiologiques (ex. effet sur les canaux d'ions), et ce, sans avoir d'effets sur la régulation de gènes. La voie de signalisation via autres voies de signalisations (*growth factor signaling*) est ligand-indépendant. Les ERs seront plutôt activés à travers autres voies de signalisations (ex. par des facteurs de croissance (GF)). Dans ce schéma, les ERs sont activés par des kinases permettant leur dimérisation et liaison à l'ADN. Tiré de (Heldring *et al.*, 2007).

1.4.4 Les ERs dans la cancérogenèse mammaire

Dans la glande mammaire normale, il y a une petite proportion (20-30 %) de cellules luminales épithéliales qui expriment ER α (Fowler *et al.*, 2007). Dans les cellules précancéreuses et transformées, plus de 50 % ont une expression d'ER α beaucoup plus élevée (Fowler *et al.*, 2007). Cette hausse entraîne une augmentation de transcription génique E2-dépendante; on note alors une perturbation du contrôle au niveau de la croissance, la différenciation, la prolifération et le cycle cellulaire (Fowler *et al.*, 2007). L'hormone E2 stimulera la production de facteurs de croissance, entraînant une réponse de prolifération sur les cellules voisines qui sont ER α - via une signalisation paracrine (Song *et al.*, 2006).

1.4.4.1 Influence d'E2 sur la glande mammaire

La molécule E2 joue également un rôle critique dans l'adhésion cellulaire, un processus qui influence la structure normale de l'épithélium mammaire, mais aussi la migration et l'invasion pendant la tumorigénèse et la formation de métastases (Heldring *et al.*, 2007). Une altération au niveau de l'expression de molécules d'adhésions et des protéines impliquées dans la migration, comme les cadhérines, les caténines, les intégrines et les MMPs, a été observée lors d'un cancer mammaire (Heldring *et al.*, 2007). À titre d'exemple, ER α influence l'activité de Snail, un facteur de transcription qui inhibe la transcription d'E-cadhérine, une protéine clé des jonctions adhérentes (Heldring *et al.*, 2007). Il semble qu'ER β peut également être impliqué dans cette régulation (Heldring *et al.*, 2007). Des études à partir de la glande mammaire de souris ont démontré que la perte d'expression génique en ER β peut résulter en une réduction du niveau de molécules d'adhésion, comme l'E-cadhérine et l'intégrine $\alpha 2$ ainsi que de molécules de jonctions, comme la connexine 32 et l'occludin (Heldring *et al.*, 2007).

1.4.4.2 Expression d'ER α et ER β dans le cancer du sein

De nos jours, l'expression en ER α est vérifiée de manière routinière dans les diagnostics de cancer du sein (Heldring *et al.*, 2007). À titre d'exemple, l'équipe de chercheurs du Dr Holst a analysé un peu plus de 2000 biopsies de tumeurs mammaires (Holst *et al.*, 2007). Leurs résultats ont démontré qu'environ les deux tiers des tumeurs surexpriment le gène ERS1, codant pour ER α , accompagné d'une augmentation au niveau protéique (Holst *et al.*, 2007). La majorité des tumeurs positives sont associées aux lésions mammaires pré-malignes ou aux stades tumoraux plus tardifs (Holst *et al.*, 2007). Malgré le fait que le rôle d'ER β en tant que marqueur de diagnostic de cancer du sein soit sous investigation intense, son implication n'est pas encore clairement établi (Heldring *et al.*, 2007). ER β est le récepteur prédominant dans les tissus sains, mais est moins exprimé dans les tissus de cancer du sein (Paterni *et al.*, 2014). Certaines études ont démontré que le niveau protéique d'ER β est plus élevé aux premiers stades du cancer du sein et dans les tumeurs de bas grades (Heldring *et al.*, 2007). Lorsqu'ER α et ER β sont co-exprimés dans une même cellule, ER β peut avoir un effet antagoniste sur l'activité transcriptionnelle d'ER α (Heldring *et al.*, 2007). Bien que les mécanismes soient peu connus, il a été démontré qu'ER β peut altérer le recrutement de certain co-régulateurs d'ER α et induire sa dégradation protéolytique (Heldring *et al.*, 2007). La prolifération en réponse à l'E2 peut donc possiblement être le résultat de la balance entre la signalisation d'ER α et ER β (Heldring *et al.*, 2007).

1.5 Le récepteur à la progestérone (PR)

Comme les ERs, les PRs sont aussi membres de la famille des facteurs de transcription nucléaires (Lange *et al.*, 2008). Ils sont essentiels pour le système reproducteur, le développement de la glande mammaire et le système nerveux central (Lanari *et al.*, 2002). Leur expression est importante pour la prolifération, la différenciation et la maintenance du phénotype de la glande mammaire (Lanari *et al.*, 2002).

1.5.1 Les isoformes

À ce jour, il y a trois isoformes connues pour les PRs, soit PR-A (94 kDa, avec la section N-terminale tronquée), -B (forme longue, 116 kDa) et -C (60 kDa) (Hagan *et al.*, 2012, Lange *et al.*, 2008). La synthèse de ces trois protéines provient du même gène, par l'option du promoteur distal ou proximal (Lange *et al.*, 2008). En général, les cellules PR+ expriment PR-A et -B (Lange *et al.*, 2008). Ces deux isoformes peuvent induire une activité transcriptionnelle différente lorsque fixées sur un promoteur donné, mais peuvent aussi reconnaître des promoteurs de gènes différents (Lange *et al.*, 2008). PR-B est requis pour le développement normal de la glande mammaire, tandis que PR-A est essentiel pour le développement de l'utérus et les fonctions reproductives (Lange *et al.*, 2008). PR-C ne possède pas d'activité transcriptionnelle (Lange *et al.*, 2008). Mais, lorsque ce dernier est exprimé, il peut augmenter l'activité des autres PRs dans les cellules cancéreuses du sein (Lange *et al.*, 2008).

1.5.2 La signalisation classique des PRs

Sous forme latente, les PRs peuvent être dans le noyau ou dans le cytoplasme associés aux protéines chaperonnes HSPs, afin de maintenir leur stabilité et une conformation convenable pour l'activation (Hagan *et al.*, 2012, Lange *et al.*, 2008). Les HSPs permettent aussi la liaison des PRs avec autres protéines de signalisations (Lange *et al.*, 2008). La signalisation classique s'effectue par les PRs retrouvés dans le noyau (Hagan *et al.*, 2012). Une fois activé par des hormones naturelles (progestérone) ou synthétiques (progestin), le récepteur subira un changement de conformation permettant une dissociation avec les HSPs suivi d'une dimérisation afin de former un homo- ou un hétérodimère (Hagan *et al.*, 2012, Lange *et al.*, 2008). Les PRs vont ensuite former un complexe avec leurs co-régulateurs afin de se lier aux éléments de réponse à la progestérone (PRE «*progesterone response element*») sur le promoteur du gène cible (Lange *et al.*, 2008). Il aura alors un changement de conformation de la chromatine et le recrutement de l'ARN polymérase II afin de débiter la transcription (Hagan *et al.*, 2012, Lange *et al.*, 2008). La liaison peut se faire directement ou indirectement par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription, tels AP-1, SP1 ou STATs (Hagan *et al.*, 2012). Différentes études ont démontré une rétroaction entre les PRs et certains STATs, notamment STAT-3 et -5; les uns activent la capacité transcriptionnelle des autres (Hagan *et al.*, 2012). Cette rétroaction est critique pour le développement normal de la glande mammaire (Hagan *et al.*, 2012). Seulement un petit nombre de gènes régulés par les PRs ont été identifiés, dont certains n'ont pas de séquences PRE sur leur promoteur, et sont plutôt activés via les interactions avec d'autres facteurs de transcription (Lange *et al.*, 2008). Parmi les gènes modulés par les PRs, on compte *c-myc*, *EGFR*, *c-fos*, *p21*, le substrat 2 de récepteur à l'insuline (*IRS-2*, «*insulin receptor substrate 2*»), *STAT5* et la cyclin D1 (Hagan *et al.*, 2012, Lange *et al.*, 2008).

1.5.3 Les signalisations non-génomiques des PRs

Des expériences par mutation dirigée dans le domaine SH3 des PRs, soit le domaine d'interaction avec le domaine SCR (*short consensus repeats*) à la membrane plasmique des cellules mammaires démontrent qu'une induction très rapide de signalisations (quelques minutes) peut se produire via des PRs cytoplasmiques (Boonyaratanakornkit

et al., 2007, Lange *et al.*, 2008). Cette voie non-génomique résulte en la transcription de gènes impliqués dans la hausse de prolifération des cellules épithéliales de la glande mammaire et l'activation d'autres facteurs de transcription (Hagan *et al.*, 2012, Lange *et al.*, 2008). L'activation des PRs cytoplasmiques, majoritairement PR-B, (Hagan *et al.*, 2012) peut induire, entre autres, l'activité des EGFRs, des MAPKs et de PI3K (Gasiewicz *et al.*, 2008, Lange *et al.*, 2008). Ces mécanismes impliquent une liaison directe des PRs par interaction protéine-protéine (Lange *et al.*, 2008). En effet, les PRs possèdent dans leur structure, un motif riche en proline (PXXP) (Lange *et al.*, 2008). Ce domaine permet une liaison avec le domaine Scr-homology-3 (SH3) des protéines de signalisations de la famille des proto-oncogène tyrosine-protein kinase Src, de manière ligand-dépendante, permettant l'activation des MAPKs (Lange *et al.*, 2008). Les molécules de signalisations cytoplasmiques activées par les PRs cytoplasmiques peuvent à leur tour activer par phosphorylation la fonction transcriptionnelle des PRs retrouvés dans le noyau (Lange *et al.*, 2008). Il y a donc possibilité d'une rétroaction positive entre les PRs des voies classique et non-génomique permettant une régulation d'induction de gènes appropriés (figure 10) (Lange *et al.*, 2008). En effet, plusieurs des fonctions dépendantes des PRs sont également c-Scr, MAPK et RAS-dépendants (Lange *et al.*, 2008).

1.5.4 Les modifications covalentes

Les modifications post-traductionnelles se font majoritairement par phosphorylation au niveau des régions N-terminales des isoformes PR-A/B sur les résidus de lysines et de sérines (Hagan *et al.*, 2012). Ces modifications, qui sont le plus souvent ligand-dépendantes, peuvent significativement affecter plusieurs aspects du récepteur, comme sa stabilité, sa localisation dans la cellule, ses interactions avec autres facteurs de transcription, son activité transcriptionnelle et sa sélectivité de promoteur (Hagan *et al.*, 2012). Souvent, les kinases dépendantes de cyclines 2 (CDK2, «*cyclin dependant kinase 2*») ajouteront des groupements phosphates sur les PRs (Hagan *et al.*, 2012). Hormis son rôle de phosphorylation, CDK2 peut aussi faire intégralement partie du complexe de transcription de PR (Hagan *et al.*, 2012).

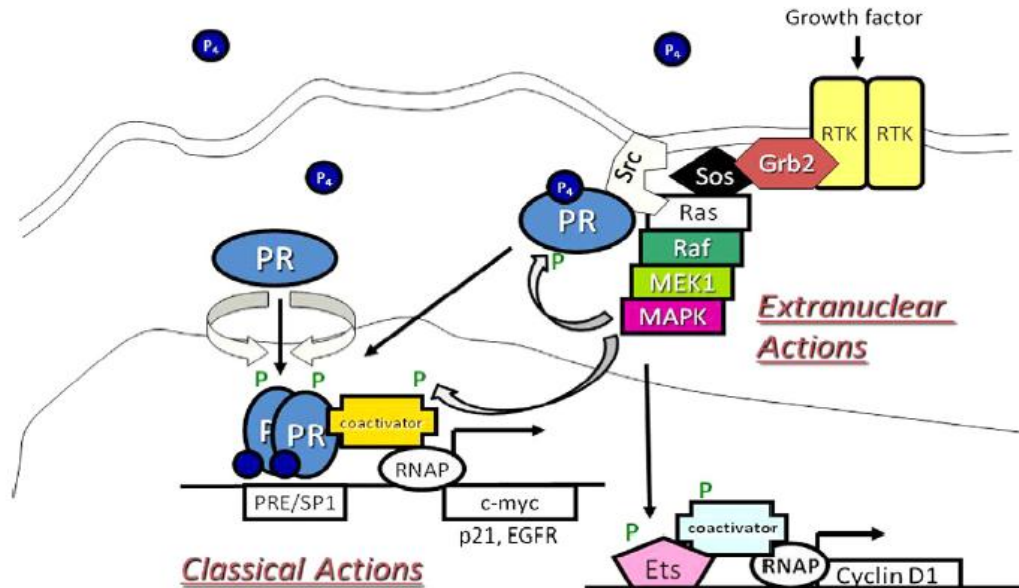


Figure 10. Schéma représentant les signalisations classique et non-génomique des PRs. La progestérone (P_4) qui se lie aux PRs peut induire l'interaction entre c-SRC et PR. Cette interaction amène à l'activation de RAS de manière c-SRC-dépendante. La protéine RAS pourra alors activer les MAPKs. Les MAPKs vont activer les PRs nucléaires et ses co-activateurs par phosphorylation. Ces PRs peuvent ensuite exercer leur activité transcriptionnelle par une interaction aux PREs ou via autres molécules (ex, P1). Les signalisations classique et non génomique sont donc deux événements interreliés. Tiré de (Hagan *et al.*, 2012).

1.5.5 Les PRs dans le cancer du sein

Puisque la progestérone influence directement la régulation du système endocrinien, l'évaluation de la relation entre une exposition à cette hormone et le développement de la glande mammaire et/ou le cancer du sein est d'une grande importance (Soyal *et al.*, 2002). L'activation des MAPKs par les PRs permet une amplification de prolifération qui est nécessaire pour l'expansion rapide de l'épithélium mammaire, surtout lors du cycle menstruel et lors de la grossesse (Hagan *et al.*, 2012). La dérégulation des signaux impliqués dans la croissance et le développement normal pourrait amener les cellules vers la progression d'un cancer du sein (Hagan *et al.*, 2012). Dans la glande mammaire d'un adulte sain, il n'y a qu'une petite proportion des cellules luminales épithéliales (7-10%) qui expriment ER et PR (chez les femmes qui ne sont pas enceintes) (Hagan *et al.*, 2012, Lange *et al.*, 2008). Les cellules ER/PR+ ont la capacité de prolifération, mais sont maintenues en mode non proliférative par des molécules inhibitrices, tels TGF- β ou *p27* (Lange *et al.*, 2008). Environ 30 % des cas de cancer du sein ont perdu *p27* et/ou ont un taux d'activité élevé en CDK2 (Lange *et al.*, 2008). De nombreuses études *in vitro* ont démontré un lien entre l'action des PRs et le contrôle du cycle cellulaire par leur interaction avec, entre autres, CDK2 (Lange *et al.*, 2008). Suite à la perte de *p27*, l'activité transcriptionnelle des PRs peut être ligand-indépendante et être enclenchée par CDK2 (Lange *et al.*, 2008). Donc, dans le cancer du sein, l'action mitogénique des PRs pourrait être liée à la perte de régulation de points de contrôle et/ou à l'augmentation

d'activité des kinases (Lange *et al.*, 2008). La majorité des lésions cancéreuses du sein de bas stades expriment ER et PR (Lange *et al.*, 2008). Ces récepteurs restent élevés dans 60 % des cas de cancer avancé (Lange *et al.*, 2008). La surexpression des récepteurs pourrait donc être liée à la prolifération rapide de la tumeur en réponse aux hormones stéroïdiennes, via des mécanismes paracrines, puis autocrines (Lange *et al.*, 2008).

1.5.5.1 Les PR-A et PR-B dans le cancer du sein

Il a été suggéré que le ratio entre PR-A et PR-B doit également être pris en considération lors d'un diagnostic de cancer du sein (Anderson, 2002). Normalement, le ratio d'expression de PR-A et PR-B est d'environ 1:1 à la membrane plasmique (Anderson, 2002). Une modification de l'équilibre favorisant PR-B a été identifiée dans plusieurs tumeurs (Anderson, 2002). Des études ont suggéré que PR-B à la membrane plasmique possède le plus fort potentiel de transcription génique (Anderson, 2002). Il est donc possible que le ratio de ces récepteurs s'avère un marqueur important lors d'un diagnostic (Anderson, 2002).

1.6 Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR)

Le laboratoire de Poland a été le premier à purifier et caractériser le récepteur Ah de la souris en 1976 (Poland *et al.*, 1976). Il est maintenant bien connu que c'est un récepteur impliqué dans un grand nombre de fonctions biologiques et retrouvé dans plusieurs espèces (incluant l'humain) et tissus (Denison *et al.*, 2011). Des études de rétro-dégradation d'AhR dans la souris ont démontré que cette protéine a des fonctions biologiques très importantes au sein d'un organisme (Safe *et al.*, 2013). Les souris génétiquement modifiées sans AhR (*knockout*) démontrent une baisse de fertilité et des altérations de la structure et/ou fonction au niveau, entre autres, du foie, du cœur et de divers sections du tractus génital (Safe *et al.*, 2013). Plusieurs études ont démontré de nombreux rôles d'AhR au sein d'une cellule, tels la régulation de cycle cellulaire, l'apoptose, les contacts cellule-cellule, l'immunité, le maintien des cellules souches, la neurogenèse, le métabolisme et autres (Safe *et al.*, 2013). Le large spectre de réponses cellulaires induites par AhR est probablement lié aux multiples interactions de cette protéine avec des facteurs de transcription et autres molécules de signalisations (Safe *et al.*, 2013).

1.6.1 Signalisation classique d'AhR

Ce facteur de transcription est membre de la famille des protéines basique-hélice-boucle-hélice/PAS (bHLH/PAS, «*basic helix-loop-helix/PER-ARNT-SIM*») (Feng *et al.*, 2013). Sous forme latente, il est retrouvé dans le cytosol de la cellule, en complexe avec deux protéines HSP90, une protéine accessoire *HSP-interacting protein* (p23) et la protéine *immunophilin-like HBV X-associated protein 2* (XAP2) (Feng *et al.*, 2013). Une fois activé par un ligand, il y aura changement de conformation d'AhR afin d'exposer le SLN, permettant sa translocation nucléaire (Denison *et al.*, 2011). Ce changement de conformation sera suivi d'une perte de liaison avec son complexe protéique et de sa liaison subséquente avec son partenaire «translocateur nucléaire d'AhR» (ARNT, «*Ah receptor nuclear translocator*») qui l'attend dans le noyau (Denison *et al.*, 2011).

L'hétérodimère AhR/ARNT va interagir avec autres co-activateurs/répresseurs, afin de remodeler la chromatine pour aller sur la séquence d'élément de réponse des xénobiotiques (XRE, «*xenobiotique response element*»), située sur le promoteur des gènes cibles (Feng *et al.*, 2013). Le complexe pourra alors débiter la transcription via le recrutement de la polymérase II (figure 11) (Feng *et al.*, 2013). Parmi le grand nombre de gènes induits par AhR, les plus connus sont ceux codant pour les protéines de la phase I et II de la métabolisation, dont les cytochromes P450 (CYP1A1/1A2/1B1/2S1) (Feng *et al.*, 2013). Ces protéines jouent un rôle crucial dans le métabolisme, l'élimination et la détoxification/activation de xénobiotiques et de médicaments (Feng *et al.*, 2013). Suite à son action au niveau transcriptionnel, AhR sera exporté vers le cytosol à l'aide de la protéine maintenance de région de chromosome 1 (CRM1, «*chromosome region maintenance 1*») où il sera dégradé par le 26 S-ubiquitin-protéasome (figure 11) (Feng *et al.*, 2013). L'inhibition d'AhR est aussi assurée par la protéine répresseur d'AhR (AHRR, «*aryl hydrocarbon receptor repressor*»), dont l'expression est elle-même régulée par AhR (Denison *et al.*, 2011).

1.6.2 Modifications covalentes d'AhR

La régulation au niveau de la distribution, de l'activité transcriptionnelle et de la stabilité d'AhR est, entre autres mécanismes, assurée par phosphorylation via la protéine kinase C (PKC) (Puga *et al.*, 2009). Par exemple, lorsqu'AhR est dans le cytoplasme, sa phosphorylation permet d'accroître son affinité avec HSP90, tandis que dans le noyau, la phosphorylation permet la liaison AhR/ARNT/XRE (Puga *et al.*, 2009).

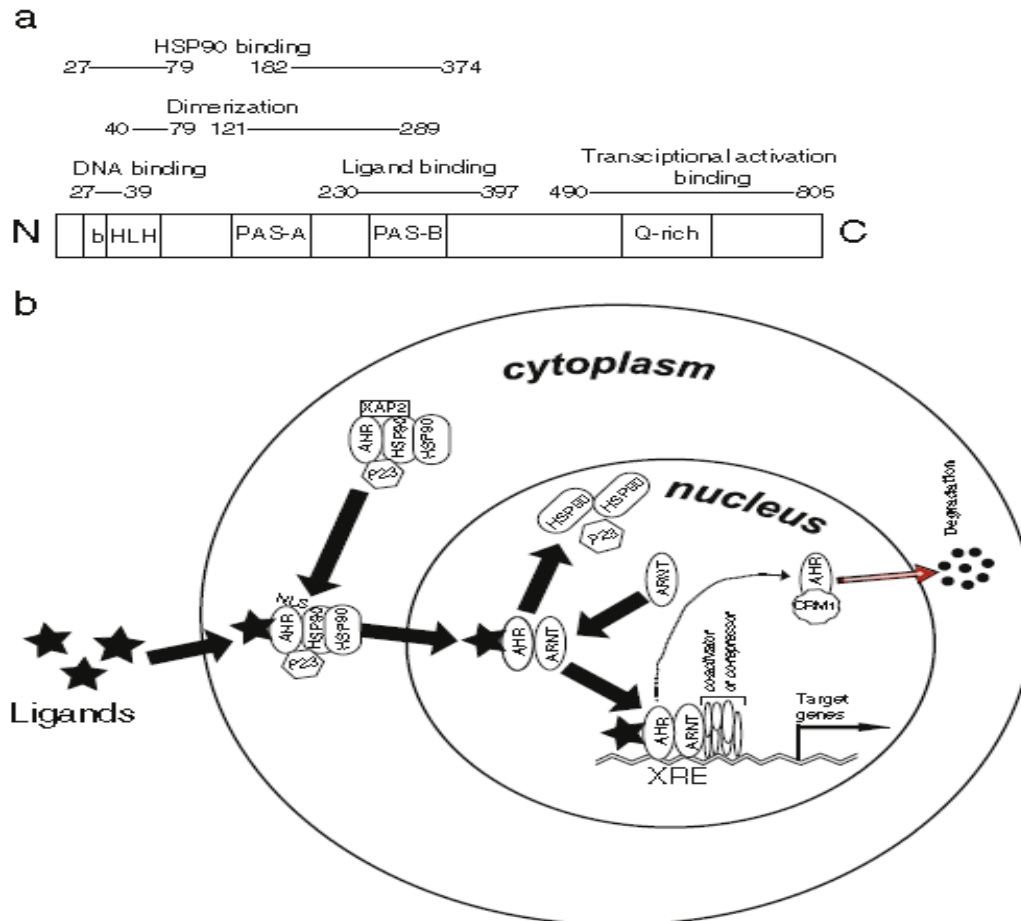


Figure 11. Représentation schématique de la structure fonctionnelle et la signalisation classique d'AhR. A) Représentation des domaines fonctionnels d'AhR. B) Représentation simplifiée de la signalisation classique d'AhR. Sous forme latente, AhR est retrouvé dans le cytosol dans un complexe protéique (incluant HSP90, P23 et XAP2). Suite à son activation, il y aura la translocation nucléaire d'AhR où il pourra se dissocier de son complexe afin de s'associer avec son partenaire ARNT. L'hétérodimère AhR/ARNT pourra se joindre avec autres partenaires permettant la liaison au XRE dans le promoteur des gènes cibles et ainsi réguler leur transcription. Suite à la régulation transcriptionnelle, AhR est exporté du noyau à l'aide des CRM1 pour se faire dégrader via le 25S-ubiquitin-protéasome. Tiré de (Feng *et al.*, 2013).

1.6.3 Les ligands d'AhR

1.6.3.1 Molécules endogènes

Malgré les nombreuses études sur les ligands d'AhR, son ligand physiologique endogène n'a pas encore été clairement identifié; AhR demeure donc un récepteur orphelin (Denison *et al.*, 2011). Cela peut être dû à la difficulté d'obtenir la protéine AhR isolée afin de déterminer la structure du DLL (Denison *et al.*, 2011). Ce manque d'information limite les expériences afin d'accroître nos connaissances des mécanismes d'actions endogènes d'AhR (Denison *et al.*, 2011). Des modèles théoriques sur le DLL d'AhR ont été développés basés sur l'homologie de séquences avec autres récepteurs nucléaires, tel ER α humain (Denison *et al.*, 2011). De plus, des expériences de

mutagenèse dirigée ont permis d'identifier les résidus nécessaires pour la liaison du TCDD avec AhR (Denison *et al.*, 2011). Ainsi, bien qu'elles n'ont pas une affinité aussi élevée que la TCDD, des molécules endogènes pouvant se lier aux AhR ont été identifiées, comme la tryptamine, l'acide indole-acétique, l'acide indole pyruvique (par la conversion enzymatique du tryptophane), l'indirubine et l'indigo (des métabolites excrétés dans l'urine humaine) et des photo-produits du tryptophane, dont le plus actif est le 6-formylindolo (3,2 b)carbazole (FICZ) (Denison *et al.*, 2003). La bilirubine et la biliverdine qui sont des métabolites de l'hème, de même que certains métabolites de l'acide arachidonique sont aussi des ligands potentiels d'AhR dans des conditions physiologiques (Denison *et al.*, 2003).

1.6.3.2 Les ligands exogènes- Contaminants environnementaux

Les premiers ligands de hautes affinités identifiés pour AhR comprennent une grande variété de contaminants hydrophobes de l'environnement, tels les hydrocarbures aromatiques halogénés (HAHs) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques non-halogénés (HAPs) (Denison *et al.*, 2011). Parmi ces ligands, on compte les dibenzo-*p*-dioxines polychlorés (PCDD, «*polychlorinated dibenzodioxins*»), comme le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), les dibenzofuranes polychlorés (PCDF, «*polychlorinated dibenzofurans*»), les biphényles polychlorés (BPC) ainsi que des composés apparentés, soit un groupe diversifié de contaminants, dont plusieurs sont hautement toxiques (Denison *et al.*, 2011). Pour activer AhR, les HAHs sont actifs à partir de concentrations de l'ordre du picomolaire (pM), alors que les HAPs sont de moindre efficacité et doivent atteindre des concentrations de l'ordre du nanomolaire (nM) (Denison *et al.*, 2003). Les études de divers laboratoires ont confirmé le rôle nécessaire d'AhR comme médiateur de toxicité de ces composés (Safe *et al.*, 2013).

1.6.3.3 Les ligands exogènes- Composés naturels

Des ligands exogènes ont aussi été identifiés dans l'alimentation, la plupart étant des molécules extraites de végétaux, de légumes, de fruits et de thés (Denison *et al.*, 2003). Les flavonoïdes (qui incluent les flavones, les flavonoles, les flavonones et les isoflavones) font partie du groupe le plus important de ligands exogènes d'AhR produits naturellement dans l'environnement (Denison *et al.*, 2003). Puisque ce sont des molécules très abondantes dans la diète humaine (concentrations sanguines pouvant atteindre l'ordre du micromolaire (μM)), elles peuvent avoir un impact significatif sur les fonctions biologiques qui dépendent d'AhR (Denison *et al.*, 2003). Il y a aussi certains caroténoïdes (comme la canthaxanthine), l'indole-3-carbinol (I3C), et certains polyphénols (comme le resvératrol) qui peuvent agir en tant qu'agonistes/antagonistes (Denison *et al.*, 2003).

Le grand nombre et la diversité en structures des ligands démontrent clairement qu'AhR n'est pas uniquement un récepteur pour des produits toxiques, mais ayant aussi des activités endogènes bien importantes (Puga *et al.*, 2005). Les fonctions biologiques d'AhR varient selon la présence de certains ligands endogènes, le type cellulaire, le tissu et le stade de développement (Puga *et al.*, 2005).

1.6.4 AhR dans la cancérogenèse

Pendant plusieurs décennies, AhR a été étudié pour son rôle dans la toxicité et la cancérogenèse induit par des xénobiotiques (Feng *et al.*, 2013). Par exemple, la TCDD fait partie de la catégorie de carcinogènes humains de type I (selon l'Agence internationale pour la recherche sur le cancer) (International Agency for Research on Cancer, 2014). Ce composé, un ligand d'une haute affinité pour AhR, est connu pour induire de nombreux types de cancers (foie, colon, estomac, pancréas, poumon et autres) (Safe *et al.*, 2013).

1.6.4.1 Activation d'AhR; effets toxiques

L'effet toxique médié par certains ligands exogènes d'AhR peut également se faire via les voies non-génomiques de ce dernier. Selon le contexte cellulaire, AhR peut interagir avec une multitude de protéines de signalisations. Une étude à l'aide de puce d'ADN, confirme que le TCDD peut activer la signalisation des MAPKs en aval d'EGFRs (Marlowe *et al.*, 2005). Cela peut donc expliquer en partie l'effet pro-cancérogène par le TCDD, puisque les signalisations de ces MAPKs peuvent amener à l'induction de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Marlowe *et al.*, 2005). Puisque le TCDD n'est pas un ligand pour les EGFRs, il semblerait que les signalisations entre AhR et EGFR sont importantes pour l'induction de la toxicité des ligands de contaminants environnementaux (Marlowe *et al.*, 2005). Par exemple, le TCDD peut activer l'expression de GTPase p21^{RAS}, d'ERK et de *c-Jun N-terminal/stress-activated protein kinases* (JNK/SAPK), soit toutes des molécules en aval d'EGFRs (Marlowe *et al.*, 2005, Puga *et al.*, 2009). L'induction de leurs activités peut amener à une perturbation du contrôle du cycle cellulaire, puisque ces kinases permettent la régulation d'évènements mitogènes et développementaux par le contrôle de l'expression de gènes et autres évènements via la phosphorylation de facteurs de transcription (Puga, *et al.*, 2009). L'induction de l'activité de ces kinases est AhR-dépendante, puisque dans plusieurs cas, elle est nécessaire pour la transcription de gènes dépendants d'AhR (incluant CYP1A1) (Puga *et al.*, 2009). Bref, il semble y avoir une signalisation à double sens entre AhR et certaines MAPKs, mais les mécanismes impliqués sont peu connus; des ligands d'AhR peuvent activer certaines MAPKs, qui peuvent à leur tour moduler des étapes d'activation d'AhR en facilitant sa liaison à l'ADN (Puga *et al.*, 2009). Donc, l'activation des MAPKs peut représenter un mécanisme alternatif par lequel des ligands d'AhR peuvent amener un grand nombre de réponses cellulaires défavorables (Puga *et al.*, 2009).

1.6.4.2 Activation d'AhR; effets anticancéreux

Dans un environnement sans ligands exogènes, AhR serait impliqué dans la progression du cycle cellulaire (Barhoover *et al.*, 2010). Son activation par le TCDD mènerait à l'arrêt de la progression du cycle cellulaire et l'inhibition de la prolifération, un phénomène qui serait cellule-dépendante (Barhoover *et al.*, 2010). Les mécanismes d'actions d'AhR dans le contrôle du cycle cellulaire ne sont pas encore bien compris (Barhoover *et al.*, 2010). Un point de contrôle de la progression de la cellule de la phase G1 à S peut se faire via le suppresseur de tumeur Rb (Barhoover *et al.*, 2010). Rb permet de réguler négativement le facteur de transcription E2F1, ayant comme cibles en

aval des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Barhoover *et al.*, 2010). Dans un environnement sans ligand, AhR peut interagir avec le complexe CDK4 afin d'aider à la phosphorylation de Rb, ce qui faciliterait la progression du cycle cellulaire en freinant l'activité de ce dernier (Barhoover *et al.*, 2010). Lorsqu'AhR se fait activer, il y aura dissociation avec CDK4 et de HSP90 (Barhoover *et al.*, 2010). Cela permet de démasquer le DLL d'AhR, qui se liera plutôt avec Rb (dans sa forme non-phosphorylée), permettant de bloquer la cellule en phase G1 (Puga *et al.*, 2000). L'interaction entre AhR et RB est donc connue comme étant un point de contrôle pendant la progression du cycle cellulaire (Puga *et al.*, 2000). Cette activité peut expliquer en partie comment AhR non-activé par un ligand exogène peut amener à une prolifération, mais que son activation arrête la progression à la phase G1 dans plusieurs lignées cellulaires, dont différents types de cellules cancéreuses de la glande mammaire (Saito *et al.*, 2014).

Malgré l'incohérence en ce qui concerne le rôle d'AhR en tant que pro-oncogène ou suppresseur de tumeur, il est clair que cette protéine est fortement impliquée entre autres, dans la migration, la prolifération et l'apoptose, par des mécanismes dépendants ou indépendants de ligands exogènes ou endogènes (Safe *et al.*, 2013). Sa grande variété de fonctions entre cellules/tissus/espèces peut-être due aux divers changements de conformations induites par une variété de ligands, ainsi que ses interactions subséquentes avec des co-régulateurs (Safe *et al.*, 2013). Cela peut aussi faire en sorte qu'un ligand peut agir en tant qu'agoniste ou antagoniste (Safe *et al.*, 2013).

1.6.5 AhR dans le cancer du sein

La première étude sur l'effet du TCDD au niveau du cancer du sein a été publiée en 1978 (Kociba *et al.*, 1978). Une diminution du nombre de tumeurs dans les glandes mammaires a été observée chez des rattes exposées par le TCDD via leur diète pendant 2 ans (Kociba *et al.*, 1978). De plus, une étude épidémiologique sur 10 ans a démontré une augmentation de différents types de cancers chez les gens exposés à une grande quantité de TCDD relâché dans l'air suite à l'explosion d'une usine de fabrication de produits chimiques à Seveso, en Italie (Bertazzi *et al.*, 1989b). Cependant, le taux de décès liés aux cancers du sein était diminué (Bertazzi *et al.*, 1989b). Puisqu'il a été démontré qu'une exposition de TCDD active AhR, plusieurs études ont été réalisées afin de comprendre comment l'activation d'AhR peut contribuer à une baisse des taux de cancer du sein.

1.5.1.1 Signalisation entre AhR et ER

Il est bien connu que l'activation d'AhR peut réguler négativement l'activité des ERs, par différents mécanismes d'actions. De manière réciproque, les ERs peuvent aussi avoir un rôle important pour la signalisation d'AhR. Il a été démontré qu'ER peut agir comme co-activateur d'AhR pour la production de CYP1A1/1B1 suite à un traitement de TCDD dans les lignées de cellules épithéliales mammaires cancéreuses MCF-7 et T47-D (Feng *et al.*, 2013). Une fois activés, les CYPs peuvent métaboliser l'œstrogène, ce qui empêche sa liaison aux ERs et ainsi bloquer leur activation (Feng *et al.*, 2013).

Le récepteur Ah peut être retrouvé en complexe avec cullin 4B ubiquitine ligase (CUL4AHR), dont l'assemblage est dépendant de l'activation d'AhR (Feng *et al.*, 2013). Dans ce complexe, AhR agit comme adaptateur de substrat pour des récepteurs de stéroïdes sexuels, menant à leur dégradation (Feng *et al.*, 2013). Ainsi, dans les cellules MCF-7 et T47-D exposées à différents ligands d'AhR (xénobiotiques et naturels), une dégradation d'ER par le protéasome a été observée (Feng *et al.*, 2013).

Les protéines du complexe d'AhR peuvent aussi contribuer à la perturbation de la fonction d'ER (Safe *et al.*, 2013). Par exemple, bien qu'il ait une plus grande affinité pour AhR, l'ARNT peut agir comme co-activateur d'ER (Safe *et al.*, 2013). Ainsi, lorsqu'AhR est activé par la TCDD, ARNT ne pourra plus agir comme co-activateur d'ER due à sa préférence à AhR. De plus, AhR peut aussi être en compétition avec ER pour son co-activateur Sp1 (Safe *et al.*, 2013). Cette théorie est supportée par des résultats démontrant qu'une exposition à la TCDD induit une inhibition de l'expression de protéines dépendantes à l'œstrogène, telles la cathepsin, c-fos, HSP27, le récepteur à la prolactine et PR (Safe *et al.*, 2013).

Les nombreux exemples démontrant que la perturbation de l'activité d'ER, un joueur important dans environ 70 % des cancers du sein (Holst *et al.*, 2007) via AhR, pourrait expliquer le lien entre l'activation d'AhR et la diminution de la viabilité de divers types de cellules cancéreuses mammaires. Toutefois, l'étude de Hall *et al.*, semble infirmer cette théorie (Hall *et al.*, 2010). Les analyses de cette étude démontrent que l'activation d'AhR peut inhiber la croissance et différentes caractéristiques tumorigéniques de cellules cancéreuses mammaires, et ce, peu importe leur statut en ER, PR ou HER2; l'action anticancéreuse d'AhR n'est donc pas limitée à son effet suppresseur sur ER (Hall *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2009).

1.6.5.2 Expression d'AhR dans des tissus cancéreux du sein

Récemment, l'équipe de Saito R *et al.* a analysé l'expression d'AhR dans 90 tissus de carcinomes mammaires invasifs de femmes japonaises qui n'ont pas reçu de traitements avant la chirurgie (Saito *et al.*, 2014). Les données de l'étude ont démontré que le nombre de cellules AhR-positives était significativement plus élevé dans l'épithélium des tissus de carcinomes comparé aux sections de tissus non pathologiques (Saito *et al.*, 2014). De façon similaire, une autre étude a démontré une surexpression d'AhR constitutivement actif et une diminution d'expression d'AhRR dans des tumeurs du sein comparé à leurs tissus normaux (Feng *et al.*, 2013). De plus, une étude par puce d'ADN démontre une association forte entre la surexpression d'AhR et les stades avancés de cancers de sein invasifs (Goode *et al.*, 2013).

1.6.5.3 Signalisation d'AhR dans des cellules cancéreuses du sein

In vitro, il a démontré que la signalisation d'AhR supprime la migration induite par l'œstrogène, diminue l'expression de certains sous-types de MMPs et diminue la prolifération et l'invasion de manière significative dans les cellules ER+, avec une tendance similaire dans les cellules ER- (Saito *et al.*, 2014). De plus, dans les cellules HMECs, une surexpression d'AhR amène à une augmentation dans la motilité et la

migration, la prolifération, la croissance indépendante d'ancrage et la transition épithélio-mésenchymateuse (Brooks *et al.*, 2011, Goode *et al.*, 2013). Réciproquement, l'extinction génique d'Ahr résulte à une augmentation de réponses apoptotiques par une dysfonction mitochondriale et une augmentation de l'activité des caspases -3-8-9 et de BAD; soit des protéines impliquées dans la réponse apoptotique intrinsèque et extrinsèque (Goode *et al.*, 2013). De façon similaire, une extinction génique d'AhrR dans différentes lignées (dont les HMECs) amène à une résistance aux signaux apoptotiques et augmente la motilité et l'invasion *in vitro* et *in vivo*. (Zudaire *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces résultats indique qu'une expression anormalement haute d'Ahr peut jouer un rôle important dans la progression de cellules tumorales du sein (Feng *et al.*, 2013). Ainsi, le statut d'Ahr dans des cellules de carcinomes mammaires est considéré comme un marqueur pronostic nouvellement identifié de patients atteints de cancer du sein (Saito *et al.*, 2014). Il est donc crucial de déterminer si Ahr pourrait être une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement du cancer du sein.

1.7 Génistéine

La génistéine (4',5,7-trihydroxy-isoflavone) est une isoflavone, soit une molécule de type phytoestrogène, naturellement retrouvée dans les plantes (Vitale *et al.*, 2013). Le soja est la plante dans laquelle on retrouve la plus grande quantité de génistéine, à savoir une concentration aussi élevée que 3 mg/g (Vitale *et al.*, 2013). Bien qu'il y a plus de 300 variétés de plantes connues pour avoir une activité estrogénique (Vitale *et al.*, 2013), il y a un grand intérêt pour la génistéine retrouvée dans le soja dû à sa grande consommation mondialement et à son potentiel d'agir comme perturbateur du système endocrinien (Vitale *et al.*, 2013).

1.7.1 Le métabolisme de la génistéine

Il y a trois types d'isoflavones dans le soja; la génistine, la daidzin et la glycitéine (en plus petite proportion pour ce dernier) (Wu *et al.*, 2008). Dans les plantes, 99 % des isoflavones sont liées de manière covalente à une molécule de glucose, soit une forme qui n'est pas biologiquement disponible (Allred *et al.*, 2001b). La génistéine n'y fait pas exception; à l'état naturel, la génistéine est retrouvée sous forme glycolisée, soit la génistine (Allred *et al.*, 2001b). Suite à son ingestion, la génistine est hydrolysée, amenant la perte du glucose, formant ainsi l'aglycone, connu sous le nom de génistéine (Allred *et al.*, 2001b). La génistéine est une molécule lipophile, thermodynamiquement stable, ayant un petit poids moléculaire (PM= 270) (Yang *et al.*, 2012). Ces propriétés sont propices à une absorption rapide et presque complète (Yang *et al.*, 2012).

Chez l'humain, la conversion de la génistin en génistéine peut se faire par les enzymes β -glucosidases ou la muqueuse intestinale (Vitale *et al.*, 2013). La génistéine peut ensuite être absorbée ou métabolisée davantage par la microflore intestinale en autres métabolites (Vitale *et al.*, 2013). La métabolisation des isoflavones par des bactéries de l'intestin est importante pour leur bioactivation et biodisponibilité (Vitale *et al.*, 2013).

Cette action se fait principalement par les réactions de gluconisation et sulfation (avec une petite proportion des réactions effectuées par certains CYPs) (Vitale *et al.*, 2013). Une grande partie de ces réactions sont effectuées dans les entérocytes (Vitale *et al.*, 2013). Plusieurs facteurs, tels l'âge, le sexe et la source alimentaire peuvent influencer le degré de métabolisation des formes primaires d'isoflavones, ayant donc un impact sur la biodisponibilité chez l'humain (Vitale *et al.*, 2013). Des études ont démontré que la biodisponibilité de la génistéine est basse chez l'humain puisqu'elle est largement métabolisée sous forme inactive suite à l'absorption (Yang *et al.*, 2012). En effet, une grande quantité est directement éliminée, laissant une petite proportion retrouvée sous forme non conjuguée (aglycone) dans la circulation sanguine (Yang *et al.*, 2012). En tout, environ 1.6 % se retrouve à l'état stable suite à une dose unique de 50 mg (Yang *et al.*, 2012). Suite à son absorption, la génistéine se retrouve en plus grande concentration dans l'estomac, suivi du foie, le sang et les tissus reproductifs (utérus, ovaire, vagin et prostate) (Yang *et al.*, 2012). Au niveau du tissu mammaire, la génistéine se retrouve principalement sous forme de glucuronide, soit liée à une molécule d'acide glucuronique en concentration relativement basse (comparé au plasma); il y aurait donc une activité estrogénique faible dans le sein (Yang *et al.*, 2012). Les aglycones restant dans le sang seront éventuellement métabolisés par le système hépatique (Yang *et al.*, 2012). Finalement, la génistéine se fait éliminer par l'action métabolique des enzymes de la phase II (Yang *et al.*, 2012). La génistéine est principalement éliminée par les voies biliaire et rénale sous la forme conjuguée d'un glucose (Yang *et al.*, 2012).

1.7.2 Activité estrogénique de la génistéine

La génistéine possède une structure semblable à celle de l'E2, et peut agir en tant qu'agoniste ou antagoniste des ERs (Hilakivi-Clarke *et al.*, 2010). Bien qu'elle ait une affinité plus faible que l'E2, la génistéine a le potentiel de perturber l'activité du ER (Wu *et al.*, 2008). En effet, des études ont démontré que la génistéine peut induire des gènes dépendants de l'œstrogène, comme *c-Fos* (dans l'utérus et l'urètre prostatique) (Santell *et al.*, 1997, Strauss *et al.*, 1998). Il a été démontré que la génistéine peut se lier avec une affinité neuf fois plus forte avec l'isoforme β du ER en comparaison de l'isoforme α (Hilakivi-Clarke *et al.*, 2010). Ce fait est intéressant puisqu'il est de plus en plus reconnu que l'isoforme β peut contrôler négativement l'action proliférative de l'isoformes α (Heldring *et al.*, 2007). ER β est significativement plus exprimé pendant le développement précoce du sein et à l'âge adulte en comparaison de l'isoforme α (Hilakivi-Clarke *et al.*, 2010). Par contre, ER α est plus exprimé qu'ER β dans les tumeurs mammaires (Hilakivi-Clarke *et al.*, 2010). L'action que va exercer la génistéine sur le sein via les ERs va donc dépendre de plusieurs facteurs, tels que le stade de développement, l'activité des co-répresseurs/activateurs, la dose admise et le temps d'action (Vitale *et al.*, 2013). Plus le niveau d'exposition d'une femme à l'estrogène est haut, plus le risque de développer un cancer du sein est augmenté (Hilakivi-Clarke *et al.*, 2010). Il est donc important de comprendre les mécanismes d'actions et les données épidémiologiques des aliments connus pour avoir des propriétés estrogéniques.

1.7.3 Études épidémiologiques

La première étude qui a démontré un lien entre la consommation de génistéine et le risque de cancer du sein a été publiée en 1991 par l'équipe de Lee *et al.* (Lee *et al.*, 1991). Selon cette étude, parmi les femmes en pré-ménopauses de la ville de Singapour en Chine, on observe une diminution du risque de développement d'un cancer du sein chez celles qui consomment une quantité plus grande de soja (Lee *et al.*, 1991). Suite à cette étude, il y a une attention considérable sur l'analyse du lien entre la consommation en soja et l'incidence de cancer du sein (Wu *et al.*, 2008). Une méta-analyse sur des études épidémiologiques (surtout de types cas-témoin) effectuée par le groupe de Wu *et al.* a démontré un lien significatif entre l'apport en soja et la réduction du risque de cancer du sein chez des femmes asiatiques (Wu *et al.*, 2008). À l'inverse, une étude similaire effectuée par le groupe de Trock *et al.* a démontré que cette association est observée uniquement chez les femmes occidentales, et non chez les asiatiques (Trock *et al.*, 2006). Récemment, une nouvelle méta-analyse a démontré que les isoflavones du soja peuvent avoir un effet protecteur chez les femmes pré- et post-ménopausées asiatiques, mais pas chez les femmes occidentales (Chen *et al.*, 2014). Cette association semblait plus forte chez les femmes en pré-ménopauses en comparaison des femmes en post-ménopauses, reflétant l'importance de prendre en considération le statut hormonal lors de ce genre d'analyse (Chen *et al.*, 2014). Les données actuelles provenant d'études épidémiologiques suggèrent donc une relation inverse entre la consommation en génistéine et le risque de cancer du sein. Les différentes conclusions en fonction du groupe ethnique peuvent possiblement être expliquées par la forme et la source de l'isoflavone, la réponse biologique à cette molécule en fonction du groupe ethnique et les interactions possibles de la génistéine avec des hormones en fonction du profil hormonal de la femme (Nagata, 2010).

L'importance du statut hormonal est également appuyée par les études épidémiologiques comparant l'effet de l'exposition à la génistéine avant ou pendant la puberté et l'incidence de cancer du sein plus tard dans la vie. En effet, il a été démontré que la consommation de soja chez les adolescentes chinoises, américaines et canadiennes diminue de façon significative le risque future de cancer du sein, et ce, de façon plus importante que chez les adultes (Korde *et al.*, 2009, Shu *et al.*, 2001, Thanos *et al.*, 2006, Wu *et al.*, 2002). Lors de l'adolescence, la glande mammaire subie une phase importante de prolifération et de différenciation, la génistéine pourrait modifier l'expression de gènes, résultant en des effets protecteurs et préventifs contre le cancer. Il est également possible d'émettre comme hypothèse que les adolescentes expriment un plus haut niveau en ER β , ce qui pourrait être une cause des effets bénéfiques de la génistéine, en raison de sa grande affinité pour ce récepteur qui peut réguler négativement l'action proliférative de ER α .

1.7.4 La génistéine au niveau de la glande mammaire

Plusieurs études ont été réalisées afin de comprendre les mécanismes d'actions de la génistéine, notamment au niveau de la glande mammaire. Puisque les estrogènes sont impliqués dans la prolifération des cellules de l'épithélium mammaire, il semble contradictoire que la génistéine, une molécule estrogénique, puisse être liée à une

diminution du taux de cancer du sein. Afin d'exercer leur effet prolifératif, les ERs doivent pouvoir (entre autres mécanismes) activer la transcription de l'amphiréguline, un ligand d'EGFRs (Hilakivi-Clarke *et al.*, 2010). L'activation de certains EGFRs par l'amphiréguline est essentielle pour la prolifération massive des cellules épithéliales mammaires (Ciarloni *et al.*, 2007). La génistéine étant un inhibiteur de tyrosine kinase, il est donc possible que les effets protecteurs de la génistéine soient liés à une inhibition de l'activité de l'amphiréguline (Hilakivi-Clarke *et al.*, 2010).

1.7.4.1 La génistéine au niveau des cellules du sein

La génistéine est connue comme un antioxydant, un anti-inflammatoire, ainsi que pour ses capacités à inhiber l'angiogénèse, à induire l'apoptose et la différenciation et à réguler l'expression de gènes (Messina *et al.*, 1994). De plus, il a été suggéré que la génistéine peut inhiber l'activité de la progestérone 5 α -réductase (responsable de la production de la progestérone), de l'aromatase (permet la production de l'œstrogène), de l'ADN topoisomérase (contrôle la structure topologique de l'ADN) et les signaux émis par les protéines tyrosines kinases (Vitale *et al.*, 2013). La génistéine est bien connue pour la modulation d'événements épigénétiques. Plusieurs études suggèrent que les réponses cellulaires suite à un traitement de génistéine seraient liées à une modulation de l'activité de différents DNMTs. Il a été démontré que la génistéine peut renverser la méthylation des gènes BRCA1/2, induisant leur expression dans des cellules cancéreuses humaines mammaires (Bosviel *et al.*, 2012). Il a également été observé, *in vivo*, que la génistéine peut augmenter l'expression de deux suppresseurs de tumeurs, soit deux inhibiteurs de CDKs (p16 et p21), et diminuer l'expression de deux oncogènes soit *B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog* (BMI1) et c-MYC dans des cellules précancéreuses et cancéreuses (Li *et al.*, 2013a). Ces changements d'expression seraient dus à des modifications de méthylation d'histones au niveau des promoteurs associés (Li *et al.*, 2013a). De façon similaire, une exposition à la génistéine peut induire une baisse d'expression de la transcriptase inverse de la télomérase (hTERT, «*human telomerase reverse transcriptase*»), soit la sous-unité catalytique de l'oncogène télomérase, via la baisse de l'activité des DNMT1, DNMT3a et DNMT3b au niveau de son promoteur dans les cellules cancéreuses du sein (Li *et al.*, 2009). Cette baisse d'expression de hTERT serait due à une augmentation du niveau de E2F-1 (répresseur de hTERT) et une diminution de c-MYC (activateur de hTERT) (Li *et al.*, 2009). Il a également été démontré par l'équipe de Xie *et al.* que la génistéine a le potentiel de renverser les événements de méthylation au niveau des promoteurs de certains suppresseurs de tumeurs (comme la protéine muté d'ataxie télangiectasie (ATM, «*ataxia telangiectasia mutated*»), PTEN et *serpin peptidase inhibitor, SERPINB5; Clade B (ovalbumin), member 5* (SERPINB5)) dans les lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231 (Xie *et al.*, 2014). Cette action serait liée à l'inhibition de certains DNMTs, notamment DNMT1. À l'aide d'une technique de modèle moléculaire *in silico* pour l'analyse d'interaction, l'équipe de Xie *et al.* a proposé que l'inhibition de l'activité de DNMT1 se fait par une liaison de la génistéine dans le site catalytique de ce dernier (Xie *et al.*, 2014). Cette action pourrait bloquer l'accès de la cytosine, empêchant donc la méthylation (Xie *et al.*, 2014). L'ensemble de ces études suggèrent que la génistéine

pourrait exercer son action par l'activation de voies de signalisations ainsi que par des mécanismes épigénétiques.

Paradoxalement, certaines études ont démontré qu'une exposition à la génistéine aurait plutôt des effets cancérogènes. Chez des femmes post-ménopausées atteintes du cancer du sein, un traitement de genistin ou de génistéine a stimulé la croissance de cellules mammaires dans le cadre d'une étude pré-clinique (Allred *et al.*, 2001b). De plus, différentes études ont démontré qu'un traitement de génistéine peut augmenter le niveau de prolifération ainsi qu'amener une résistance à un traitement de tamoxifène (Allred *et al.*, 2001a, Ju *et al.*, 2002). Au contraire, Panhong Fan *et al.* ont démontré qu'un traitement de génistéine amène la diminution de prolifération dans cette même lignée cellulaire (Fan *et al.*, 2013). Des études dans un modèle plus près de l'humain, les primates, ont démontré qu'une exposition à la génistéine résulte en une diminution de la prolifération de l'épithélium mammaire et de l'épaisseur de l'endomètre (Wood *et al.*, 2007). Ces effets contradictoires pourraient être expliqués par des différences de protocoles et/ou de doses utilisées. En effet, des analyses par puce d'ADN de l'équipe de Lavigne *et al.* ont démontré qu'un traitement d'une dose physiologiquement disponible (10 μ M) de génistéine sur la lignée cellulaire MCF-7 peut amener à un patron d'expression de gènes indiquant une augmentation de l'activité mitotique, tandis qu'un traitement à des doses pharmacologiques (25 μ M) amène plutôt à l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose et la diminution de la prolifération (Lavigne *et al.*, 2008). L'ensemble de ces études démontre l'importance de bien comprendre les mécanismes d'actions de la génistéine afin d'évaluer son potentiel thérapeutique pour le cancer du sein.

1.7.5 La combinaison de la génistéine avec la décitabine

La décitabine est une molécule qui agit en tant qu'analogue de la cytidine par le remplacement du carbone cinq du cycle aromatique de la pyrimidine par un atome d'azote (Ellen J.B. Derissen *et al.*, 2013b). À de faibles doses, cette molécule synthétique permet la déméthylation de l'ADN par l'inactivation des DNMT1, sans effets toxiques au niveau des cellules (Ellen J.B. Derissen *et al.*, 2013b). Cette molécule est utilisée pour le traitement de différents types de cancers afin de permettre une réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs via l'arrêt de méthylation de leur promoteur (Ellen J.B. Derissen *et al.*, 2013b). L'augmentation de l'expression de ces gènes amène à une régulation de la progression du cycle cellulaire, permettant ainsi l'induction de la différenciation, la diminution de la prolifération et/ou l'augmentation de l'apoptose des cellules filles (Ellen J.B. Derissen *et al.*, 2013b, Nie *et al.*, 2014).

À ce jour, la décitabine est une molécule approuvée pour le traitement du syndrome myélodysplasique et la leucémie myéloïde aiguë (Wijermans *et al.*, 2000). De plus, une attention est portée sur cette molécule dans plusieurs études cliniques en phase I et II avec des résultats prometteurs pour le traitement du cancer de l'ovaire, du poumon, du côlon et autres (Nie *et al.*, 2014). Au niveau du cancer du sein, l'équipe du Dr Borges a démontré qu'un traitement de décitabine permet de renverser l'hyperméthylation du promoteur du gène codant pour la protéine kinase D1 (PRKD1, «*protein kinase D1*»),

ayant pour conséquence une diminution significative du taux d'invasion des cellules MDA-MB-231 (Borges et al., 2013). La protéine PRKD1 est importante pour le maintien du phénotype normal de l'épithélium et de prévenir la transition épithélio-mésenchymal, soit une des premières étapes pour amener une cellule vers plus de mobilité et d'invasion (Bastea et al., 2012). Une autre étude *in vitro* a démontré qu'un traitement de décitabine au niveau de différents types de cellules cancéreuses de la glande mammaire (T47-D, MDA-MB-231, MCF-7 et autres) permet d'augmenter l'expression de protéines ayant un rôle important dans le maintien de l'intégrité du génome et prévenir la dégradation de l'ADN, telles la protéine 1 de protection de la télomérase (POT1, «protection of telomeres protein 1» et la protéine interagissante avec TRF1 (TIN2, «TRF1 (telomeric DNA repeat binding factor 1) interacting protein 2) (Martinez et al., 2010, Motevalli et al., 2014).

À différentes reprises, il a été démontré que l'effet de la génistéine est plus puissant lorsque combinée à un agent déméthylant de l'ADN (comme la décitabine (5-aza-2'-deoxycytidine)) ou une enzyme déacétylase d'histone (comme la trichostatine A) (Li et al., 2013a, Li et al., 2009, Li et al., 2013b). Les mécanismes derrière les effets synergiques sur l'expression de gènes entre la génistéine et la décitabine ne sont toujours pas bien compris à ce jour.

CHAPITRE 2: A CO-TREATMENT OF GENISTEIN AND DECITABINE DECREASES PROLIFERATION AND ACTIVATES AHR IN BREAST CANCER CELLS

Traduction du titre en français : Un co-traitement de génistéine et de décitabine permet une diminution de la prolifération et l'activation d'Ahr dans des cellules cancéreuses mammaires.

Cet article à été soumis au journal *Carcinogenesis* en date du 16 janvier 2015.

2.1 Contributions des auteurs

2.1.1 Auteurs

Natasha Mercier,étudiante à la maîtrise en sciences expérimentales de la santé, INRS, Institut Armand-Frappier

Élise Kolasa, stagiaire postdoctorale, INRS, Institut Armand-Frappier

Michel Charbonneau, directeur de recherche, INRS, Institut Armand-Frappier

Isabelle Plante, directrice de recherche, INRS, Institut Armand-Frappier

2.1.2 Contributions des auteurs

Toutes les expériences et analyses contribuant au développement de cet article ont été réalisées par la première auteure, Natasha Mercier, à l'exception des expériences et analyses d'apoptose et impliquant les siRNA qui ont été réalisées par Élise Kolasa. L'article a été rédigé par Natasha Mercier, en collaboration avec Isabelle Plante. Les directeurs de recherche Michel Charbonneau et Isabelle Plante ont supervisé l'avancement du projet de recherche.

2.2 Résumé de l'article

Plusieurs études démontrent que l'isoflavone génistéine peut diminuer la viabilité des cellules cancéreuses mammaires. Parmi ces nombreuses propriétés anticancéreuses, la génistéine est bien connue pour sa capacité d'altération d'évènements épigénétiques, amenant à une différenciation d'expression d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs. Plusieurs études démontrent que les effets bénéfiques de la génistéine sont plus puissants lorsque cette dernière est combinée à la décitabine, soit une molécule pouvant déméthylar l'ADN. À ce jour, les mécanismes impliqués pour permettre une diminution dans la viabilité demeurent encore mal compris, tout comme l'efficacité en

fonction du sous-type de cancer du sein. Le cancer du sein peut être catégorisé en fonction de l'expression de certains récepteurs, tels ER α , PR et HER2. Il semble aussi avoir un lien entre l'expression d'Ahr et le cancer du sein, puisque lorsqu'activé, par son ligand connu avec la plus grande affinité, le TCDD, ce récepteur amène à la diminution de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires. Parmi les ligands exogènes d'Ahr, il y a différents types d'isoflavones. Notre objectif était donc de déterminer les effets au niveau de la viabilité et l'expression de certains marqueurs du cancer du sein, suite à une co-exposition de génistéine et de décitabine, sur des lignées de cellules humaines cancéreuses mammaires présentant différents profils de cancer du sein. Suite aux traitements, il y a eu l'analyse comparative sur la viabilité, l'expression des marqueurs ER α / β , PR-A/B, HER2 et Ahr et sur l'activation d'Ahr. L'ensemble de nos résultats (présentés sous forme d'article et en annexe) a démontré qu'un co-traitement de génistéine/décitabine peu diminuer significativement la viabilité, par une baisse de prolifération, des cellules cancéreuses (T47-D et MDA-MB-231) et transformées (MCF-10A e MCF-12A), sans affecter les cellules primaires saines. Au niveau des cellules cancéreuses, il y a eu l'observation d'une diminution significative de l'expression des PRs cytoplasmiques et des HER2 dans les cellules T47-D, ainsi qu'une translocation nucléaire d'Ahr par son activation dans les cellules T47-D et MDA-MB-231. Nos résultats suggèrent que la baisse de viabilité des cellules cancéreuses induite par ce traitement pourrait être via l'activité d'Ahr et la baisse de l'expression des PRs et HER2. Cette étude démontre qu'un co-traitement de génistéine/décitabine a un potentiel thérapeutique contre le cancer du sein, tant au niveau des tumeurs de type luminal B et triple négatif.

2.3 Article tel que soumis

A Co-treatment of Genistein and Decitabine Decreases Proliferation and Activates Ahr in Breast Cancer Cells

Natasha Mercier, Élise Kolasa, Michel Charbonneau and Isabelle Plante*

INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, H7V 1B7, Canada

* For correspondance : Isabelle Plante

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies

Laval, QC

H7L 5S1

isabelle.plante@iaf.inrs.ca

2.3.1 Summary

This study showed that a combination of genistein-decitabine inhibits proliferation in breast cancer cells representative of Luminal B and triple-negative subtypes, without having significant effects on normal cells. This anti-proliferative effect is achieved, in part, by activation of AhR.

2.3.2 Abstract

Breast cancer can be classified in different subtypes, largely based on the expression of three receptors: ER, PR and HER2. Although survival has increased in a last decades due to, among others, the development of targeted therapies against these receptors, breast cancer remains the cause of many deaths. There is therefore a need for new therapeutic agents targeting different receptors. Studies have shown that genistein can reduce the viability of breast cancer cells. It is known that flavonoids are ligand for AhR. Thus, our objective was to determine the effects of a combination of genistein, an isoflavone, and decitabine on cell viability, on the expression of receptors targeted by current therapies and on AhR in different breast cancer subtypes. Together, our results showed that exposure to genistein alone or in combination with decitabine significantly reduces the viability of cancer cells, without affecting healthy primary cells, at most doses tested. This decrease in viability seems to be associated with nuclear translocation and activation of AhR in T47-D and MDA-MB-231 cells, and to down-regulation of the expression of PR and HER2 in T47-D cells. Moreover, inhibition of AhR partially restore cell proliferation in T47-D cells following genistein-decitabine treatment, suggesting that AhR is involved in the anti-proliferative effects of the co-treatment. Together, our results suggest that AhR activation could be a potential therapeutic target for both triple-negative and luminal B subtypes of breast cancer, and that this activation could be achieved through a genistein-decitabine treatment.

2.3.3 Introduction

Each year, breast cancer affects 1 in 8 women in North America, and 1 in 30 will die from it. Breast cancer is a heterogeneous disease encompassing multiple subtypes, each with different molecular characteristics, prognoses and responses to therapies. Four major molecular subtypes are generally distinguished, based on the expression of estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) (Prat *et al.*, 2011). These receptors are largely involved in proliferation, apoptosis and control of cell cycle progression of the breast epithelium. As a result, therapeutic agents have been developed to specifically target these receptors, increasing considerably the chances of eradicating the disease. However, some tumors become resistant to these targeted treatments. Moreover, tumors that express none of these three receptors (triple-negative) are linked to poor prognostic and survival because no specific treatment is available, due to the lack of available target (Prat *et al.*, 2011).

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway, which is involved in various cellular processes such as the cell cycle and cell migration, could be a potential drug target for breast cancer treatment (Murray *et al.*, 2014). Epidemiological studies have shown that women exposed to xenobiotic ligands of AhR, like PCB and PCDD, have a significantly

reduced risk of developing breast cancer (Bertazzi *et al.*, 1989a, Bertazzi *et al.*, 1989b, Denison *et al.*, 2011). Indeed, activated AhR may lead to stop cell progression at the G1 checkpoint in several types of breast cancer cells (Saito *et al.*, 2014). Therefore, there is an on-going search for non-toxic ligands that can activate AhR to inhibit proliferation of breast cancer cells.

Isoflavones are natural molecules considered generally safe for the organism, and many of them are known to activate AhR (Denison *et al.*, 2003). Genistein is an isoflavone with estrogenic activity found in plants, particularly in soybeans (Vitale *et al.*, 2013). Epidemiological studies have demonstrated a link between the consumption of genistein and decreased risk of developing breast cancer (Chen *et al.*, 2014, Korde *et al.*, 2009, Shu *et al.*, 2001, Thanos *et al.*, 2006, Trock *et al.*, 2006, Wu *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2008). Similarly, in rodents, exposure to dietary genistein before or during puberty resulted in a lower incident of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors (Fritz *et al.*, 1998, Lamartiniere *et al.*, 2002). Several anti-cancer properties have been associated with this molecule, such as antioxidant, anti-inflammatory and anti-angiogenesis properties and capacity to induce apoptosis of cancer cells (Messina *et al.*, 1994). Moreover, genistein has the ability to regulate gene expression by modulating epigenetic events leading to change in the expression of oncogenes and tumor suppressor genes (Bosviel *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2013b, Xie *et al.*, 2014). Interestingly, it has been found that genistein is more potent in modulating gene and protein expression when combined with other drugs, such as decitabine (Li *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2013b). Decitabine is a synthetic molecule approved for the treatment of various cancers, which inhibits action of DNA methyl transferases (E. J. Derissen *et al.*, 2013a). As a result, exposure to decitabine generally leads to increased expression of tumor suppressor genes.

This study aimed to evaluate the therapeutic potential of a combination of genistein-decitabine on breast cancer cells. More specifically, we wanted to assess if the co-treatment can 1) reduce the viability of breast cancer cells, 2) alter the expression of one or more receptors targeted by current therapies and 3) activate AhR.

2.3.4 Materials and methods

2.3.4.1 Compounds

The following compounds were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, Missouri, US): Genistein, 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine), dimethyl sulfoxide (DMSO), HEPES, human epidermal growth factor (EGF), bovine insulin and cholera toxin. Others compounds includes 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD, Radian Cil, Inc, 99% pure), Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco (Life Technologies, Burlington, ON)), and Hydrocortisone (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC).

2.3.4.2 Cell culture conditions

All cell lines, except Jurkat (J77), were purchased from ATCC. T47-D (lot #61062006), MDA-MB-231 (lot #59922846) and Primary Mammary Epithelial Cells (HMEC) (PCS-

600-010, lot #61682028) were characterized by ATCC by DNA profiling, maintained under recommended conditions and kept in culture for a maximum of 10 passages (approximately 4-6 weeks). Doubling-time and cell specific markers were also regularly monitored. T47-D breast carcinoma cells were maintained in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), supplemented with 2% (w/v) of sodium bicarbonate, 0.1% (v/v) of bovine insulin, 0.01M of HEPES and 10% FBS. MDA-MB-231 breast carcinoma cells were maintained in RPMI Medium 1640 (Gibco), supplemented with 2% (w/v) of sodium bicarbonate and 10% FBS. HMEC (human mammary epithelial cells) were maintained in Mammary Epithelial Cell Basal medium (ATCC) supplemented with compound provided in the Mammary Epithelial Cell Growth Kit (ATCC). All cell lines were grown in plastic petri dishes, plates or flasks and passage at a confluence of 80% in sterile conditions. The medium was changed every 48 hours. Jurkat (J77) cells were a generous gift of Jacques Bernier. They were maintained in RPMI Medium supplemented with 10% FBS. These cells were not characterized as they were used only as a positive control for apoptosis.

2.3.4.3 Cell treatments

Genistein and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) were diluted in DMSO, and decitabine in PBS, in sterile conditions. Control cells were treated DMSO and PBS for a final concentration of 0.1%. The cells were seeded and incubated for 24 hours to allow cell adhesion. Cells were then incubated with fresh medium containing the compound of interest (genistein (10, 25, 50 and 100 μ M), decitabine (20nM) or TCDD (5.3 nM, used as a positive control for AhR activation)) for 48 hours for protein expression and localisation analysis, and 6 days for viability analysis. When required, treatment medium was renewed every 48h. Genistein doses were chosen based on physiologically achievable doses (10 μ M), pharmacological doses (25-50 μ M) and a higher dose, presumably toxic (100 μ M) (Lavigne *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2013a). For decitabine, the 20nM dose was chosen based on a dose-response clone's formation assay that showed a 50% reduction in the number of clones in MDA-MB- 231 cells after 10 days of treatment (data not published). Staurosporine (1 μ M for 2h) was used to induce apoptosis in Jurkat (J77) cells.

2.3.4.4 Transcriptional activity of AhR analysis

The cells were seeded in 24-well plates and incubated for 24 hours. Cells were first transfected with the reporter plasmids (Cignal Reporter Assay (XRE) kit, Qiagen, Toronto, ON) using lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer guidelines. 16 hours post transfection, cells were treated with experimental compounds for 8 hours. The signal was reported using the Dual-Glo luciferase Assay system kit (Promega, Madison, WI), according to the manufacturer guidelines and analyzed using the MicroBeta Trilux (PerkinElmer, Woodbridge, ON).

2.3.4.5 Viability assay

Cell viability was assessed by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) analysis, according to manufacturer's instructions (Sigma).

2.3.4.6 Western blot analysis

Nuclear and cytoplasmic protein extractions were performed using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific) according to the manufacturer guidelines. Protease inhibitors were added to the lysis buffers. Whole cell protein extracts were prepared using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton 100X, 1% sodium deoxycholate and 1% SDS), supplemented with 5 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, and 1 mM Na₃VO₄. Samples were aliquoted, snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C. All steps were performed on ice. Using this kit, two fractions are obtained: a fraction, enriched in nuclear proteins, and a fraction enriched in cytoplasmic proteins, which also contained membrane proteins.

Protein concentrations were determined using the Pierce BCA protein assay kit (Thermo scientific). For each sample, 10-30 µg of protein (depending on the cell type) was separated onto SDS-PAGE gels (TGX Stain-Free FastCast Acrylamide kit, 10%, BioRad, Mississauga, ON) and transferred onto a PVDF membranes. Membranes were blocked with TBS-Tween 0.1 % Tween 20 containing 5 % non-fat milk and incubated overnight at 4°C with primary antibodies (Caspase 9 (1/1000), Cell Signaling (9502); Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) (1/1000), Biosource (AHF0262); AhR (1/1000), Santa Cruz (SC-133088); ERα (1/1000), Santa Cruz (SC-8005); ERβ (1/1000) Santa Cruz (SC-8974); PR-A/B (1/5000), Cell Signaling (#3176); HER2 (1/5000), Cell signaling (#2165S). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (goat-anti-rabbit (1/10 000), Santa Cruz (SC-2004); goat-anti-mouse (1/10 000), Santa Cruz (SC-2005)) were used. Chemiluminescent signals were detected using the Clarity western ECL substrate (BioRad) and analysed using ChemiDoc MP System and ImageLab software (BioRad). Protein expressions were normalised on total lane protein.

2.3.4.7 Immunofluorescence

Cells were seeded on coverslips and treated as described. Cells were fixed and permeabilized using 80% methanol/20% acetone for 15 min at 4°C, followed by two washes with cold PBS. The samples were blocked using 2% BSA (diluted in PBS) in a humid room and then incubated with AhR antibody (1/50) followed by a mouse-Alexa-488 secondary antibody (1/500) (Invitrogen). Nuclei were stained with DAPI. AhR localisation was analysed using a LSM710 Zeiss confocal microscope.

2.3.4.8 Reverse cell transfections

Scramble and specific AhR siRNA (Invitrogen: s1200, s199481) were diluted in Opti-MEM I medium and mixed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer recommendations. Cells were trypsinized and added to the medium containing siRNA at the density of 3x10⁴ cells/cm². The mixture was replaced by regular medium the day after and cells harvested 48h, 72h, 96h and 120h later.

2.3.4.9 Assessment of viability in real-time using xCELLigence technology

Cells were transfected as described above and seeded in E-Plates (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA). The siRNA-lipofectamine 2000 mixture was replaced by medium containing genistein and decitabine the day after. Cell proliferation was measured

quantitatively and in real-time using an xCELLigence™ RTCA DP instrument (ACEA Biosciences). The cell index, which represents the number of cells in a specific well, is measured by changes in impedance detected by gold electrode microarrays at the bottom of each well. Cell impedance was measured every 10 minutes during 96h using ACEA Biosciences RTCA software (version 1.2.1). The areas under the curve were used to compare effects between groups.

2.3.4.10 Statistic

Experiments were repeated at least 3 times. Data were analyzed using GraphPad (5th edition) using a Student *t* test or ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison test when conditions of applications were respected. Otherwise, a Mann-Whitney test or Krsuskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test were used.

2.3.5 Results

2.3.5.1 T47-D and MDA-MB-231 cells are representative of the luminal B and triple-negative subtypes, respectively

We first characterized the protein expression profile of two breast cancer cell lines, T47-D and MDA-MB-231 cells, as well as of human mammary epithelial cells (HMEC). Three main reasons supported the use of these three cell types. First, we wanted to compare efficiently of the treatment between two subtypes of breast cancer. Second, as genistein is a flavonoid thought to have estrogenic properties, we aimed to determine if genistein-decitabine could modulate levels of hormonal receptors or the aryl hydrocarbon receptor (AhR). Third, we wanted to evaluate the effects of the treatment on cancerous and non-transformed cells. Western blot analyses demonstrated that MDA-MB-231 cells are representative of triple-negative cancer, as they do not express ER α / β , PR A/B or HER2 (Figure 1). In contrast, T47-D cells express ER α / β , PR A/B and HER2, which are typically expressed in luminal B subtype (Figure 1). HMEC express HER2, but not ER α / β and PR A/B (Figure 1). All three cell types expressed AhR (Figure 1).

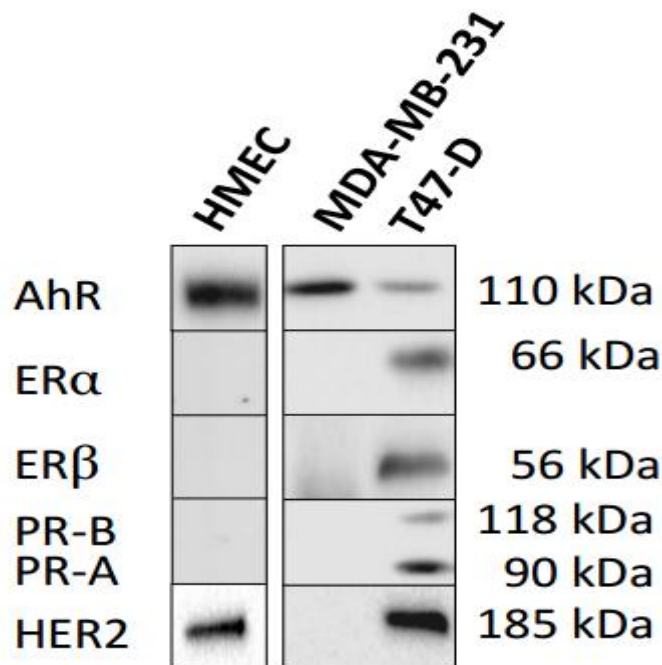


Figure 1: T47-D and MDA-MB-231 Cell Marker Profiles are Representative of Luminal B and Triple-negative Subtypes of Breast Cancer, Respectively. T47D, MDA-MB-231 and HMEC cells were seeded in petri dishes and maintained in appropriated medium for 24 hours before being harvested. Cells were lysed and protein expression was measured by western blot analysis. T47-D cells has a luminal B profile, expressing ERα/β, PR-A/B and HER2. In contrast, MDA-MB-231 cells were more representative of triple-negative breast cancer, expressing none of these receptors. HMEC cells expressed HER2 only. All three cell lines expressed AhR.

2.3.5.2 Genistein, with or without decitabine, significantly reduces viability of human breast cancer cells without affecting PARP and Caspase 9

The effects of genistein, decitabine or a combination of both molecules on cell viability were evaluated by a MTT assay. In T47-D cells, genistein had a bimodal effect, increasing the number of viable cells by 25% at the lowest dose (10μM), while decreasing cells viability by 50-80% at higher doses (25-100 μM) (Figure 2A). In MDA-MB-231 cells, genistein significantly decrease cells viability by more than 60% at all doses (Figure 2B), while only the two highest doses (50-100μM) affect viability of HMEC (Figure 2C). Decitabine alone did not affect viability of T47-D cell and HMEC, but slightly decreased viability of MDA-MB-231 cells. Surprisingly, decitabine seems to have a protective effect when combined with genistein in all cells. Indeed, cell viability was significantly increased when 25μM of genistein was combined with decitabine compared to genistein alone in T47-D, and for doses between 10-50μM for MDA-MB-231 cells (Figure 2A,B). Similarly, in HMEC, genistein alone significantly decreased viability of the cells at 50 and 100μM, but only at 100μM when combined with decitabine (Figure 2C).

We then wanted to determine if the co-treatment of genistein-decitabine was decreasing cell viability by inducing apoptosis. We thus analysed the expression of PARP and caspase 9, two proteins that are cleaved during apoptosis. While antibodies used were able to recognize both full-length and cleaved forms of PARP and caspase 9 in Jurkat (J77) cells treated with staurosporine, only the full-length proteins were detected in T47-D and MDA-MB-231 cells upon treatment (Figure 2D). Protein levels were also unaffected by the treatment (Figure 2D). These results suggest that the genistein-decitabine treatment induced a decrease in proliferation in breast cancer cells rather than increased apoptosis. Together, these results suggested that a combination of genistein between 10-50 μ M and decitabine (20nM) can efficiently decrease proliferation of breast cancer cells representative of the triple-negative subtype (MDA-MB-231 cells), without significantly affecting normal cells viability (HMEC). In luminal B subtype (T47-D), lower dose of genistein (10 μ M) can significantly increase cancer cells proliferation with or without decitabine, while higher doses (50-100 μ M) significantly decrease cell proliferation.

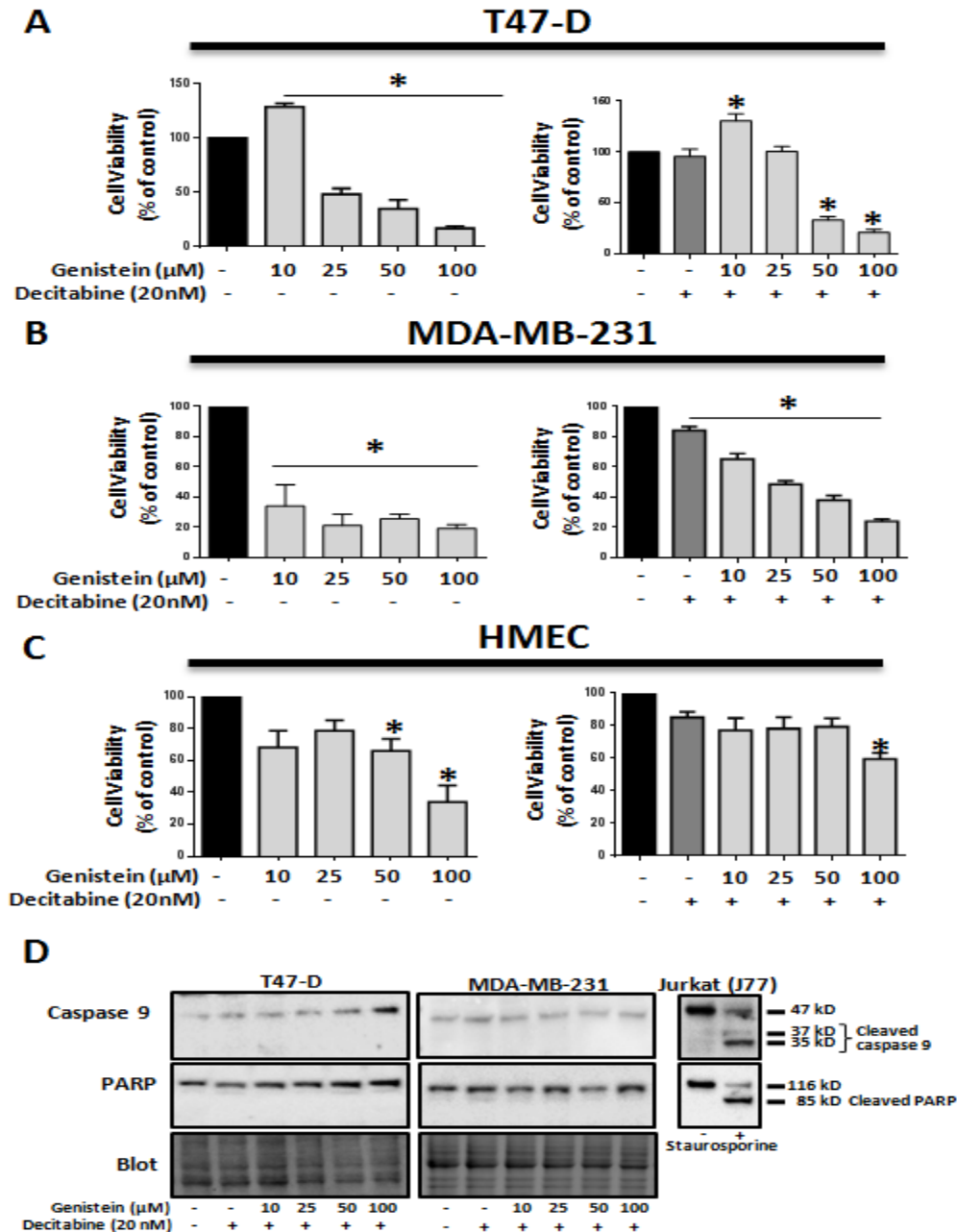


Figure 2: Genistein, with or without decitabine, significantly reduces viability of human breast cancer cells without affecting PARP and Caspase 9, and Has Little Effects on Primary Cells. T47-D (A), MDA-MB-231 (B) and HMEC (C) cells were treated with 10, 25, 50 and 100 μM of genistein, 20nM of decitabine or the combination of both molecules, as described. Viability was assessed after 6 days of treatment by MTT assay. Data represent means from three independent experiments (±SEM). *= $p < 0.05$ D) Cells were treated with 10, 25, 50 and 100 μM of genistein, 20nM of decitabine or the combination of both for 48h, as described. Cytoplasmic, nuclear or whole cells lysats were harvested and subjected to western blot analysis using Caspase 9 and PARP antibodies recognizing both full-length and cleaved species. Jurkat (J77) cells treated with 1 μM staurosporine for 2h were used as positive control. No significant changes in protein cleavage or levels were measured. Data were normalized on total protein for each lane (blot). Blots are representative of 3-5 independent experiments.

2.3.5.3 The combination of genistein-decitabine decreases the expression level of PR and HER2 in T47D cells

We then wanted to assess if genistein-decitabine treatment can decrease proliferation by modulating the expression of ER, PR and HER2 in T47-D cells, or can restore their expression in MDA-MB-231 cells. In T47-D cells, levels of ER α / β were not affected by the treatment, nor their cellular localization, as demonstrated by western blot analyses (Figure 3A). HER2 protein levels were significantly decreased in whole lysat at 100 μ M only, without being significantly affected in other fractions or doses (Figure 3A). Interestingly, the treatment resulted in a gradual reduction of the expression of PR A/B in whole lysat, which was significant only at the highest dose (Figure 3A). This decrease seems to be resulting from degradation or decreased transcription as levels were significantly lower in the cytoplasmic fraction at the two highest doses, without being affected in the nuclear fraction (Figure 3A).

In MDA-MB-231 cells, levels of ER α and PR A/B were not increased by the treatment (Figure 3B). Surprisingly, we were able to detect low levels of ER β in the cytoplasmic fraction, of MDA-MB-231 cells (Figure 3B). Although its expression was not affected by the treatment (Figure 3B), it suggest that low levels of ER β are present in MDA-MB-231 cells that cannot be detected in whole lysat (Figure 1), but can be observable when cells are sub-fractionated. Similarly, we were able to detect HER2 in whole lysat and the cytoplasmic fraction in MDA-MB-231 cells during these assays (Figure 3B), while we did not detect it in our first screening (Figure 1). As cells were used at similar passages and extracted under similar conditions, the only difference explaining this disparity is the presence of the vehicles (DMSO and PBS) in the media in all groups during treatment. Nevertheless, levels of HER2 were not affected by genistein-decitabine treatment in MDA-MB-231 cells. Together, our results suggest that decreased proliferation in T47-D cells can be linked, at least in part, to inhibition of PR A/B. However, other mechanisms are involved since MDA-MB-231 cells are also affected by the treatment, without expressing PR A/B.

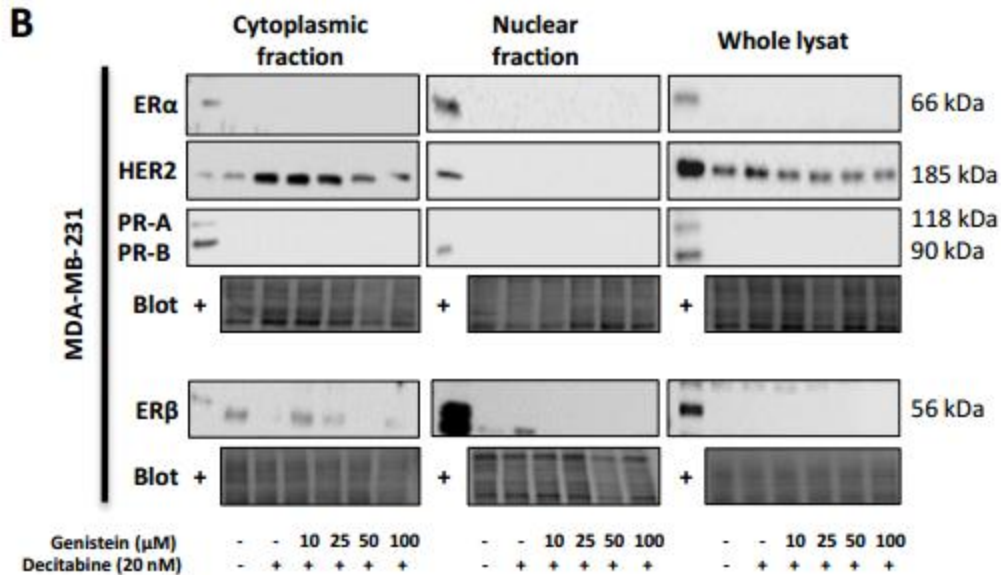
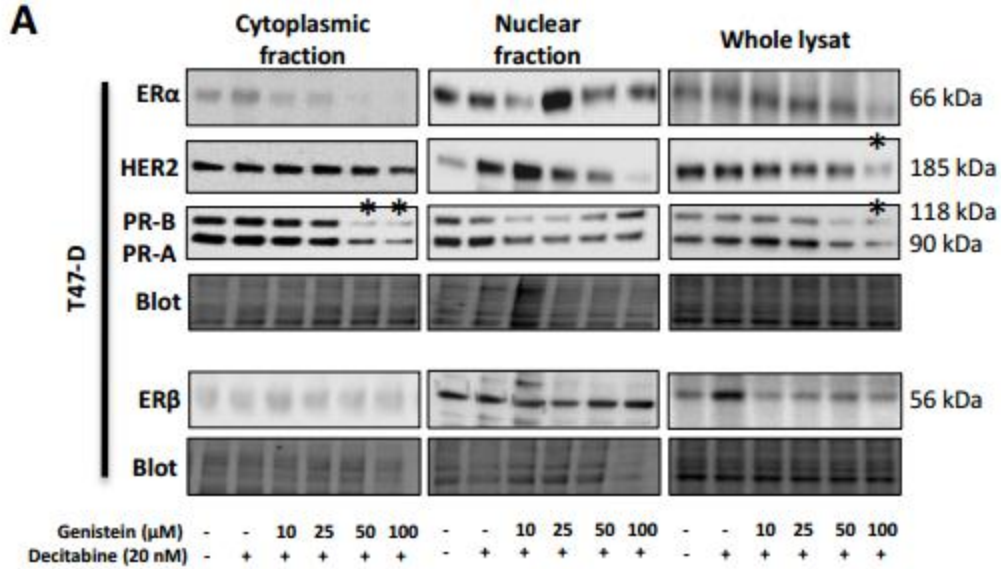


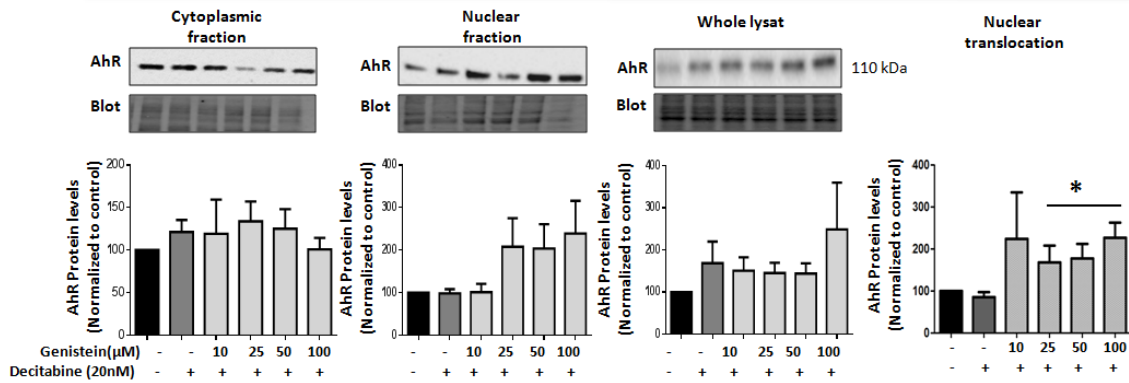
Figure 3: An Exposure to a Combination of Genistein-Decitabine Has no Significant Effects in MDA-MB-231 Cells, but Decreases PR-A/B and HER2 Levels in T47-D Cells. T47-D (A) and MDA-MB-231 (B) cells were treated with 10, 25, 50 and 100uM of genistein, 20nM of decitabine or the combination of both, as described. Cytoplasmic, nuclear or whole cells lysats were harvested and subjected to western blot analysis. A) Levels of ERα/β did not significantly changed in T47-D treated-cells compared to control. There was a dose-related decreased in PR levels in whole lysat and cytoplasmic fraction, which was significant at the highest and two highest doses, respectively. HER2 expression was also significantly decreased in whole lysats at the highest dose B) In MDA-MB-231 cells, no significant differences were measured in protein levels. T47-D were used as positive control (first lane of the blots, denoted as +). Data were normalized on total protein for each lane (blot). Blots are representative of 3-5 independent experiments. *= $p < 0.05$

2.3.5.4 Genistein-decitabine co-treatment activates AhR in T47D and MDA-MB-231 cells

Several studies have shown that activation of AhR can decrease viability in various cancer cell lines (Murray *et al.*, 2014). We thus assessed AhR status in T47-D and MDA-MB-231 cells upon co-treatment with genistein-decitabine. Western blot analyses showed that there was no significant changes in protein expression in the cytoplasmic fraction or in the whole lysat in both cell lines, except a small decrease in AhR expression in whole lysat of MDA-MB-231 cells (Figure 4). Although level of significance was not reached, AhR tended to accumulate into the nucleus in both cell lines (Figure 4). We thus measured nuclear translocation as a ratio of expression in the nuclear fraction on that of cytoplasmic fraction. In T47-D cells, there was a significant increase in nuclear translocation between 25 to 100 μ M of genistein combine with decitabine, while we observed a dose-increase (not significant) in MDA-MB-231 cells (Figure 4A, B). Upon translocation into the nucleus, AhR act as a transcription factor. Using a luciferase-based assay, we determined that in T47-D and MDA-MB-231 cells, AhR activity was increased when exposed to 10-50 μ M and 10-25 μ M of genistein, respectively, combined with decitabine (Figure 5). Interestingly, while exposure to TCDD, which is recognized as one of the most potent ligand of AhR, resulted in a 5-time increase in AhR activity in T47-D cells, it had no effect in MDA-MB-231 cells (Figure 5A). Those results were confirmed by western blot and immunofluorescent analyses where we showed that even though exposure to TCDD resulted in a clear decrease of AhR expression in the cytoplasmic fraction and an increase in the nuclear fraction in both cell lines, CYP1A1 expression, a well-known target of AhR, was increased only in T47-D cells (Figure 5B, C). Similarly, viability of TCDD-exposed T47-D cells was decreased, while there was no change in TCDD-exposed MDA-MB-231 cells (Figure 5D). These results suggested that nuclear translocation of AhR can resulted in different cell response, depending of the cell lines. Moreover, it suggests that transcriptional activity is required to inhibit cell proliferation. Together, our results suggested that the genistein-decitabin treatment leads to nuclear translocation and activation of AhR in both cell lines, and can potentially be linked to the observed inhibition in proliferation.

A

T47-D



B

MDA-MB-231

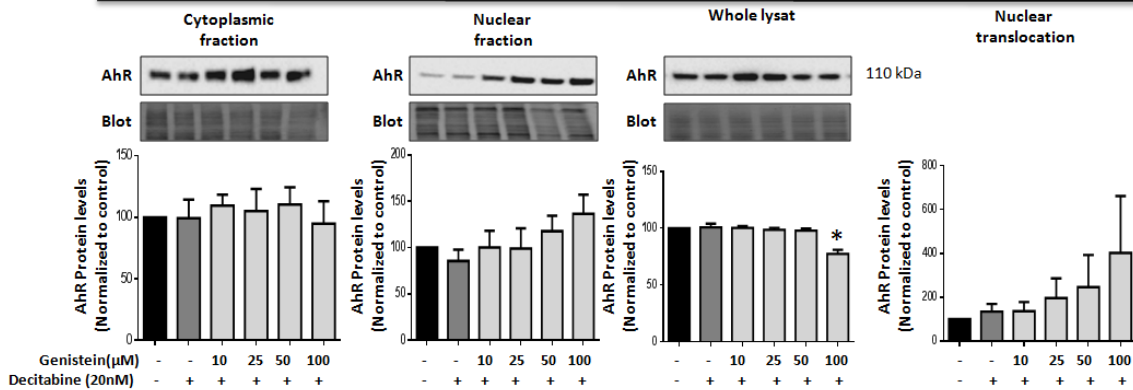


Figure 4: Exposure to a Combination of Genistein-Decitabine Induces Nuclear Translocation of AhR in T47-D and MDA-MB-231 Cells. Cells were treated with 10, 25, 50 and 100μM of genistein, 20nM of decitabine or the combination of both, as described. Cytoplasmic, nucleus or whole cells lysats were harvested and subjected to western blot analysis. A) In T47-D cells, while it was not statistically significant, nuclear levels of AhR tented to increase in a dose-dependent manner, without being changed in cytoplasmic and total lysats. Nuclear translocation, measured as a ratio of the levels of nuclear on cytoplasmic fractions, was significantly increased after a co-treatment of 10-100μM of genistein and 20nM decitabine. B) In MDA-MB-231 cells, there was a small decrease in whole lysat at the highest dose and no changes in the cytoplasmic fraction. Similar to T47-D, AhR tended to accumulate in a dose-related manner, but without reaching significance. Nuclear translocation also increased upon genistein-decitabine co-treatment without reaching significance. Data were normalized on total protein for each lane (blot). Blots are representative of 3-5 independent experiments. Data represent means from 3-5 independent experiments (±SEM). *p<0.05

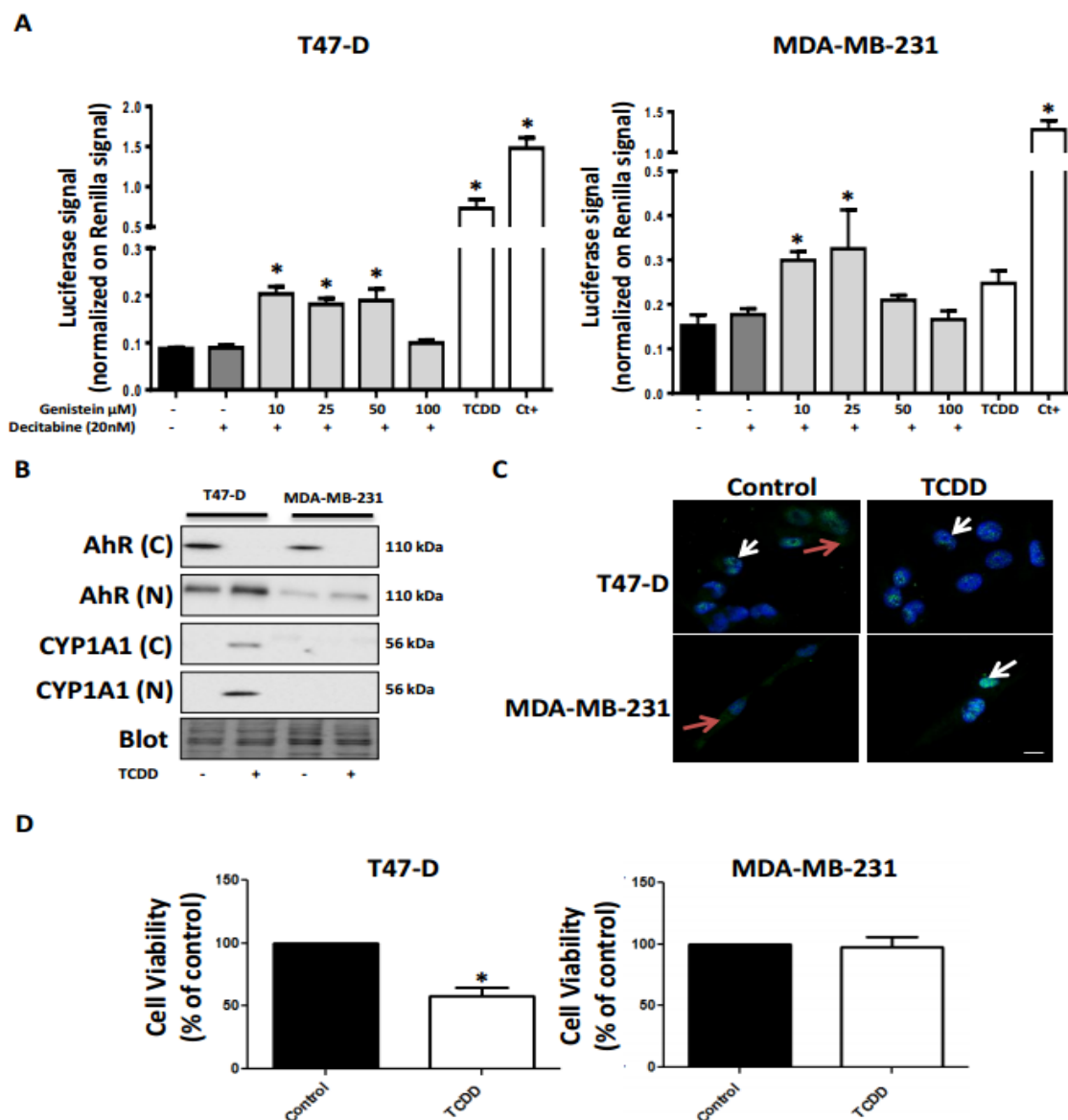


Figure 5: Exposure to a Combination of Genistein-Decitabine Results in Activation of AhR in T47-D and MDA-MB-231 Cells. A) Cells were first transfected with XRE-luciferase containing vector. The following day, cells were treated with 10, 25, 50 and 100μM of genistein, 20nM of decitabine or the combination of both, as described. Luciferase activity was increased in T47-D and MDA-MB-231 cells treated 10-50μM and 10-25μM of genistein, respectively, and 20nM decitabine. While a strong signal was observed, as expected, with the positive control (Ct+) in both cell lines, exposure to TCDD increased significantly the luciferase signal only in T47-D. Data represent means from three independent experiments ($\pm$ SEM). $^{*}p<0.05$. B-D) Cells were treated with TCDD, as described. B) Cytoplasmic and nucleus fractions were harvested and subjected to western blot analysis. In both cell lines, TCDD exposure resulted in nuclear translocation of AhR. However, CYP1A1 expression was induced only in T47-D. Data were normalized on total protein for each lane (blot). Blots are representative of 3 independent experiments. C) Cells were fixed and stained with AhR antibody (green). While AhR localized in the cytoplasm (red arrows) and in the nuclear (white arrows) in untreated cells, it localized predominantly into the nuclear upon TCDD treatment in both cell lines. Nuclei were stained with DAPI. Bar = 10μM. D) Viability was assessed by MTT assay, as described. Data represent means from three independent experiments ($\pm$ SEM). $^{*}p<0.05$.

2.3.5.5 Knocking-down AhR partly rescue the genistein-decitabine induced decrease in proliferation in T47-D cells

To determine if activation of AhR was linked to the observed decrease in cell proliferation, we knocked-down AhR in T47-D cells using specific siRNA. Two different constructs were used, resulting in a decrease of 30% and 80% of AhR protein expression 72h after transfection (Figure 6A). A time-response experiment demonstrated that the knock-down was efficiently achieved 48-120h after transfection (data not showed). Knocking-down AhR in T47-D cells resulted in an increase in cell proliferation, as observed in real-time, which was significant only when AhR was reduced by 80% (Figure 2B). We then compared the effects of the genistein-decitabine treatment on cells transfected with siRNA specific to AhR with cells transfected with a scramble siRNA. When normalized to their specific control, we observed a ~10-20% rescue in cell proliferation upon down-regulation of AhR in cells treated with 25 μ M of genistein combined with decitabine (Figure 6C). Together, these results suggested that AhR plays a role in the anti-proliferative action of the co-treatment of genistein-decitabine.

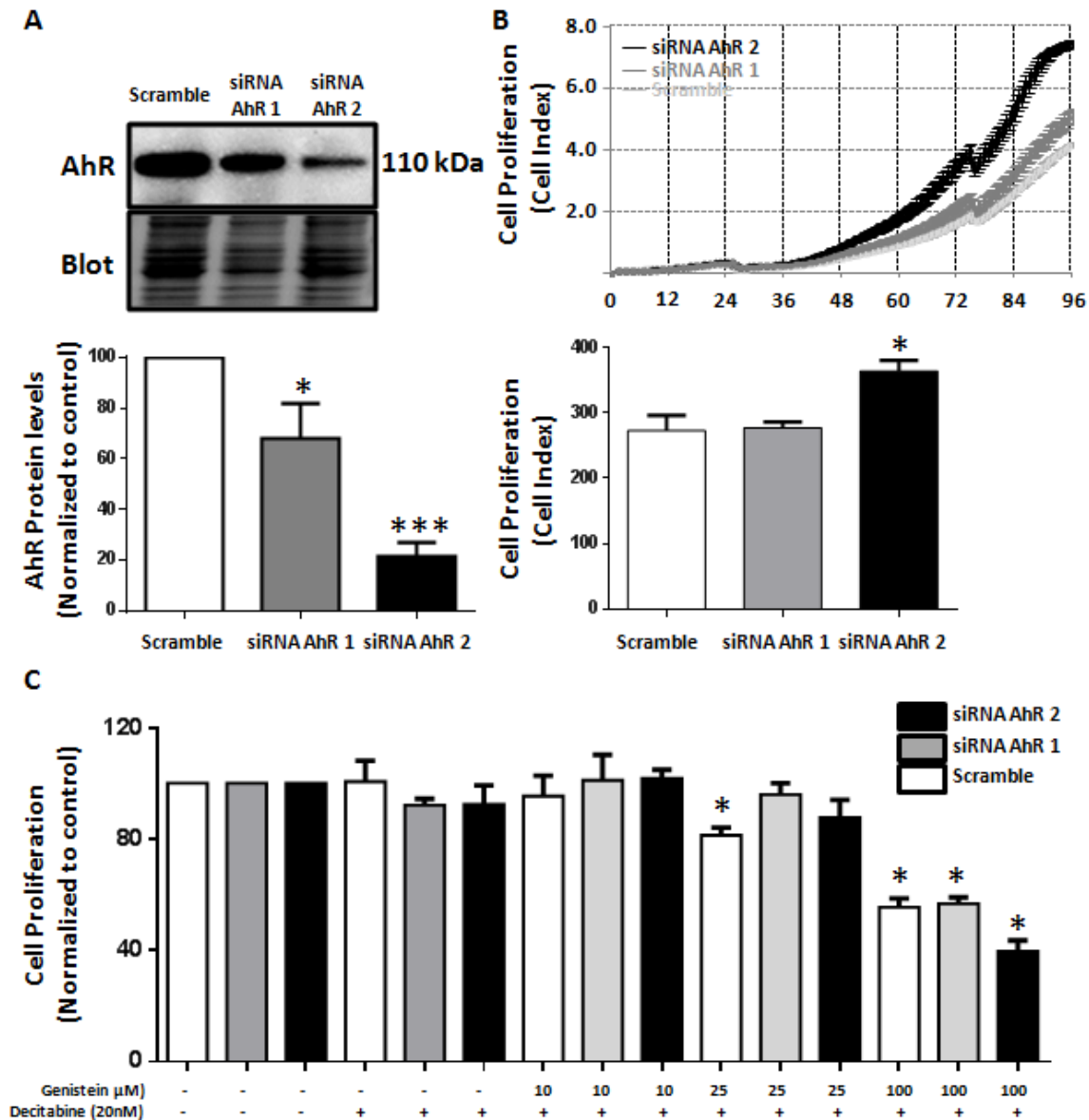


Figure 6: Down-regulation of AhR Results in Increased Cells Proliferation and Partially Rescues Cell Proliferation in Genistein-Decitabine Treated T47-D Cells. Cells were transfected with scramble siRNA or two different siRNA specific for AhR (siRNA AhR 1 and siRNA AhR 2), as described. A) 72h after transfection, cells were harvested and subjected to western blot analysis. AhR levels were decreased by 30% and 80% using siRNA AhR 1 and 2, respectively. Data were normalized on total protein for each lane (blot). Blots are representative of 3 independent experiments. Data represent means from three independent experiments ($\pm$ SEM). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. B-C) Cell proliferation was measured in real-time using an xCELLigence™ RTCA DP instrument (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA). B) Cell proliferation was significantly increased when AhR was knocked-down by 80%. Data represent means of the area under the curve from three independent experiments ($\pm$ SEM). * $p < 0.05$. C) The day after transfection, cells were treated with 10, 25 and 100uM of genistein, 20nM of decitabine or the combination of both, as described. Proliferation was measured in real-time for 96h. A small rescue of the proliferation was observed in T47-D cells transfected with siRNA AhR 1 and 2, but only at 25μM. Data represent means of the area under the curve from three independent experiments, normalized to their respective control ($\pm$ SEM). * $p < 0.05$ (compared to control).

2.3.6 Discussion

Breast cancer can be classified in different subtypes, largely based on the expression of three receptors, ER, PR and HER2(Prat *et al.*, 2011). Although survival has increased in the last decades due to, among others, the development of targeted therapies against these receptors, breast cancer remains the cause of many deaths. There is therefore a need for new therapeutic agents targeting different receptors. Thus, our objective was to determine the effects on a combination of genistein and decitabine on 1) cell viability, 2) the expression of receptors involved in cell proliferation and 3) on AhR, in different breast cancer subtypes. Together, our results showed that exposure to genistein alone or in combination with decitabine significantly reduce the viability of cancer cells, without affecting healthy primary cells, at most doses tested. This decrease in viability is associated with nuclear translocation and activation of AhR in T47-D and MDA-MB-231 cells, and to decreased expression of PRs and HER2 at the highest doses in T47-D cells. Moreover, inhibition of AhR partially restore cell proliferation in T47-D cells, suggesting that AhR is involved in the anti-proliferative effects of the co-treatment. Together, our results suggest that AhR activation can be a potential therapeutic target for both triple-negative and luminal subtypes of breast cancer, and that this activation could be achieved through a genistein-decitabine treatment.

2.3.6.1 Genistein treatment results in reduced breast cancer cells viability without having major effects on normal cells

We first tested if genistein alone or decitabine alone affect cells viability using luminal-like and triple-negative-like breast cancer cells, T47-D and MDA-MB-231 respectively, and human mammary epithelial cell (HMEC). Our results showed that decitabine alone did not affect viability of T47-D and HMEC cells, but slightly decrease viability of MDA-MB-231 cells. In T47-D and MDA-MB-231 cells, it has been shown by others that decitabine can significantly decrease cell viability at 1 μ M, and that MDA-MB-231 cells were more sensitive than T47-D cells (Zeng *et al.*, 2013). Since we used a lower dose, we probably did not reach the level at which T-47D cells became sensitive to the effect of decitabine alone.

Genistein effects were cell-dependent and dose-dependent; the treatment resulted in a reduction of viability of MDA-MB-231cells at all doses tested, of HMEC cells starting at 50 μ M, and of T47-D cells starting at 25 μ M. Interestingly, genistein alone, or in combination with decitabine, increased cells viability of T47-D at 10 μ M. One possible explanation is that genistein can activate ER at low dose. This dichotomy has also been observed in microarray analyses; physiologically-available doses of genistein (1-5 μ M) induced increased mitotic activity, whereas at a higher dose (25 μ M), the expression of apoptotic genes was altered, resulting in a decrease in the proliferation in MCF-7 breast cancer cells (Lavigne *et al.*, 2008). As this effect seems to be observed in MCF-7 and T47-D cells, which are both ER+, but not in MDA-MB-231 cells, it seems to be related to the presence of ER. In MCF-7 cells, the expression of ER α was also down-regulated at 25 μ M, which might explain the observed decrease in proliferation (Lavigne *et al.*, 2008). We have not tested the effect of genistein alone on the expression of hormonal receptors, but in our experiments using genistein combined with decitabine, there was

no significant differences in ER α or ER β protein levels or enrichment in a sub-localization in treated cells compared to control. Although we have not tested its activity directly, the absence of nuclear translocation suggested that the classical ER signaling is not involved (Heldring *et al.*, 2007). However, we observed a dose-dependent decrease in cytoplasmic PR levels, and a decreased expression of HER2 at the highest dose in T47-D cells. As both HER2 and PR signaling are also linked to cell proliferation in breast cells, an inhibition of their expression can explain, at least in part, the reduced proliferation observed at the same doses. While MCF-7 cells also express PR and HER2, no effects were reported on these receptors by Lavigne *et al.* (Lavigne *et al.*, 2008). However, they observed that AKR1C1, an aldo-reductase catalyzing the inactivation of progesterone, was up-regulated in MCF-7 cells treated with 25 μ M of genistein, suggesting that PR can be also affected. More studies are needed to determine the role of PR or HER2 after genistein-decitabine treatment.

2.3.6.2 Genistein effects on proliferation are attenuated by decitabine

Our results suggested that the genistein-decitabine co-treatment induced a decrease in proliferation rather than increased apoptosis. Levels and cleavages of Caspase-9 and PARP, two proteins involved in apoptosis, were not affected by the co-treatment, suggesting that the observed effects were due to decreased proliferation and not apoptosis of the cells. Similarly, inhibition of cell growth, without apoptosis, has been observed in MCF10AT and MCF-7 cells exposed to 10-100 μ M of genistein (Li *et al.*, 2009). This effects can be linked to activation of p53-mediated pathways by 25 μ M of genistein, as suggested by others in MCF-7 cells (Lavigne *et al.*, 2008). More experiments are required to investigate this possibility.

Surprisingly, our results show that genistein is more powerful for reducing cell viability when it is not combined with decitabine. In our experiments, a dose of 25 μ M of genistein allowed a 50% decrease in T47-D cells viability, while it took a dose of 50 μ M of genistein in combination with decitabine to observe a similar effect. Similarly, a dose of 10 μ M of genistein is sufficient to reduce the viability of MDA-MB-231 cells by about 50%, but 25 μ M of genistein was necessary to observe such a strong decrease in viability when combined with decitabine. In the HMEC cell, the combination seem to have also a protective effect; genistein treatment significantly reduces the viability at a 50 μ M dose, while the significant effect was observed at the very high dose of 100 μ M of genistein when combined with decitabine. These observations are inconsistent with other articles showing that both molecules are more efficient when combined (Li *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2013b). At least three reasons might explain this disparity. First, this difference could depend of the dose of decitabine used. In previous experiments, cells were exposed to 2 μ M of decitabine, a dose known to have important effects by it-self. We used a dose of 20nM, which had no effect on T47-D viability, and resulted in a 20% decrease in viability in MDA-MB-231 cells. Thus, it is possible that higher doses are needed to induce a synergetic effect. Second, conditions of culture could also explain part of the discrepancy. We observed that ER β and HER2 can be detected in MDA-MB-231 cells under certain conditions, while remaining undetectable in most experiments, suggesting that small variations can impact on proteins expression. Third, the synergic

effects observed by others was based on the effects of genistein and decitabine on re-expression of ER α and down-regulation of hTERT, not on cell viability (Li *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2013b). As increased level of ER α is usually associated with increased proliferation, one can speculate that cell viability was also affected in these experiments, without being reported.

Together, these results suggest that the co-treatment of 50 μ M of genistein and 20 nM of decitabine could specifically decrease cancerous cells viability, without affecting the viability of primary healthy cells, in both ER + and ER- cancer cells. While lower doses can have the opposite effect in ER+ cells, lower doses could also be effective in triple-negative breast tumors. In a clinical perspective, it is necessary to take into account this dichotomy of genistein.

2.3.6.3 A genistein-decitabine co-treatment allows activation of the transcriptional activity of AhR

Many studies have suggested that AhR could be a potential therapeutic target for breast cancer, but that its pro- and anti-tumorigenic effects can be cell- and ligand-dependent (Murray *et al.*, 2014). As AhR was expressed by both our luminal B and triple-negative cell lines, we wanted to determine if it can be linked to the decreased proliferation observed. Although the differences were not significant, our results showed that AhR tended to accumulate in the nucleus in a dose-dependent matter in both T47-D and MDA-MB-231 cells after the co-treatment of genistein-decitabine. We therefore quantified the nuclear translocation based on the ratio of the expression level in the nuclear fraction on that of the cytoplasmic fraction. Our results show a significant increase of AhR nuclear translocation in T47-D cells from a treatment between 25-100 μ M of genistein combine with decitabine. As activation of AhR is usually followed by its nuclear translocation (Denison *et al.*, 2011), these results suggested that AhR is activated, at least in T47-D cells and potentially in MDA-MB-231 cells, upon genistein-decitabine treatment. These results were confirmed by a luciferase-based assay showing that transcriptional activity of AhR is increased in T47-D and MDA-MB-231 cells when 10-50 μ M and 10-25 μ M of genistein, respectively, is combined with 20nM of decitabine. These results suggested that AhR is activated at doses for which a decrease in viability was observed in MDA-MB-231 cells, although not at all doses. For T47-D, the consistency is less clear, since viability was increased to 10 μ M, unchanged at 25 μ M and inhibited at 50-100 μ M of genistein combined with decitabine, and AhR is activated between 10-50 μ M. However, since these cells also express ER and since PR and HER2 are affected by the treatment, parallel activation of these signaling pathways can interfere with AhR signaling. Thus, the overall response could be based on the balance between these opposing signals.

Unexpectedly, although TCDD treatment, considered to be the strongest AhR ligand (Denison *et al.*, 2011), resulted in nuclear translocation of AhR in MDA-MB-231 cells, it did not seems to significantly induce its transcriptional activity, as demonstrated by luciferase signal or CYP1A1 induction, as it did in T47-D cells. Similarly, proliferation was decreased in T47-D cells, but not in MDA-MB-231 cells, upon TCDD treatment.

Others have seen similar results, showing that MDA-MB-231 cells express AhR, but do not respond to TCDD (Arellano *et al.*, 1993, Biegel *et al.*, 1990). On the opposite, it has also been showed that treatment with TCDD can increase CYP1A1 mRNA levels in MDA-MB-231 cell; however, they did not determine if CYP1A1 was also increased at the protein levels (Spink *et al.*, 1998). AhR response to ligands is known to be cells-dependent (Safe *et al.*, 2013). It suggests that MDA-MB-231 cells do not have the same cofactors as T47-D cells. Importantly, while response to TCDD is different, in both cells lines, the genistein-decitabine co-treatment appears to activate the transcriptional activity of AhR and induce a decrease in viability in these two cell lines.

However, when we down-regulated AhR in T47-D cells and exposed them to genistein-decitabine, only a small rescue of cell proliferation was observed, and only at the 25µM dose. These results suggested that AhR plays a minor role in anti-proliferative effects of the treatment on T47-D cells. Additional experiments will be needed to determine if PR of HER2 are involved in the decrease of cell viability.

2.3.7 Conclusion

Overall, our results have demonstrated that a genistein and decitabine co-treatment can decrease the viability of T47-D and MDA-MB-231 cancer cells, with little effect on healthy primary cells. The treatment had no effects on the ER, but caused a decrease in the expression of cytoplasmic PR and HER2 in T47-D cells. While it also resulted in AhR nuclear translocation and activation in both cancer cell lines, this activation seems to play a partial role in the decrease in proliferation. Thus, our results suggest that additional mechanisms are involved in anti-proliferative effects of the genistein-decitabine co-treatment. However, at lower doses, the treatment can induce proliferation of ER+ cells, demonstrating the importance of characterizing tumors and choose an appropriate dose in clinical perspective. Importantly, our results showed that the genistein-decitabine co-treatment is promising, especially for the treatment of triple-negative breast cancer, which is currently incurable.

2.3.8 Acknowledgements

Guylaine Lassonde and Martine Caplette are thanked for their assistance. Bruno Johnson and Dr Jacques Bernier are thanked for their help with Jurkat (J77) cells. E.K. is the recipient of Fondation Universitaire Armand-Frappier de l'INRS fellowship. This study was supported by I.P. institutional start-up funds. This article is dedicated to the memory of Dr Charbonneau.

2.3.9 References

1. Prat, A., *et al.* (2011) Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*, **5**, 5-23.
2. Murray, I.A., *et al.* (2014) Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat Rev Cancer*, **14**, 801-14.
3. Denison, M.S., *et al.* (2011) Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol Sci*, **124**, 1-22.
4. Bertazzi, P.A., *et al.* (1989) Mortality in an area contaminated by TCDD following an industrial incident. *Med Lav*, **80**, 316-29.
5. Bertazzi, P.A., *et al.* (1989) Ten-year mortality study of the population involved in the Seveso incident in 1976. *Am J Epidemiol*, **129**, 1187-200.
6. Saito, R., *et al.* (2014) Aryl hydrocarbon receptor in breast cancer-a newly defined prognostic marker. *Horm Cancer*, **5**, 11-21.
7. Denison, M.S., *et al.* (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **43**, 309-34.
8. Vitale, D.C., *et al.* (2013) Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, **38**, 15-25.
9. Wu, A.H., *et al.* (2008) Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. *Br J Cancer*, **98**, 9-14.
10. Trock, B.J., *et al.* (2006) Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, **98**, 459-71.
11. Chen, M., *et al.* (2014) Association between soy isoflavone intake and breast cancer risk for pre- and post-menopausal women: a meta-analysis of epidemiological studies. *PLoS One*, **9**.
12. Korde, L.A., *et al.* (2009) Childhood soy intake and breast cancer risk in Asian American women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **18**, 1050-9.
13. Shu, X.O., *et al.* (2001) Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **10**, 483-8.
14. Thanos, J., *et al.* (2006) Adolescent dietary phytoestrogen intake and breast cancer risk (Canada). *Cancer Causes Control*, **17**, 1253-61.
15. Wu, A.H., *et al.* (2002) Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. *carcinogenesis*, **23**, 1491-6.
16. Fritz, W.A., *et al.* (1998) Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis*, **19**, 2151-8.
17. Lamartiniere, C.A., *et al.* (2002) Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *J Nutr*, **132**, 552S-558S.
18. Messina, M.J., *et al.* (1994) Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer*, **21**, 113-31.
19. Li, Y., *et al.* (2013) Epigenetic reactivation of estrogen receptor-alpha (ERalpha) by genistein enhances hormonal therapy sensitivity in ERalpha-negative breast cancer. *Mol Cancer*, **12**, 1476-4598.

20. Li, Y., *et al.* (2009) Genistein depletes telomerase activity through cross-talk between genetic and epigenetic mechanisms. *Int J Cancer*, **125**, 286-96.
21. Xie, Q., *et al.* (2014) Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, **53**, 422-31.
22. Bosviel, R., *et al.* (2012) Can soy phytoestrogens decrease DNA methylation in BRCA1 and BRCA2 oncosuppressor genes in breast cancer? *Omics*, **16**, 235-44.
23. Derissen, E.J., *et al.* (2013) Concise drug review: azacitidine and decitabine. *Oncologist*, **18**, 619-24.
24. Lavigne, J.A., *et al.* (2008) Concentration-dependent effects of genistein on global gene expression in MCF-7 breast cancer cells: an oligo microarray study. *Breast Cancer Res Treat*, **110**, 85-98.
25. Li, Y., *et al.* (2013) Epigenetic regulation of multiple tumor-related genes leads to suppression of breast tumorigenesis by dietary genistein. *PLoS One*, **8**, 14.
26. Zeng, L., *et al.* (2013) Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) plays a role in the anti-tumorigenic effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine (AZA) in breast cancer cells. *Exp Cell Res*, **319**, 2282-95.
27. Heldring, N., *et al.* (2007) Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*, **87**, 905-31.
28. Arellano, L.O., *et al.* (1993) Effects of cycloheximide on the induction of CYP1A1 gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in three human breast cancer cell lines. *carcinogenesis*, **14**, 219-22.
29. Biegel, L., *et al.* (1990) Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on cell growth and the secretion of the estrogen-induced 34-, 52- and 160-kDa proteins in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **37**, 725-32.
30. Spink, D.C., *et al.* (1998) Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells. *carcinogenesis*, **19**, 291-8.
31. Safe, S., *et al.* (2013) Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as a drug target. *Toxicol Sci*, **135**, 1-16.

Chapitre 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

Un nombre important d'études a démontré que la génistéine peut diminuer la viabilité des cellules cancéreuses mammaires (Messina *et al.*, 1994). Cependant, les mécanismes impliqués ne sont pas bien compris, tout comme l'efficacité en fonction du sous-type de cancer du sein. Parmi les différentes propriétés anticancéreuses de la génistéine, cette molécule est bien connue pour altérer l'activité des DNMTs et des HDACs, permettant une différence d'expression au niveau de divers oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs (Li *et al.*, 2013a, Li *et al.*, 2009). De plus, il a été suggéré à différentes reprises que l'effet thérapeutique de la génistéine est plus puissant lorsque combiné avec la décitabine (Li *et al.*, 2013a, Li *et al.*, 2009, Raynal *et al.*, 2008). Notre laboratoire a déjà démontré *in vivo* la réaction synergique entre les deux molécules pour le traitement de la leucémie (Raynal *et al.*, 2008) et le cancer du poumon (manuscrit en préparation, NCT:01 628471). Notre objectif était donc de déterminer les effets au niveau de la viabilité et l'expression de certains marqueurs connus pour le cancer du sein, suite à une co-exposition à la génistéine et à la décitabine sur des lignées de cellules humaines cancéreuses mammaires présentant différents profils moléculaires de cancer du sein.

Les cellules T47-D et MDA-MB-231 ont été sélectionnées puisqu'elles possèdent un profil de cancer de type luminal B et triple négatif respectivement (Holliday *et al.*, 2011). Ainsi, la sélection de ces cellules nous permet d'identifier vers quels types de cancer le traitement est plus efficace et si les récepteurs ER α/β , PR-A/B, HER2 et AhR peuvent être affectés par le traitement. De plus, il y a eu une analyse comparative avec des cellules de la glande mammaire dites non tumorales, soit les MCF-10A et les MCF-12A ainsi que les cellules primaires de la glande mammaire saine (HMEC) (ATCC, 2014). Ces cellules ont été traitées avec différentes doses (10, 25, 50 et 100 μ M) de génistéine. Ces doses représentent l'intervalle entre une dose disponible de manières biologique (10 μ M), pharmaceutique (25-50 μ M) et toxique (80 μ M) (Lavigne *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2013a). Une dose de 20nM de décitabine a été choisie pour l'analyse de la combinaison avec la génistéine. Cette dose a été sélectionnée puisque les résultats d'analyse de l'essai clonogénique permettent l'observation d'une diminution de 50 % de formation de clones au niveau des cellules MDA-MB-231 (figure 1 en annexe). Nous avons utilisé le TCDD comme contrôle positif pour l'activation d'AhR. Une dose de 5.3nM a été choisie, car notre laboratoire a précédemment démontré que cette dose permet l'activation d'AhR sans effet néfaste sur les cellules.

3.1 Profil protéique des cellules

L'étude avait débuté par l'analyse du profil protéique de l'expression du récepteur à l'œstrogène (ER), à la progestérone (PR) et du facteur de croissance épidermique II (HER2), afin de confirmer que les cellules en analyse représentent bien le type de cancer du sein requis pour l'étude (figure 1). Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) avait été ajouté dans la liste des protéines en analyse pour les raisons suivantes: i) il est bien connu que ce récepteur peut se faire activer par des

isoflavones et ii) son activation peut amener à une diminution de la viabilité de plusieurs types de cellules cancéreuses mammaires (Denison *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2009). La figure 1 confirme que dans nos conditions de culture, les cellules T47-D représentent bien des cellules cancéreuses de types luminales B, alors que les cellules MDA-MB-231 représentent plutôt le type de cancer triple négatif. Les cellules HMEC expriment HER2 et non ER α/β ou PR/A/B, soit un profil typique, car 70-80 % des cellules de la glande mammaire saines expriment pas ce récepteur. Les trois lignées cellulaires expriment le récepteur Ah.

3.2 Un traitement de génistéine avec ou sans une combinaison de décitabine permet une diminution de la viabilité des cellules cancéreuses mammaires

Nos résultats ont démontré que l'effet de la décitabine est cellule-dépendante; permet de diminuer la viabilité dans les cellules MDA-MB-231, sans avoir d'effet sur les cellules T47-D ou les HMEC (figure 2). La décitabine permet également une diminution de la viabilité dans les cellules non-tumorales MCF-10A et MCF-12A (figure 3, en annexe). Suite au traitement de génistéine au niveau des cellules T47-D, une dose de 10 μ M avec ou sans la combinaison de décitabine augmente significativement la viabilité (figure 2A). Puisque les cellules T47-D expriment ER, il est possible que l'augmentation soit due à son activation. Par contre, à partir d'une dose de 50 μ M, le traitement cause plutôt une diminution significative de la viabilité. Ces résultats suggèrent qu'à des doses biologiques, la génistéine peut activer ER, alors qu'à des doses pharmacologiques, il est possible d'obtenir les effets thérapeutiques. Ces données sont cohérentes avec les résultats de l'étude par puce d'ADN de l'équipe de Lavigne *et al.* qui suggèrent que des doses physiologiquement disponibles de génistéine (1-5 μ M) induisent l'augmentation de l'activité mitotique (Lavigne *et al.*, 2008), tandis qu'à des doses pharmacologiques (25 μ M), l'expression des gènes apoptotiques est modifiée, résultant en une diminution de prolifération dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (ER+)(Lavigne *et al.*, 2008). Le traitement de génistéine permet d'observer une diminution de la viabilité de manière dose-dépendante dans les cellules MDA-MB-231 (figure 2B). L'absence d'une augmentation de la viabilité aux doses les plus faibles est cohérente avec le fait que cette lignée cellulaire n'exprime pas ER. Il semble donc que la génistéine puisse agir en tant qu'agoniste ou antagoniste d'ER en fonction de la dose. Dans les cellules HMEC, la diminution de viabilité est uniquement observée suite à la forte dose de 100 μ M de génistéine en combinaison avec la décitabine, démontrant qu'une dose équivalente à 50 μ M de génistéine combinée avec la décitabine peut diminuer efficacement la viabilité de cellules cancéreuses de divers sous-types, sans affecter les cellules saines (figure 2C). Afin de déterminer si cette diminution de viabilité est par des mécanismes d'apoptose, nous avons vérifié l'expression des protéines *poly (ADP-ribose) polymérase* (PARP) et caspase 9, soit des protéines subissant un clivage pendant le processus d'apoptose. Nous n'avons pas observé l'état clivé des protéines suite au co-traitement, ce qui suggère que la baisse de la viabilité est plutôt par une diminution de la prolifération.

De manière surprenante, nos résultats démontrent que la génistéine est plus puissante pour diminuer de viabilité lorsqu'elle n'est pas combinée avec la décitabine, suggérant un effet répresseur de ce dernier (figure 2). Ces observations sont contradictoires avec autres articles démontrant l'effet synergique entre les deux molécules (Li *et al.*, 2013a, Li *et al.*, 2009, Raynal *et al.*, 2008). Cette différence peut être en fonction de la dose de décitabine et/ou de la méthode de culture des cellules. Lors de nos expériences, une dose de 25 μ M de génistéine a permis d'observer une diminution de 50 % de la viabilité dans les cellules T47-D, alors qu'il a fallu une dose de 50 μ M de génistéine en combinaison avec la décitabine pour observer un effet semblable. De façon similaire, une dose de 10 μ M de génistéine est suffisante pour diminuer la viabilité des cellules MDA-MB-231 d'environ 50 %, mais 25 μ M de génistéine était nécessaire pour observer une diminution aussi forte de la viabilité lorsque combinée avec la décitabine. Les effets de la génistéine seule étaient également plus puissants pour une baisse de viabilité dans les cellules HMEC; un traitement de génistéine seulement diminue significativement la viabilité à une dose de 50 μ M, alors que l'effet significatif a dû atteindre une dose de 100 μ M de génistéine lorsque combinée avec la décitabine. Ces résultats suggèrent que ce co-traitement de molécules est spécifique pour les cellules cancéreuses et transformées de la glande mammaire, sans affecter la viabilité des cellules primaires saines. Puisque la génistéine et la décitabine sont des molécules connues pour modifier des événements épigénétiques, notamment au niveau des actions de méthylation, nos perspectives d'analyses futures seraient d'analyser les effets de la décitabine seule, de la génistéine seule et de la combinaison des deux molécules au niveau de la méthylation et de l'acétylation des promoteurs codant pour les protéines ER α / β , PR-A/B, HER2 et AhR.

Nous envisageons d'utiliser la technique d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP, «chromatin immunoprecipitation») afin de déterminer la présence de marqueurs d'activateurs transcriptionnels (par exemple, à l'aide d'anticorps anti-acétyle-H3, anti-acétyle-H4 et anti-H3-triméthyl-lysine-4) et de répresseurs transcriptionnels (par exemple, à l'aide d'anticorps anti-triméthyl-histone H3-Lys9 et anti-triméthyl-histone H3-Lys27) (Li *et al.*, 2013a). À titre d'exemple, le marqueur transcriptionnel H3-triméthyl-lysine-4 peut se traduire par l'action d'un ajout de trois méthyles sur la lysine 4 de l'histone 3. Des analyses génomiques à grande échelle ont démontré que cette modification particulière d'histone est bien connue pour être fortement associée avec des promoteurs qui sont transcriptionnellement actifs (Ruthenburg *et al.*, 2007). Une compilation d'évidences démontre que cette forme d'histone peut être reconnue par une panoplie de protéines effectrices de signalisations en aval pouvant affecter la chromatine (Ruthenburg *et al.*, 2007). Les acétyle-H3 et -H4 (histones H3 et H4 qui ont un ajout d'un groupement acétyle) sont fortement associés avec une activation transcriptionnelle, puisque les impacts les plus considérables au niveau de l'expression de gènes ont lieux lors des modifications sur les queues d'histones H3 et H4 (Khan *et al.*, 2012). Une autre option est l'utilisation des trousseaux développées pour mesurer l'activité de HDACs et des DNMTs dans les fractions nucléaires des cellules traitées (de la compagnie Epigentek) (Li *et al.*, 2013a). De plus, il serait intéressant d'analyser l'effet

de la génistéine au niveau de la méthylation de l'ADN par la technique ChIP à l'aide d'anticorps anti-5-méthylcytosine. En effet, une étude sur la méthylation de l'ADN global (  l'aide du kit *SuperSense Methylated DNA Quantification Kit* de la compagnie Epigentek) des cellules cancéreuses du sein MCF-7 et MDA-MB-231 traitées par la génistéine a pu d mon tr  qu'il y a une diminution globale de la méthylation de l'ADN ainsi que de l'expression et l'activité des DNMT1. Plus précisément, le traitement permet une diminution significative de la méthylation au niveau des îlots CpG situés dans la région de divers promoteurs de gènes codant pour des protéines de type supprimeur de tumeurs, permettant ainsi une augmentation de leur expression (Xie et al., 2014).

3.3 Le traitement de la combinaison de génistéine et de d c tabine permet une diminution de la localisation des PRs cytoplasmiques et de l'expression d'HER2 dans les cellules T47D

Le cancer du sein est une maladie hétérogène, dont la classification et le choix des traitements sont, en partie, basés sur la présence/absence des récepteurs hormonaux ER, PR et HER2. Ainsi, l'utilisation de deux types cellulaires représentatifs de sous-types de cancer différents permet de déterminer si un sous-type était plus affecté, et si un changement de l'expression de ces récepteurs hormonaux pouvait en être la cause. L'analyse au niveau d'AhR était également intéressante puisque non seulement son activation est liée à des changements de prolifération et au cancer (Brooks et al., 2011, Goode et al., 2013, Saito et al., 2014), mais son activité peut également affecter indirectement l'expression/activité des autres récepteurs en analyse. Il est bien connu que l'activation d'AhR peut inhiber l'activité d'ER  de différentes man res (Feng et al., 2013, Safe et al., 2013). La protéine PR fait partie des gènes cibles d'ER, alors qu'HER2 fait partie des gènes cibles de PR (Hagan et al., 2012, Heldring et al., 2007, Lange et al., 2008). Ainsi, si l'activation d'AhR par la génistéine a lieu, l'activité transcriptionnelle d'ER pourrait être compromise, ce qui pourrait inhiber la transcription de PR et/ou HER2.

Nos résultats n'ont d mon tr  aucune différence significative au niveau de l'expression d'ER /à dans les cellules T47-D et MDA-MB-231 (figure 3). Hormis le traitement de la forte dose de 100  M de génistéine sur les cellules T47-D, aucune différence d'expression de connexine 43 (Cx43) n'a pu être observée suite au traitement des cellules cancéreuses, transformées et primaires (figure 7, en annexe). Les Cx43 sont des protéines qui font partie des jonctions lacunaires, très importantes pour la communication directe entre cellules (Bier et al., 2009). Ce sont des protéines largement exprimées dans la glande mammaire et assurent des fonctions vitales, tels le développement, la croissance cellulaire et le métabolisme (Bier et al., 2009, Monaghan et al., 1996).   ce jour, il est bien compris qu'une perte d'expression de cette protéine augmente drastiquement les chances de transformation cellulaire (Bier et al., 2009, Stoletov et al., 2013). Nous avons observé une diminution de l'expression d'HER2 dans la fraction totale des cellules T47-D, suite à la forte dose de 100  M de génistéine, sans

avoir d'effet dans la fraction cytoplasmique/membranaire ou nucléaire (figure 3A). Il est possible que le niveau de protéine fût sous la limite de détection pour percevoir une différence d'expression lorsque fractionnée. Au niveau de l'expression des PRs, nous avons remarqué que la forte dose 100 μ M de génistéine en combinaison de décitabine peut diminuer significativement l'expression de PR-A et -B dans le lysat entier des cellules T47-D (figure 3A). De plus, nous avons observé qu'à partir de la dose de 50 μ M de génistéine en combinaison de la décitabine, il y a une diminution significative de l'expression de PR-A et -B dans la fraction cytoplasmique des cellules T47-D, et ce, sans affecter l'expression dans la fraction nucléaire (figure 3A). Ce dernier résultat suggère la possibilité d'une dégradation de la protéine, une diminution de sa transcription (ce qui a lieu dans le cytoplasme) ou que le traitement amène à des modifications post-traductionnelles des PRs cytoplasmiques, soit un phénomène qui pourrait être lié à l'activation d'Ahr. En effet, PR peut être phosphorylé par CDK2, ce qui peut avoir un effet sur sa localisation cellulaire (habituellement, pour être retrouvé dans le cytosol) (Hagan, et al., 2012). Or, lorsqu'activé par un ligand, Ahr peut s'associer et agir de pair avec la protéine Rb (Barhoover, et al., 2010). La protéine Rb joue un rôle clé dans la prolifération cellulaire, en freinant la progression du cycle cellulaire par l'inhibition de l'activité du facteur de transcription E2F1 (Barhoover, et al., 2010). La protéine CDK2 fait partie des gènes cibles de ce dernier (Barhoover, et al., 2010). De ces faits, l'activation d'Ahr par le co-traitement de génistéine/décitabine permettrait de diminuer de manière indirecte la transcription de CDK2 et ainsi la localisation des PRs dans le cytoplasme. Cette hypothèse reste à être validée. Quels que soient les mécanismes liés à la diminution d'expression/localisation des PRs suite au traitement, cette baisse pourrait être impliquée dans la diminution de la viabilité. Les PRs nucléaires sont des facteurs de transcription, permettant la transcription de gènes codant pour des protéines pouvant être impliquées dans la prolifération cellulaire, tel c-myc et certain EGFRs (Hagan, et al., 2012). Tandis que les PRs cytoplasmiques amènent à des réponses cellulaires manifestées par la transcription de gènes impliqués dans la hausse de prolifération et l'activation d'autres facteurs de transcription via l'activation des protéines de signalisations en aval des EGFRs (Hagan, et al., 2012, Lange, et al., 2008). Ainsi, des expériences supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer si la baisse de PR est 1) Ahr-dépendante et 2) impliquée dans la baisse de viabilité. Néanmoins, puisque le traitement induit une diminution de la viabilité dans les cellules MDA-MB-231, soit une lignée qui n'exprime pas PR, il est évident que d'autres mécanismes sont impliqués. Pour les cellules MDA-MB-231, le traitement n'a pas induit une nouvelle expression d'ER, PR ou HER2 (figure 3B).

À notre connaissance, il n'y a pas autres études qui ont regardé l'effet de différentes doses de génistéine au niveau de l'expression de HER2 et PR dans les cellules T47-D et MDA-MB-231. L'analyse au niveau de l'expression d'ER α est difficilement comparable avec les données dans la littérature scientifique. Un article a démontré qu'aux mêmes doses de génistéine (50 μ M) et temps d'exposition (48 heures), le traitement induit une augmentation dans l'expression d'ER α dans les cellules MDA-MB-231 (Li et al., 2013b). Tandis qu'un autre article a plutôt démontré une baisse d'expression dans les cellules

cancéreuses du sein MCF-7, suite aux mêmes conditions de traitement (Choi *et al.*, 2014). L'incohérence entre les différentes conclusions peut être due par le type de cellule ou les méthodes de culture cellulaire, pouvant amener à des variations génétiques de la cellule. En effet, la figure 3B démontre que les cellules MDA-MB-231 ont subi une déviation génétique par leur nouvelle expression en ER β et HER2, soit un phénomène typique pour des cellules cancéreuses. Nos perspectives d'analyses futures seraient d'observer le ratio d'expression entre ER α et ER β et analyser si le co-traitement de génistéine et de décitabine pourrait activer un des deux récepteurs.

3.4 Un co-traitement de génistéine/décitabine permet l'activation de l'activité transcriptionnelle d'Ahr

Bien que les différences n'étaient pas significatives, nos résultats suggèrent une augmentation semblable à un modèle dose-dépendante de l'expression d'Ahr dans la fraction nucléaire des cellules T47-D et MDA-MB-231 (figure 4). Nous avons donc quantifié la translocation nucléaire en fonction du ratio du niveau d'expression de la fraction nucléaire sur celui de la fraction cytoplasmique. Nos résultats démontrent une augmentation de la translocation nucléaire d'Ahr, dont le niveau est significatif entre les doses de 25 à 100 μ M de génistéine en combinaison avec 20nM de décitabine dans les cellules T47-D (figure 4A), alors qu'il y avait une tendance d'augmentation de manière dose-dépendante dans les cellules MDA-MB-231 (figure 4B). Cette translocation suggère l'activation d'Ahr par le co-traitement (Denison *et al.*, 2011). Pour confirmer l'induction de son activation, les cellules T47-D et MDA-MB-231 ont été transfectées avec un vecteur contenant un site de liaison d'Ahr suivi d'un gène codant pour la protéine luciférase. De façon surprenante, la réponse transcriptionnelle a pu être observée aux doses comprises entre de 10 et 50 μ M de génistéine combinée à la décitabine dans les cellules T47-D (figure 5A), suggérant que cette méthode d'analyse est plus sensible. De façon similaire, une induction de l'activité transcriptionnelle d'Ahr a été observée dans les cellules MDA-MB-231 pour les doses de 10 et 25 μ M de génistéine combinée à la décitabine (figure 5A). Ces résultats suggèrent qu'Ahr est effectivement activé aux doses pour lesquelles une baisse de la viabilité a été observée dans les cellules MDA-MB-231. Ces observations semblent indiquer la possibilité qu'Ahr soit impliqué dans la baisse de viabilité induite entre ces doses, alors que d'autres mécanismes seraient impliqués aux doses plus fortes. Pour les cellules T47-D, la réponse est moins claire, puisque la viabilité était augmentée à 10 μ M, inchangée à 25 μ M et inhibée à 50 μ M, doses auxquelles Ahr est activé. Puisque ces cellules expriment également les ERs, PRs et HER2, il pourrait y avoir une activation parallèle de ces voies de signalisations menant à une augmentation de la prolifération. Ainsi, la réponse globale au niveau de la prolifération serait en fonction de la balance entre ces deux signalisations contraires, et varierait selon la dose. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

De manière inattendue, les cellules MDA-MB-231 n'ont pas répondu au traitement de TCDD (figure 5B), considéré par plusieurs comme le ligand le plus fort pour Ahr (Denison, *et al.*, 2011), qui servait de témoin positif dans nos études. Nos données ont

démontré qu'un traitement de TCDD induit la translocation nucléaire d'Ahr dans les deux lignées cellulaires, mais induit une baisse de viabilité et l'induction de l'expression de CYP1A1, un gène cible d'Ahr (Feng *et al.*, 2013), uniquement dans les cellules T47-D (figure 5B, 5C et 5D). Bien que les ligands d'Ahr sont cellules-dépendantes (Safe *et al.*, 2013), il a été démontré qu'un traitement de TCDD induit l'expression de CYP1A1 dans les cellules MDA-MB-231 (Spink *et al.*, 1998). Par contre, d'autres études ont démontré que les cellules MDA-MB-231 expriment des récepteurs Ah qui ne semblent pas répondre au TCDD (Arellano *et al.*, 1993, Biegel *et al.*, 1990). La divergence au niveau de ces résultats pourrait provenir de la dose de TCDD utilisée ou des conditions de culture. Il semblerait donc que les cellules MDA-MB-231 n'ont pas les mêmes cofacteurs que les cellules T47-D permettant une activité transcriptionnelle pour l'induction de CYP1A1. Malgré le fait que le TCDD n'induit pas les mêmes réponses dans les cellules T47-D et MDA-MB-231, le co-traitement de génistéine/décitabine semble pouvoir activer l'activité transcriptionnelle d'Ahr et induire une diminution dans la viabilité dans ces deux lignées cellulaires (figure 2A, 2B et 5A). Afin de déterminer si l'activation d'Ahr est liée à la diminution de la viabilité des cellules cancéreuses, nous avons induit une diminution du degré de traduction de la protéine Ahr dans les cellules T47-D, par la méthode de transfection siARN. L'utilisation de deux différentes séquences de siARN a provoqué une diminution d'expression d'Ahr de 30 % et de 80 % respectivement (figure 6A). Une dégradation de 80 % de la protéine entraîne une augmentation de la prolifération (figure 6B). Suite à une comparaison de l'effet d'un co-traitement de génistéine/décitabine sur des cellules transfectées avec une séquence non-spécifique contre une séquence spécifique pour Ahr, nous avons pu observer qu'une dose de 25 μ M de génistéine permet le rétablissement de 10-20 % de la prolifération au niveau des cellules exprimant moins d'Ahr (figure 6C). Ces résultats suggèrent qu'Ahr joue un rôle partiel dans l'effet anti-prolifération induit par le co-traitement des molécules.

L'ensemble de nos résultats démontre qu'un co-traitement de génistéine et de décitabine diminue la viabilité des cellules cancéreuses T47-D et MDA-MB-231, des lignées transformées MCF-10A et MCF-12A, sans affecter les cellules primaires saines. Le traitement a peu d'effet sur les récepteurs ERs, mais induit une diminution de l'expression des PRs cytoplasmiques, une diminution d'HER2 dans le lysat entier des cellules T47-D ainsi qu'une translocation nucléaire d'Ahr par son activation dans les cellules cancéreuses. Ainsi, nos résultats suggèrent que la baisse de viabilité des cellules cancéreuses pourrait être liée par l'activité d'Ahr et possiblement par la diminution d'expression des PRs cytoplasmiques et/ou d'HER2. Des expériences sont requises afin de vérifier ces deux dernières hypothèses.

3.5 L'activation d'Ahr pourrait être une nouvelle avenue thérapeutique pour les tumeurs du sein de type triple négatif

Les cancers de type triple négatif affectent 15-20 % des femmes ayant un cancer du sein. C'est un type de cancer qui est souvent agressif, de haut grade avec un mauvais pronostic (Suzan G, 2014). À ce jour, il n'y a aucune cible spécifique pour ce type de

cancer (Suzan G, 2014). Donc, pour le moment, les seuls traitements disponibles sont par des méthodes non spécifiques au niveau de la cellule, comme la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie (Suzan G, 2014). Nos résultats démontrant qu'un co-traitement de génistéine/décitabine permet l'activation d'AhR et une diminution de viabilité dans les cellules cancéreuses mammaires, semblent pointer vers la possibilité qu'AhR puisse être une nouvelle cible thérapeutique pour ce type de cancer.

3.6 CONCLUSION

L'ensemble de nos résultats indique qu'un co-traitement à la génistéine et à la décitabine peut inhiber la prolifération de différents types de cellules cancéreuses mammaires, en ayant peu ou pas d'effet sur la viabilité des cellules normales. De plus, les résultats suggèrent que la décitabine permet une « protection » des cellules saines. Par contre, à des doses plus faibles, le traitement peut induire la prolifération des cellules ER+, démontrant l'importance de bien caractériser les tumeurs et de choisir une dose adéquate dans l'éventualité d'une étude clinique. La baisse de viabilité semble être, en partie, liée à l'activation du récepteur Ah. Ainsi, ce récepteur pourrait devenir une nouvelle cible thérapeutique pour le cancer du sein, et plus particulièrement, pour les tumeurs de sous-type triple négatif pour lesquelles aucune thérapie ciblée n'est disponible présentement.

CHAPITRE 4 : RÉFÉRENCES

- Allred CD, Allred KF, Ju YH, Virant SM & Helferich WG (2001a) Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Res* 61(13):5045-5050.
- Allred CD, Ju YH, Allred KF, Chang J & Helferich WG (2001b) Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. *carcinogenesis* 22(10):1667-1673.
- Anderson E (2002) The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res* 4(5):197-201.
- Antal MC, Krust A, Chambon P & Mark M (2008) Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(7):2433-2438.
- Arellano LO, Wang X & Safe S (1993) Effects of cycloheximide on the induction of CYP1A1 gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in three human breast cancer cell lines. *carcinogenesis* 14(2):219-222.
- Atalay G, Cardoso F, Awada A & Piccart MJ (2003) Novel therapeutic strategies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) family and its downstream effectors in breast cancer. *Ann Oncol* 14(9):1346-1363.
- Barhoover MA, Hall JM, Greenlee WF & Thomas RS (2010) Aryl hydrocarbon receptor regulates cell cycle progression in human breast cancer cells via a functional interaction with cyclin-dependent kinase 4. *Mol Pharmacol* 77(2):195-201.
- Barkova J, Lukas J, Muller H, Luthoft D, Strauss M & Bartek J (1994) Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer* 57(3):353-361.
- Bastea LI, Doppler H, Balogun B & Storz P (2012) Protein kinase D1 maintains the epithelial phenotype by inducing a DNA-bound, inactive SNAI1 transcriptional repressor complex. *PLoS One* 7(1):20.
- Bertazzi PA, Zocchetti C, Pesatori AC, Guercilena S, Sanarico M & Radice L (1989a) Mortality in an area contaminated by TCDD following an industrial incident. *La Medicina del lavoro* 80(4):316-329.
- Bertazzi PA, Zocchetti C, Pesatori AC, Guercilena S, Sanarico M & Radice L (1989b) Ten-year mortality study of the population involved in the Seveso incident in 1976. *Am J Epidemiol* 129(6):1187-1200.
- Biegel L & Safe S (1990) Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on cell growth and the secretion of the estrogen-induced 34-, 52- and 160-kDa proteins in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37(5):725-732.
- Bier A, Oviedo-Landaverde I, Zhao J, Mamane Y, Kandouz M & Batist G (2009) Connexin43 pseudogene in breast cancer cells offers a novel therapeutic target. *Mol Cancer Ther* 8(4):786-793.
- Bissell MJ & Radisky D (2001) Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1(1):46-54.
- Bodenstine TM & Welch DR (2008) Metastasis suppressors and the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron* 1(1):1-11.
- Boerner JL, Demory ML, Silva C & Parsons SJ (2004) Phosphorylation of Y845 on the epidermal growth factor receptor mediates binding to the mitochondrial protein cytochrome c oxidase subunit II. *Mol Cell Biol* 24(16):7059-7071.

- Bolger R, Wiese TE, Ervin K, Nestich S & Checovich W (1998) Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ Health Perspect* 106(9):551-557.
- Boonyaratanakornkit V, McGowan E, Sherman L, Mancini MA, Cheskis BJ & Edwards DP (2007) The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Mol Endocrinol* 21(2):359-375.
- Borges S, Doppler H, Perez EA, Andorfer CA, Sun Z, Anastasiadis PZ, Thompson E, Geiger XJ & Storz P (2013) Pharmacologic reversion of epigenetic silencing of the PRKD1 promoter blocks breast tumor cell invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 15(2).
- Bosviel R, Dumollard E, Dechelotte P, Bignon YJ & Bernard-Gallon D (2012) Can soy phytoestrogens decrease DNA methylation in BRCA1 and BRCA2 oncosuppressor genes in breast cancer? *Oncotarget* 3(5):235-244.
- Briskin C (2002) Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7(1):39-48.
- Briskin C & O'Malley B (2010) Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(12):25.
- Bronner C, Fuhrmann G, Chedin FL, Macaluso M & Dhe-Paganon S (2010) UHRF1 Links the Histone code and DNA Methylation to ensure Faithful Epigenetic Memory Inheritance. *Genet Epigenet* 14(2):29-36.
- Brooks J & Eltom SE (2011) Malignant transformation of mammary epithelial cells by ectopic overexpression of the aryl hydrocarbon receptor. *Curr Cancer Drug Targets* 11(5):654-669.
- Buick RN & Pollak MN (1984) Perspectives on clonogenic tumor cells, stem cells, and oncogenes. *Cancer Res* 44(11):4909-4918.
- Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ & Picard D (1996) Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *Embo J* 15(9):2174-2183.
- Butt S, Borgquist S, Anagnostaki L, Landberg G & Manjer J (2009) Parity and age at first childbirth in relation to the risk of different breast cancer subgroups. *Int J Cancer* 125(8):1926-1934.
- Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S & Nakshatri H (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 276(13):9817-9824.
- Chen M, Rao Y, Zheng Y, Wei S, Li Y, Guo T & Yin P (2014) Association between soy isoflavone intake and breast cancer risk for pre- and post-menopausal women: a meta-analysis of epidemiological studies. *PLoS One* 9(2).
- Chin K, de Solorzano CO, Knowles D, Jones A, Chou W, Rodriguez EG, Kuo WL, Ljung BM, Chew K, Myambo K, Miranda M, Krig S, Garbe J, Stampfer M, Yaswen P, Gray JW & Lockett SJ (2004) In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet* 36(9):984-988.
- Choi EJ, Jung JY & Kim GH (2014) Genistein inhibits the proliferation and differentiation of MCF-7 and 3T3-L1 cells via the regulation of ERalpha expression and induction of apoptosis. *Exp Ther Med* 8(2):454-458.

- Ciarloni L, Mallepell S & Briskin C (2007) Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(13):5455-5460.
- Daniel CW, Silberstein GB & Strickland P (1987) Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography. *Cancer Res* 47(22):6052-6057.
- Demory ML, Boerner JL, Davidson R, Faust W, Miyake T, Lee I, Huttemann M, Douglas R, Haddad G & Parsons SJ (2009) Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria: regulation and effect. *J Biol Chem* 284(52):36592-36604.
- Denison MS & Nagy SR (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:309-334.
- Denison MS, Soshilov AA, He G, DeGroot DE & Zhao B (2011) Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol Sci* 124(1):1-22.
- Derissen EJ, Beijnen JH & Schellens JH (2013a) Concise drug review: azacitidine and decitabine. *The oncologist* 18(5):619-624.
- Derissen EJB, Beijnen JH & Schellens JHM (2013b) Concise Drug Review: Azacitidine and Decitabine. *The Oncologist* 18(5):619-624.
- Diel P (2002) Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicol Lett* 127(1-3):217-224.
- Dittmann K, Mayer C & Rodemann HP (2010) Nuclear EGFR as novel therapeutic target: insights into nuclear translocation and function. *Strahlenther Onkol* 186(1):1-6.
- Elenbaas B & Weinberg RA (2001) Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res* 264(1):169-184.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB & Herman JG (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61(8):3225-3229.
- Fan P, Fan S, Wang H, Mao J, Shi Y, Ibrahim MM, Ma W, Yu X, Hou Z, Wang B & Li L (2013) Genistein decreases the breast cancer stem-like cell population through Hedgehog pathway. *Stem Cell Res Ther* 4(6):146.
- Feng S, Cao Z & Wang X (2013) Role of aryl hydrocarbon receptor in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2:197-210.
- Fondation canadienne du cancer du sein (2014) *Le cancer du sein au Canada en 2013.*, <http://www.cbcbf.org/fr-fr/central/AboutBreastCancerMain/AboutBreastCancer/Pages/BreastCancerinCanada.aspx> (Consulté le 6 juillet 2014)
- Fondation cancer du sein du Québec (2014) *Les stades et les grades de cancer du sein.*, http://rubanrose.org/Les_stades_et_les_grades_de_cancer_du_sein-fr-118 (Consulté le 4 août 2014)
- Fowler AM & Alarid ET (2007) Amping up estrogen receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res* 9(4):305.
- Fritz WA, Coward L, Wang J & Lamartiniere CA (1998) Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis* 19(12):2151-2158.

- Gasiewicz TA, Henry EC & Collins LL (2008) Expression and activity of aryl hydrocarbon receptors in development and cancer. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 18(4):279-321.
- Goode GD, Ballard BR, Manning HC, Freeman ML, Kang Y & Eltom SE (2013) Knockdown of aberrantly upregulated aryl hydrocarbon receptor reduces tumor growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cell line. *Int J Cancer* 133(12):2769-2780.
- Gronbaek K, Hother C & Jones PA (2007) Epigenetic changes in cancer. *Apmis* 115(10):1039-1059.
- Hagan CR, Daniel AR, Dressing GE & Lange CA (2012) Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. *Mol Cell Endocrinol* 357(1-2):43-49.
- Hall JM, Barhooover MA, Kazmin D, McDonnell DP, Greenlee WF & Thomas RS (2010) Activation of the aryl-hydrocarbon receptor inhibits invasive and metastatic features of human breast cancer cells and promotes breast cancer cell differentiation. *Mol Endocrinol* 24(2):359-369.
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.
- Harari D & Yarden Y (2000) Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 19(53):6102-6114.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M & Gustafsson JA (2007) Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87(3):905-931.
- Hilakivi-Clarke L, Andrade JE & Helferich W (2010) Is soy consumption good or bad for the breast? *J Nutr* 140(12):27.
- Holliday DL & Speirs V (2011) Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res* 13(4).
- Holst F, Stahl PR, Ruiz C, Hellwinkel O, Jehan Z, Wendland M, Lebeau A, Terracciano L, Al-Kuraya K, Janicke F, Sauter G & Simon R (2007) Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat Genet* 39(5):655-660.
- International Agency for Research on Cancer (2014) *World Health Organization.*, <http://www.iarc.fr/> (Consulté le 26 juin 2014)
- James Watson TB, Stephen Bell, Alexander Gann, Michael Levine, Richard Losick (2009) *Biologie moléculaire de gène*. PEARSON, France, 6
- Jenkins S, Betancourt AM, Wang J & Lamartiniere CA (2012) Endocrine-active chemicals in mammary cancer causation and prevention. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 129(3-5):191-200.
- Jensen EV (1962) On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med* 6:47-59.
- Ju YH, Doerge DR, Allred KF, Allred CD & Helferich WG (2002) Dietary genistein negates the inhibitory effect of tamoxifen on growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) cells implanted in athymic mice. *Cancer Res* 62(9):2474-2477.
- Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D & Chambon P (1995) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270(5241):1491-1494.

- Khan SI, Aumsuwan P, Khan IA, Walker LA & Dasmahapatra AK (2012) Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. *Chemical research in toxicology* 25(1):61-73.
- Kociba RJ, Keyes DG, Beyer JE, Carreon RM, Wade CE, Dittenber DA, Kalnins RP, Frauson LE, Park CN, Barnard SD, Hummel RA & Humiston CG (1978) Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 46(2):279-303.
- Korde LA, Wu AH, Fears T, Nomura AM, West DW, Kolonel LN, Pike MC, Hoover RN & Ziegler RG (2009) Childhood soy intake and breast cancer risk in Asian American women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(4):1050-1059.
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128(4):693-705.
- Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S & Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12):5925-5930.
- La société du cancer du sein du Canada (2014) *Stades de cancer du sein.*, <http://www.bccsc.ca/p/124/1/185/t/Soci%C3%A9t%C3%A9-du-cancer-du-sein-du-Canada---Stades-de-cancer-du-sein> (Consulté le 2 octobre 2014)
- Lamartiniere CA, Cotroneo MS, Fritz WA, Wang J, Mentor-Marcel R & Elgavish A (2002) Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *The Journal of nutrition* 132(3):552S-558S.
- Lanari C & Molinolo AA (2002) Progesterone receptors--animal models and cell signalling in breast cancer. Diverse activation pathways for the progesterone receptor: possible implications for breast biology and cancer. *Breast Cancer Res* 4(6):240-243.
- Lange CA & Yee D (2008) Progesterone and breast cancer. *Womens Health* 4(2):151-162.
- Lavigne JA, Takahashi Y, Chandramouli GV, Liu H, Perkins SN, Hursting SD & Wang TT (2008) Concentration-dependent effects of genistein on global gene expression in MCF-7 breast cancer cells: an oligo microarray study. *Breast Cancer Res Treat* 110(1):85-98.
- Lee HP, Gourley L, Duffy SW, Esteve J, Lee J & Day NE (1991) Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet* 337(8751):1197-1200.
- Lemmon MA & Schlessinger J (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141(7):1117-1134.
- Li Y, Chen H, Hardy TM & Tollefsbol TO (2013a) Epigenetic regulation of multiple tumor-related genes leads to suppression of breast tumorigenesis by dietary genistein. *PLoS One* 8(1):14.
- Li Y, Liu L, Andrews LG & Tollefsbol TO (2009) Genistein depletes telomerase activity through cross-talk between genetic and epigenetic mechanisms. *Int J Cancer* 125(2):286-296.
- Li Y, Meeran SM, Patel SN, Chen H, Hardy TM & Tollefsbol TO (2013b) Epigenetic reactivation of estrogen receptor-alpha (ERalpha) by genistein enhances hormonal therapy sensitivity in ERalpha-negative breast cancer. *Mol Cancer* 12(9):1476-4598.

- Mallepell S, Krust A, Chambon P & Briskin C (2006) Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7):2196-2201.
- Marlowe JL & Puga A (2005) Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *Journal of cellular biochemistry* 96(6):1174-1184.
- Martinez P & Blasco MA (2010) Role of shelterin in cancer and aging. *Aging Cell* 9(5):653-666.
- Messina MJ, Persky V, Setchell KD & Barnes S (1994) Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer* 21(2):113-131.
- Monaghan P & Moss D (1996) Connexin expression and gap junctions in the mammary gland. *Cell Biol Int* 20(2):121-125.
- Motevalli A, Yasaei H, Virmouni SA, Slijepcevic P & Roberts T (2014) The effect of chemotherapeutic agents on telomere length maintenance in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 145(3):581-591.
- Murray IA, Patterson AD & Perdew GH (2014) Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat Rev Cancer* 14(12):801-814.
- Nagata C (2010) Factors to consider in the association between soy isoflavone intake and breast cancer risk. *J Epidemiol* 20(2):83-89.
- Nie J, Liu L, Li X & Han W (2014) Decitabine, a new star in epigenetic therapy: the clinical application and biological mechanism in solid tumors. *Cancer Lett* 354(1):12-20.
- Osborne C, Wilson P & Tripathy D (2004) Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 9(4):361-377.
- Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA & Minutolo F (2014) Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids* 24(14):00151-00152.
- Poland A, Glover E & Kende AS (1976) Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem* 251(16):4936-4946.
- Polyak K (2007) Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* 117(11):3155-3163.
- Prat A & Perou CM (2011) Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 5(1):5-23.
- Programme Québécois De Dépistage Du Cancer Du Sein (2015) *Anatomie du sein.*, <http://www.depistagesein.ca/anatomie-du-sein/> (Consulté le 30 Avril)
- Puga A, Barnes SJ, Dalton TP, Chang C, Knudsen ES & Maier MA (2000) Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest. *J Biol Chem* 275(4):2943-2950.
- Puga A, Ma C & Marlowe JL (2009) The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochemical pharmacology* 77(4):713-722.
- Puga A, Tomlinson CR & Xia Y (2005) Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. *Biochemical pharmacology* 69(2):199-207.

- Raynal NJ, Charbonneau M, Momparler LF & Momparler RL (2008) Synergistic effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine and genistein in combination against leukemia. *Oncol Res* 17(5):223-230.
- Roskoski R, Jr. (2014) ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res* 87:42-59.
- Ruthenburg AJ, Allis CD & Wysocka J (2007) Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Molecular cell* 25(1):15-30.
- Safe S, Lee SO & Jin UH (2013) Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as a drug target. *Toxicol Sci* 135(1):1-16.
- Saito R, Miki Y, Hata S, Takagi K, Iida S, Oba Y, Ono K, Ishida T, Suzuki T, Ohuchi N & Sasano H (2014) Aryl hydrocarbon receptor in breast cancer-a newly defined prognostic marker. *Horm Cancer* 5(1):11-21.
- Santell RC, Chang YC, Nair MG & Helferich WG (1997) Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *J Nutr* 127(2):263-269.
- Shi F, Telesco SE, Liu Y, Radhakrishnan R & Lemmon MA (2010) ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(17):7692-7697.
- Shu XO, Jin F, Dai Q, Wen W, Potter JD, Kushi LH, Ruan Z, Gao YT & Zheng W (2001) Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 10(5):483-488.
- Singh RR & Kumar R (2005) Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis. *Journal of cellular biochemistry* 96(3):490-505.
- Société canadienne du cancer (2014) *Anatomie et physiologie du sein.*, <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/anatomy-and-physiology/?region=on> (Consulté le 9 mai 2014)
- Société canadienne du cancer (2015) *Cancer du sein chez l'homme.*, <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/breast-cancer/breast-cancer-in-men/?region=on> (Consulté le 5 mai)
- Song RX, Fan P, Yue W, Chen Y & Santen RJ (2006) Role of receptor complexes in the extranuclear actions of estrogen receptor alpha in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 13(1):S3-13.
- Soyal S, Ismail PM, Li J, Mulac-Jericevic B, Conneely OM & Lydon JP (2002) Progesterone's role in mammary gland development and tumorigenesis as disclosed by experimental mouse genetics. *Breast Cancer Res* 4(5):191-196.
- Spink DC, Spink BC, Cao JQ, DePasquale JA, Pentecost BT, Fasco MJ, Li Y & Sutter TR (1998) Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells. *carcinogenesis* 19(2):291-298.
- Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P & Werb Z (2006) Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation* 74(7):365-381.
- Stoletov K, Strnadel J, Zardouzanian E, Momiyama M, Park FD, Kelber JA, Pizzo DP, Hoffman R, VandenBerg SR & Klemke RL (2013) Role of connexins in

- metastatic breast cancer and melanoma brain colonization. *J Cell Sci* 126(Pt 4):904-913.
- Strauss L, Makela S, Joshi S, Huhtaniemi I & Santti R (1998) Genistein exerts estrogen-like effects in male mouse reproductive tract. *Mol Cell Endocrinol* 144(1-2):83-93.
- Suzan G C (2014) *Molecular Subtypes of Breast Cancer.*, <http://www5.komen.org/BreastCancer/SubtypesofBreastCancer.html> (Consulté le 7 mai 2014)
- Thanos J, Cotterchio M, Boucher BA, Kreiger N & Thompson LU (2006) Adolescent dietary phytoestrogen intake and breast cancer risk (Canada). *Cancer Causes Control* 17(10):1253-1261.
- Travers AA & Thompson JM (2004) An introduction to the mechanics of DNA. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 362(1820):1265-1279.
- Trock BJ, Hilakivi-Clarke L & Clarke R (2006) Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 98(7):459-471.
- Virani S, Colacino JA, Kim JH & Rozek LS (2012) Cancer epigenetics: a brief review. *Ilar J* 53(3-4):359-369.
- Vitale DC, Piazza C, Melilli B, Drago F & Salomone S (2013) Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 38(1):15-25.
- Vu TH, Li T, Nguyen D, Nguyen BT, Yao XM, Hu JF & Hoffman AR (2000) Symmetric and asymmetric DNA methylation in the human IGF2-H19 imprinted region. *Genomics* 64(2):132-143.
- Wang YN & Hung MC (2012) Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell Biosci* 2(1):2045-3701.
- Wang YN, Wang H, Yamaguchi H, Lee HJ, Lee HH & Hung MC (2010) COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport. *Biochem Biophys Res Commun* 399(4):498-504.
- Wiesen JF, Young P, Werb Z & Cunha GR (1999) Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development* 126(2):335-344.
- Wijermans P, Lubbert M, Verhoef G, Bosly A, Ravoet C, Andre M & Ferrant A (2000) Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol* 18(5):956-962.
- Wikipedia (2014) *Epidermal growth factor receptor.*, http://en.wikipedia.org/wiki/Epidermal_growth_factor_receptor (Consulté le 2 août 2014)
- Wood CE, Register TC & Cline JM (2007) Soy isoflavonoid effects on endogenous estrogen metabolism in postmenopausal female monkeys. *carcinogenesis* 28(4):801-808.
- Wu AH, Wan P, Hankin J, Tseng CC, Yu MC & Pike MC (2002) Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. *carcinogenesis* 23(9):1491-1496.
- Wu AH, Yu MC, Tseng CC & Pike MC (2008) Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. *Br J Cancer* 98(1):9-14.

- Xie Q, Bai Q, Zou LY, Zhang QY, Zhou Y, Chang H, Yi L, Zhu JD & Mi MT (2014) Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer* 53(5):422-431.
- Yang Z, Kulkarni K, Zhu W & Hu M (2012) Bioavailability and pharmacokinetics of genistein: mechanistic studies on its ADME. *Anticancer Agents Med Chem* 12(10):1264-1280.
- Zeng L, Jarrett C, Brown K, Gillespie KM, Holly JM & Perks CM (2013) Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) plays a role in the anti-tumorigenic effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine (AZA) in breast cancer cells. *Exp Cell Res* 319(14):2282-2295.
- Zhang S, Lei P, Liu X, Li X, Walker K, Kotha L, Rowlands C & Safe S (2009) The aryl hydrocarbon receptor as a target for estrogen receptor-negative breast cancer chemotherapy. *Endocr Relat Cancer* 16(3):835-844.
- Zudaire E, Cuesta N, Murty V, Woodson K, Adams L, Gonzalez N, Martinez A, Narayan G, Kirsch I, Franklin W, Hirsch F, Birrer M & Cuttitta F (2008) The aryl hydrocarbon receptor repressor is a putative tumor suppressor gene in multiple human cancers. *J Clin Invest* 118(2):640-650.

ANNEXE I

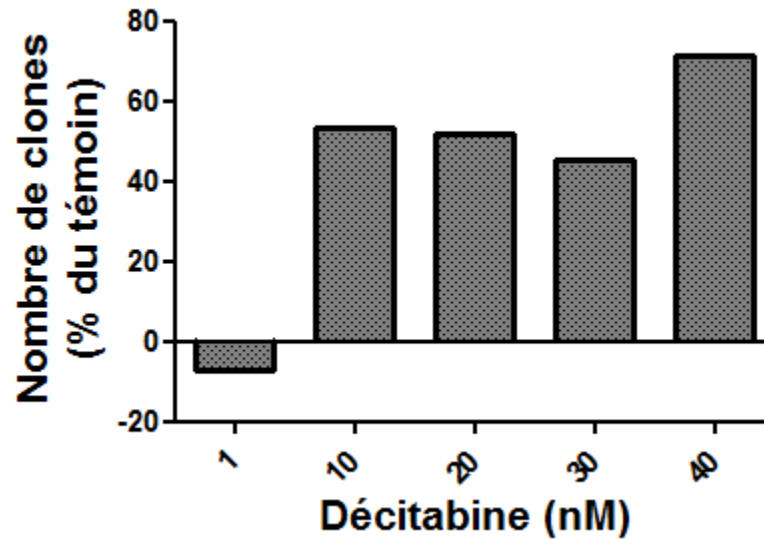


Figure 1. Un traitement de 20 nM de décitabine permet une diminution de 50 % de formation de clones dans les cellules MDA-MB-231. Les cellules ont étéensemencées dans une plaque à six puits et maintenues pour une période de 24 heures dans le milieu de culture approprié. Le milieu de culture a ensuite été changé pour un milieu de culture traité (pour une concentration finale de 1, 10, 20, 30 et 40 nM de décitabine) pour une période de 48 heures. Le milieu de culture a ensuite été changé pour un milieu de culture non-traité, jusqu'à l'obtention de colonies visibles à oeil (environ dix jours). Les colonies ont ensuite été fixées (0.15 % bleu de méthyle dilué dans le méthanol) et comptées. Les résultats représentent une seule expérience.



Figure 2. Profile de marqueurs des cellules MCF-10A et MCF-12A. Les cellules MCF-10A et MCF-12A ont étéensemencées dans des plaques de pétris et maintenues dans un milieu de culture approprié pendant 24 heures avant d'être récoltées. Les cellules ont ensuite été lysées et l'expression des protéines a été mesurée par immunobuvardage de type western, en utilisant le lysat entier des cellules. Les protéines AhR et HER2 ont été détectées dans les cellules MCF-12A, alors que seulement la protéine HER2 a été détectée dans les cellules MCF-10A. Les résultats représentent trois expériences indépendantes.

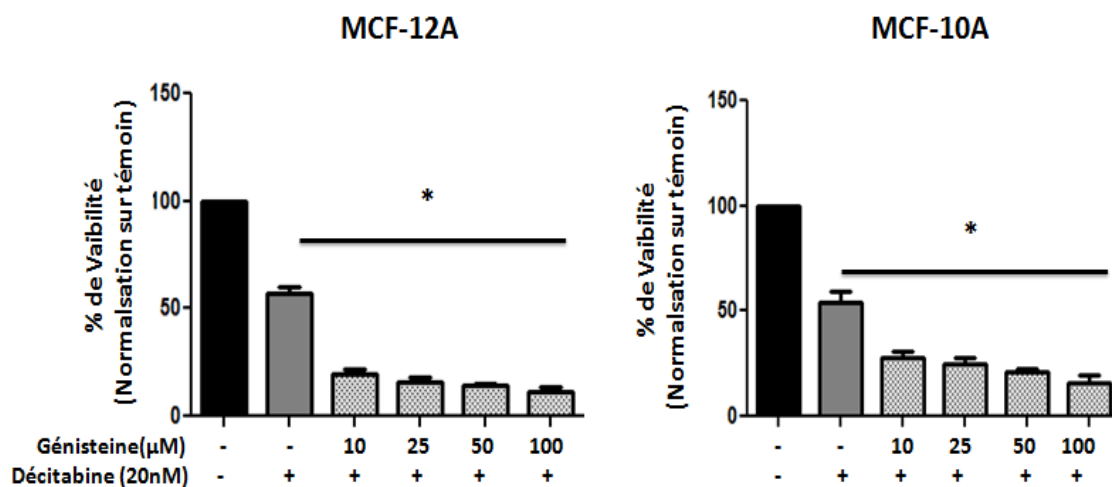


Figure 3. Le traitement d'une combinaison de génistéine et de décitabine permet une diminution significative de la viabilité des cellules transformées MCF-12A et MCF-10A. Les cellules ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits et maintenues pour 24 heures dans le milieu de culture approprié. Le milieu a ensuite été changé pour un milieu traité avec 10, 25, 50, et 100 μM de génistéine combinée avec 20 nM de décitabine. La viabilité cellulaire a été analysée suite à un traitement de six jours par analyse MTT. Le milieu de culture a été remplacé à tout les 48 heures. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes ($\pm$ SD). Un * indique un effet statistiquement significatif comparé avec les cellules témoins (traitées par DMSO/PBS). (* P <0.05).

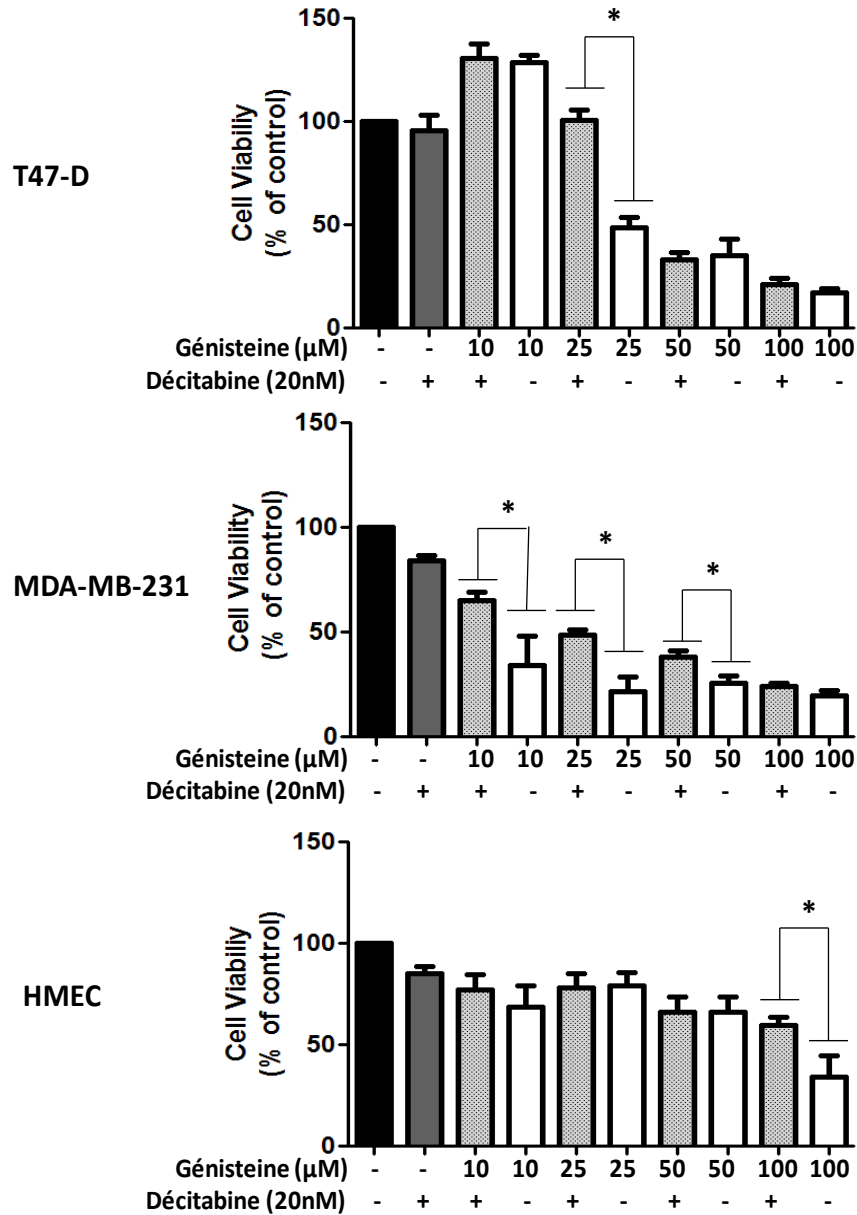


Figure 4. Comparaison du traitement de génistéine avec le traitement de la combinaison de génistéine et de décitabine. Le traitement de génistéine permet une plus grande intensité de diminution significative de la viabilité des cellules T47-D, MDA-MB-231 et HMEC à certaines doses en comparaison avec le co-traitement de génistéine et de décitabine. Les cellules ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits et maintenues pour 24 heures dans le milieu de culture approprié. Le milieu a ensuite été changé pour un milieu traité avec 10, 25, 50, et 100 μM de génistéine combinée avec 20 nM de décitabine. La viabilité cellulaire a été analysée suite à un traitement de six jours par analyse MTT. Le milieu de culture a été remplacé à tout les 48 heures. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes (±SD). Un * indique un effet statistiquement significatif comparé avec les cellules témoins (traitées par DMSO/PBS). (* $P < 0.05$).

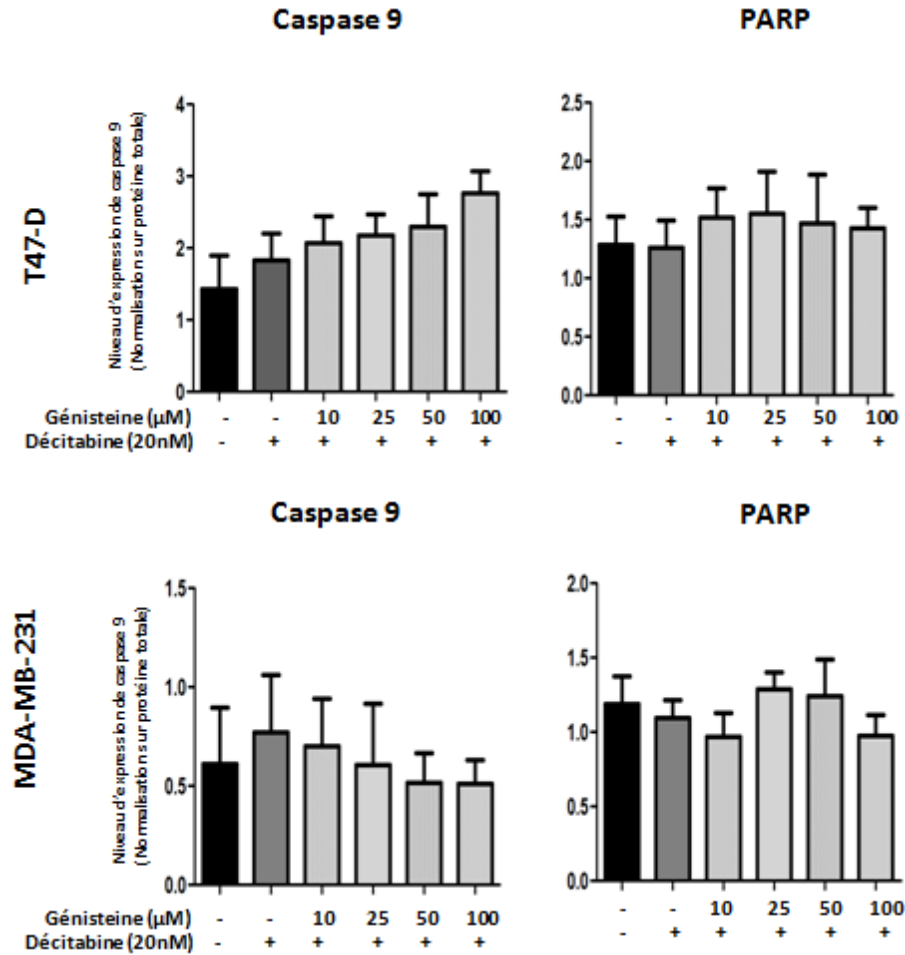


Figure 5. Le traitement d'une combinaison de génistéine avec ou sans décitabine n'a pas d'effet sur l'expression des protéines PARP et capspase 9 dans les cellules T47-D et MDA-MB-231. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de pétris et maintenues pour 24 heures dans le milieu approprié. Le milieu a ensuite été changé pour un milieu traité avec 10, 25, 50, et 100 µm de génistéine combinée avec 20 nM de décitabine. Les fractions cytoplasmiques, les fractions nucléaires ou les lysats entiers ont été récoltés suite à un traitement de 48 heures. L'expression des protéines a été analysée par la méthode d'immunobuvardage de type western. Les cellules Jurkat (J77) traitées avec 1µM de staurosporine pour une période de deux heures ont été utilisées comme contrôle positif. Il n'y a pas eu d'observation de changement significatif au niveau de l'expression des protéines en fonctions des différents traitements. Les résultats représentent le pourcentage des témoins et sont normalisés sur l'expression des protéines totales. Les résultats représentent la moyenne de trois à cinq expériences indépendantes (±SD). Un * indique un effet statistiquement significatif comparé avec les cellules témoins (traitées par DMSO/PBS). (* $P < 0.05$).

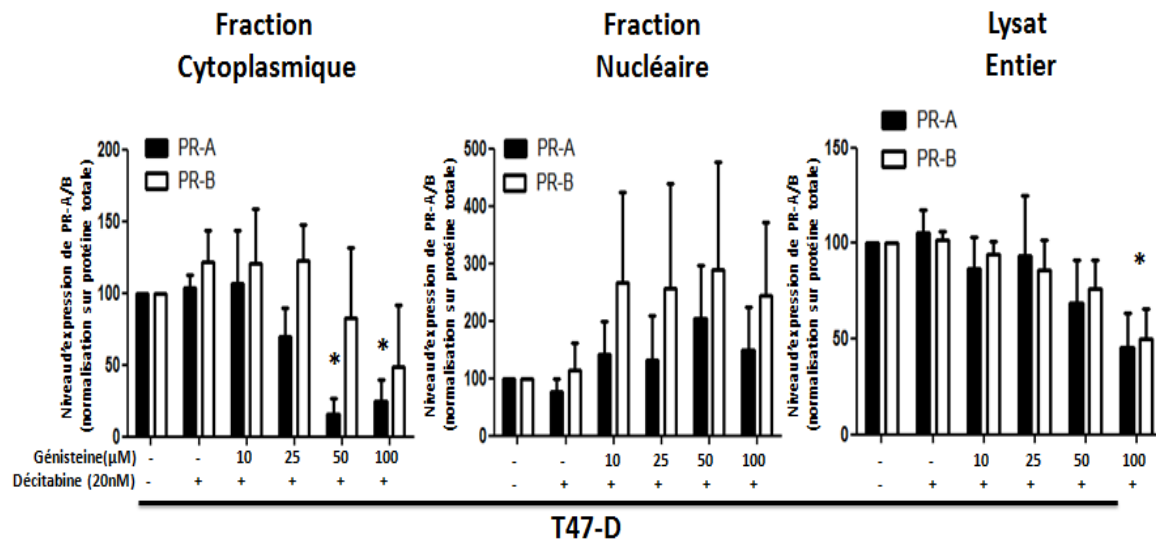


Figure 6. Le traitement d'une combinaison de génistéine et de décitabine permet de diminuer significativement l'expression des PR-A et des PR-B cytoplasmiques dans les cellules T47-D. Les cellules ont été ensemencées dans des plaques de pétris et maintenues pour 24 heures dans le milieu approprié. Le milieu a ensuite été changé pour un milieu traité avec 10, 25, 50, et 100 μm de génistéine combinée avec 20 nM de décitabine. Les fractions cytoplasmiques, les fractions nucléaires ou les lysats entiers ont été récoltés suite à un traitement de 48 heures. L'expression des protéines a été analysée par la méthode d'immunobuvardage de type western. Le niveau des PR-A est significativement diminué dans les fractions cytoplasmiques de cellules T47-D exposées avec 50-100 μm de génistéine et 20nM de décitabine. Les lysats entiers des cellules T47-D traitées avec 100 μm de génistéine et 20 nM de décitabine ont démontré un niveau de PR-A/B significativement diminué. Le contrôle positif est le lysat entier des cellules T47-D non traitées. Les résultats représentent le pourcentage des témoins et sont normalisés sur l'expression des protéines totales. Les résultats représentent la moyenne de cinq expériences indépendantes ($\pm$ SD). Un * indique un effet statistiquement significatif comparé avec les cellules témoins (traitées par DMSO/PBS). (* $P < 0.05$).

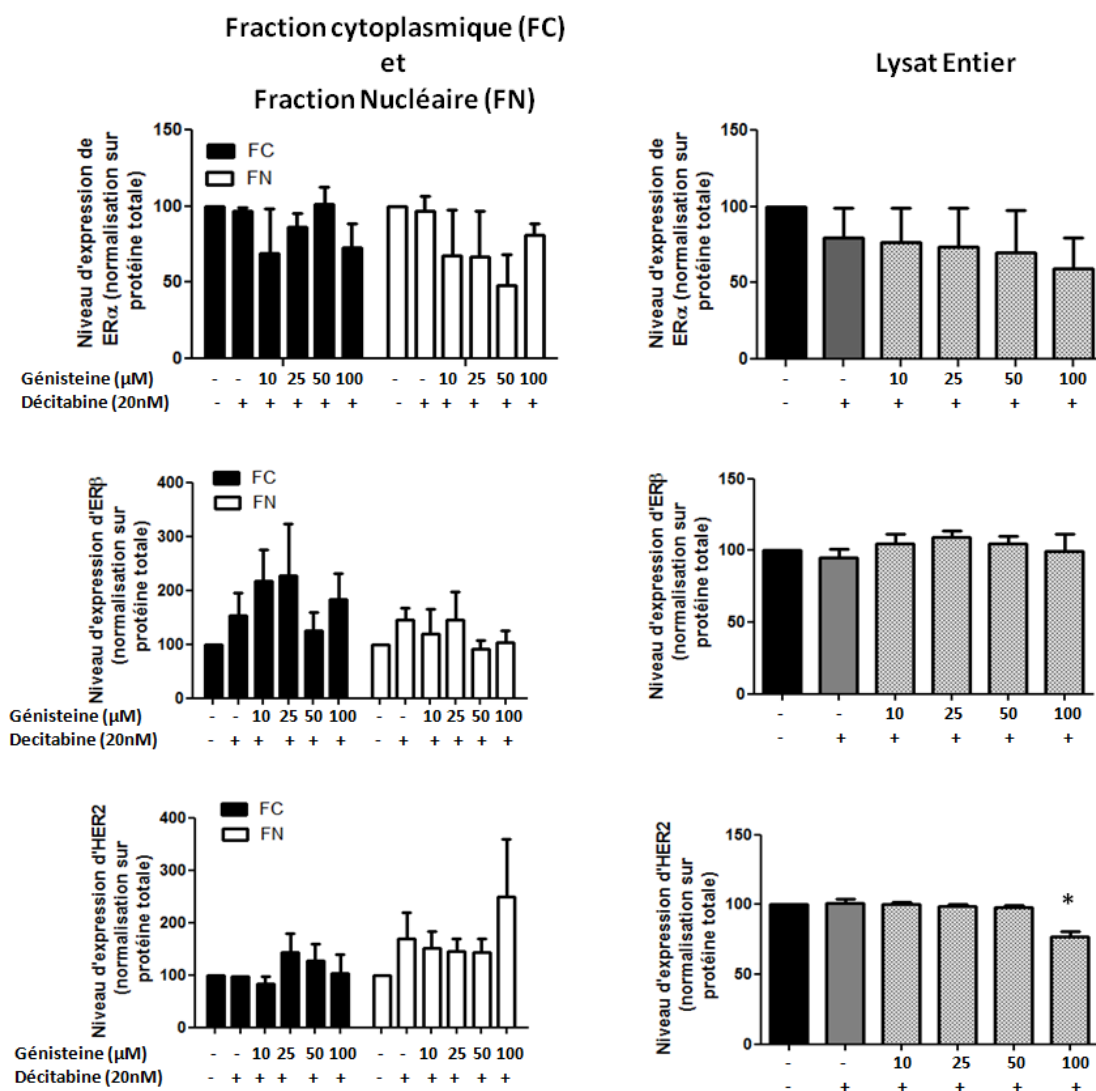


Figure 7. Un co-traitement de génistéine et de décitabine n'a pas d'effet significatif sur l'expression de ERα/β dans les cellules T47-D, mais permet une diminution significative de l'expression d'HER2. Les cellules ont été ensemencées dans des plaques de pétris et maintenues pour 24 heures dans le milieu approprié. Le milieu a ensuite été changé pour un milieu traité avec 10, 25, 50 et 100 μM de génistéine combinée avec 20 nM de décitabine. Les fractions cytoplasmiques, les fractions nucléaires et les lysats entiers ont été récoltés suite à un traitement de 48 heures. L'expression des protéines a été analysée par la méthode d'immunobuvardage de type western. Il n'y a pas eu de différence significative de l'expression de ERα/β dans les cellules T47-D traitées. Le niveau d'HER2 a été significativement diminué dans le lysat entier des cellules T47-D suite à un traitement de 100 μM de génistéine et de 20 nM de décitabine. Le contrôle positif est le lysat entier des cellules T47-D non traitées. Les résultats sont représentés en pourcentage de cellules témoins (la moyenne ±SD de trois expériences indépendantes pour ERα et de cinq expériences indépendantes pour les analyses de ERβ et d'HER2). Un * indique un effet statistiquement significatif comparé avec les cellules témoins (traitées par DMSO/PBS). (* $P < 0.05$).

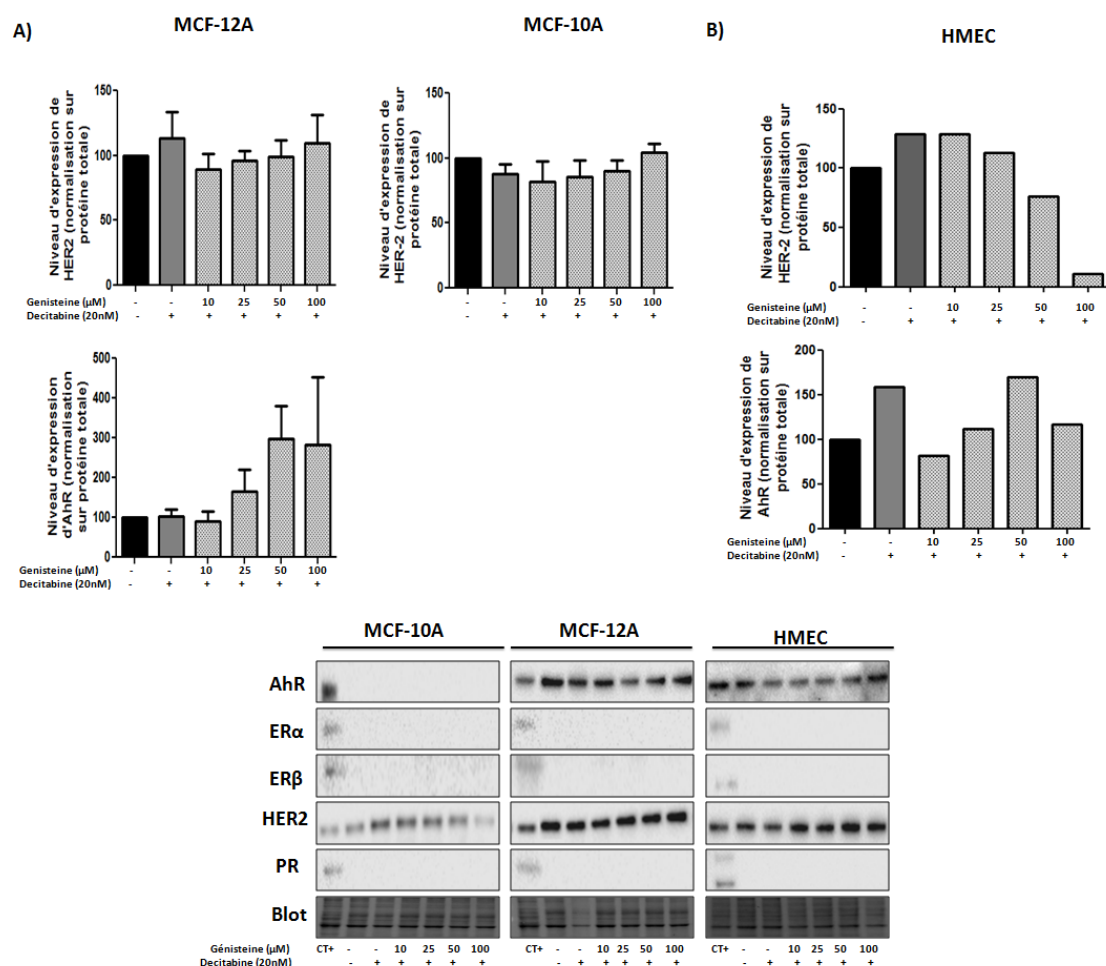


Figure 8. Un co-traitement de génistéine et de décitabine n'a pas d'effet significatif sur l'expression de ERα/β, de PR-A/B, d'HER2 ou AhR au niveau des lysats entiers des cellules MCF-10A, MCF-12A et HMEC. Les cellules ont été ensemencées dans des plaques de pétris et maintenues pour 24 heures dans le milieu approprié. Le milieu a ensuite été changé pour un milieu traité avec 10, 25, 50 et 100 μM de génistéine combinée avec 20 nM de décitabine. Les lysats entiers ont été récoltés suite à un traitement de 48 heures. L'expression des protéines a été analysée par la méthode d'immunobuvardage de type western. A) Expression protéique des cellules non-tumorales MCF-10A et MCF-12A. B) Expression protéique des cellules primaires normales HMEC. Le contrôle positif est le lysat entier des cellules T47-D non traitées. Les résultats sont représentés en pourcentage de cellules témoins (la moyenne ±SD de trois expériences indépendantes pour les cellules MCF-10A et MCF12A et une expérience pour les cellules HMEC).

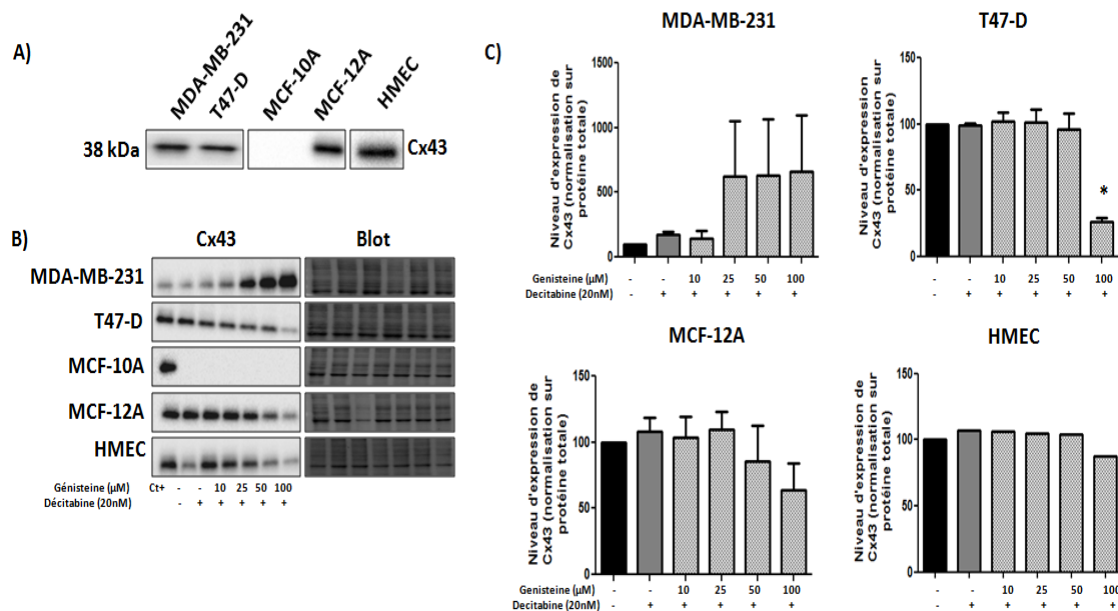


Figure 9. Un co-traitement de génistéine et de décitabine n'a pas d'effet significatif sur l'expression de Cx43 au niveau des lysats entiers des toutes les cellules en analyses. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de pétris et maintenues pour 24 heures dans le milieu approprié. Dans un cas, le milieu a été changé par du milieu frais et les cellules ont été récoltées après 48 heures pour analyser l'expression de Cx43 dans les cellules non traitées. Dans un autre cas, le milieu a été changé pour un milieu traité avec 10, 25, 50 et 100 μM de génistéine combinée avec 20 nM de décitabine et les lysats entiers ont été récoltés suite à un traitement de 48 heures. L'expression des protéines a été analysée par la méthode d'immunobuvardage de type western. A) Expression protéique des cellules MCF-10A et MCF-12A et HMEC non traitées. B) Expression protéique des cellules MCF-10A et MCF-12A et HMEC traitées. Le contrôle positif est le lysat entier des cellules T47-D non traitées. Les résultats sont représentés en pourcentage de cellules témoins (la moyenne $\pm$ SD de trois expériences indépendantes pour les cellules MCF-10A et MCF-12A et une expérience pour les cellules HMEC).

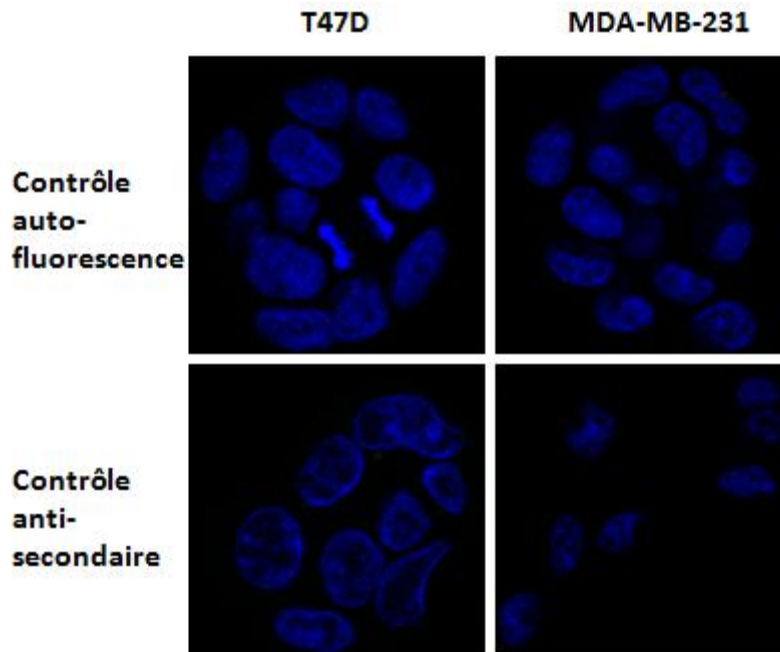


Figure 10. Contrôle de qualité d'expérience d'immunofluorescence. Les analyses d'auto-fluorescences ont été effectuées sur des cellules n'ayant pas été incubées avec des anticorps primaires ou secondaires, afin de démontrer que les cellules n'ont pas d'auto-fluorescence dans la longueur d'onde utilisée pour la détection de la protéine AhR. Le contrôle anti-secondaire a été effectué avec des cellules qui n'ont pas été incubées avec des anticorps primaires, afin de démontrer la spécificité des l'anticorps secondaires. Les résultats sont de trois expériences indépendantes.

ANNEXE II - Preuve de soumission dans le journal *Carcinogenesis*

16-Jan-2015

Dear Dr Plante

We are writing to confirm that the manuscript titled "A Co-treatment of Genistein and Decitabine Decreases Proliferation and Activates AhR in Breast Cancer Cells", has been successfully submitted to *Carcinogenesis*. The manuscript has been assigned the following manuscript number: CARCIN-2015-00030. Please make a note of this manuscript number and include it in all future communications.

You can keep track of this manuscript by logging in to your Author Centre at <https://mc.manuscriptcentral.com/carcin> where the status will be displayed.

If you do not know your log in details, you can enter your e-mail address in the Password Help field on the log in page and you will receive an e-mail with your account information.

Please note that all future communications concerning this manuscript will be directed to the Corresponding Author ONLY.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

OPTIONAL OPEN ACCESS – Please note that if the manuscript is accepted for publication in *Carcinogenesis*, you will have the option, at an additional charge, to make the paper freely available online immediately upon publication, under the Oxford Open initiative (see <http://www.oxfordjournals.org/oxfordopen/about>). Applicable Oxford Open charges can be found in the Authors Instructions (<http://www.oxfordjournals.org/jnls/list/carcin/instauth/general.html>).

Thank you for your interest in *Carcinogenesis*.

Yours sincerely

Penny

Mrs Penny Brown
Carcinogenesis
carcinogenesis.editorialoffice@oup.com