

Université du Québec  
Institut national de la recherche scientifique  
Institut Armand-Frappier

**Évaluation des propriétés antiprolifératives de la tectochrysin et de la pinocembrine par des mécanismes dépendants du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) dans les cellules mammaires cancéreuses humaines**

Par

Marjolaine Miclette

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences expérimentales de la santé

**Jury d'évaluation**

Examineur interne  
Présidente du jury

Cathy Vaillancourt  
INRS Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Sami Haddad  
Département de santé environnementale  
Université de Montréal

Directeur de recherche

Thomas Sanderson  
INRS Institut Armand-Frappier

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement feu le Pr Michel Charbonneau, mon directeur de recherche qui m'a accueillie avec enthousiasme dans son laboratoire et qui m'a témoigné sa confiance. Je suis grandement reconnaissante d'avoir travaillé avec ce chercheur engagé et passionné par ses projets pendant mes années de travail en laboratoire; il m'a encadré avec ouverture pour les nouveaux défis. Tout en étant une inspiration et poussant ma réflexion, il a su m'encourager, être disponible et me conseiller à chaque étape du parcours. Sa bonne humeur et son enthousiasme perpétuel face aux difficultés que l'on a pu rencontrer ont été une source de motivation.

Je témoigne toute ma gratitude au Pr Thomas Sanderson qui m'a accueillie pour la fin de ce projet. Son écoute, sa disponibilité, sa flexibilité et ses encouragements ont été précieux pour la traversée de la ligne d'arrivée. Sa patience et sa compréhension ont été hautement appréciées.

Je remercie spécialement Jessy Tremblay pour son aide irremplaçable au niveau des différents types de microscopie ainsi que pour la cytométrie en flux. Je remercie Myriam Létourneau et le Pr David Chatenet pour les discussions passionnantes de chimie et le partage de leur expertise, ainsi que Michel Courcelles pour son assistance en tant que bibliothécaire. Je tiens également à remercier Guylaine Lassonde, technicienne de laboratoire, pour son assistance et ses conseils en laboratoire. J'ai eu la chance de travailler dans un environnement exceptionnel. Je remercie ma collègue de laboratoire, Natasha Mercier, et toute l'équipe du Pr Thomas Sanderson.

Un grand merci aux étudiants du campus et collègues avec qui j'ai partagé de bons moments au quotidien et avec qui j'ai tissé de belles relations et amitiés pendant tout ce parcours.

Finalement, je tiens à remercier mes amis et toute ma famille pour leurs encouragements tout au long de ce parcours, particulièrement ma mère Monique Daoust à laquelle je témoigne toute ma gratitude.

Je dédie ce mémoire à mon père.

## RÉSUMÉ

Le cancer du sein, le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes dans les pays occidentaux, est détecté de plus en plus fréquemment chez les jeunes patients. Afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour les carcinomes avec un haut degré d'agressivité, l'étude du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) comme cible thérapeutique est prometteuse. Le but de cette étude est d'évaluer le potentiel de la tectochryrine et de la pinocembrine, deux flavonoïdes communément retrouvés dans le propolis, en parallèle avec la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) à réduire la prolifération de cellules mammaires humaines cancéreuses T47D par l'activation du récepteur Ah. Nos résultats montrent que la tectochryrine et la pinocembrine sont des ligands agonistes du récepteur Ah puisqu'ils induisent une baisse du taux de AhR en concomitance avec des hausses de l'enzyme du cytochrome P1A1 (CYP1A1). Parallèlement, les observations morphologiques montrent une diminution des sites de formation de points d'adhérence cellulaire, qui est un signe d'une baisse de croissance cellulaire. Ces résultats sont attestés conjointement avec une augmentation du nombre de cellules dans la phase G0/G1 du cycle cellulaire ainsi que des baisses de c-myc et d'Akt. Ces résultats vont dans le même sens que les modulations induites par la TCDD indiquant des mécanismes agonistes des deux molécules. Pour la première fois, nous montrons que la tectochryrine et la pinocembrine induisent une diminution des taux de récepteurs à l'œstrogène (ER) ainsi que du facteur de croissance épidermique ErbB2. Les baisses d'ErbB2 attesteraient d'un mécanisme antagoniste. Collectivement, ces travaux ont permis d'attester pour la première fois des propriétés antiprolifératives spécifiques de la tectochryrine et de la pinocembrine en mettant en relation AhR et le récepteurs ER $\alpha$  ainsi que le facteur ErbB2 dans les cellules mammaires cancéreuses humaines.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>I</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>II</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>X</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>13</b>
<b>CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE</b> .....	<b>16</b>
1.1. Le cancer du sein .....	16
1.1.1. Situation actuelle et projections .....	16
1.1.2. Morphologie du sein .....	17
1.1.3. Les facteurs de risque associés au développement du cancer du sein.....	19
1.1.3.1. Les facteurs génétiques .....	19
1.1.3.2. Les facteurs hormonaux et reproductifs .....	19
1.1.3.3. Les facteurs sanitaires .....	20
1.1.3.4. Les facteurs environnementaux.....	21
1.1.4. Cancérogenèse mammaire .....	22
1.1.5. Classification des tumeurs mammaires.....	23
1.1.5.1. Le type ER+/luminal.....	24
1.1.5.2. Les types basal et normal breast-like .....	24
1.1.5.3. Les types basal et ErbB2+.....	25
1.1.6. Les principaux récepteurs impliqués dans la cancérogenèse mammaire.....	26
1.1.6.1. Les récepteurs stéroïdiens .....	27
1.1.6.2. Les récepteurs aux œstrogènes.....	27
1.1.6.3. Isoformes des récepteurs à l'œstrogène.....	29
1.1.6.4. Régulation et voies de signalisation classique des œstrogènes .....	30
1.1.6.5. Régulation et voie de signalisation non-classique des œstrogènes .....	31
1.1.7. Les récepteurs reliés aux récepteurs des œstrogènes (ERRs) : .....	31
1.1.8. Récepteur à la progestérone .....	32
1.1.8.1. Isoformes du récepteur à la progestérone.....	32

1.1.9. Les récepteurs à activité tyrosine kinase.....	34
1.1.9.1. RTK et cancer .....	34
1.1.9.2. Les récepteurs aux facteurs de croissance épidermique.....	35
1.1.9.3. ErbB2/HER2 dans la cancérogenèse mammaire.....	35
1.2. Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR).....	37
1.2.1. Famille et structure de AhR .....	37
1.2.2. Le polymorphisme de AhR.....	38
1.2.3. Les isoformes de AhR.....	39
1.2.4. Les ligands de AhR.....	39
1.2.4.1. Les ligands endogènes de AhR .....	40
1.2.4.2. Les ligands exogènes de AhR .....	41
1.2.5. Mécanismes d'activation et de régulation de AhR .....	41
1.2.6. Mécanismes d'action classique et non-classique de AhR.....	43
1.2.7. Interaction de AhR avec d'autres voies de signalisation .....	43
1.2.8. Les rôles physiologiques de AhR.....	45
1.2.9. AhR dans la cancérogenèse lier .....	45
1.2.9.1. Effets pro-carcinogènes de AhR .....	46
1.2.9.2. Effets anti-carcinogènes de AhR.....	46
1.2.10. AhR dans le cancer du sein.....	47
1.2.10.1. AhR dans le tissu mammaire cancéreux .....	47
1.2.10.2. L'interaction entre AhR et les ERs .....	48
1.2.10.3. La signalisation de AhR dans les cellules mammaires cancéreuses.....	50
1.3. Prévention et traitement du cancer par les polyphénols.....	51
1.3.1. Effets chimiopréventifs des polyphénols sur les cellules cancéreuses.....	52
1.3.1.1. Potentiel antioxydant.....	53
1.3.1.2. Effets sur les enzymes liées au métabolisme des xénobiotiques.....	54
1.3.1.3. Arrêt du cycle cellulaire .....	54
1.3.1.4. Induction de l'apoptose .....	54
1.3.1.5. Effets antiprolifératifs .....	55
1.3.1.6. Inhibition de l'inflammation .....	56
1.3.2. Le potentiel thérapeutique des polyphénols sur les cellules cancéreuses .....	57
1.3.2.1. Effets anti-angiogéniques.....	57
1.3.2.2. Effets anti-métastasiques.....	58

1.3.3. Les flavonoïdes .....	58
1.3.4. Flavonoïdes : modèles pour la conception d'agents thérapeutiques .....	59
1.3.5. Les flavonoïdes et leurs mécanismes d'action cellulaire .....	60
1.3.6. Mécanismes d'inhibition des RTK par les flavonoïdes .....	60
1.3.6.1. Interaction avec le site de liaison de l'ATP .....	60
1.3.6.2. Interaction avec le site d'activation du domaine kinase .....	62
1.3.6.3. Interaction avec le site allostérique .....	62
1.3.6.4. Interaction avec les radeaux lipidiques .....	63
1.3.6.5. Inhibiteurs covalents/liaisons covalentes .....	63
1.4. La tectochrysinine et la pinocembrine .....	64
1.4.1. La tectochrysinine .....	65
1.4.1.1. La tectochrysinine, agoniste du récepteur Ah .....	65
1.4.1.2. Effets anticancérigènes de la tectochrysinine .....	65
1.4.1.3. Effets antioxydants .....	66
1.4.2. La pinocembrine .....	67
1.4.2.1. Effets anticancérigènes .....	67
1.4.2.2. Effets anti-inflammatoires et anti-oxydants .....	67
1.4.3. Effets anti-microbiens .....	68
1.5. Hypothèses et objectifs de recherche .....	69
<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>71</b>
2.1. Composés : dioxine et flavonoïdes .....	72
2.2. Lignée cellulaire et conditions de traitement .....	72
2.3. Analyse de la morphologie cellulaire .....	72
2.4. Quantification de la viabilité cellulaire .....	73
2.5. Détection de la cytotoxicité .....	73
2.6. Analyse du cycle cellulaire .....	74
2.7. Extraction des protéines totales .....	75
2.8. Immunobuvardage de type Western .....	75
2.8.1. Anticorps .....	76
2.9. Analyses statistiques .....	76

<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS</b> .....	<b>78</b>
3.1. La tectochrysin et la pinocembrine inhibent la prolifération et la viabilité cellulaire et montrent un effet cytotoxique modéré.....	78
3.2. La tectochrysin et la pinocembrine : ligands de AhR.....	82
3.3. La tectochrysin et la pinocembrine augmentent le nombre de cellules en phase G0/G1 et diminuent les taux d'Akt et de c-myc.....	88
3.4. La tectochrysin et la pinocembrine engendrent des diminution d'ER $\alpha$ et d'ErbB2 .....	93
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION</b> .....	<b>97</b>
4.1. La tectochrysin et la pinocembrine sont des agonistes de AhR et induisent la synthèse de CYP1A1 .....	98
4.2. La tectochrysin a des effets antiprolifératifs plus élevés que la pinocembrine .....	100
4.3. La tectochrysin et la pinocembrine diminuent la prolifération et la viabilité cellulaire des cellules T47D. ....	101
4.4. La tectochrysin et la pinocembrine engendrent une augmentation des cellules en phase G0/G1 ainsi qu'une diminution des taux de protéines c-myc et Akt .....	104
4.5. La tectochrysin et la pinocembrine induisent une baisse d'expression d'ER $\alpha$ et d'ErbB2 .....	107
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>112</b>
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>113</b>

# LISTE DES FIGURES

## Chapitre 1 : Revue de la littérature

- Figure 1.1** Incidence mondiale du cancer du sein chez les femmes en 2012
- Figure 1.2** La glande mammaire et son développement
- Figure 1.3** Représentation schématique de la structure des ER $\alpha$  et ER $\beta$
- Figure 1.4** Représentation schématique des différentes isoformes des récepteurs à la progestérone
- Figure 1.5** Schématisation des domaines fonctionnels du récepteur Ah
- Figure 1.6** Mécanisme d'activation et régulation du récepteur Ah
- Figure 1.7** Interaction d'AhR et EGFR dans la transduction du signal qui résulte dans l'activation transductionnelle via la voie des MAP kinases
- Figure 1.8** Classes et sous-classes des polyphénols
- Figure 1.9** Les effets des polyphénols et d'autres composés naturels sur différents stades de la cancérogenèse
- Figure 1.10** Structure générale des principaux flavonoïdes
- Figure 1.11** Région charnière des récepteurs à activité tyrosine kinase et site de liaison de l'ATP
- Figure 1.12** Structures chimiques de la pinocembrine et de la tectochry sine

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

- Figure 2.1** Organigramme récapitulatif de la démarche expérimentale

## Chapitre 3 : Résultats

- Figure 3.1** Effets de la TCDD, de la pinocembrine et de la tectochry sine sur la viabilité des cellules T47D
- Figure 3.2** Effets cytotoxiques de la TCDD, de la pinocembrine et de la tectochry sine sur les cellules T47D.

- Figure 3.3** Effets de la tectochryrine et de la pinocembrine sur la prolifération et la morphologie des cellules T47D
- Figure 3.4** Diminution du taux de AhR suite à l'exposition à la tectochryrine et la pinocembrine
- Figure 3.5** La tectochryrine et la pinocembrine n'induisent pas de changements significatifs dans la quantité totale de HSP90
- Figure 3.6** La tectochryrine et la pinocembrine induisent l'expression de CYP1A1
- Figure 3.7** Effets de la tectochryrine et de la pinocembrine sur le cycle cellulaire des cellules mammaires cancéreuses T47D
- Figure 3.8** Profil du cycle cellulaire des cellules T47D suite aux traitements à 10  $\mu$ M de pinocembrine et de tectochryrine pour des périodes de 24, 48 et 72h.
- Figure 3.9** La tectochryrine et la pinocembrine induisent une baisse de quantité totale de la protéine Akt.
- Figure 3.10** La tectochryrine et la pinocembrine diminuent l'expression protéique de c-myc.
- Figure 3.11** Effets de la tectochryrine et de la pinocembrine sur les quantités totales du récepteur à l'œstrogène alpha.
- Figure 3.12** La tectochryrine et la pinocembrine diminuent l'expression protéique du récepteur ErbB2.

# LISTE DES TABLEAUX

## Chapitre 1 : Revue de la littérature

**Tableau 1.1** Les Facteurs de risque du cancer du sein selon la Société Canadienne du Cancer 2015

**Tableau 1.2** Les sous-types moléculaires des cancers mammaires

## Chapitre 3 : Résultats

**Tableau 3.1** Valeurs de la IC50 des composés sur les cellules T47D

**Tableau 3.2** Valeurs de la EC50 des composés sur les cellules T47D tel que déterminés par le test de LDH

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
Ah	Hydrocarbures aromatiques
AhR	Récepteur aux hydrocarbures aromatiques
AhRR	Répresseur du récepteur Ah
AIF	Facteurs induisant l'apoptose, <i>AIF-apoptose inducing factor</i>
Akt/ AKT1	Protéine tyrosine kinase « Akt »
ALDH3A1	Aldéhyde déshydrogénase
AP1	Facteur de transcription AP1
AR	Récepteurs aux androgènes
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNT	Facteur de translocation nucléaire du récepteur Ah
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine triphosphate
bHLH-PAS	basic helix-loop-helix-PER/ARNT/SIM
BPC	biphényles polychlorés
CDK	cyclin-dépendant kinase
cAMP	adénosine monophosphate cyclique
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
COX2	Cyclooxygénase-2
CYP1A1	Cytochrome P1A1
DBD	DNA binding domain
DRE	Dioxin response element
EGCG	Epigallocatechine gallate
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Récepteurs pour le facteur de croissance épidermique
Ephs	Récepteurs des éphrines
ER	Récepteurs des oestrogènes
ERRs	Récepteurs reliés aux récepteurs des oestrogènes
ErbB2	Récepteur de facteurs de croissance HER2
ERE	Séquences de réponse aux oestrogènes
eSP1	Facteur de transcription eSP1
FGFR	Récepteurs pour les facteurs de croissance des fibroblastes
GPx	Glutathione peroxydase

GR	Glutathione reductase
HAH	Hydrocarbures aromatiques halogénés
HSP	Heat shock protein
IAP	Inhibitory apoptosis protein
IARC	Centre international de recherche sur le cancer
ID	Inhibitory domain
IGF	Insulin growth factor
IGFR	Insulin growth factor receptor
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IR	Insulin receptor
kDA	Kilodaltons
LBD	Ligand binding domain
MDA	Malondialdéhyde
MMPS	Membrane metalloproteineases
MR	Récepteurs aux minéralocorticoïdes
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NLS	Nuclear localisation sequence
NR	Nuclear receptor
NR3C	Récepteur aux 3-ketostéroïdes
NTD	Domaine NH <sub>2</sub> -terminal
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PAH	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
PAS	PER/ARNT/SIM
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PEG	Polyéthylène glycol
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PG	Progestérone
POP	Polluants organiques persistants
PPAR	Proliférateurs de peroxysomes
PR	Progesterone receptor
pRB	Protéine du rétinoblastome
PTK	Protein tyrosine kinase
RTK	Receptor tyrosine kinase
SOD	Superoxyde dismutase

TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TNF	Tumor necrosis factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
XRE	Xénobiotic response element

## INTRODUCTION

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent dans les pays occidentaux chez les femmes et il est la raison la plus probable qu'une femme meure du cancer. Il s'agit d'une problématique mondiale d'une urgence grandissante : le taux d'incidence de cancer du sein dans les pays à bas et moyens revenus augmente de 5% par année depuis 1975 tandis que les pays à hauts revenus ont le taux le plus élevé avec 52 % depuis 2012. Variant selon les populations, les facteurs de risques sont de natures génétiques, hormonales, sanitaires et environnementales. Au niveau moléculaire, les causes de développement sont liées à une défaillance des mécanismes de réparation de l'ADN menant à des altérations génétiques, l'expression d'oncogènes et des altérations épigénétiques causées notamment par des substances exogènes. Le processus de développement du cancer du sein implique des mutations de l'ADN et des altérations moléculaires de l'épithélium normal menant à l'augmentation marquée des caractéristiques phénotypiques de la population cellulaire, qui évolue de l'hyperplasie au carcinome *in situ* vers un cancer invasif [1].

La classification actuelle des cancers mammaires est établie selon des biomarqueurs prédictifs tel que l'expression des récepteurs à l'œstrogène, à la progestérone et au statut du facteur de croissance épidermique à activité tyrosine kinase ErbB2. Dans le cadre de la recherche de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques, un intérêt grandissant pour le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) s'est développé. Classiquement associé aux effets pro-carcinogènes d'une sous-classe de polluants organiques persistants (POP), les hydrocarbures halogénés (HAH) et polyhalogénés (PAH), le récepteur peut non seulement induire des effets anti-carcinogènes lorsque lié à certains ligands mais les recherches des cinq dernières années le qualifient de nouveau biomarqueur pour l'établissement de pronostic. Effectivement, son expression dans les cancers du sein évolue vers une surexpression dans les cancers de stades invasifs et agressifs hormono-indépendants, où il est constitutivement activé. Autant les POP que les polyhénols sont étudiés en tant que ligands du récepteurs Ah pour d'une part, étudier leur

potentiel chimiothérapeutique et chimiopréventif associés à leur liaison au récepteur Ah et d'autre part, tenter d'élucider les mécanismes agonistiques et/ou antagonistiques sous-jacents à leurs propriétés anti-carcinogènes. Étant donné son implication dans plusieurs voies de signalisation cellulaires, notamment la voie oestrogénique, certaines voies mitogéniques et apoptotiques, les recherches de l'effet de ligands d'AhR d'origine naturelle ayant un potentiel pharmacothérapeutique sur le cancer du sein sont grandissantes et les découvertes prometteuses [2, 3].

Le but de la présente recherche est d'étudier l'effet de deux flavonoïdes, la tectochrysin et la pinocembrine, sur le récepteur Ah ainsi que sur différents paramètres liés à la prolifération des cellules mammaires cancéreuses humaines, tels que les variations dans le cycle cellulaire et sur deux biomarqueurs du cancer du cancer du sein : ER et ErbB2. Nos recherches ont été effectuées sur les cellules T47D, un modèle de cellules cancéreuses exprimant les récepteurs à l'œstrogène, à la progestérone et ErbB2. La tectochrysin, une flavone, et la pinocembrine, un flavanone, ont été choisis notamment car ils induisent les éléments de réponse aux xénobiotiques enclenchés par AhR en plus d'augmenter la synthèse de CYP1A1 dans les cellules hépatiques de souris. Ces deux molécules sont en grande quantité dans la propolis, une résine végétale fabriquée par les abeilles qui leur sert d'agent anti-inflammatoire et anti-infectieux. Leurs propriétés respectives démontrées seront présentées ultérieurement.

Ce mémoire est présenté sous forme traditionnelle en quatre chapitres. Dans le premier chapitre, une revue de la littérature associée à la présente recherche est composée de trois parties : la situation actuelle du cancer du sein, des facteurs de risques qui en sont la cause et la cancérogenèse mammaire. La deuxième partie traitera de l'aspect moléculaire du récepteur Ah pour ensuite traiter de ses mécanismes de régulation et son implication dans le cancer. La troisième partie présentera les différents aspects de la prévention et du traitement du cancer par les polyphénols, et plus spécifiquement par les flavonoïdes, pour terminer avec les connaissances actuelles au sujet de la tectochrysin et de la pinocembrine.

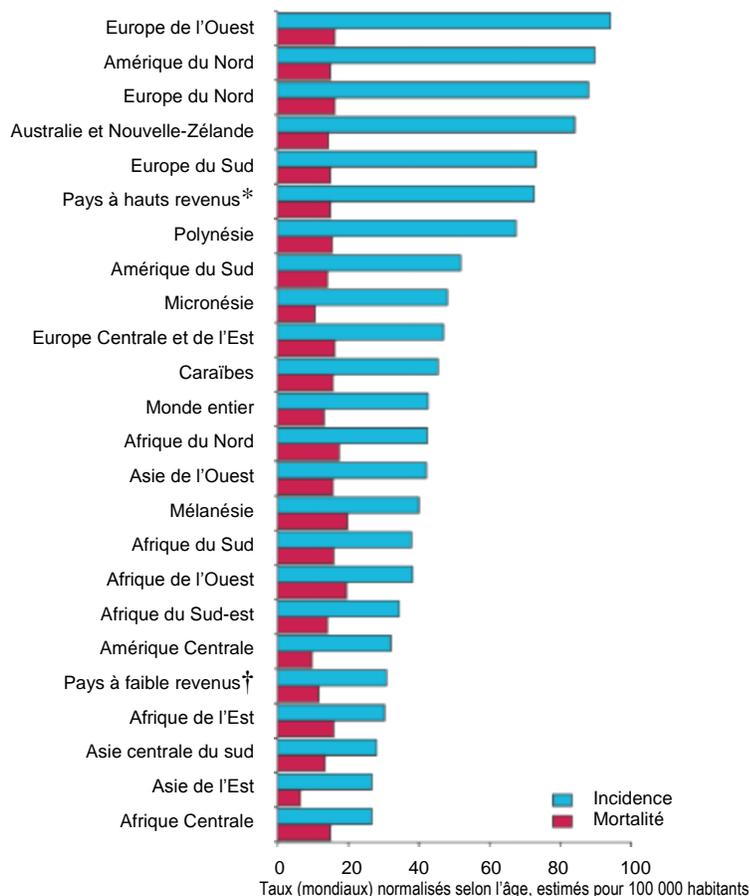
Les hypothèses et les objectifs suivront en faisant le lien vers le deuxième chapitre présentant la méthodologie et le troisième chapitre présentant les résultats selon les objectifs spécifiques de recherche. Dans la quatrième partie, une discussion des résultats ainsi qu'une conclusion clôtureront ce mémoire.

## **CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE**

### **1.1. Le cancer du sein**

#### **1.1.1. Situation actuelle et projections**

Le cancer du sein occupe chez la femme la première place en termes d'incidence et de mortalité. Il s'agit d'un réel problème de santé publique au niveau mondial [4]. L'incidence mesurée de ce type de cancer au cours de ces vingt-cinq dernières années est en augmentation constante [5]. En 2015, 234 190 nouveaux cas de cancers du sein étaient estimés aux États-Unis dont 40 730 morts, soit 17,4% [6]. À l'échelle mondiale, 1 383 500 nouveaux cas ont été décrits en 2013 ce qui compte pour 23% de tous les cancers diagnostiqués chez la femme. Il est dévastateur et représente la cause majeure de décès des femmes attribuable au cancer dans le monde avec 458 400 cas en 2013[7]. La majeure partie de ces nouveaux cas (691 300) et décès (268 900) est rapportée dans les pays économiquement développés mais l'OMS (Organisation mondiale de la santé), à travers ses bulletins, estime que ces chiffres pourraient s'accroître de 50% d'ici 2020 dont 70% de cas dans les pays en voie de développement. En 2015 au Canada, il s'agit également du cancer le plus fréquent chez les femmes, avec le risque qu'une femme sur neuf en soit atteinte et une sur vingt-cinq mourra des suites de la maladie [8].

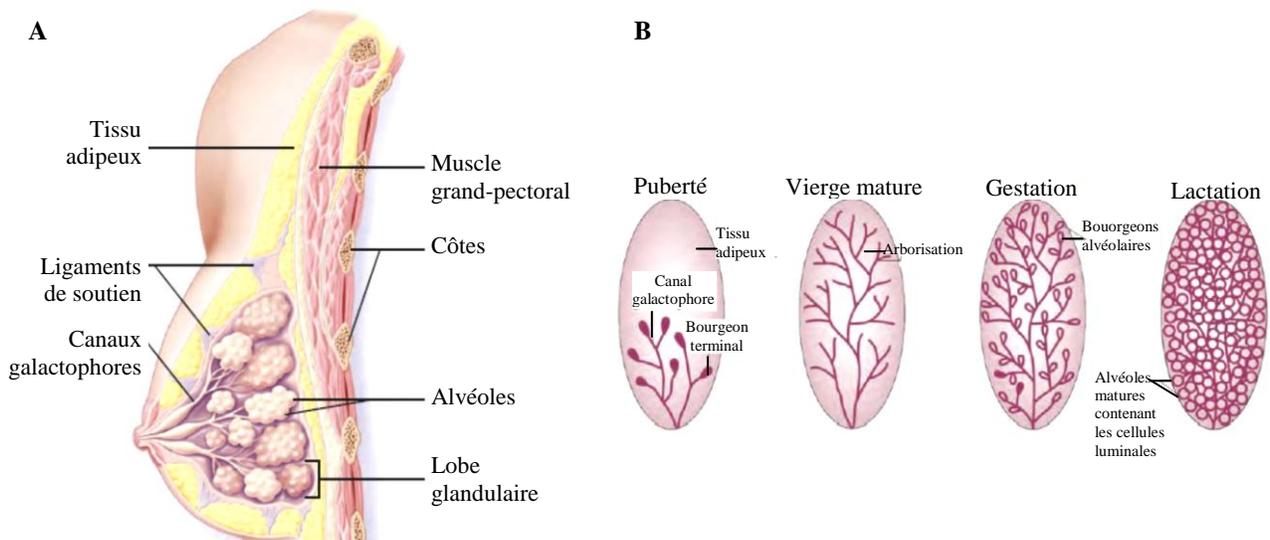


**Figure 1.1: Incidence et mortalité mondiale du cancer du sein chez les femmes en 2012**, modifié de Ferley et al., 2015[9] \*Inclue toutes les régions d'Europe, Amérique du Nord, Australie, Nouvelle Zélande et Japon. †Inclue toutes les régions d'Afrique, Asie (excluant le Japon), Amérique Latine, Les Caraïbes, La Mélanésie, les États Fédérés de Micronésie et de Polynésie. Régions définies par le CIRC et l'OMS. Données de l'agence internationale de recherche sur le Cancer. GLOBOCAN 2012.

### 1.1.2. Morphologie du sein

Le sein a pour fonction primaire la synthèse, la sécrétion et l'éjection du lait. Il est composé de la glande mammaire, de tissus conjonctifs, de tissus adipeux, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de nerfs et de ligaments suspenseurs du sein (Figure 1.2). Le développement de la glande mammaire se fait tardivement et subit un remodelage au cours de la vie.

Rudimentaire à la naissance, c'est à la puberté que s'effectue la majorité de son développement. Chez l'homme, l'action de la testostérone en inhibe le développement et l'action des œstrogènes et de la progestérone en stimule sa croissance chez la femme. Lors du développement, une accumulation de tissus adipeux et fibreux se produit et est accompagnée de l'épaississement, de l'allongement et du branchement des canaux ainsi que du développement de lobules glandulaires. Surviennent aussi des changements de pigmentation et de dimension du mamelon et de l'aréole. Une augmentation du volume du sein peut atteindre jusqu'à 15% essentiellement lors de la phase lutéale au cours des cycles menstruels subséquents [10].



**Figure 1.2. La glande mammaire et son développement.** **A.** Représentation schématique d'une coupe transversale de sein. **B.** Développement de la glande mammaire de souris au cours de la puberté, la gestation et la lactation. De la naissance à la puberté, la glande mammaire rudimentaire présente une organisation ductale rudimentaire. Au cours de la puberté, la production ovarienne cyclique d'œstrogènes et de progestérone permet la croissance des canaux galactophores. En cas de gestation, la libération d'hormones placentaires induit la croissance et la différenciation des cellules qui donneront naissance aux alvéoles. Finalement, lors de la lactation, les alvéoles deviennent complètement matures et les cellules luminales synthétisent et sécrètent le lait. Modifié de Hennighausen et Robinson, 2005 [11].

Les changements hormonaux associés à la grossesse produisent une croissance et une prolifération intense, la formation des acini sécrétoires, une augmentation de la quantité de tissus adipeux et une augmentation du flux sanguin. Au moment du sevrage, la glande

mammaire involue jusqu'à la grossesse suivante. Une involution de la glande mammaire survient également, après la ménopause, suite à l'arrêt de la production des hormones ovariennes. Contrairement à l'involution observée après une période d'allaitement, cette dernière touche les lobules et les canaux qui régressent et sont progressivement remplacés par du collagène et du tissu adipeux [12].

### **1.1.3. Les facteurs de risque associés au développement du cancer du sein**

Les facteurs de risque impliqués dans la survenue du cancer du sein sont nombreux et varient d'une population à une autre. On distingue quatre grands types de facteurs de risques : génétiques ou héréditaires, hormonaux et reproductifs, sanitaires et environnementaux [13].

#### **1.1.3.1. Les facteurs génétiques**

Le cancer du sein a une incidence familiale et génétique. Trois gènes semblent impliqués lorsqu'ils sont mutés: les gènes *BRCA1* (Breast Cancer 1), *BRCA2* (Breast Cancer 2) dans la prédisposition génétique au cancer du sein et même de l'ovaire et le gène *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated) plus en faveur d'une instabilité génomique. Le gène *p53* ayant un rôle de suppresseur de tumeur régulant le cycle cellulaire et l'apoptose est également muté chez 20 à 70% des patientes atteintes [14].

#### **1.1.3.2. Les facteurs hormonaux et reproductifs**

Les œstrogènes et la progestérone auraient un rôle dans la phase promotionnelle de la cancérogenèse mammaire en stimulant davantage les mitoses cellulaires et en amplifiant le potentiel métastatique [15]. Concernant les facteurs hormonaux exogènes, malgré la divergence des données relatives à l'utilisation des contraceptifs oraux, plusieurs études ont révélé un risque accru de cancer du sein chez les femmes qui en consomment. Le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) reconnaît la prise d'hormones, telles que les œstro-progestatifs utilisés en contraception orale et en traitement médical de la ménopause, comme un risque cancérigène. L'âge précoce à la première grossesse et la

multiparité constituent également des événements de prédisposition à la survenue de ce cancer. En revanche, l'allaitement réduit ce même risque de manière significative [16, 17].

### **1.1.3.3. Les facteurs sanitaires**

Des maladies bénignes du sein ou mastopathies bénignes peuvent constituer des facteurs de risque stratifiés en fonction du stade prolifératif de la pathologie. Les maladies bénignes du sein sont classées en trois catégories : les lésions non prolifératives, les lésions prolifératives sans atypies et les lésions prolifératives avec atypies. Ces dernières, lorsqu'elles sont présentes, multiplient par quatre le risque de développer un cancer du sein [15].

Des études ont en effet rapporté que des femmes avec une densité mammaire élevée ont quatre à six fois plus de risque de développer un cancer du sein [18]. Les cellules qui composent le tissu adipeux sont fréquemment retrouvées à proximité des tumeurs, constituant un composant majeur du stroma tumoral. Plusieurs travaux ont en effet souligné que le rôle des adipocytes ne se résumait pas à un rôle énergétique. Ils se comportaient en cellules endocrines capables de sécréter les adipokines incluant des hormones, des facteurs de croissance, des chimiokines et des molécules pro-inflammatoires [19].

L'exposition à des radiations au niveau du tronc avant l'âge de 40 ans, tel que lors de traitement d'un lymphome, ainsi qu'un mode de vie sédentaire ou alors, la consommation d'alcool et l'obésité constituent d'autres facteurs augmentant le risque de cancérogenèse mammaire [20-22].

### 1.1.3.4. Les facteurs environnementaux

Au cours des dernières années, plusieurs études ont montré l'impact de l'environnement sur la cancérogenèse. L'intérêt a été fortement axé sur le lien entre les polluants environnementaux et la cancérogenèse mammaire. De plus, certaines substances phytochimiques moduleraient le processus oncogénique via des activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires ou alors en mimant la structure chimique et l'activité de certaines hormones. Une sous-classe de polluants organiques persistants (POP), les organochlorés, a été largement étudiée quant à son implication dans la cancérogenèse suite à des expositions prolongées. Ce groupe de molécules regroupant les biphényles, les furanes, les dioxines polychlorés, l'hexachlorobenzène, le lindane et le dichlorodiphényltrichloroéthane ont une demi-vie très longue et s'accumulent dans l'environnement ainsi que dans la chaîne alimentaire, d'où leur toxicité [23].

**Tableau 1.1: Les Facteurs de risque du cancer du sein selon la Société Canadienne du Cancer 2015**

Facteurs de risque	Facteurs de risque possibles
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Antécédents personnels de cancer du sein</li> <li>▪ Antécédents familiaux de cancer du sein ou autres cancers</li> <li>▪ Mutations des gènes <i>BRCA</i></li> <li>▪ Seins denses</li> <li>▪ Descendance juive ashkénase</li> <li>▪ Troubles génétiques rares</li> <li>▪ Antécédents de reproduction (âge des menstruations et de la ménopause, nombre de grossesses)</li> <li>▪ Exposition aux rayonnements ionisants</li> <li>▪ Hormonothérapie substitutive</li> <li>▪ Contraceptifs oraux</li> <li>▪ Hyperplasie atypique</li> <li>▪ Alcool / Obésité</li> <li>▪ Statut socio-économique élevé</li> <li>▪ Grande taille à l'âge adulte (associée à un apport énergétique et l'alimentation tôt dans la vie)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inactivité physique</li> <li>▪ Gain de poids à l'âge adulte</li> <li>▪ Tabagisme et fumée secondaire</li> <li>▪ Poids élevé à la naissance</li> <li>▪ Avoir un travail de nuit</li> <li>▪ Certaines affections bénignes</li> </ul>

Tableau modifié de la Société canadienne du cancer, 2015 [24]

#### 1.1.4. Cancérogenèse mammaire

Le développement du cancer du sein est un processus qui s'étend sur une longue période impliquant de multiples altérations moléculaires et une évolution des populations cellulaires avec une augmentation remarquable de caractéristiques phénotypiques agressives ou invasives. Toutefois, le temps requis pour cette progression n'est pas connu, car à l'exception des cancers pédiatriques, la plupart des cancers surviennent à un certain âge. Les cancers du sein sporadiques, où est écartée la composante génétique, surviennent tard dans la vie contrairement aux cancers du sein à prédisposition génétique qui apparaissent plus tôt.

Le cancer du sein se développe à partir d'un épithélium normal qui évolue vers une hyperplasie atypique et se poursuit en carcinome *in situ* pour aboutir en un cancer invasif [25]. Les principales causes de développement du cancer du sein sont liées à des altérations génétiques caractérisées par une défaillance des mécanismes de réparation de l'ADN, tels que l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et de gènes apoptotiques. Une activation concomitante de l'expression d'oncogènes et des altérations épigénétiques suite à l'exposition à des agents mutagènes agissent comme promoteurs de la cancérogenèse mammaire [26, 27].

Le cancer du sein est donc une pathologie complexe qui évolue en plusieurs phases pouvant se chevaucher, avec une phase de latence de plusieurs années avant l'apparition des premiers signes cliniques. Au cours de la première phase d'initiation, une lésion stable du génome est transmise lors de la division cellulaire et persiste pendant de nombreuses années à l'état latent : c'est le stade hyperplasique. Durant la seconde phase de promotion, d'autres altérations se rajoutent et aboutissent au développement d'une cellule cancéreuse : c'est le stade dysplasique. Lors de la troisième phase, dite de progression, une tumeur maligne s'installe. À la quatrième phase, les cellules métastatiques se propagent; c'est la phase d'invasion (Société canadienne du cancer 2015).

Ces phénomènes aboutissent à un tableau de prolifération cellulaire incontrôlée, une dédifférenciation histologique, une augmentation de l'angiogenèse (vascularisation) et une disparition du contrôle apoptotique. À partir d'une cellule maligne et après 20 réplifications, on obtient un million de cellules tumorales, soit un milligramme de tissu malin. Si la progression se poursuit, la masse tumorale augmente, sécrète des molécules qui assurent sa vascularisation et son alimentation en oxygène et en nutriments [28].

Les mécanismes complexes à la base du processus de la cancérogenèse mammaire sont régis par une multitude de signaux provenant des interactions entre différentes molécules et leurs récepteurs. Ces derniers étant de réelles cibles thérapeutiques. Nous aborderons essentiellement dans les sections suivantes les différents types de tumeurs mammaires et les principaux récepteurs en lien avec notre recherche.

#### **1.1.5. Classification des tumeurs mammaires**

Les tumeurs mammaires humaines présentent une grande diversité tant dans leur développement naturel que dans leur réactivité aux traitements. La variation de l'activité transcriptionnelle des cellules tumorales et cancéreuses mammaires est à l'origine de leur diversité biologique.

Pendant au moins quatre décennies, la classification des cancers mammaires a été basée sur les observations histologiques. En 2003, l'OMS en accord avec les sociétés savantes, reconnaît 18 types histologiques de cancer du sein invasif mais les critères diagnostics pour la caractérisation de chaque entité demeuraient subjectifs et les données recueillies de chaque sous-type avaient un impact limité sur les décisions thérapeutiques [29]. Les biomarqueurs prédictifs tels que l'expression des récepteurs à l'œstrogène, à la progestérone ou le statut d'ErbB2, ont été d'un grand apport pour la prise en charge clinique [30]. ErbB2 est un récepteur de facteurs de croissance épidermique transmembranaire à activité tyrosine kinase. Aussi nommé HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), il active des voies de signalisation de prolifération cellulaire et anti-apoptotiques.

Les travaux de Perou et al. [31] ont permis de définir quatre sous-types avec différents profils d'expression associés à des pronostics particuliers et à des potentiels de survie distincts : le type *luminal*, le type *basal-like*, le type où ErbB2 est surexprimé et le type *normal breast-like*. Ces sous-types peuvent être regroupés en deux grandes classes selon leur hormono-dépendance et l'expression des récepteurs aux oestrogènes (ERs).

#### **1.1.5.1. Le type ER+/luminal**

Les profils d'expression génique des cancers de type luminal sont semblables à ceux des cellules normales qui tapissent l'intérieur (le lumen) des canaux et ses glandes mammaires. La première classe *ER+/luminal* est associée à un bon pronostic avec 80 à 85% de survie sur cinq années. Elle est caractérisée par l'expression des gènes des ERs et de plusieurs gènes contigus sur le même locus. Des travaux ultérieurs ont abouti à la stratification du groupe luminal en *luminal A* et *luminal B*, montrant que ce système de classification a une valeur pronostique [32]. Le type *luminal A* est le moins agressif de tous les types de carcinomes mammaires et présente le meilleur pronostic de survie. Les deux sous-types luminal surexpriment ERs mais se distinguent par l'expression différentielle de certains gènes. Le *luminal A* exprime GATA binding protein 3, X-box binding protein1, neofol factor 3, hepatocyte nuclear factor3a et estrogen regulated LIV-. Le type *luminal B* se caractérise plutôt par une surexpression des gènes prolifératifs [33]. Les cancers mammaires de type luminal sont fréquents avec une incidence de 60 % pour le *luminal A* et 20 % pour le *luminal B* [32].

#### **1.1.5.2. Les types basal et normal breast-like**

La classe n'exprimant pas les ERs, les récepteurs à la progestérone (PR) et ErbB2 comprend deux types : basal et le type normal breast-like. Les tumeurs de type normal breast-like sont nommées ainsi car elles tendent à ressembler à un épithélium normal dans les analyses de transcriptome. Elles diffèrent du type basal car elles sont caractérisées par l'expression prononcée de gènes spécifiques des cellules épithéliales basales et adipeuses. Elles représentent 5 à 10% de tous les carcinomes mammaires et ont un pronostic de survie moyen, plus faible que le type luminal .

#### **1.1.5.2.1. Le type basal et le sous-type claudin-low**

Les carcinomes de type basal sont dits « triple négatifs » car ils n'expriment pas les ERs, PR et ErbB2. Le sous-type *claudin-low* constitue 10% des cancers et se caractérise par la présence de marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse, une résistance à la chimiothérapie et un faible pronostic de survie. Le type basal a été décrit pour la première fois par des études immunohistochimiques [34] et il émerge par son profil transcriptomique [31, 35, 36]. Il représente 15% des cancers du sein, se caractérise par une vitesse de prolifération très élevée et un pronostic négatif. Dans certaines études, on lui attribue une certaine spécificité ethnique : une étude menée en Caroline du Nord montre que le type basal a une prévalence plus élevée chez les femmes africaines-américaines préménopausées [35, 37, 38].

#### **1.1.5.3. Les types basal et ErbB2+**

Les cancers avec surexpression de ErbB2 et de type basal sont difficiles à traiter et sont associés à un pronostic de survie plus faible sur cinq années (50% à 60%). Cette différence de survie est étroitement liée aux différences de réponse aux traitements constatées dans ces deux cas. Les cancers surexprimant ErbB2 représentent 17% des cancers du sein [37].

**Tableau 1.2: Les types moléculaires des cancers mammaires**  
 Inspiré de Guiu S. et al., 2012 [39]

Types moléculaires	Classification IHC	Incidence %
<b>Luminal A</b>	<b>Luminal A</b> ER et ou PR présents ErbB2 absent Ki 67 < 14%	60%
<b>Luminal B</b>	<b>Luminal B / ERbB2-</b> ER et ou PR présents ErbB2 absent Ki 67 ≥ 14%	20%
	<b>Luminal B / ErbB2 +</b> ER et/ou PR présent Ki67 absent ErbB2 surexprimé	
<b>HER2 surexprimé</b>	<b>ErbB2 + (non Luminal)</b> ErbB2 surexprimés ER et PR absents	10%
<b>Basal</b>	<b>Triple négatif</b> ER et PR absents ErbB2 absent	10%

IHC : Immunohistochimie

Ki67 : marqueur de prolifération

### 1.1.6. Les principaux récepteurs impliqués dans la cancérogenèse mammaire

Les études d'inactivation de gènes des récepteurs aux stéroïdes chez la souris ont révélé que les actions concertées de l'œstrogène et de la progestérone sont nécessaires pour le développement normal de la glande mammaire. La liaison de l'œstrogène à son récepteur favorise la croissance des conduits qui envahissent le coussinet adipeux mammaire provenant du mamelon, tandis que les complexes œstrogène-ER et progestérone-PR interagissent de concert au développement des bourgeons terminaux, ou acini, en structures produisant du lait dans la glande mammaire (Figure 1.2).

Le facteur de croissance épidermique (EGF) et le facteur de croissance de type insuline (IGF-1) augmentent également la prolifération des bourgeons terminaux au cours

du développement normal du sein, favorisent l'excroissance canalaire ainsi que les ramifications induites par les œstrogènes et la progestérone. En effet, l'expression de PR en réponse aux œstrogènes nécessite la présence d'EGF et suggère l'existence d'interactions importantes entre ces différents types de récepteurs [40, 41].

#### **1.1.6.1. Les récepteurs stéroïdiens**

Les stéroïdes agissent sur les cellules cibles en contrôlant la transcription de gènes après fixation sur les récepteurs nucléaires (NR). Parmi les 48 membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, la superfamille NR3 correspond à celle des ERs et est composée de trois groupes :

- les récepteurs aux oestrogènes (ERs)
- les récepteurs reliés aux ERs (ERRs)
- les récepteurs aux 3-ketostéroïdes (NR3C) qui incluent les récepteurs aux androgènes (AR), les récepteurs à la progestérone (PR), les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) et les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR)

Le mécanisme d'action central de ce type de récepteurs est basé sur la liaison du complexe ligand-récepteur, homodimérique ou hétérodimérique, aux séquences de réponse aux hormones (HREs) des régions promotrices de gènes cibles [42].

#### **1.1.6.2. Les récepteurs aux œstrogènes**

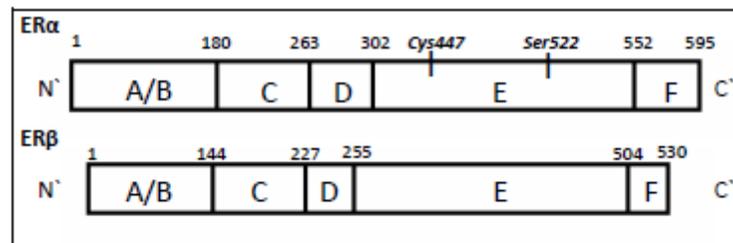
L'association du cancer du sein aux ERs est reconnue depuis plus d'un siècle [43]. Mais le mécanisme d'action de ces hormones est resté une énigme pendant au moins 60 ans.

Deux sous-types de récepteurs à l'œstrogène sont actuellement décrits : ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Ils sont codés par deux gènes distincts. Le gène ER $\alpha$  est localisé en 6q24-7 et le gène ER $\beta$  en 14q 21-22. Les transcrits sont composés de 9 exons chacun. Les protéines correspondantes diffèrent en nombre d'acides aminés ; la protéine ER $\alpha$  de 66 kDa est légèrement plus longue avec 590 acides aminés comparée à 530 acides aminés pour ER $\beta$  de 54 kDa [44].

### 1.1.6.2.1. Structure des récepteurs à l'oestrogène

Sur le plan structural, ces protéines présentent six domaines fonctionnels distincts et l'analyse comparative des récepteurs alpha et bêta montre un degré d'homologie au niveau de trois domaines (Figure 1.3) [45]. Ainsi on retrouve :

- Le domaine NH2-terminal (NTD) qui contient le domaine AF1 impliqué dans l'interaction avec les facteurs d'activation et l'activation des gènes cibles. Ce domaine est spécifique pour ER $\alpha$  et ER $\beta$ .
- Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) est caractérisé par deux régions en doigts de zinc hautement conservées. Elles sont essentielles à la liaison de haute affinité aux séquences ERE localisées dans les gènes cibles et pour la dimérisation du récepteur avec le domaine de liaison au ligand (LBD).
- Le domaine LBD : essentiel pour la liaison du ligand
- Le domaine NLS ou région charnière, et le domaine C-terminal sont liés à la dimérisation du récepteur et à la translocation nucléaire



A/B	Domaine AF-1 : indépendant de l'activation hormonale pour la transcription
C	DBD : site de liaison à l'ADN, site de dimérisation
D	NLS : séquence de localisation nucléaire, site de dimérisation, région charnière
E	LBD : site de liaison du ligand ; domaine AF-2 dépendant de l'activation hormonale pour la transcription
F	Peu connu, inhibiteur de la dimérisation (hypothèse)

**Figure 1.3 : Représentation schématique de la structure des ER $\alpha$  et ER $\beta$ .** Le nombre en acides aminés et la fonction de chaque domaine sont représentés. Modifié de Soltysik, K. et al, 2013 [46].

### 1.1.6.3. Isoformes des récepteurs à l'oestrogène

Chez l'humain, trois isoformes de ER $\alpha$  (ER $\alpha$ , ER $\alpha$ -36 et ER $\alpha$ -46) et cinq isoformes de ER $\beta$  (ER $\beta$ , ER $\beta$ 2, ER $\Delta$ exon5, ER $\beta$ 4 et ER $\beta$ 5) produits d'un épissage alternatif ont été décrites, mais les fonctions biologiques spécifiques à chacune ne sont pas totalement élucidées [47].

Les récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont coexprimés dans les glandes mammaires, thyroïdes et surrénales ainsi que dans l'épididyme, la moëlle osseuse et plusieurs types de cellules du système immunitaire (lymphocytes, monocytes, macrophages, cellules dendritiques). Ils sont par ailleurs exprimés séparément dans différents tissus : ER $\alpha$  est exprimé dans l'utérus, le foie, les reins et le cœur tandis qu'ER $\beta$  est exprimé dans les ovaires, la prostate, les poumons, la vessie ainsi que dans les systèmes gastro-intestinal, hématopoïétique et le système nerveux central [48, 49].

Les rôles des isoformes du récepteur ER $\beta$  ne sont pas clairement élucidés aussi bien, dans les conditions physiologiques normales que dans le cadre du développement tumoral. Il semble toutefois que ces isoformes modulent la signalisation d'ER $\alpha$ . L'isoforme ER $\beta$ 2 est la plus longue et contient une séquence de 26 acides aminés spécifiques dans son domaine de liaison. Son affinité pour des ligands et des coactivateurs est fortement diminuée comparativement aux autres isoformes mentionnées [50]. De plus, ER $\beta$ 2 dimérise préférentiellement avec ER $\alpha$  et présenterait un effet inhibiteur contrecarrant son activation. Il a été démontré que l'hétérodimère ER $\alpha$ / ER $\beta$ 2 inhibe l'activation E2-dépendante d'ER $\alpha$ . Le ratio de ces deux isoformes aurait un rôle modulateur de tous les effets en aval [51].

Les ER $\alpha$  affectent la transcription de gènes proprolifératifs comme le PCNA (proliferating cell nuclear antigen), un facteur nécessaire à la synthèse de l'ADN et essentiel pour la réplication cellulaire, et des gènes antiapoptotiques tels que la survivine et Bcl-2 [52]. D'autres gènes répondent également aux ER $\alpha$  tels que les gènes WNT11 qui auraient un rôle inhibiteur de l'apoptose dans le cancer du sein. Ainsi plusieurs gènes cibles sont impliqués dans la transduction, la transcription et la coactivation.

Les récepteurs ER $\beta$  induisent la suppression de tumeurs cellulaires avec ou sans œstrogènes [53] et auraient un effet inhibiteur sur la croissance des cellules du cancer du sein. Plusieurs protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire et la prolifération telles que CDC25A, le facteur de transcription E2F1 et la survivine (tous isoformes confondus) sont régulées négativement par ER $\beta$ . Ceci dit, il régule positivement la protéine pro-apoptotique p21 [50, 54].

#### **1.1.6.4. Régulation et voies de signalisation classique des œstrogènes**

Les récepteurs à l'œstrogène régulent l'expression génique selon au moins deux voies de signalisation : la voie génomique avec liaison directe à l'ADN ou par l'interaction protéine-protéine avec d'autres facteurs de transcription et la voie non-génomique par l'induction de cascades de signalisation issues de la liaison de ER non lié à un ligand ou à des facteurs de transcription.

La voie génomique ou classique est dépendante de la liaison du ligand aux récepteurs à l'œstrogène et la fonction de facteur de transcription leur est ainsi associée. Les ER sont synthétisés dans le cytoplasme et ensuite dirigés vers le noyau cellulaire. Non liés, les ER sont séquestrés dans un complexe inactif en présence de protéines HSP70 et HSP90, de la cyclophiline 40, des protéines de liaison FKBP51 et FKBP52 régulatrices des voies de signalisation des hormones stéroïdes [55].

La liaison au ligand active le ER qui change de conformation, se dissocie des HSP et interagit avec des protéines co-activatrices et relargue des co-répresseurs. Ce complexe actif se lie aux séquences ERE situées dans le promoteur du gène cible et active l'initiation de la transcription [55].

Suite à la liaison des œstrogènes aux récepteurs, la phosphorylation et la dimérisation se produisent. Le complexe se lie à d'autres facteurs de transcription tels que AP1, SP1, Fox, Oct, NF- $\kappa$ B et GATA-3 conduisant à la régulation de l'expression génique de gènes ne comprenant pas de séquence ERE. Le récepteur à l'œstrogène agit donc dans ce cas comme un co-activateur [56].

### **1.1.6.5. Régulation et voie de signalisation non-classique des œstrogènes**

Dans la voie non-classique, les récepteurs liés aux œstrogènes empruntent des voies de signalisations cytoplasmiques et interagissent avec les récepteurs des facteurs de croissance, notamment via la protéine adaptatrice Shc, conduisant à l'activation de plusieurs cascades de kinases telles que MAPK, AKT, protéine kinase C, p21, raf, IGF-1R et EGFR. Ce mode d'activation peut en l'occurrence moduler ultérieurement la voie classique en activant des protéines co-activatrices de ER [55].

Les récepteurs aux œstrogènes sont aussi régulés par des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) qui activent des cascades moléculaires telle que la voie PI3K /Akt et MAPK kinases. Un des mécanismes majeurs de PI3K /Akt/mTOR est l'activation des RTK dont ErbB2 [57, 58].

La voie non génomique est rapide et dépend des ERs ancrés dans la membrane et d'autres protéines transmembranaires. L'activation des ERs membranaires est à l'origine de signalisation impliquant le calcium, le monoxyde d'azote (NO) et l'activation de plusieurs kinases [59]. Un mécanisme ligand indépendant, incluant d'autres voies de signalisation permet d'activer les ERs. Ces derniers peuvent être stimulés par les MAPK et PI3K [60]. Ils peuvent également être phosphorylés par ERK et AKT activés par EGFR ou IGFR [61].

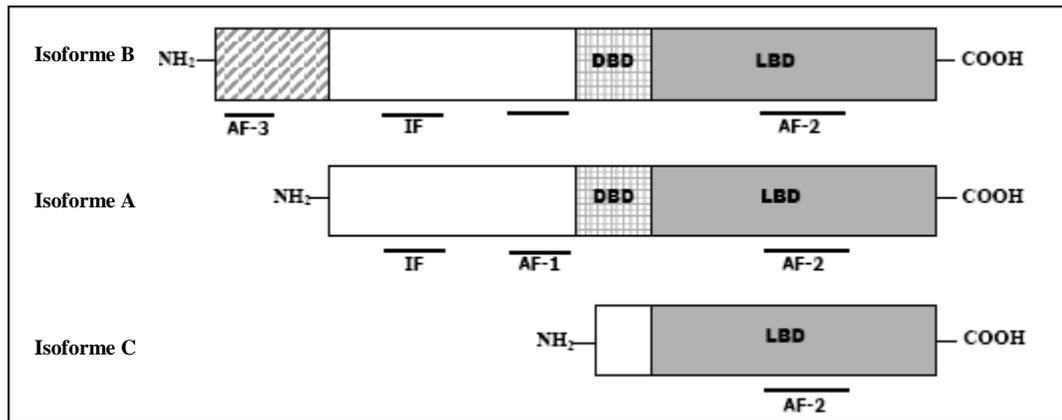
### **1.1.7. Les récepteurs reliés aux récepteurs des œstrogènes (ERRs) :**

Des études sur les voies de signalisation des œstrogènes ont permis de décrire d'autres voies additionnelles de transduction du signal, médiées par les récepteurs reliés aux récepteurs aux œstrogènes (ERRs):  $ERR\alpha$ ,  $ERR\beta$ , and  $ERR\gamma$  [62]. Ils sont constitutivement actifs avec un haut degré d'homologie avec les récepteurs aux œstrogènes classiques. De plus, les ERRs ne se lient pas aux œstrogènes ou autres ligands endogènes comme le font les ERs et sont considérés comme des récepteurs orphelins. Ils sont en fait impliqués dans des voies alternatives entraînant le développement du cancer et deviennent à leur tour de potentiels cibles thérapeutiques pour le traitement des

carcinomes mammaires et de la prostate qui ne répondent pas aux traitements conventionnels. Les ERRs peuvent également être activés via des voies alternatives de transduction telles que des phosphorylations en réponse aux stimuli via les facteurs IGFR ou EGFR [63].

### 1.1.8. Récepteur à la progestérone

Le récepteur à la progestérone (PR) fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires et sa liaison à la progestérone (PG) enclenche des voies génomiques et non-génomiques rapides liées aux voies de signalisation mitogènes SRC, Ras, MAPK. Certains sont toutefois membranaires avec une structure apparentée à celle des récepteurs couplés aux protéines G [64].



**Figure 1.4: Représentation schématique des différentes isoformes des récepteurs à la progestérone.** Modifié de Rekawiecki et *al.* [65].

#### 1.1.8.1. Isoformes du récepteur à la progestérone

Plusieurs isoformes humaines de PR ont été décrites dont les deux principales sont hPR-A et hPR-B (figure 1.4) [66, 67]. La distribution tissulaire et leur fonction ne sont pas identiques. Elles sont toutefois, codées par un même gène situé sur le chromosome 11 et

sont le produit de l'utilisation de deux promoteurs distincts aboutissant à la synthèse de deux ARNm différents [68].

Une troisième isoforme (hPR-C), essentiellement cytoplasmique en comparaison à hPR-A et hPR-B qui sont des récepteurs nucléaires, n'a pas de domaine de liaison à l'ADN mais peut lier la progestérone. Elle serait impliquée dans le déclenchement de la parturition : un de ses rôles hypothétiques serait de séquestrer la progestérone, l'empêchant de se lier aux autres isoformes. Elle empêcherait par exemple hPR-B de se lier aux éléments de réponse de la progestérone induisant en conséquence un effet négatif sur hPR-B [69]. Par ailleurs, il a été montré que hPR-C augmente l'activité transcriptionnelle de hPR-A et hPR-B dans les cellules mammaires cancéreuses T47D. L'expression et le rôle de hPR-C dans la glande mammaire normale et dans le cancer du sein restent à être déterminés [70].

Le rapport hPRA/hPRB varie dans différentes conditions physiologiques et pathologiques. La réponse au ligand, qu'elle soit agoniste ou antagoniste, est influencée par la concentration cellulaire des différentes isoformes, des différents coactivateurs et répresseurs [71, 72].

Le ratio hPRA/hPRB peut être perturbé dans le cancer du sein [73]. Ce déséquilibre semble être précoce dans le processus de cancérogenèse mammaire puisqu'il est observé dans des lésions pré-cancéreuses, dans des hyperplasies mammaires et dans le tissu normal de patientes porteuses d'une mutation de BRCA1/2 [71]. Un déséquilibre du rapport A/B est retrouvé dans 50% des tumeurs mammaires avec une prédominance de A par rapport à B. Il existerait aussi un lien entre l'expression différentielle de ces formes de récepteur à la progestérone et le pronostic des tumeurs. La prédominance de PRA par rapport à PRB était prédominante dans les cancers de grade 3 [68].

### **1.1.9. Les récepteurs à activité tyrosine kinase**

Les RTK sont une classe importante de récepteurs transmembranaires; ils constituent des composantes essentielles pour la transmission des signaux intercellulaires. Ils sont caractérisés par un domaine extracellulaire glycosylé ou de type immunoglobuline, un domaine transmembranaire composé d'une hélice  $\alpha$  et un domaine intracellulaire à activité kinase [74].

Les principales familles qui comprennent plusieurs récepteurs oncogéniques sont les récepteurs pour le facteur de croissance épidermique (EGFR), le récepteur à l'insuline (IR), les récepteurs pour le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR), les récepteurs pour les facteurs de croissance plaquettaires (PDGFR), les récepteurs pour les facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR), les récepteurs pour les facteurs de croissance des hépatocytes et les récepteurs des éphrines (Ephs).

#### **1.1.9.1. RTK et cancer**

Certains RTK sont des proto-oncogènes car ils sont impliqués dans des processus menant à la croissance tumorale et la création de métastases, tels que la production de dérivés réactifs de l'oxygène, la prolifération, la migration et la survie cellulaire. Une surexpression et des mutations de ces récepteurs peuvent induire plusieurs types de cancers [75].

Les mutations que peuvent subir les RTK dans l'apparition de néoplasmes sont de plusieurs types et, entre autres, peuvent occasionner une augmentation de la synthèse des RTK. La plus grande proximité des récepteurs due à une augmentation de leur densité accroît leur collision, ce qui peut mener à leur activation sans avoir été activés par un ligand, tel qu'il est le cas pour le récepteur ErbB2. De plus, l'augmentation de la synthèse de facteurs de croissance ligands de RTKs impliqués dans la croissance tumorale et l'angiogenèse, a été remarquée dans plusieurs types de cancers [75].

### **1.1.9.2. Les récepteurs aux facteurs de croissance épidermique**

Les voies de signalisation initiées par les EGFR sont parmi les plus importantes qui régulent la croissance; elles ont notamment des rôles cruciaux dans la différenciation et la croissance cellulaire lors du développement embryonnaire. Cette sous-famille comprend quatre RTK : EGFR (ErbB1), HER2 (HER-2/neu, ErbB2), HER3 (ERbB3) et HER4 (ERbB4). Les ligands connus des EGFR sont au nombre de 11 et incluent le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance de transformation alpha (TGF- $\alpha$ ), le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) et les neurégulines. EGFR se lie à différents ligands, dont EGF et au TNF $\alpha$ , tandis que les neurégulines se lient à HER3 et HER4. Aucun ligand n'est connu pour ErbB2 mais il est très souvent associé aux autres EGFR lors de la dimérisation du récepteur. Bien que seuls HER1 et HER4 aient une activité tyrosine kinase intrinsèque, il a été démontré que tous les EGFR sont capables d'initier les cascades de signalisation subséquentes à leur dimérisation [76].

Les voies de signalisation des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) et de la phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase (PI3K) sont initiées par tous les complexes récepteurs/ligands des EGFR. Plusieurs types de cancer surexpriment les EGFR, notamment ErbB2 et ErbB3, particulièrement dans le cancer du sein [77], et ils constituent une cible pour les traitements contre cette affection. Les deux types d'approche pour l'inhibition de ces récepteurs sont le développement d'anticorps dirigés contre le site de liaison extracellulaire (Trastuzumab ou Herceptin) d'une part et, d'autre part, les traitements de chimiothérapie inhibant leur activité tyrosine kinase [74].

### **1.1.9.3. ErbB2/HER2 dans la cancérogenèse mammaire**

L'activation des fonctions de signalisation du récepteur ErbB2 est enclenchée par sa dimérisation avec d'autres partenaires de la famille ErbB. Le site de liaison extracellulaire de ErbB2 est constitutivement en conformation ouverte, mais n'est pas actif pour la liaison à des ligands [78].

Le facteur AP-2 et la famille de facteurs de transcription Ets contribuent à la surexpression de ErbB2 dans les cellules mammaires cancéreuses. Le facteur de

transcription AP-2 augmente l'expression de ErbB2 en se liant directement à deux sites spécifiques du promoteur, à -213 bp et à -500 pb en amont du site Cap [79, 80] tandis que les facteurs de transcription Ets stimulent l'expression d'ErbB2 en prévenant la formation d'une structure en triplex au promoteur surenroulé [81].

La surexpression de ErbB2 dans les cellules mammaires cancéreuses est associée à un pronostic faible ainsi qu'à la formation de métastases. Bien qu'il n'ait pas de ligand endogène connu, ErbB2 lorsque surexprimé peut s'auto-activer par une homodimérisation spontanée et faciliter son hétérodimérisation avec ErbB1 et ErbB3, résultant en l'activation de plusieurs voies de signalisation [82, 83]. De plus, ErbB2 a l'activité kinase catalytique la plus forte des EGFR et les hétérodimères dont il fait partie possèdent les fonctions de signalisation les plus fortes [84]. Ainsi, cibler ErbB2 afin d'inactiver les voies de signalisation favorisant la cancérogenèse mammaire constitue une stratégie utilisée par plusieurs protocoles thérapeutiques.

Le gène du récepteur aux facteurs de croissance ErbB2 est surexprimé dans 20% des carcinomes mammaires. L'activation de ErbB2 mène à l'activation subséquente des voies de signalisation mitogènes PI3K/Akt ou MEK/ERK qui contribuent tant à la prolifération tumorale, qu'à la résistance aux traitements [85, 86]. De plus, une surexpression de ErbB2 dans les cellules mammaires cancéreuses engendre une élévation de la sécrétion d'interleukin-6 (IL-6) qui régule directement les cellules souche cancéreuses mammaires. De plus, IL-6 active la voie Janus-activated-kinase 1(JAK1)-Stat3 dans un mode de rétrocontrôle positif accroissant la tumorigenèse. Dans les cellules épithéliales, la voie JAK1-Stat3 promeut la survie, la prolifération et la migration cellulaire ainsi que la transformation oncogénique [87].

Peu de recherches ont tenté d'investiguer un lien entre AhR et ErbB2. L'équipe de Zhao et al. ont observé une augmentation de l'expression ARNm de AhR dans ces cellules MCF-7 surexprimant ErbB2. Toutefois, les détails mécanistiques de l'interaction entre ErbB2 et AhR restent à déterminer [88].

## **1.2. Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR)**

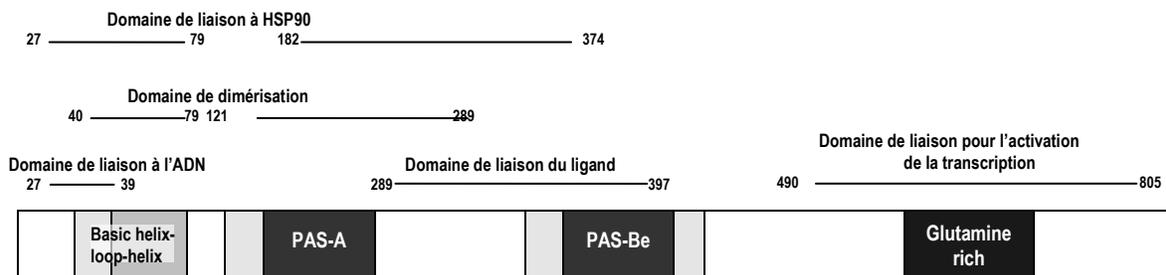
AhR a été identifié pour la première fois par l'équipe de Poland et al. en 1976 qui a montré son interaction spécifique à la 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), un contaminant environnemental hautement toxique qui est un produit secondaire de la combustion de substances organiques et de processus industriels [89].

Largement exprimé dans les tissus des vertébrés, AhR est un facteur de transcription activé par des ligands endogènes et exogènes qui intervient dans l'expression génique et la production d'effets tant biologiques que toxiques. Il est un médiateur de la toxicité des dioxines, un régulateur de fonctions physiologiques et est impliqué dans la cancérogenèse.

### **1.2.1. Famille et structure de AhR**

AhR est un facteur de transcription activé par un ligand de la famille basic helix-loop-helix-PER/ARNT/SIM (bHLH-PAS). L'architecture de cette famille de protéines est caractérisée par un motif hélice-boucle-hélice situé, à l'extrémité N-terminale.

Le domaine PAS (PER-ARNT-SIM) peut se lier et détecter de petites molécules endogènes ou xénobiotiques, telles que l'oxygène moléculaire, les métabolites cellulaires ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Les protéines contenant ce domaine sont souvent trouvées dans les voies de signalisation qui régulent les réponses aux changements environnementaux : chez les mammifères, cela inclut les voies enclenchées par un état d'hypoxie, les changements du rythme circadien et les réponses à l'exposition aux hydrocarbures polycycliques ou halogénés. Ces voies de signalisation régulent les réponses adaptatives de tout l'organisme, tant dans la phase de développement que durant toute son existence [90].



**Figure 1.5 : Schématisation des domaines fonctionnels du récepteur Ah.** Inspiré de Jackson et al, 2015 [91].

Le domaine PAS-B constitue le domaine de fixation au ligand et est le site de liaison de HSP90 dans le cytoplasme. Le domaine précédant le motif hélice-boucle-hélice est spécifique à l'interaction de AhR avec les séquences géniques d'éléments de réponse aux dioxines (DRE). La région contenant le motif hélice-boucle-hélice sert d'intermédiaire à l'hétérodimérisation entre AhR et le facteur de translocation nucléaire (ARNT); cette liaison se conclut avec les domaines PAS. En absence de ligand agoniste, le domaine inhibiteur (ID : inhibitory domain) est responsable de l'inhibition de l'activité des domaines de transactivation de la transcription (TA) de l'extrémité carboxyle [92].

### 1.2.2. Le polymorphisme de AhR

Le gène codant AhR chez l'humain est localisé sur le chromosome 7 et comprend 12 exons codant pour une protéine de masse moléculaire théorique de 96 kDa mais c'est une protéine de 110 kDa qui est révélée via des analyses de SDS-PAGE [93]. Les polymorphismes intra et inter-espèces de AhR peuvent être à l'origine de la diversité des effets qui lui sont associés, ce qui rend ardu l'établissement d'une quelconque généralisation. Bien que peu nombreux chez l'humain, c'est en fonction de l'ethnicité que des polymorphismes ont été identifiés. La majorité des polymorphismes identifiés sont dans l'exon 10, qui code le domaine de transactivation : ces modifications se répercutent

au niveau de l'induction de la transcription de CYP1A1 [94]. D'autres variations de séquences neutres aboutissant au même acide aminé ont été identifiées dans les régions codantes des domaines bHLH (exon 2), PAS (exon 4) et PAS/LDB (exon 7).

### 1.2.3. Les isoformes de AhR

Les effets dépendants de AhR divergent selon les ligands, le tissu et l'espèce concernés. De surcroît, les polymorphismes intra- et inter-espèces de AhR contribuent à la diversité de ses effets biologiques. Notons que seulement pour le modèle murin, quatre allèles du récepteur ont été identifiés pour un même ligand :  $Ah^d$ ,  $Ah^{b-1}$ ,  $Ah^{b-2}$ ,  $Ah^{b-3}$ . Leur poids moléculaire varie entre 95 kDa et 105 kDa. De la même manière que les souris *AhR-null*, des expériences *in vivo* ont montré que les souris exprimant l'allèle  $Ah^d$  sont les seules à être insensibles aux effets toxiques induits par la TCDD mais possèdent le plus haut degré d'affinité avec la dioxine, soit dix fois plus que  $Ah^{b-2}$  [95-97].

Le clonage du récepteur humain a montré une différence de 6 kDa de plus que le récepteur murin codé par  $Ah^{b-2}$ . Seulement trois acides aminés diffèrent entre les allèles  $Ah^d$  et  $Ah^{b-2}$  et parmi les différents modèles *in vivo*, le cochon d'Inde est celui présentant le plus haut degré d'homologie de séquence avec la protéine humaine. Il s'agit néanmoins, de l'espèce ayant le plus haut degré de sensibilité aux effets toxiques de la TCDD contrairement à l'humain qui est l'une des plus résistantes.

### 1.2.4. Les ligands de AhR

AhR peut être activé ou inhibé par des ligands de structures chimiques hautement variés. La compréhension au niveau moléculaire de la liaison récepteur-ligand, de la spécificité des ligands ainsi que des mécanismes d'activation de AhR par différents ligands est tributaire des détails structuraux du domaine PAS B, le site de liaison du ligand (LBD). Or, la structure tridimensionnelle exacte de AhR et les détails moléculaires de son site de liaison ne sont pas à ce jour élucidés, ce qui limite la compréhension des mécanismes d'action de AhR [98].

Le plus récent modèle théorique du LBD de AhR est fondé sur l'homologie des domaines PAS B de HIF-2 $\alpha$  et ARNT [99], des protéines de la famille PAS, sur la base du haut degré de similitude de leur séquence du domaine PAS B et de leur relation fonctionnelle avec AhR [100].

Selon les espèces, des différences importantes ont été rapportées quant à la spécificité de la liaison de ses ligands et les fonctions de AhR spécifiques au ligand [101]. À ce jour, la TCDD constitue le ligand pour AhR qui a le plus d'affinité [102]. Son activation est habituellement associée à l'induction de la transcription d'isoenzymes du cytochrome P450 de phase I (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 et CYP2S1), variant selon les différents tissus et types cellulaires [103].

#### **1.2.4.1. Les ligands endogènes de AhR**

Plusieurs molécules endogènes se lient à AhR. Les mécanismes de régulation qui dépendent de AhR dans des conditions physiologiques restent à élucider et ne sont pour l'instant associés de manière spécifique à aucun ligand endogène de AhR.

L'indirubine et l'indigo, des métabolites retrouvés dans l'urine humaine, sont parmi les molécules identifiées [104]. Le tryptophane ainsi que des métabolites issus de sa conversion enzymatique, tels que l'acide indole pyruvique, la tryptamine et l'acide indole acétique, sont aussi reconnus comme agonistes de AhR [105].

La modulation de l'expression d'enzymes du cytochrome P450 confère à certains ligands endogènes d'AhR le potentiel d'avoir certaines fonctions en conditions physiologiques. Parmi ces molécules, on note les photo-produits du tryptophane qui sont naturellement générés au niveau de la peau exposée aux rayons UV : le 6-formylindolo(3,2b)carbazole (FICZ) est celui de plus haute affinité [106]. Les métabolites de l'acide arachidonique ainsi que la bilirubine et la biliverdine, des métabolites de l'hème, activent aussi dans des conditions physiologiques des fonctionnalités d'AhR [107-109].

#### 1.2.4.2. Les ligands exogènes de AhR

Les ligands exogènes les plus connus et de plus haute affinité pour AhR sont des hydrocarbures aromatiques halogénés (HAH) ainsi que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH) ayant au moins quatre cycles benzoïques. Ils sont hydrophobes, planaires et leur degré d'affinité pour AhR varie en fonction de leur électronégativité, de la polarité des groupements et de leurs liaisons hydrogènes. Ce sont des polluants environnementaux qui sont les premiers ligands à avoir été identifiés. Les HAH sont de plus haute affinité, étant actifs à partir de concentrations de l'ordre du picomolaire (pm), tandis que les PAH le sont à partir du nanomolaire (nm) [102, 110].

AhR peut se lier à des molécules exogènes aux propriétés physicochimiques et structurales dissemblables des molécules dites « classiques », les HAH et PAH, ayant servi de modèle pour la définition des critères structuraux d'un ligand d'AhR.

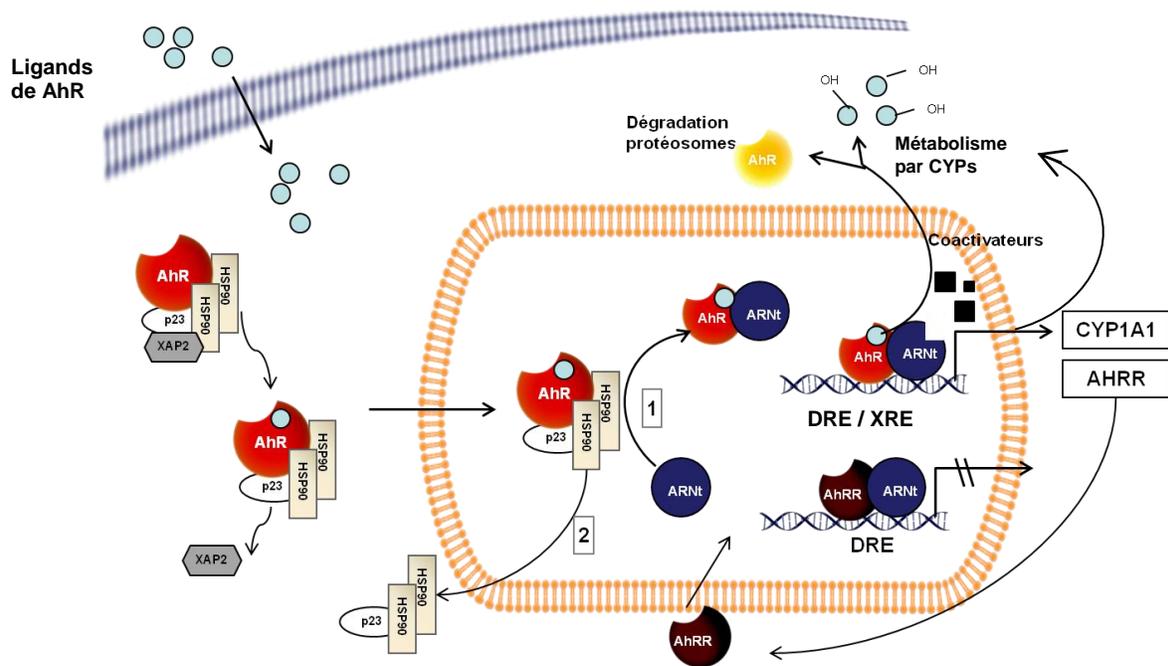
Des polyphénols, des terpènes, des indoles et autres molécules phytochimiques d'origine alimentaires constituent une grande source de ligands exogènes de AhR car elles peuvent atteindre des concentrations sanguines de l'ordre du micromolaire ( $\mu\text{M}$ ) lors de l'alimentation. Ces molécules peuvent alors avoir, à ce taux un impact significatif sur les fonctions biologiques dépendantes de AhR [102]. L'indolo-[3,2b]-carbazole (ICZ) est le ligand naturelle d'origine alimentaire avec le plus haut degré d'affinité connu pour AhR avec des doses variant de 0,2-3,6 nM pour l'induction de l'expression génique dépendante de AhR, tant chez l'humain et la souris (*in vitro*) que chez le rat (*in vivo*) [111, 112]

#### 1.2.5. Mécanismes d'activation et de régulation de AhR

En absence de ligand, AhR est sous forme inactive dans le cytoplasme, associé à deux protéine de choc thermique (HSP90), à l'immunophiline XAP-2 et à une protéine p23, (figure 1.6) [113]. Une fois lié à un ligand, le complexe s'active, et est transloqué dans le noyau pour former un complexe avec le facteur de translocation nucléaire du récepteur, l'ARNT. Le complexe AhR/ARNT se lie à des séquences spécifiques de l'ADN, connues

sous le nom d'éléments de réponses aux dioxines (DRE) ou éléments de réponses aux xénobiotiques (XRE), et régule l'expression d'une batterie de gènes [114] et des enzymes de détoxification du cytochrome P450 de phase I (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 et CYP2S1) et de phase II (UDP-glucosyl-transférase UGT1A6, quinone oxydoréductase-1 dépendante de *NAPDH* (NQO1), l'aldéhyde déshydrogénase ALDH3A1 et plusieurs glutathione-S-transférases).

Un rétrocontrôle négatif de l'activité transcriptionnelle d'AhR est exercé par le répresseur du récepteur Ah (AhRR) dont l'expression est induite par le complexe AhR/ARNT [115]. AhRR compétitionne avec AhR pour former un hétérodimère avec ARNT : le complexe AhRR/ARNT se lie subséquentment aux séquences des DRE et inhibe ainsi l'activité de AhR. Les deux facteurs de transcriptions constituent les éléments de la régulation en boucle de l'activité de AhR (Figure 1.6) [116, 117].



**Figure 1.6. Mécanisme d'activation et régulation de AhR.** Inspiré de Denison et al, 2011 [118].

### **1.2.6. Mécanismes d'action classique et non-classique de AhR**

L'origine du mécanisme d'action classique de AhR est issue de l'étude extensive des effets du récepteur suite à sa liaison aux HAH et PAH, plus particulièrement à la TCDD. Le mécanisme génomique classique de la transduction du signal dépendante de AhR (Figure 1.6) résulte en la transactivation subséquente des enzymes de phase I et II du métabolisme des xénobiotiques. Suite à la transcription, AhR est dégradé dans le cytoplasme par les protéasomes et les xénobiotiques sont métabolisés par les enzymes du cytochrome (CYPs) L'expression de CYP1A1 constitue un biomarqueur de l'activation d'AhR et de l'exposition d'espèces diverses aux HAHs/PAHs, notamment par la mesure de l'activité EROD (ethoxyrésorufin O-dééthylase).

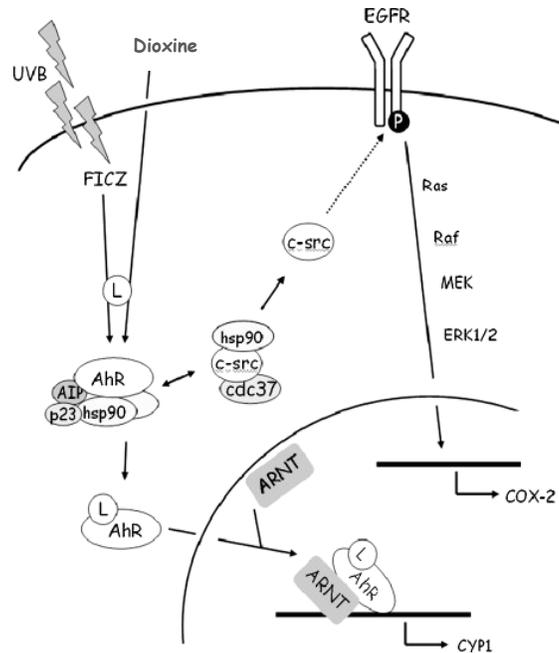
La transcription génique dépendante de AhR, décrite selon cette voie, résulte en l'induction de l'expression de gènes de cytochromes, du SOS1 impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire via la voie de signalisation de Ras, de TiPARP (TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymérase) supprimant la gluconéogenèse hépatique. De plus, la signalisation dépendante des ERs est inhibée dû au catabolisme de l'estrogène par CYP1A1 et CYP1B1 [118-120].

AhR peut exercer son action par des mécanismes non-classiques. Il s'agit du résultat de son activité en tant que protéine nucléaire ou facteur de transcription nucléaire interagissant et interférant directement avec d'autres protéines nucléaires et facteurs de signalisation. Il interagit notamment dans la signalisation des récepteurs nucléaires hormonaux, dans la prolifération et le cycle cellulaire ainsi que dans la modulation de voies de signalisation intracellulaires [118].

### **1.2.7. Interaction de AhR avec d'autres voies de signalisation**

AhR interfère avec d'autres voies de signalisation incluant la voie impliquant le facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B) [121], des protéines kinases et les EGFRs [122, 123] (Figure 1.7), la voie des MAP kinases et la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP)

impliquée dans la communication cellulaire [124]. Il interagit avec d'autres facteurs tels que P53 et pRb, HIF-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$  et Nrf2 [125, 126].



**Figure 1.7. Interaction d'AhR et EGFR dans la transduction du signal qui résulte dans l'activation transcriptionnelle via la voie des MAP kinases.** Modifié de Haarmann-Stemmann et al. 2009 [127].

Ces interrelations avec AhR surviennent souvent par des mécanismes indépendants de la liaison du complexe AhR/ARNT à la séquence DRE de la voie classique. Toutefois, les voies dépendantes et indépendantes de la transcription génique de ce complexe peuvent agir en concomitance sur une voie de signalisation, tel qu'il en est le cas pour l'interaction de AhR avec ER $\alpha$  et ER  $\beta$  [118]. AhR activé par les dioxines interfère avec ER de plusieurs manières. Il peut inhiber la transcription de ER, réduire le niveau de ses ligands et interférer avec la transduction du signal en se liant à une séquence inhibitrice des éléments de réponse aux dioxines (iDREs) [128-130]. De plus, il peut recruter ER pour sa propre régulation génique, ce qui diminue la synthèse de gènes dépendants de ER, et compétitionne avec ER pour son hétérodiméridation avec ARNT [131, 132]. Finalement, il peut agir comme une ubiquitine ligase ou recruter des ubiquitines ligases

suite à son activation par des molécules phytochimiques et engendrer la dégradation de ER dans les protéasomes [133, 134].

### **1.2.8. Les rôles physiologiques de AhR**

Les rôles de AhR dans le développement normal et dans les fonctions physiologiques ont été investigués grâce au développement des souris AhR-nulle. Effectivement, ces modèles ont montré des malformations cardiaques, des atteintes dermiques, hépatiques, vasculaires, ovariennes et des dérégulations du système immunitaire [135-138]. L'ensemble des résultats obtenus attestent que AhR est directement impliqué dans la régulation génique à la base de multiples processus physiologiques. [139, 140].

Outre ses fonctions de détoxification, il participe notamment dans la régulation de l'hématopoïèse, de la réponse immune, du cycle cellulaire et de l'apoptose et il intervient dans la modulation de l'adhésion et de la migration cellulaire. Il contribue au développement et au maintien neurologique, au rythme circadien, à la réponse à l'hypoxie, à l'angiogenèse [141-144] ainsi qu'au développement ovarien et de la régulation du système reproducteur féminin [145].

Le rôle et les mécanismes de AhR dans le développement du sein ou son implication dans la glande mammaire sont peu connus et ont été peu investigués. Selon une étude sur des souris transgéniques, l'absence de AhR dans des souris n'aurait pas affecté le développement normal de la glande mammaire mais a eu un impact négatif sur le processus de lactation [146], ce qui suggère des mécanismes liés à AhR dans la régulation du système reproducteur féminin en lien avec la glande mammaire.

### **1.2.9. AhR dans la cancérogenèse**

Les données de la littérature associant AhR à la cancérogenèse mettent en évidence des conclusions contradictoires quant au rôle de AhR dans le cancer du sein. La difficulté de comprendre les mécanismes sous-jacents de régulation impliqués est directement liée à l'influence multifactorielle qu'exerce AhR.

### **1.2.9.1. Effets pro-carcinogènes de AhR**

La carcinogenèse médiée par AhR est directement liée à l'étude extensive des effets de la TCDD qui a été classée comme carcinogène de classe 1 pour l'humain par le CIRC en 1997. La base de ces allégations est directement corrélée d'une part avec l'augmentation de multiples cancers dans les modèles animaux et d'autre part, avec l'augmentation de l'incidence de mortalité de travailleurs industriels dans des environnements hautement exposés à la TCDD.

AhR est associé à un statut de promoteur de tumeurs étant donné que la TCDD, qui est une substance considérée hautement carcinogène, est son ligand de plus haute affinité. La réponse carcinogène induite par sa liaison à la TCDD et à d'autres polluants environnementaux (PAH, HAH et BPC) est due à la génotoxicité médiée par AhR. L'induction des enzymes de détoxification de phase I et II subséquentes à la liaison de ces types de molécules à AhR engendrent le métabolisme de ces polluants dont les métabolites secondaires ont un fort potentiel mutagène [126, 147].

De plus, l'activation du récepteur Ah est directement liée à l'inhibition de la transcription du gène suppresseur de tumeur BCRA1 et du gène HSP27. L'expression de ces derniers est corrélée à l'inhibition de la croissance cellulaire des cellules mammaires [148-150]. AhR participe aussi dans de nombreuses voies de signalisation mitogènes, telle que la voie des MAP kinases, et déclenche l'activité kinase des proto-oncogènes c-Src et la protéine kinase C (PKC), qui favorisent la prolifération de cellules malignes [151].

### **1.2.9.2. Effets anti-carcinogènes de AhR**

Paradoxalement à ses effets carcinogènes, l'activation de AhR est associée à une perturbation du cycle cellulaire ayant pour conséquence une diminution de la réplication génomique et une inhibition de la prolifération cellulaire. Des arrêts du cycle cellulaire en phase G0/G1 et G2/M, via l'inhibition de cyclines et de kinases cyclines-dépendantes, ont notamment été montrés suite à l'exposition de différentes lignées cellulaires à la TCDD [151, 152]. L'activation d'AhR par la TCDD engendre aussi la synthèse des enzymes du

cytochrome et contrecarrent la voie de signalisation des oestrogènes, tel qu'il en sera discuté dans la section suivante dans le cas du cancer du sein.

Plusieurs autres mécanismes témoignent de l'interaction de AhR dans les voies de signalisation menant à la suppression de la croissance de cellules cancéreuses tel que l'altération de la voie de signalisation TGF- $\beta$ , l'interaction avec la protéine Rb, suppresseur de tumeur et contrôlant le cycle cellulaire, ainsi que l'induction de p27 [153].

### **1.2.10. AhR dans le cancer du sein**

Un nombre croissant d'études décrivent une surexpression de AhR dans certaines cellules normales à croissance rapide et dans les tumeurs en l'absence de ligands exogènes, dont le cancer du sein. La variation de l'expression de AhR dans chez les patients atteints de cancer du sein et son implication clinique est investiguée depuis quelques années seulement. Des études épidémiologiques ont fait suite à l'incident de Seveso en Italie, un accident industriel de 1976 bien connu impliquant un déversement de TCDD suite à une explosion d'une usine de fabrication de produits chimiques ; les données démontrent chez les victimes un risque accru de développer certains cancers dans les zones hautement touchées mais une diminution des taux de décès liés au cancers [154, 155]. Kociba et al. ont publié la première étude sur l'effet de la TCDD dans le cancer du sein en 1978 : une étude de deux ans rapporte une diminution du nombre de tumeurs dans les glandes mammaires chez les rattes ayant été exposées à la TCDD par leur alimentation [156]. L'activation d'AhR par la TCDD a démontré avoir des effets sur la diminution des cellules mammaires cancéreuses humaine *in vitro* [130]. Plusieurs études ont donc étudié AhR dans un but thérapeutique et afin de comprendre la mécanistique derrière l'activation d'AhR par la TCDD.

#### **1.2.10.1. AhR dans le tissu mammaire cancéreux**

Plusieurs études récentes relatent un taux de AhR plus élevé dans les tissus cancéreux que dans les tissus non-pathologiques, une augmentation d'AhR dans les carcinomes, proportionnellement avec le taux d'agressivité du carcinome mammaire, ainsi que

l'activation constitutive de AhR dans les cancers agressifs. Suite à l'étude de tissus de carcinomes mammaires invasifs de 90 patientes comparés aux tissus épithéliaux mammaires normaux, l'équipe de Saito et al. a constaté que le taux de AhR était plus élevé dans les tissus cancéreux [157]. De plus, une forte corrélation entre la surexpression d'AhR et le caractère agressif du carcinome a été montré par Goode et al. dans une étude par puce d'ADN [158]. Par ailleurs, une surexpression de AhR activé constitutivement ainsi qu'une diminution de l'expression d'AhRR dans les tumeurs mammaires a été montré par l'équipe de Feng et al. [159]. L'équipe de Saito et al. stipule que le statut de AhR dans les carcinomes est un nouveau biomarqueur pour l'établissement de pronostic chez les patientes ayant le cancer du sein [157].

#### **1.2.10.2. L'interaction entre AhR et les ERs**

Plusieurs études montrent que la perturbation de l'activité des ERs en lien avec l'activation de AhR pourrait expliquer la relation entre l'activation de AhR et la diminution de la viabilité de divers types de cellules mammaires cancéreuse. L'activation d'AhR peut réguler négativement l'activité transcriptionnelle des ERs par différents mécanismes d'action. L'accumulation nucléaire de AhR suite à son activation engendre la formation du complexe nucléaire AhR:ARNT, réduisant ainsi la quantité d'ARNT disponible pour l'activité transcriptionnelle de ER, préférentiellement de ER $\beta$  car ARNT est un coactivateur plus sélectif pour ER $\beta$  que pour ER $\alpha$  [160]. D'autre part, tant AhR qu'ARNT peuvent recruter ER $\alpha$  pour former le complexe ER $\alpha$ :ARNT:AHR, qui engendre la transrepression de gènes dépendant de la régulation d'AhR et diminue la disponibilité d'ER $\alpha$  pour son activité transcriptionnelle [161].

Les ligands d'AhR sont connus pour perturber la signalisation du récepteur à l'oestrogène *in vitro* [162], tel la TCDD qui a montré avoir des effets anti-oestrogènes en inhibant la liaison de ER $\alpha$  aux éléments de réponse aux oestrogènes, engendrant ainsi sa dégradation[163]. Ceci dit, le 3-methylcholanthrene, un ligand synthétique d'AhR, a montré l'effet contraire, promouvant ainsi le recrutement de ER $\alpha$  aux séquences ERE sans ligand d'ER [162]. De plus, les voies de signalisation d'AhR et ER induisent la

synthèse des métalloprotéases qui sont impliquées dans le processus invasif des carcinomes.

Par ailleurs, lors d'une exposition à la TCDD dans les cellules mammaires cancéreuses T47D et MCF-7, les ERs sont impliqués dans la signalisation d'AhR en agissant comme co-activateur pour la production de CYP1A1/CYP1B1 [159]. Les agonistes d'AhR induisent le CYP1A1 qui a une activité catalytique sur le 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>). Celui-ci est enzymatiquement transformé en 2 hydroxyestradiol (2-OH-E<sub>2</sub>) et ensuite en 2-méthoxy-E<sub>2</sub> (2-MeOE<sub>2</sub>) par le catéchol *O*-méthyl transférase (COMT), un métabolite connu pour être non-carcinogène avec des effets inhibiteurs sur la prolifération cellulaire et sur l'angiogenèse dans le cancer du sein [164, 165]. Conséquemment, la signalisation impliquant ER $\alpha$  et PR est inhibée ainsi que l'induction de gènes et l'activation de protéines liées à la voie oestrogénique.

Les fonctions d'ER peuvent aussi être perturbées par les protéines du complexe d'AhR. Par exemple, AhR peut compétitionner avec ER pour le co-activateur Sp1. Une exposition des cellules MCF-7 et ZR-75 à la TCDD induirait une inhibition de l'expression de protéines dépendantes de la signalisation de l'oestrogène telles que PR, le récepteur à la prolactine, la cathépsin, c-fos et HSP27 [166-168].

De plus, ER peut aussi compétitionner avec AhR pour l'ARNT. Celui-ci se complexe préférentiellement à AhR mais peut agir comme co-activateur d'ER. Ainsi, l'activation d'AhR par un ligand empêche l'ARNT d'agir comme co-activateur pour ER [168]. L'activation d'AhR peut aussi engendrer la dégradation d'ER dans les protéasomes. Lorsque complexé avec cullin 4B ubiquitine ligase (CUL4<sup>AhR</sup>) suivant son activation, AhR agit comme adaptateur de substrat pour les récepteurs de stéroïdes sexuels ce qui mène à leur dégradation. Ainsi, dans les cellules mammaires cancéreuses humaines T47D et MCF-7, une dégradation d'ER dans les protéasomes a été observée suite à la liaison d'AhR à des xénobiotiques ou des ligands d'origine naturelle [159]. Malgré que le récepteur aux oestrogènes est un récepteur important dans près de 70% des cancers du sein selon Holst et al.[169], l'action anticarcinogène d'AhR ne serait entièrement

dépendante à son effet suppresseur sur ER. Effectivement, Hall et al. montrent que l'activation d'AhR inhibe la croissance de cellules cancéreuses mammaires ainsi que la tumorigenèse peut importe l'importance relative des récepteurs ER, PR et ErbB2 [170].

### **1.2.10.3. La signalisation de AhR dans les cellules mammaires cancéreuses**

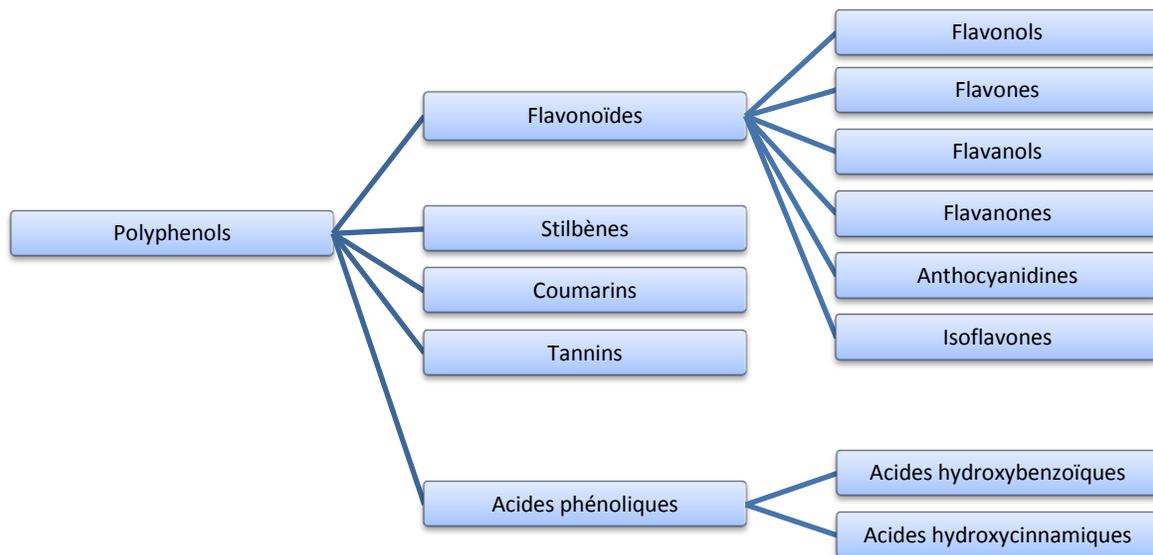
In vitro, Saito et al. montre que la signalisation de AhR diminue la prolifération cellulaire tant dans les cellules ER+ que ER- et inhibe la migration cellulaires dépendante de l'œstrogène par la diminution de l'expression de certains sous-type de métalloprotéinésases de la matrice cellulaire (MMPs). D'autre part, Brooks et al. ont constaté une augmentation de la prolifération, de la migration et de l'invasion cellulaire dans des lignées de cellules épithéliales mammaires normales modifiées pour surexprimer AhR [171]. Par ailleurs, la suppression génique d'AhRR dans des cellules du tumeurs mammaires provenant de biopsies et de différentes lignées de cellules mammaires cancéreuses humaine engendre une résistance aux signaux apoptotique et augmente la motilité [172]. Parallèlement, la suppression génique d'AhR dans les cellules triple-négatives MDA-MB-231 mène à un dysfonctionnement mitochondrial et une augmentation de l'activité de protéines pro-apoptiques, BAD et les caspases 3, 8 et 9, engendrant une augmentation de la réponse apoptotique [158]. Conséquemment, une surexpression d'AhR a un rôle de premier ordre dans la progression des carcinomes mammaires. Il est donc d'un grand intérêt d'investiguer son potentiel comme cible thérapeutique.

Des agonistes et modulateurs du récepteur aux œstrogènes ont été largement étudiés pour le traitement du cancer du sein. Le tamoxifène comme antagoniste d'ER (antagoniste d'ER $\beta$  et antatogiste partiel d'ER $\alpha$ ) par l'inhibition de l'aromatase est d'ailleurs un traitement contre le cancer du sein [173]. Plusieurs récepteurs associés à des effets toxiques ou génotoxiques chez l'humain et sur les modèles animaux en laboratoire, tels que les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) et le récepteur des rétinoïdes (RAR/RXR), sont ciblés en tant que potentiels cible thérapeutiques pour traiter ce type de cancer. AhR serait dans cette optique une cible de choix car non

seulement il agit sur la voie oestrogénique, mais il interfère également dans plusieurs voies de signalisation impliquées dans la cancérogenèse. De plus, il est surexprimé dans le stade triple-négatif du cancer du sein pour lequel aucun traitement spécifique n'existe à ce jour [3].

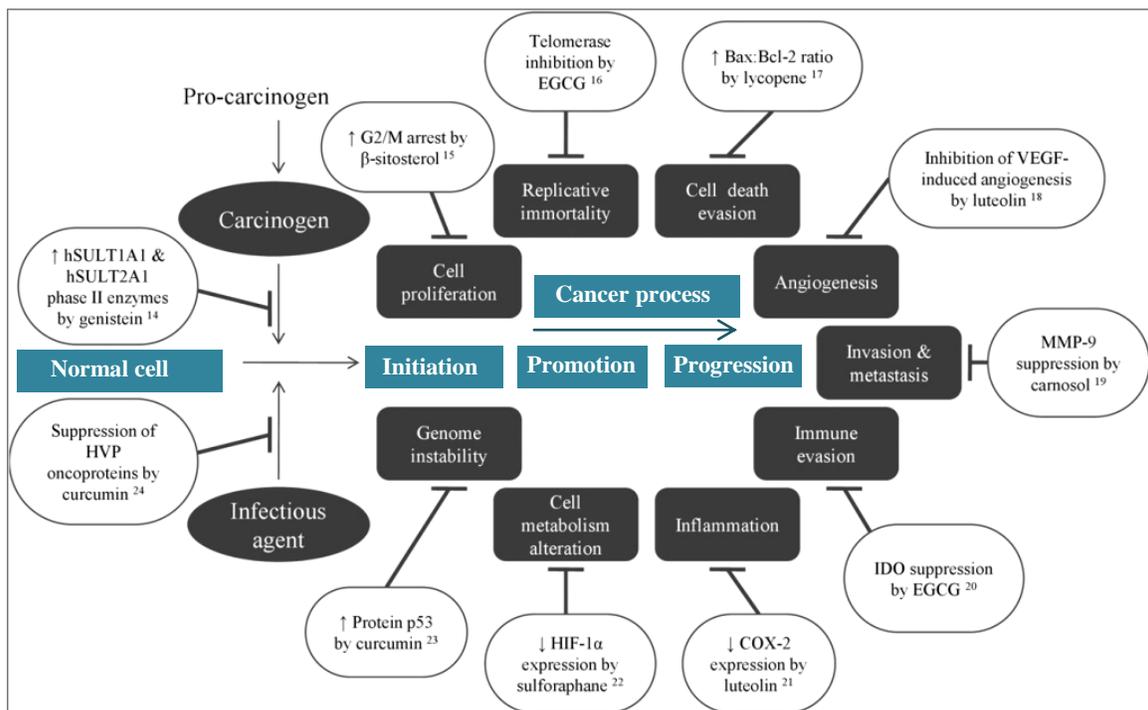
### 1.3. Prévention et traitement du cancer par les polyphénols

Abondamment retrouvés dans le règne végétal comme produit du métabolisme secondaire des plantes, les polyphénols sont des composés organiques caractérisés par plusieurs groupements phénoliques de poids moléculaire variant entre 500 et 4 000 Dalton. Plus de 8 000 différents composés ont été décrits et divisés en 5 classes selon leur structure chimique (Figure 1.8) [174] . Ils correspondent aux substances actives de plusieurs plantes médicinales, notamment celles utilisées pour le traitement du cancer [175].



**Figure 1.8. Classes et sous-classes des polyphénols.**

Retrouvés comme micronutriments abondants dans l'alimentation, les polyphénols sont reconnus pour leurs effets d'antioxydants naturels et leur rôle dans la prévention des maladies associées au stress oxydatif. De plus, ils modulent l'activité d'enzymes et de récepteurs cellulaires impliqués dans la transduction du signal des voies de signalisation de la cancérogenèse (Figure 1.9). Leurs effets préventifs et leur potentiel thérapeutique dans le traitement du cancer et des maladies neurodégénératives, cardiovasculaires et inflammatoires émergent alors de manière évidente [176, 177].



**Figure 1.9. Les effets des polyphénols et d'autres composés naturels sur différents stades de la cancérogenèse.** Les molécules phytochimiques ayant des activités anticancérigènes agissent sur des cibles moléculaires impliquées dans le développement du cancer. Un exemple pour chaque stade est illustré. Modifié de Gonzalez-Vallinas et al., 2013 [178].

### 1.3.1. Effets chimiopréventifs des polyphénols sur les cellules cancéreuses

Les propriétés anticancérigènes des polyphénols sont de nature chimiopréventive et chimiothérapeutique. Un aspect chimiopréventif inhibe le processus de cancérogenèse. Ces composés préviennent la formation de procarcinogènes (métabolites oxydants et

électrophiles) ou en bloquent leur action. La diminution des dommages causés à l'ADN prévient donc l'initiation tumorale ou en inhibe la promotion et la progression.

D'autres molécules, dites agents suppresseurs, agissent directement sur les facteurs impliqués dans l'expression et la progression du cancer [179]. Les polyphénols sont également impliqués dans la modulation des mécanismes épigénétiques et dans la réorganisation du génome, en agissant au niveau de trois processus : la méthylation de l'ADN, la modification des histones et la régulation génique post-transcriptionnelle via l'ARN non-codant ou micro ARN [180].

La dose et la biodisponibilité sont des facteurs qui ont un impact direct sur les effets des polyphénols de source alimentaire. La biodisponibilité est tributaire de la structure chimique des composés et des processus liés à l'absorption intestinale, telles que la glycosylation, l'estérification et la polymérisation. Elle diffère grandement selon les classes de polyphénols de source alimentaire, dont les effets chimiopréventifs en dépendent directement [177, 181, 182].

L'effet chimiopréventif des polyphénols est reflété par l'activité qu'exercent ces composés à plusieurs niveaux sur le contrôle des cascades de signalisation cellulaire. Nous présenterons ci-dessous les principaux effets rapportés dans la littérature.

#### **1.3.1.1. Potentiel antioxydant**

Les polyphénols peuvent prévenir les dommages à l'ADN causés par les radicaux libres ou des substances procarcinogènes par différents mécanismes d'action. Ils peuvent agir comme chélateur d'ions en agissant directement avec les radicaux libres [183] ou en tant que modulateur d'enzymes impliquées dans le stress oxydatif, diminuant l'activité de la glutathione peroxydase (GPx), la glutathione réductase (GR) ou la superoxyde dismutase (SOD), pour ne nommer que celles-ci [184].

### **1.3.1.2. Effets sur les enzymes liées au métabolisme des xénobiotiques**

En interagissant avec les enzymes du cytochrome P450, certains polyphénols réduisent l'activation de procarcinogènes et leur transformation en substances carcinogènes, bloquant ainsi le processus de cancérogenèse. Le myricétin, la quercétine et l'apigénine ont montré une telle activité lors d'essais enzymatiques *in vitro* et *in vivo* chez le rat. Une inhibition des enzymes de phase 1 augmente l'activité ou l'expression des enzymes de conjugaison de phase 2 et favorise ainsi l'élimination de substances cancérogènes [185, 186].

### **1.3.1.3. Arrêt du cycle cellulaire**

La prolifération de cellules tumorales peut être bloquée par l'interaction de composés phénoliques avec des protéines spécifiques régissant la régulation du cycle cellulaire. Un arrêt du cycle en phase G1 dans des cellules du cancer du sein et du col de l'utérus a été induit par des polyphénols du thé suite à l'inhibition de l'expression de protéines kinases cyclines-dépendantes (CDK1, CDK2 et CDK4) ainsi que des protéines régulant la voie de dégradation ubiquitine-protéasomes (p21, p27 et p53) [187, 188]. Par ailleurs, une diminution de l'expression des cyclines A et B1 induite par l'acide gallique contenu dans le thé a été rapportée dans le cancer du côlon, avec pour conséquence un arrêt du cycle cellulaire en phase S [189]. Une baisse de ces mêmes cyclines en plus de la cycline B1 par le piceatannol a provoqué une diminution de la prolifération cellulaire en induisant un arrêt en phase G2 [189].

### **1.3.1.4. Induction de l'apoptose**

L'induction de l'apoptose des cellules tumorales est un aspect chimiopréventif important des polyphénols de source alimentaire. L'épigallocatechine gallate (EGCG), l'apigénin, la chrysin et le resveratrol ont ce potentiel d'induction et les cellules cancéreuses semblent en être plus sensibles que les cellules normales [190-192]. En modifiant l'état d'oxydo-réduction des cellules cancéreuses, les polyphénols du thé, la quercétine et les anthocyanines induisent l'apoptose en entraînant la fragmentation de l'ADN et

l'activation de la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale. Les protéines proapoptotiques (caspases 2 et 9) sont ainsi activées et la protéine Bcl-2 antiapoptotique est inhibée. S'ensuit le relargage de protéines mitochondriales, telles que le cytochrome c et Smac/DIABLO, qui promeuvent l'activité du facteur induisant l'apoptose AIF (apoptose inducing factor) et neutralisent les protéines antiapoptotiques IAP (inhibitory apoptosis proteins) [193-196].

L'EGCG a induit la mort cellulaire programmée par la voie intrinsèque dans plusieurs types de lignées cancéreuses. Son interaction directe avec les récepteurs Fas, des protéines de la famille TNF (tumor necrosis factor), fait intervenir la voie apoptotique extrinsèque. Dans ce même contexte, l'inhibition de l'activité de la télomérase par l'EGCG a aussi entraîné le processus apoptotique [197-199].

#### **1.3.1.5. Effets antiprolifératifs**

Nombre de polyphénols interfèrent avec les voies de signalisation PI3K/AKT, la voie des MAP kinases et le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) qui régulent la prolifération et la survie cellulaire. Ils agissent donc indirectement sur la régulation de l'apoptose et préviennent ainsi la signalisation tumorigénique [192, 196].

##### **1.3.1.5.1. Inhibition de la voie MAPK/PI3K**

L'effet antiprolifératif de composés phénoliques peut être attribuable à leur interaction directe avec les récepteurs extracellulaires émettant le signal prolifératif. Une inhibition complète du récepteur des facteurs de croissance plaquettaire  $\beta$  (PDGF) par son interaction directe avec l'EGCG empêche la phosphorylation de protéines impliquées dans la transduction du signal de ces voies prolifératives, telles que PI3K et ERK-1/2. Il s'ensuit une diminution de l'expression de protéines, dont des sous-unités de Akt (p85 et p110) ce qui contrecarre l'effet prolifératif [200].

Une inhibition directe de la phosphorylation de protéines régulatrices de la transduction du signal d'Akt est rapportée avec la curcumine engendrant un arrêt du cycle cellulaire en G1 et l'apoptose de cellules cancéreuses [201]. Les cellules mammaires cancéreuses en

présence de quercétine et de EGCG montrent une diminution de manière dose-dépendante des récepteurs à activité tyrosine kinase ErbB2 et ErbB3 concomitante avec l'inhibition de la phosphorylation de Akt et ERK [202, 203].

#### **1.3.1.5.2. Inhibition de NF- $\kappa$ B**

NF- $\kappa$ B est un facteur nucléaire de transcription impliqué dans l'expression de gènes pro-inflammatoires et dans la survie de cellules cancéreuses. Son activation promeut la transcription de gènes anti-apoptotiques, tels que XIAP, Bcl-2, Bcl-Xl, I $\kappa$ B- $\alpha$ , cIAP1, cIAP-2, et inhibe des processus liés à l'induction de l'apoptose. Son inactivation est donc souhaitée dans un contexte d'arrêt des processus menant à la tumorigenèse et son inactivation par AKT suggère une interaction entre ces voies de signalisation [204]. Une régulation à la baisse d'AKT et de NF- $\kappa$ B menant à une baisse de prolifération cellulaire et à l'induction de l'apoptose a été observée suite aux effets de la curcumine sur des cellules de lymphome [205] et à ceux de la génistéine sur des cellules mammaires cancéreuses [206].

#### **1.3.1.6. Inhibition de l'inflammation**

Impliqués dans des voies de signalisation pro-inflammatoires, NF- $\kappa$ B, la cyclooxygénase-2 (COX-2) et le TNF ont un rôle important dans la prolifération cellulaire, l'activité antiapoptotique, la promotion de l'angiogenèse et la prolifération métastatique [207, 208]. En entravant directement la libération de TNF- $\alpha$  dans des cellules cancéreuses, plusieurs composés phénoliques bloquent l'activation ou la synthèse de COX-2 et NF- $\kappa$ B [209-211].

La COX-2 est hautement surexprimée dans de nombreux types de cancers dans les stades pré-malins et malins. L'inhibition de COX-2, menant au blocage de la production de prostaglandines (PG), prévient la croissance et le développement de néoplasmes [212]. Une diminution d'ARNm de COX-2 induite par des flavones a pour conséquence l'apoptose de cellules cancéreuses du colon. Dans ce même type de cancer, une

diminution de l'activité de COX-2 par un traitement à la génistéine génère un arrêt du cycle cellulaire [213, 214].

Dans les cellules du cancer du côlon, un traitement à l'EGCG a induit l'activation de l'AMPK (acetyl-CoA carboxylase kinase), engendrant une diminution de l'expression de COX-2. Une baisse de l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) a été constatée en concomitance et liée à la baisse de COX-2, bloquant ainsi l'angiogenèse [215].

### **1.3.2. Le potentiel thérapeutique des polyphénols sur les cellules cancéreuses**

La résistance accrue et les effets secondaires des traitements de chimiothérapie ont fait émerger les recherches sur le potentiel pharmacologique des polyphénols. L'inhibition de l'angiogenèse et des processus liés à la prolifération métastatique sont des stades-clé à cibler dans le processus de la cancérogenèse.

#### **1.3.2.1. Effets anti-angiogéniques**

Les composés phénoliques exercent des effets anti-angiogéniques en entravant la libération de facteurs de croissance, en inhibant leur synthèse et celle de leurs récepteurs ou en bloquant les voies de signalisation qu'ils induisent. Ils agissent aussi sur l'expression de MMPs, fortement présentes dans les remodelages cellulaires liés à l'angiogenèse.

Plusieurs flavonoïdes ont entravé la libération de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) dans des lignées mammaires cancéreuses humaines [216]. Une régulation à la baisse de métalloprotéinases, de VEGF, PDGF et de leurs récepteurs a été induite par l'acide élagique, l'EGCG, la génistéine, dans différents types de lignées cancéreuses humaines. De plus, ces composés ont inhibé la phosphorylation d'EGFR, de VEGF et de PDGFR [217-219].

Ces effets anti-angiogéniques peuvent s'exercer via la modulation de protéines régulant le cycle cellulaire [220], par le blocage des voies de signalisation mitogène tel que

PI3K/AKT [221] ou encore par l'activation de molécules pro-apoptotiques [222] régulant en amont la phosphorylation de récepteur des facteurs de croissance.

### **1.3.2.2. Effets anti-métastatiques**

Le stade métastatique du cancer est une interaction entre l'angiogenèse, la dégradation de la matrice extracellulaire, la protéolyse ainsi que l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaire. Il s'agit d'un processus par lesquels un sous-ensemble de cellules ou des cellules individuelles cancéreuses se propagent vers des organes ou des tissus éloignés.

Les MMPs sont considérées essentielles dans la formation de métastases et un lien clair a été établi entre les MMP, la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion des cellules. Les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance jouent un rôle crucial dans la modulation de leur sécrétion [223-225].

Il a été rapporté que l'épécatéchine, l'EGCG et la delphinidine ont inhibé l'invasion de cellules cancéreuses avec une baisse concomitante de l'expression de la MMP-9 [220, 226]. De plus, une baisse de l'activité des MMP-2 et MMP-9 par la delphinidine a également été montrée avec une baisse de la migration cellulaire [227]. Il en est de même pour la curcumine qui, en inhibant la transcription de NF- $\kappa$ B dans des cellules mammaires cancéreuses *in vitro* et *in vivo*, entraîne une baisse de l'expression des MMP-1 et MMP-2 [228].

### **1.3.3. Les flavonoïdes**

Avec plus de 6 500 molécules répertoriées à ce jour, les flavonoïdes représentent 60% des composés phénoliques disponibles dans l'alimentation provenant des plantes [229]. Ils sont divisés selon le degré d'oxydation de l'hétérocycle en différentes sous-classes structurales : flavones, flavonols, isoflavones, flavanones, flavan-3-ol et anthocyanines (Figure 1.10).



fabriquer un produit anticarcinogène dirigé contre PI3K, une protéine à activité tyrosine kinase (PTK) hétérodimérique impliquée dans la régulation de fonctions cellulaires [235].

### **1.3.5. Les flavonoïdes et leurs mécanismes d'action cellulaire**

Suite à leur ingestion, les flavonoïdes et leurs métabolites se retrouvent accumulés dans le plasma ou dans certains organes comme le cerveau en concentration beaucoup plus faible que des petites molécules antioxydantes, telles que l'acide ascorbique et l' $\alpha$ -tocophérol [236]. Leur métabolisme *in vivo* engendre une altération significative de leur potentiel réducteur. Les flavonoïdes se retrouvent ainsi sous forme de métabolites ou de conjugués suite à l'absorption intestinale, au passage dans le foie et à la dégradation enzymatique par les bactéries de la microflore intestinale [237]. Outre leurs mécanismes d'action liés à leurs propriétés antioxydantes et de chélateur d'ions métalliques, ils interagissent directement avec des enzymes liées à la progression du cancer telles que l'aromatase (CYP19) [238], enzyme responsable de la biosynthèse des œstrogènes, et la topoisomérase, enzyme contrôlant la torsion et l'enroulement de l'ADN [239].

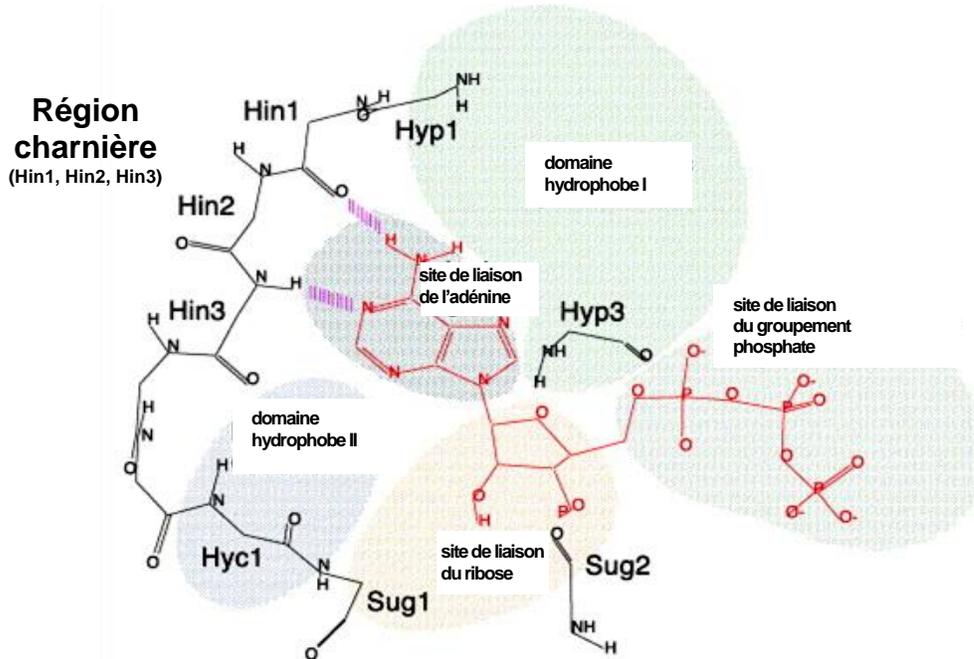
D'autre part, il a été suggéré que les différents degrés d'hydroxylation, de polymérisation et de méthylation des flavonoïdes sont des déterminants importants de leurs interactions spécifiques et non spécifiques avec les protéines et les lipides membranaires. Ces attributs permettraient leur interaction avec les protéines et les lipides membranaires en modifiant leur degré d'adsorption, soit physique ou chimique [240, 241].

### **1.3.6. Mécanismes d'inhibition des RTK par les flavonoïdes**

#### **1.3.6.1. Interaction avec le site de liaison de l'ATP**

Bien que l'intégrité du site de liaison de l'ATP soit hautement conservée entre les différentes protéines kinases, les régions hydrophobes qui l'entourent peuvent différer et constitueraient les causes des effets sélectifs de certains flavonoïdes. Ce site de liaison comprend cinq régions : les sites de liaison de l'adénine, du ribose et du groupement

phosphate ainsi que les sites de liaison hydrophobe I et II (figure 1.11). L'ATP se lie lorsque l'adénine forme des ponts hydrogène avec le site « charnière » (hinge region), un segment qui connecte les terminaisons –amino et –carboxy terminales du domaine kinase.



**Figure 1.11 Région charnière des récepteur à activité tyrosine kinase et site de liaison de l'ATP, modifié de Paul et al. 2004 [242]**

Les inhibiteurs de type 1 des PTK agissent de manière compétitive avec l'ATP en mimant sa liaison à l'enzyme. Ils reconnaissent la conformation active du domaine kinase, une conformation non favorable au transfert d'un groupement phosphate [243]. Il s'agit souvent d'une molécule ayant un noyau hétérocyclique qui occupe le site de liaison de l'adénine de l'ATP où elle sert de support pour les chaînes latérales des régions hydrophobes I et II adjacentes. Ces régions jouent un rôle important dans la sélectivité des inhibiteurs de protéines kinases.

Concernant les flavonoïdes qui se lient à la région de l'ATP, une hypothèse est que le groupement chromanone mimerait l'adénine de l'ATP et que le nombre de groupements hydroxyle sur leur cycle B ainsi que le degré d'insaturation des liaisons C2-C3 seraient des composantes déterminantes pour leurs capacités bioactives [244]. La myricétine

constitue un bon exemple de ce type d'interaction car elle se lie directement au site de liaison de l'ATP, de AKT1, MKK4, Fyn et PI3K $\gamma$  de manière à imiter sa liaison [85, 235, 245, 246].

#### **1.3.6.2. Interaction avec le site d'activation du domaine kinase**

Le site d'activation du domaine kinase joue un rôle très important dans la régulation de l'activité des PTK. Sa composition et son architecture sont hautement conservés dans toutes les PTK. Les inhibiteurs des PTK de type 2 reconnaissent la conformation inactive du domaine kinase. L'analyse des structures co-cristallisées de multiples inhibiteurs de type 2 avec le site inactif du domaine kinase a démontré qu'ils ont tous un pharmacophore similaire et se lient à un même ensemble de liaisons hydrogènes [247]. Des exemples de ce type d'inhibiteur sont l'imatinib, un inhibiteur de ABL1, c-KIT et PDGFR [248] et le sorafenib, inhibiteur de c-KIT, PDGFR et Raf qui se lient au site d'activation de ces PTK [249].

#### **1.3.6.3. Interaction avec le site allostérique**

Le site allostérique, qui est distinct du site enzymatique et du site de liaison de l'ATP des PTK, peut lier un ligand et réguler de manière positive ou négative l'activité enzymatique. Ce site constitue une cible plus spécifique que le site actif pour le développement de médicaments car il est plus spécifique non seulement à l'intérieur d'une même espèce mais à chaque PTK [250].

Les inhibiteurs de cette catégorie démontrent le plus haut degré de sélectivité pour les PTK parce qu'ils exploitent un site de liaison spécifique à une PTK particulière. Le CI-1040 (PD184342) est l'inhibiteur du site allostérique de PTK qui a été le mieux caractérisé. Il inhibe MEK1 et MEK2 en occupant un site adjacent au site de liaison de l'ATP [251]. Un autre exemple est Akt-I-1 qui se lie au domaine PH (pleckstrin homology) d'Akt. Ce domaine possède une affinité pour des groupements phosphoinositides phosphorylés tels que ceux de PI3K, de PTEN ou de la protéine kinase

C (PKC) [252]. La delphinidine, un flavonoïde, est un exemple d'inhibiteur allostérique qui se lie directement à Fyn sans entrer en compétition avec l'ATP [253].

#### **1.3.6.4. Interaction avec les radeaux lipidiques**

Certains RTK, tels qu'EGFR [254] et IGFR [255], sont associés à des radeaux lipidiques (lipid rafts). Ces centres organisationnels contribuent à l'assemblage de molécules de signalisation, à la régulation de la neurotransmission ainsi qu'à la modification et au déplacement de protéines et de récepteurs membranaires. [256]. Au niveau de l'effet des flavonoïdes sur les RTK, il a été suggéré que leur différent degré d'hydroxylation, de polymérisation et de méthylation seraient des déterminants importants de leurs interactions spécifiques et non-spécifiques avec les protéines et les lipides membranaires. [257].

La liaison du ligand à son récepteur ainsi que l'activité tyrosine kinase des EGFR serait grandement influencée par leur environnement lipidique [258]. En effet, le traitement de cellules du colon cancéreuses avec l'épigallocatechine gallate (EGCG) a provoqué l'internalisation de EGFR sans même qu'il y ait liaison avec EGF [259]. L'organisation des lipides joue donc un rôle important dans l'internalisation de récepteurs membranaires.

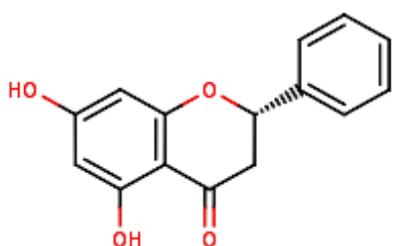
#### **1.3.6.5. Inhibiteurs covalents/liaisons covalentes**

Une autre classe d'inhibiteurs de PTK est capable de former une liaison covalente irréversible avec le site actif, le plus souvent en interagissant avec un résidu cystéine nucléophile. À ce jour, aucun flavonoïde étudié n'a démontré ce type d'inhibition. Malgré le grand nombre de protéines kinases qui pourraient être ciblées par cette approche, il est important de considérer le potentiel toxique des inhibiteurs covalents sur des cibles non spécifiques dans un processus de développement de médicaments [234].

#### 1.4. La tectochrysin et la pinocembrine

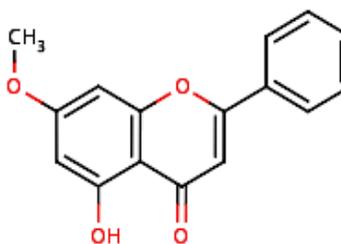
La tectochrysin est une flavone naturelle O-méthylée planaire et la pinocembrine est un flavanone non-planaire (figure 1.12). Ces molécules ont la capacité de bloquer la mutagenèse et sont reconnues pour leurs effets antioxydants, anti-tumoraux, anti-inflammatoires et antimicrobiens [260-262]. Elles sont retrouvées dans une grande variété de plantes, dans le miel et sont présents en grande quantité dans la propolis originaire de différentes régions géographiques [263-267].

La propolis est une résine fabriquée par les abeilles à partir de substance des bourgeons des plantes et de cire d'abeille. Elle est utilisée par celles-ci comme agent antiviral, antifongique et antibactérien, pour les protéger des maladies et comme mortier pour réparer la ruche [268]. Les propriétés pharmacologiques des extraits éthanoliques de la propolis sont qualifiées d'anti-tumorales, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, anesthésiques, hypotensives et hépatoprotectrices [269].



**Pinocembrine**

(5, 7-dihydroxyflavanone)



**Tectochrysin**

(5-Hydroxy-7-methoxyflavone)

**Figure 1.12. Structures chimiques de la pinocembrine et de la tectochrysin**

### **1.4.1. La tectochrysin**

#### **1.4.1.1. La tectochrysin, agoniste du récepteur Ah**

Un degré d'affinité marqué de la tectochrysin pour AhR a été rapporté par l'équipe d'Amakura et al., ce qui suggère qu'il en est un ligand exogène naturel [270, 271]. De plus, les résultats d'études sur des lignées cellulaires cancéreuses n'exprimant ni les récepteurs aux œstrogènes, ni à la progestérone, ni à ErbB2 montrent une cytotoxicité dépendante de AhR lors du traitement à la tectochrysin [272]. Effectivement, la cytotoxicité de cette molécule est deux fois plus élevée sur les cellules cancéreuses qui répondent bien aux agonistes de AhR [272] en comparaison aux cellules où AhR ne répond pas à ses agonistes [273]. Parallèlement, Bisson et al. ont montré que la tectochrysin engendre la translocation de AhR dans le noyau et active CYP1A1 dans les cellules hépatiques murines. De plus, elle active la NADPH quinone réductase *in vivo* en plus de provoquer une forte activation du récepteur par arrimage moléculaire, ce qui confirme son statut d'agoniste [274].

#### **1.4.1.2. Effets anticancérigènes de la tectochrysin**

La tectochrysin isolée de l'écorce de la tige de *Cyathostemma argenteum*, une plante originaire de Malaisie est traditionnellement utilisée dans le traitement du cancer du sein [275]. Khamis et al. ont montré une toxicité modérée de la molécule sur les cellules mammaires cancéreuses MCF-7, une lignée exprimant les récepteurs aux œstrogènes [275].

Il est rapporté par He et al. que la tectochrysin extraite de la plante *Alpinia oxyphylla Miquel* a été utilisée pour ses propriétés anti-angiogéniques dans le traitement du cancer et des maladies inflammatoires [276]. Sur des cellules humaines du cancer du poumon, l'équipe de Oh et al. montre une inhibition de la phosphorylation de STAT3 par la tectochrysin. L'augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques DR3 et Fas ainsi que la diminution de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules cancéreuses du poumon sont rapportées de manière dose-dépendante [277]. Par ailleurs, Park et al. montre que le traitement à la tectochrysin des cellules humaines du cancer du côlon

engendre une inhibition de NF- $\kappa$ B par son interaction directe avec la tectochrysin. Elle cause ainsi l'apoptose des cellules cancéreuses via l'augmentation de l'expression de DR3, DR4 et Fas, des protéines pro-apoptotiques [278].

La tectochrysin est également un inhibiteur spécifique et efficace de la protéine ABCG2 [279] qui est un transporteur de xénobiotiques à l'origine d'une résistance aux multiples traitements de chimiothérapie. Elle a également montré un potentiel d'inhibiteur sélectif des promoteurs de la cyclooxygénase-2 (COX-2) dont la production est augmentée dans 40% des carcinomes mammaires invasifs [280]. La COX-2 est impliquée dans la formation de néoplasmes et la synthèse de prostaglandines (PEG2), un prostanoloïde-clé promouvant la tumorigénèse et l'angiogénèse. La tectochrysin inhibe également la synthèse de la NO synthase inductible (iNOS) dont l'activité augmente l'agressivité des tumeurs et est associée à un taux de survie faible chez les patients atteints de cancer du sein [280, 281].

#### **1.4.1.3. Effets antioxydants**

L'effet antioxydant de la tectochrysin a été rapporté par plusieurs études. Lee et al. [282] en rapportent un effet hépatoprotecteur suite à une intoxication au CCl<sub>4</sub> chez le rat. La tectochrysin a provoqué une diminution de l'activité élevée des transaminases sériques suite à l'augmentation de l'activité d'enzymes anti-oxydantes telle que la SOD hépatique (super oxyde dismutase), la catalase et la glutathion peroxydase ainsi qu'une baisse significative de la production de MDA (malondialdéhyde) produit de la peroxydation lipidique.

Un effet protecteur de même type est relaté par Boutabet et al.[263] sur les fonctions rénales du rat lors d'un traitement antibiotique par la doxorubine. Une administration de tectochrysin, contenue dans la propolis, avant la doxorubine a contrecarré la toxicité de l'antibiotique en préservant les fonctions rénales et en diminuant le stress oxydatif. Les données rapportées montrent une diminution de la quantité de créatine plasmatique et du MDA avec une augmentation concomitante de la glutathion peroxydase.

## **1.4.2. La pinocembrine**

La pinocembrine est déjà utilisé comme agent thérapeutique dans le traitement des ishémies cérébrales [283, 284]. Amakura et al. ont observé un degré d'affinité marqué de la pinocembrine pour AhR suggérant qu'il en est un ligand naturel [270, 271]. De plus, certaines recherches ont soulevé que sa cytotoxicité serait restreinte aux lignées cellulaires cancéreuses et absente sur des cellules normales [285, 286].

### **1.4.2.1. Effets anticancérigènes**

La pinocembrine exerce des effets anti-androgéniques par son action inhibitrice sur la stéroïde-5- $\alpha$ -réductase [287], enzyme en amont de la synthèse des hormones stéroïdiennes. Il est également un inhibiteur sélectif de la COX-2 en interagissant directement avec son récepteur [288, 289] et induit l'apoptose mitochondriale dans des cellules du cancer du côlon via l'activation de la protéine apoptotique Bax [285]. Ce composé a montré également un effet inhibiteur de l'activité de l'aromatase diminuant ainsi l'effet oestrogénique [290].

La pinocembrine exerce un effet inhibiteur de l'ATPase transporteur de  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique chez le rat dans les mastocytes et les neutrophiles [291], engendrant des inhibitions enzymatiques. Dans des cas de cancer, les mastocytes contribuent à l'angiogenèse via la sécrétion de médiateurs tels que VEGF, TNF et des prostaglandines [292] tandis que les neutrophiles ont le potentiel de stimuler la formation de métastases par la sécrétion d'interleukines [293].

### **1.4.2.2. Effets anti-inflammatoires et anti-oxydants**

La pinocembrine a la propriété de réduire l'inflammation via la diminution des protéines anti-apoptotiques telles que Bax et Bcl-2 dans les cellules neurales [294] et par une réduction de l'expression de TNF, des métalloprotéases ainsi que de chimiokines pro-inflammatoires dans des cellules neurovasculaires [295].

Les aspects anti-oxydants de la pinocembrine sont notamment liés à l'inhibition de la peroxydation des lipides membranaires, la neutralisation et la baisse de radicaux libres [296, 297] ainsi que l'inhibition du stress oxydatif mitochondrial et d'enzymes impliquées dans le stress oxydatif, tel que la protéine kinase C [298-301].

#### **1.4.3. Effets anti-microbiens**

La pinocembrine a été rapporté comme ayant un large spectre d'effets antibactériens[302], a un effet bactériostatique contre le *Staphylococcus aureus*, [303] et agit comme inhibiteur de l'activité de la glucosyltransférase chez *Streptococcus mutans* [304], bactérie impliquée dans les processus carcinogéniques par son rôle dans l'augmentation de la production de TNF $\alpha$ , d'interleukine-1 et d'interleukine-6 par les monocytes [207, 305]. Ses propriétés anti-virales incluent l'inhibition directe de protéases impliquées dans les processus de migration du virus HIV-1 et du sérotype-2 du virus de la dengue [262].

## 1.5. Hypothèses et objectifs de recherche

Dans le cadre de la recherche de nouvelles voies thérapeutiques contre le cancer du sein, AhR suscite de plus en plus d'intérêt car sa surexpression et son activation constitutive sont retrouvées dans les stades agressifs des carcinomes mammaires. De plus, les cancers dont les cellules surexpriment ErbB2, un récepteur aux facteurs de croissance impliqué dans la prolifération cellulaire, démontrent aussi un degré d'agressivité très élevé. AhR est un facteur de transcription nucléaire activé dans le cytosol notamment par des ligands exogènes tel les dioxines, les HAPs et des molécules phytochimiques. La 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxine (TCDD) a la plus haute affinité connue pour ce récepteur. La TCDD ayant des effets toxiques indésirables mais démontrant des propriétés anticarcinogènes, l'objet principal de ce projet d'étude est d'investiguer le pouvoir anticancéreux d'autres substances chimiques d'origine naturelles ayant une haute affinité avec le récepteur Ah mais étant dépourvues des effets toxiques de la TCDD.

Nous avons choisi la tectochrysin et la pinocembrine comme ligands de AhR pour leur affinité avec celui-ci sachant leurs diverses propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes et anticarcinogènes. Notre hypothèse est que les molécules phytochimiques ayant une affinité pour le récepteur Ah entraînent une baisse de prolifération cellulaire et diminuent la fonctionnalité d'ErbB2 dans des cellules mammaires humaines. Les objectifs spécifiques visent à démontrer 1) si des ligands sélectionnés du récepteur Ah, en remplacement de la TCDD, modulent la prolifération cellulaire en investiguant divers paramètres tel que la viabilité, la cytotoxicité, le cycle cellulaire ainsi que des enzymes clé de voies de signalisation mitogènes tel que Akt et c-myc et 2) à explorer l'effet de la tectochrysin et de la pinocembrine sur l'expression du récepteur à l'estrogène alpha ainsi que sur ErbB2, étant donné qu'il s'agit de biomarqueurs de la cancérogenèse mammaire qui engendrent des voies de signalisation promouvant la carcinogenèse.

La lignée de cellules cancéreuses mammaires humaines T47D, exprimant AhR et déjà bien caractérisée quant à son profil de récepteurs, ont été traitées *in vitro* durant 2 à 6 jours. La viabilité cellulaire a été évaluée par un test WST-1 quantifiant l'activité

mitochondriale et la cytotoxicité par un test quantifiant la lactate déshydrogénase. La morphologie cellulaire a été attestée par microscopie à fluorescence et le cycle cellulaire, évalué par cytométrie en flux. Finalement, la modulation de AhR, de l'enzyme du cytochrome CYP1A1, de la protéine chaperone HSP90, de Akt, de c-myc, du récepteur à l'estrogène alpha ainsi que du récepteur ErbB2 ont été étudiés par immunobuvardage de type Western. Dans l'ensemble, le but visé de ces travaux est d'apporter un éclairage sur le potentiel de la tectochrysine et de la pinocembrine à moduler la croissance des cellules mammaires cancéreuses par des mécanismes dépendants de AhR et d'ErbB2.

## CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'approche expérimentale a été conduite grâce à l'utilisation de lignées cellulaires T47D. Il s'agit de cellules humaines provenant du tissu épithélial de glande mammaire d'un carcinome canalaire métastatique caractérisé comme étant de type luminal B [43]. Les cellules T47D utilisées expriment les récepteurs à la progestérone, aux oestrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  et le récepteur aux facteurs de croissance épidermique ErbB2. Les cellules ont été traitées au DMSO 0,5 % (groupe contrôle) et séparément par trois molécules : la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) comme témoin positif, la tectochrysine et la pinocembrine en tant que molécules à l'étude. Le traitement des cellules a débuté au troisième passage après décongélation et a été réalisé sur trois passages successifs. La démarche expérimentale résumant les différentes étapes est présentée sur l'organigramme ci après :

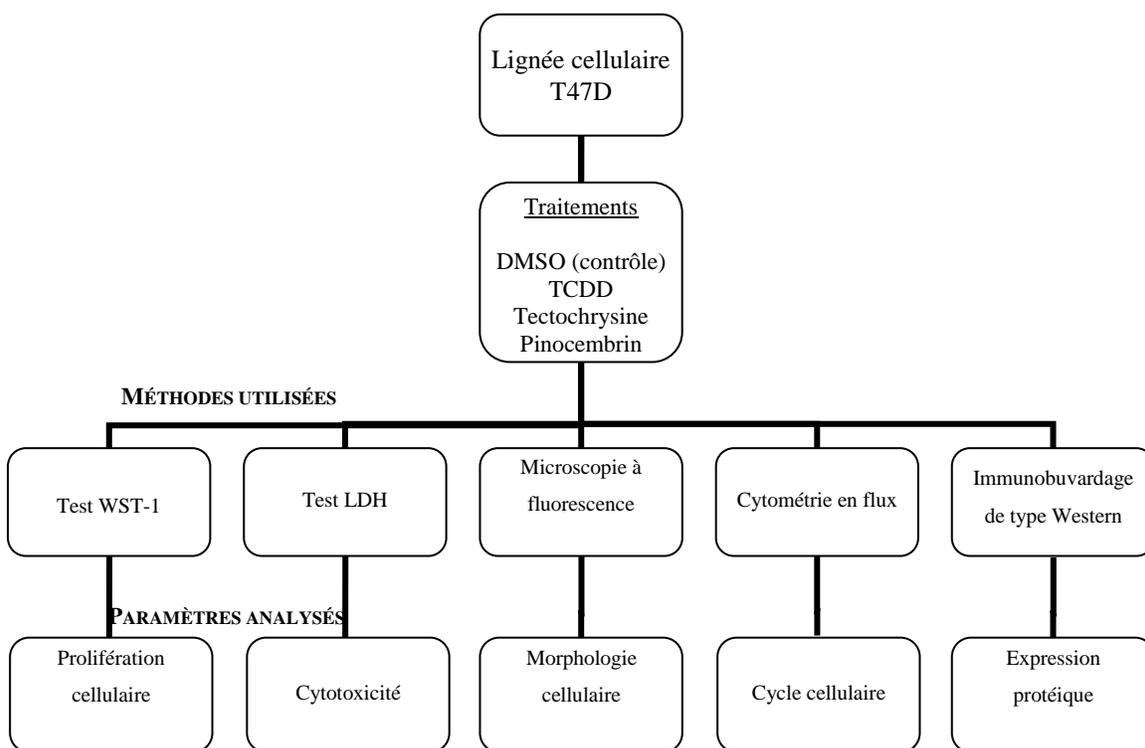


Figure 2.1. Organigramme récapitulatif de la démarche expérimentale

## **2.1. Composés : dioxine et flavonoïdes**

La dioxine représentée par la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) (99,1%) (AccuStandard Inc. Connecticut, É.-U.)

Les flavonoïdes représentés par la tectochrysin (5-hydroxy-7-méthoxyflavone, 98%) (Indofine Chemical Company inc., 98%, NJ, É.-U.) et la pinocembrine (5,7-dihydroxyflavone) (Sigma Aldrich, Missouri, É.-U.) ont été dilués dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) à une concentration finale de 0,5% dans le milieu de culture.

## **2.2. Lignée cellulaire et conditions de traitement**

Les cellules T47D, cryopréservées au passage 139, ont été cultivées dans un milieu composé à 90% de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario), 10% de sérum fœtal bovin (FBS) (Sigma-Aldrich), 10nM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) (Sigma-Aldrich) et 0,01 mg/ml d'insuline (Sigma-Aldrich). La culture cellulaire a été effectuée dans un incubateur à 37°C avec un taux de CO<sub>2</sub> de 5%. Les traitements par les différents composés ont été introduits au troisième passage après la décongélation, 24 h après l'ensemencement des cellules et sur trois passages consécutifs (N=3). La TCDD (5,3 nM) a été utilisée dans toutes les expériences comme témoin positif pour valider la fonctionnalité de AhR.

## **2.3. Analyse de la morphologie cellulaire**

La microscopie à fluorescence a été utilisée d'une part, afin de s'assurer de la dissolution complète des composés et de l'absence de formation de cristaux dans le milieu de culture, et d'autre part, afin d'apprécier les différences de morphologie cellulaire, les variations de la prolifération cellulaire selon les traitements. Les résultats pour une période de 6 jours sont présentés afin de montrer les effets à long terme des composés (Nikon, Eclipse, TE2000-U, grossissement final 40x, logiciel Metamorph).

## **2.4. Quantification de la viabilité cellulaire**

La prolifération cellulaire a été évaluée avec le test WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) et effectuée selon les directives du fabricant. Ce test est basé sur la mesure de l'activité de la succinate-tétrazolium reductase mitochondriale en présence de sels de tétrazolium du réactif WST-1. Celui-ci réduit en formazan, est dosé à une longueur d'onde de 440 nm. L'intensité, reflétant le taux de déshydrogénases, est directement corrélée au nombre de cellules vivantes.

Les cellules T47D ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits avec une concentration de  $1 \times 10^4$  cellules/puits dans 100  $\mu$ l de milieu de culture. Après 24 heures, les cellules ont été traitées avec la tectochrysin et la pinocembrine (1, 5, 10, 20, 40, 80  $\mu$ M) et avec la TCDD (0,53, 1,06 et 5,3 nM) pour une période de 48 h. Les composés ont été préparés dans le DMSO puis mélangés au milieu de culture. À la fin du traitement, 10  $\mu$ l de réactif de prolifération cellulaire WST-1 ont été ajoutés dans chaque puits. Une incubation de 2 heures a été effectuée dans un environnement humide à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> avant la prise de résultats. La lecture de l'absorbance s'est effectuée à 440 nm (Spectramax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune effectuée en triple, avec l'écart type (SD)

## **2.5. Détection de la cytotoxicité**

La cytotoxicité des composés a été déterminée par un test colorimétrique, mesurant l'activité lactate déshydrogénase (LDH) (Roche Diagnostics) dans le milieu de culture. La LDH est une oxydoréductase catalysant la conversion du pyruvate en lactate ainsi que de NADH en NAD<sup>+</sup>. Les cellules ayant subi des dommages toxiques suite à une exposition aux différents composés sont lysées et libèrent la LDH dont l'activité sera quantifiée dans le milieu de culture.

Les cellules T47D ( $1 \times 10^4$  cellules/puits) ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits et traitées 24 heures après ensemencement avec la tectochrysine et la pinocembrine (1, 5, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{M}$ ) et avec la TCDD (0,53, 1,06 et 5,5  $\mu\text{M}$ ) pour une période de 48 h. Ensuite, une incubation de 30 min à la température pièce à la noirceur a été effectuée avec la solution catalyste (diaphorase/ $\text{NAD}^+$ ) et la solution de colorant (sels de tétrazolium et lactate de sodium) pour permettre la réaction enzymatique des sels de tétrazolium en formazan. L'absorbance a été mesurée à 490 nm et 620 nm (Spectramax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

## **2.6. Analyse du cycle cellulaire**

L'analyse des variations du cycle cellulaire a été réalisée par la cytométrie en flux qui a permis de compter, de trier et de suivre la distribution des cellules en fonction de leur phase dans le cycle cellulaire.

Les cellules T47D ont étéensemencées selon une densité de  $5 \times 10^5$  cellules dans des pétris de  $20 \text{ cm}^2$ . Elles ont été traitées 24 heures après leur ensemencement avec la tectochrysine et la pinocembrine (5, 10, 30  $\mu\text{M}$ ) et avec la TCDD (5,3 nM) pour des périodes de 24, 48 et 72 heures. Suite aux traitements, les cellules ont été lavées au PBS 1x à  $4^\circ\text{C}$  et trypsinisées avec de la Trypsine-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich). Les cellules ont ensuite été centrifugées à 100 g pendant 10 minutes à  $20^\circ\text{C}$  pour être resuspendues avec 300  $\mu\text{l}$  de PBS 1X. Elles ont ensuite été fixées avec de l'éthanol 100% à  $-20^\circ\text{C}$  pendant 15 minutes, centrifugées à 300 g pour 10 minutes pour ensuite être incubées en présence de l'iodure de propidium 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich) et de ribonuclease A (Sigma-Aldrich). L'analyse des cellules a été effectuée avec un cytomètre FACS calibre (BD Biosciences, Californie, É.-U.) et les données analysées avec le logiciel ModFit LtTM (Verity Software House, Maine, É.-U.).

## **2.7. Extraction des protéines totales**

L'extraction des protéines totales a été effectuée pour la réalisation des tests d'immunobuvardage de type Western. Des traitements de 2 jours ont été effectués en concordance avec les autres tests effectués. Des traitements de 6 jours ont permis d'évaluer la tendance à long terme des traitements par rapport à 2 jours de traitement.

Les cellules T47D ont étéensemencées dans des pétris de 20 cm<sup>2</sup> (5x10<sup>5</sup> cellules/pétri) dans le milieu de culture complet pendant 24 h. Les cellules sont ensuite exposées à différentes concentrations de tectochrysin et de pinocembrine (10 et 20 µM) et de TCDD (5,3 nM) pendant 2 et 6 jours. Pour l'exposition de 6 jours, le milieu de culture contenant les composés a été changé au troisième jour du traitement, pour chaque concentration. À la fin des traitements, les cellules sont rincées au PBS 1X à 4°C. Les lysats cellulaires entiers sont obtenus avec l'ajout du tampon de lyse RIPA (50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, NP-40 1%, déoxycholate de sodium 1% et SDS 1%) complété avec des inhibiteurs de protéases : 5 µg/ml aprotinine, 5 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF et 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Les lysats cellulaires ont été récoltés avec un racloir et centrifugés à 4 °C pendant 10 minutes à 100 g. Les échantillons ont été conservés à -80 °C. La concentration des protéines extraites a été réalisé avec une trousse de dosage de protéines BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Les résultats ont été analysés par densitométrie et normalisés par rapport à l'expression de la β-actine.

## **2.8. Immunobuvardage de type Western**

Une quantité de 40 à 60 µg de protéines extraites ont été chauffées à 100 °C puis séparées sur un gel de compactage à 4% et un gel SDS-PAGE à 8%. Le transfert a été effectué sur des membranes de nitrocellulose (Trans-Blot Transfer Pack, 0.2 µ Midi Nitrocellulose Membrane, Bio-Rad, Missisauga, ON) avec le Trans-Blot Transfert System (Bio-Rad) et vérifié avec la coloration au rouge ponceau. Les membranes ont été placées dans un tampon de blocage avec 0,1% TBS-Tween 20 et de lait 5% pendant 1 h et incubées avec les anticorps primaires et secondaires. L'incubation avec les anticorps primaires est

réalisée à 4°C pendant toute une nuit, celle avec les anticorps secondaires dure 1 h à température ambiante. Les caractéristiques des anticorps utilisés sont présentées ci-après.

Après incubation, les membranes sont lavées avec le tampon 0,1% TBS-Tween 20 à cinq reprises pendant cinq minutes à température ambiante. Les complexes protéine-anticorps ont été révélés avec les réactifs Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) avec l'utilisation du Gel Doc <sup>TM</sup> XR+ System (Bio-Rad). La  $\beta$ -actine a été utilisée comme protéine de contrôle interne.

### 2.8.1. Anticorps

	Compagnie	Dilution
<b>Anticorps primaires</b>		
Akt	Cell Signaling #9272	1:1000
$\beta$ -actine	Abcam, ab40864	1:60000
c-Myc	Abcam, ab32	1:1000
ErbB2	Cell signaling #2165	1 :1500
AhR (A-3)	Santa Cruz, sc-133088,	1:1500
ER alpha (H-70)	Santa Cruz, sc-20772,	1:1000
Hsp90 A/B	Abcam, ab58950	1:2000
<b>Anticorps secondaires</b>		
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz, sc2005	1 :10000
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz, sc2004	1:10000

### 2.9. Analyses statistiques

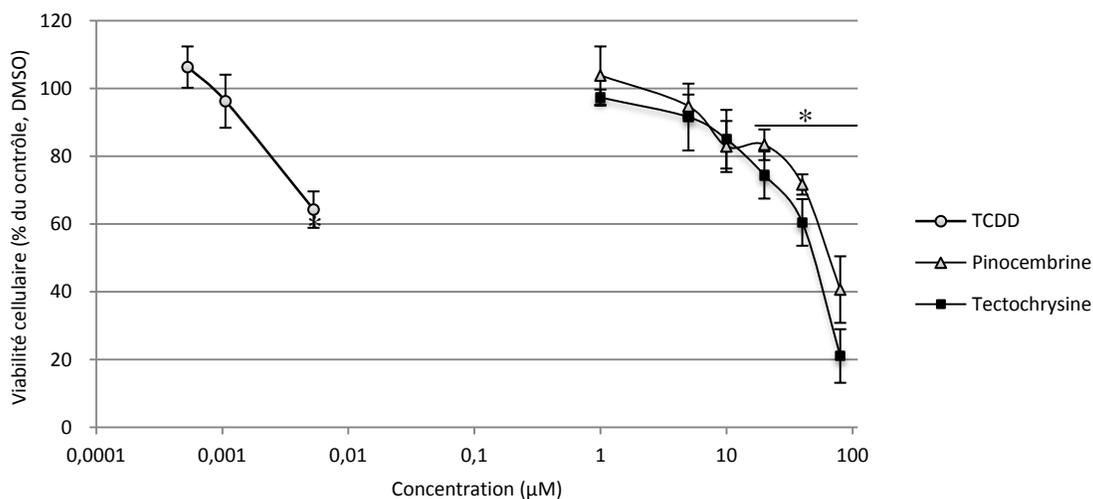
Tous les traitements ont été effectués en triple pour chaque expérience, chacune répétée de façon indépendante trois fois. Les concentrations relatives aux IC50 et EC50 ont été calculées par analyse de régression non-linéaire avec le logiciel GraphPad Prism v5. Le test de *t* de Student et l'analyse de variance à une seule variable (ANOVA), suivis d'un post test de Tukey ont aussi été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism v5 (GraphPad

Sotware, San Diego, CA, USA). Les résultats de cytométrie en flux ont été exploités avec le logiciel ModFit LT™ (Verity House, ME, USA). L'intervalle de confiance est déterminé à  $p < 0,05$ .

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

La TCDD a été utilisée comme témoin positif, tout au long de la démarche expérimentale, attestant d'une part, de la réceptivité d'AhR dans les lignées utilisées et d'autre part, validant la fonctionnalité du mécanisme classique d'activation d'AhR par la dioxine. Les résultats de toutes les expériences sont comparés au groupe contrôle traité au DMSO (0,5%).

### 3.1. La tectochrysrine et la pinocembrine inhibent la prolifération et la viabilité cellulaire et montrent un effet cytotoxique modéré



**Figure 3.1. Effets de la TCDD, de la pinocembrine et de la tectochrysrine sur la viabilité des cellules T47D.** La viabilité est mesurée par le test WST-1 de manière dose-dépendante après 48h de traitement. La compilation des résultats (moyenne  $\pm$  SD %) est normalisée avec le contrôle (100%). \*  $p < 0,05$

Le test WST-1 a été effectué pour attester des changements dans la viabilité cellulaire. La tectochrysrine et la pinocembrine, comme la TCDD, ont induit après 48h une perte de viabilité cellulaire de manière dose-dépendante sur les cellules mammaires cancéreuses T47D (figure 3.1). La concentration pour laquelle est constatée une différence

significative par rapport au contrôle est de 20µM. Cette concentration et sa moitié (10 µM) ont été utilisées pour les tests d'immunobuvardage de type Western et pour les observations en microscopie (figure 3.3). Pour la TCDD, la concentration de 5,3 nM, qui montre des effets significatifs par rapport au contrôle, a été utilisée comme témoin positif pour les expériences subséquentes.

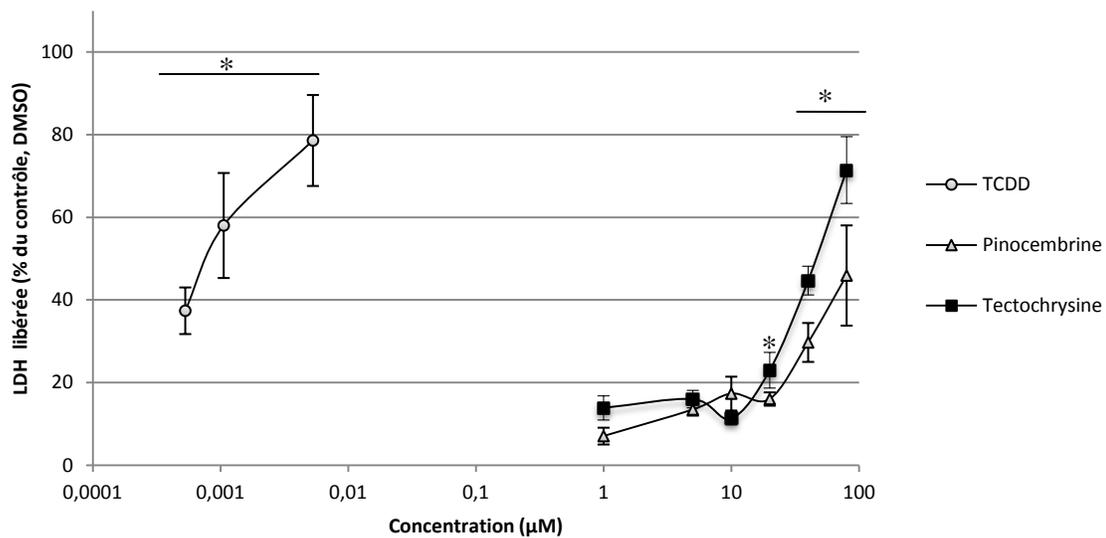
La tectochryisine et la pinocembrine induisent une baisse de viabilité cellulaire de 50% par rapport au contrôle pour 48 heures pour des concentrations en deçà de 70 µM. Le calcul de la IC<sub>50</sub> permet de mieux illustrer ces effets (tableau 3.1). Ainsi la tectochryisine a un potentiel plus élevé à diminuer la viabilité cellulaire avec une IC<sub>50</sub> de 49,5 µM pour 67,6 µM pour la pinocembrine.

**Tableau 3.1. Valeurs de la IC<sub>50</sub> des composés sur les cellules T47D pour une période de 48 heures par rapport au contrôle.**

	IC <sub>50</sub>		
	TCDD	Pinocembrine	Tectochryisine
µM	0,007	67,6	49,5

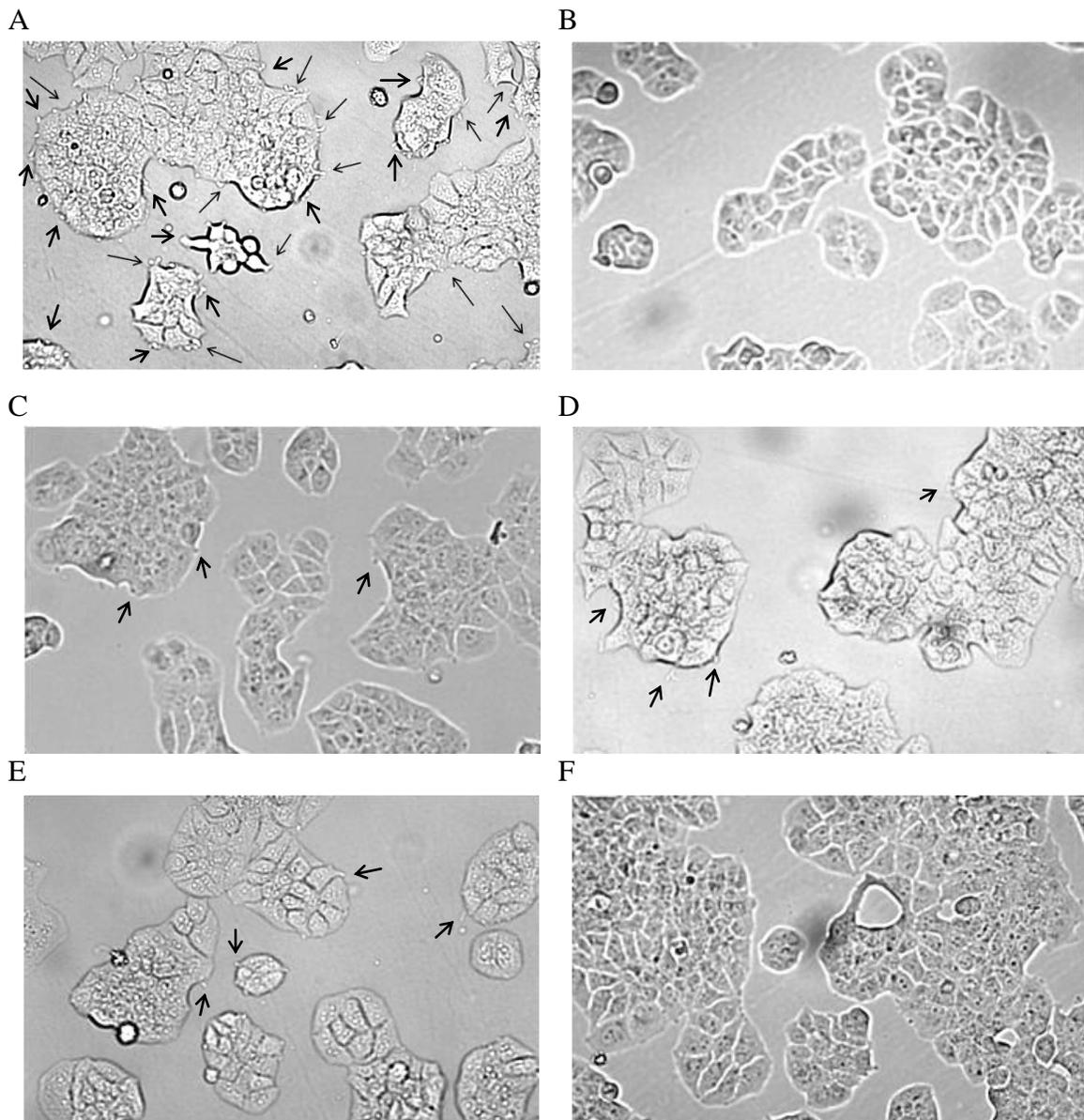
**Tableau 3.2. Valeurs de la EC<sub>50</sub> des composés sur les cellules T47D pour une période de 48 heures telles que déterminées par le test de LDH.**

	EC <sub>50</sub>		
	TCDD	Pinocembrine	Tectochryisine
µM	0,025	431,2	280,9



**Figure 3.2. Effets cytotoxiques de la TCDD, de la pinocembrine et de la tectochryisine sur les cellules T47D.** La cytotoxicité est mesurée de manière dose-dépendante par la quantité de LDH libérée dans le milieu de culture après 48h de traitement. La compilation des résultats (moyenne  $\pm$  SD %) est normalisée avec le contrôle (100%). \*  $p < 0,05$

Le test de LDH a montré que la tectochryisine et la pinocembrine ont une différence significative par rapport au contrôle à partir d'une concentration de 20µM et 40 µM respectivement (figure 3.2). Les doses induisant 50% de l'effet cytotoxique maximal reflétant les valeurs de l'EC50 sont en deçà de 450µM pour la pinocembrine, et en deçà de 300 µM pour la tectochryisine. Il en ressort également que pour un même effet, la tectochryisine est 1,5 fois plus efficace que la pinocembrine (tableau 3.2). Les concentrations de 20 µM et 10 µM utilisées pour les immunobuvardages de type Western et pour les observations en microscopie correspondent respectivement à une cytotoxicité de 3,56 % et 1,56 % pour la tectochryisine et 2,32 % et 1,16 % pour la pinocembrine, par rapport au maximum de cytotoxicité (100% de LDH libérée).

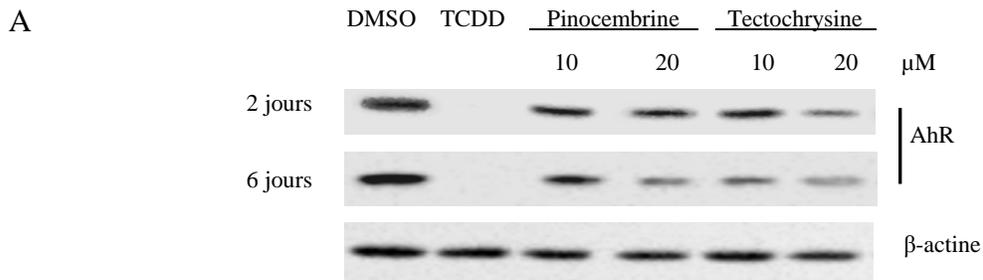


**Figure 3.3. Effets de la tectochrysin et de la pinocembrine sur la prolifération et la morphologie des cellules T47D.** Observation microscopique des cellules T47D après un traitement de 6 jours, grossissement 40x. (A) Contrôle (DMSO), les flèches indiquent des sites où la formation de points d'adhérence est abondante (B) Témoin positif-TCDD 5,3 nM (C) Tectochrysin 10  $\mu$ M (D) Tectochrysin 20  $\mu$ M (E) Pinocembrine 10  $\mu$ M (F) Pinocembrine 20  $\mu$ M. Les flèches pour (C), (D), (E) et (F) montrent un point d'adhérence.

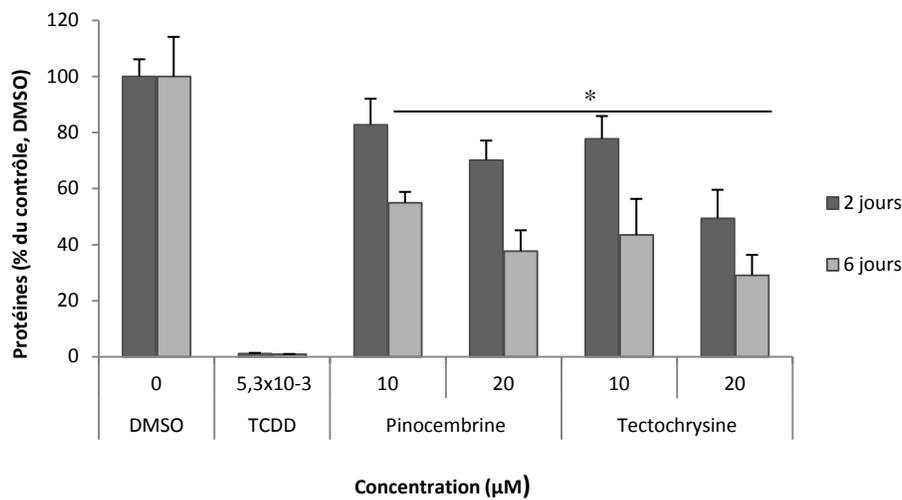
L'observation de changements morphologiques des cellules T47D constitue un moyen rapide d'attester des variations dans la viabilité et la prolifération cellulaire. Les cellules T47D ont été incubées avec la pinoembrine et la tectochrysine à des concentrations de 10  $\mu\text{M}$  et 20  $\mu\text{M}$  pendant 6 jours. Tel que montré sur la figure 3.3, le groupe contrôle (DMSO) (A) a plusieurs sites de protubérances et signes de migration cellulaire où la formation de points d'adhérence est abondante. Les cellules incubées avec la TCDD, la tectochrysine et la pinoembrine montrent des changements morphologiques en comparaison au contrôle. Il est possible de constater une disparition des sites de protubérance pour les cellules traitées avec la TCDD et la tectochrysine à une concentration de 20  $\mu\text{M}$ . Les cellules exposées à des concentrations de 10  $\mu\text{M}$  et à 20 $\mu\text{M}$  de pinoembrine montrent quelques points d'adhérence.

### **3.2. La tectochrysine et la pinoembrine : ligands de AhR**

En premier lieu, le potentiel de la pinoembrine et de la tectochrysine comme ligand de AhR a été investigué par la quantification de ce même récepteur et de la protéine chaperone HSP90, afin de voir si les composés interagissent avec cette dernière ce qui pourrait affecter la fonctionnalité de AhR. Son activation sera confirmée par l'analyse de la variation de CYP1A1.



B

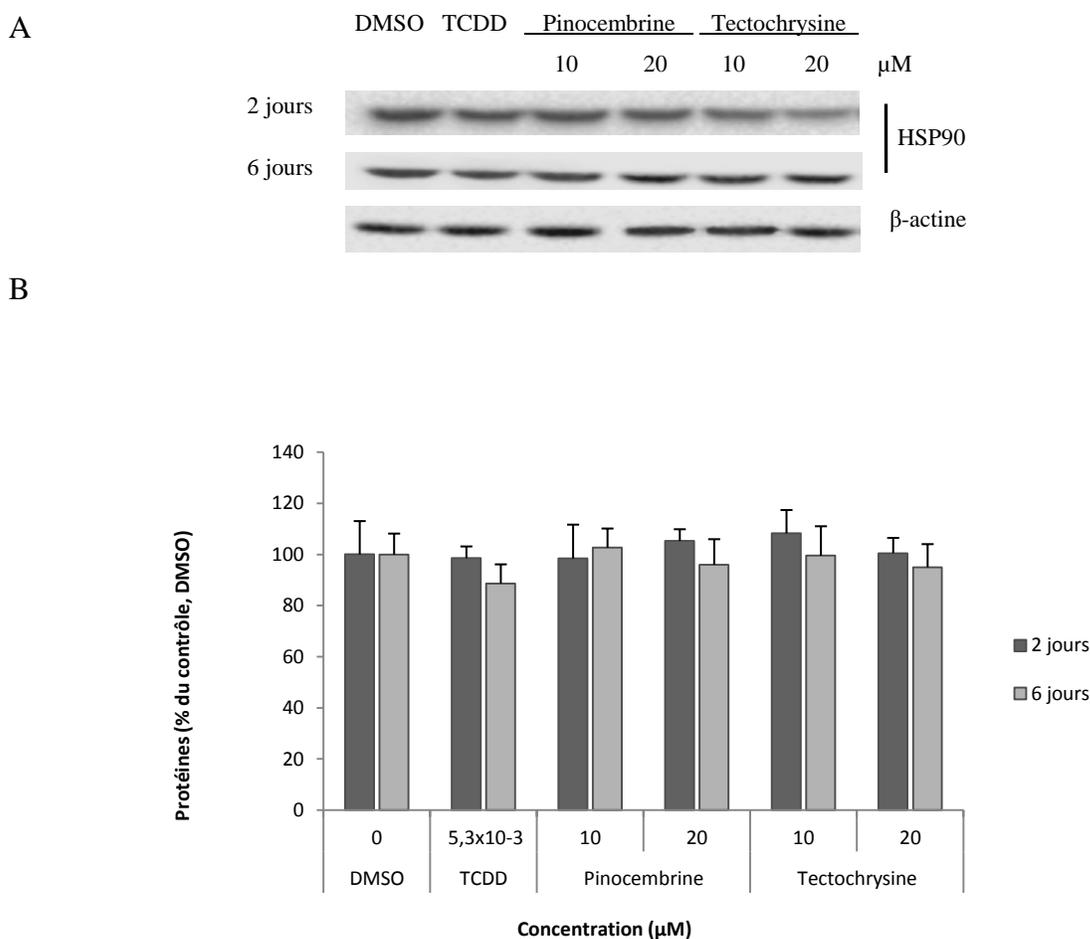


**Figure 3.4. Diminution du taux de AhR suite à l'exposition à la tectochrysin et la pinocembrine.** Les cellules ont été traitées avec la tectochrysin et la pinocembrine aux concentrations indiquées pour des durées de 2 et 6 jours. Le taux de AhR a été déterminé par immunobuvardage de type Western, analysé par densitométrie et normalisé par rapport à l'expression de la β-actine. (A) Les résultats d'une expérience sur trois sont représentés. (B) La compilation des résultats (moyenne ± SD %) est normalisée avec le contrôle (100%). \* p<0,05

L'analyse des variations du taux de AhR permet de vérifier s'il y a eu dégradation du récepteur suite à sa liaison à un ligand ou des variations dans son expression. Les cellules T47D ont été traitées avec la tectochrysin et la pinocembrine pour des périodes de 2 et 6 jours pour suivre cette variation. Les deux composés induisent une diminution de la quantité totale de AhR après 2 jours de traitement par rapport au contrôle (DMSO)

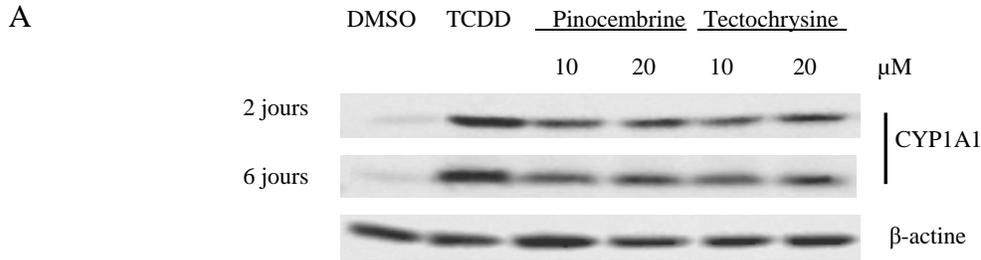
(Figure 3.4). Pour des concentrations de 10  $\mu\text{M}$  et 20  $\mu\text{M}$  de pinocembrine, les taux de AhR sont de  $82,8 \pm 9,3\%$  et  $70,2 \pm 6,0\%$  respectivement par rapport au contrôle. Pour les mêmes concentrations de tectochrysin, des taux plus bas sont retrouvés ( $77,8 \pm 8,1\%$  et  $49,4 \pm 10,1\%$ ). Après un traitement de 6 jours avec les deux composés pour les mêmes concentrations (10  $\mu\text{M}$  et 20  $\mu\text{M}$ ), le processus de diminution se poursuit avec des taux de  $54,9 \pm 3,8\%$  et  $37,7 \pm 7,4\%$  pour la pinocembrine et de  $43,4 \pm 12,9\%$  et  $29,0 \pm 7,3\%$  pour la tectochrysin.

La tectochrysin et la pinocembrine induisent une baisse du taux de AhR en fonction du temps et de manière dose-dépendante. Après 2 jours de traitement, la tectochrysin à 20  $\mu\text{M}$  induit une baisse de 50% du récepteur. Des baisses de la quantité totale de récepteur supérieures à 45% sont attestées lors du traitement de 6 jours pour les deux composés aux différentes concentrations. La TCDD induit une baisse du taux de récepteurs supérieure à 95%.

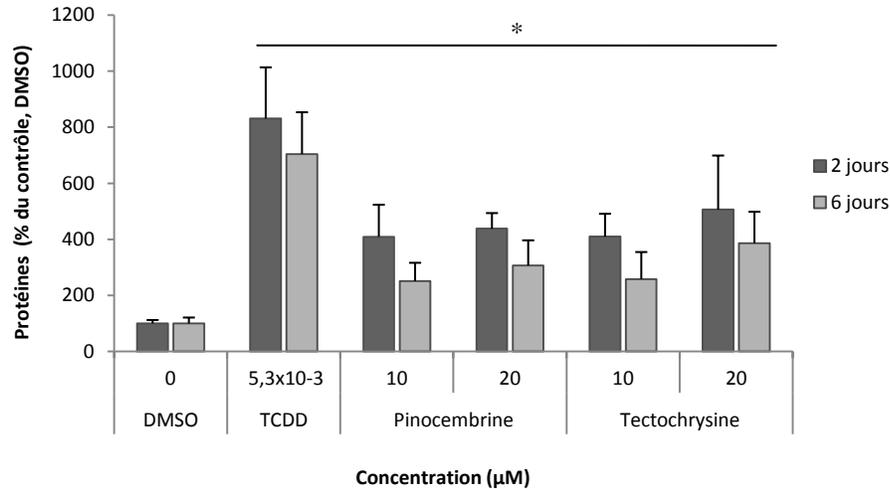


**Figure 3.5. La tectochryisine et la pinocembrine n'induisent pas de changements significatifs dans la quantité totale de HSP90.** Les cellules ont été traitées avec la tectochryisine et la pinocembrine aux concentrations indiquées pour des durées de 2 et 6 jours. L'expression protéique a été déterminée par immunobuvardage de type Western, analysée par densitométrie et normalisée par rapport à l'expression de la β-actine. (A) Les résultats d'une expérience sur trois sont représentés. (B) La compilation des résultats (moyenne ± SD %) est normalisée avec le contrôle (100%). \* p<0,05

Ensuite, nous avons évalué si la tectochryisine et la pinocembrine ont un effet sur la protéine de choc thermique HSP90. Cette protéine chaperonne s'associe à AhR lors de la liaison au ligand et contribue à l'activation du récepteur. Les résultats obtenus (figure 3.5) ne démontrent pas de changements significatifs dans la quantité totale de protéines HSP90 par rapport au contrôle (DMSO) après 2 et 6 jours de traitement avec la pinocembrine. Les résultats des groupes de la TCDD avoisinent ceux du contrôle.



B



**Figure 3.6. La tectochryisine et la pinocembrine induisent l'expression de CYP1A1.** Les cellules ont été traitées avec la tectochryisine et la pinocembrine aux concentrations indiquées pour des expositions de 2 et 6 jours. L'expression protéique a été déterminée par immunobuvardage de type Western, analysée par densitométrie et normalisée par rapport à l'expression de la  $\beta$ -actine. (A) Les résultats d'une expérience sur trois sont représentés. (B) La compilation des résultats (moyenne  $\pm$  SD%) est normalisée avec le contrôle (100%). \*  $p < 0,05$

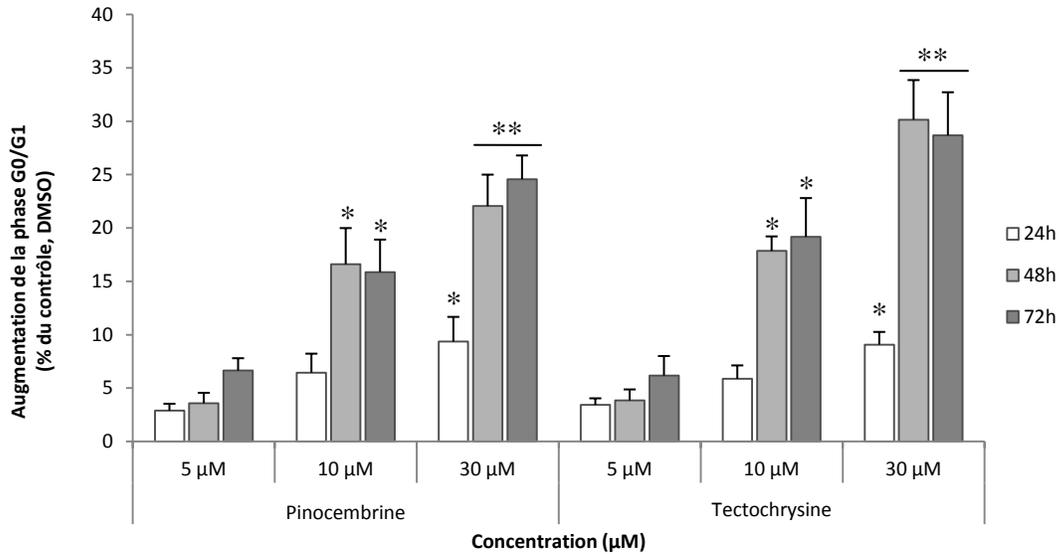
Enfin, nous avons évalué l'expression de CYP1A1 par immunobuvardage de type western afin de rechercher une éventuelle induction de la production du CYP1A1, signe de l'activation de AhR par un agoniste.

Les traitements de 2 et 6 jours ont provoqué des hausses significatives ( $p < 0,05$ ) de la production de CYP1A1 par rapport au contrôle (DMSO) avec toutefois, des résultats plus prononcés pour l'exposition de 2 jours (figure 3.6). En effet, la pinocembrine à 10  $\mu$ M et 20  $\mu$ M a induit une augmentation des taux de CYP1A1 atteignant les valeurs de  $409 \pm$

114% et  $438 \pm 56\%$ . Pour la tectochrysin des taux de  $410 \pm 82\%$  et  $506 \pm 193\%$  ont été respectivement constatés à 10  $\mu\text{M}$  et 20  $\mu\text{M}$ . Pour les mêmes concentrations, après 6 jours, le traitement au pinocembrine affiche des taux de  $251 \pm 66\%$  et  $307 \pm 90\%$  et la tectochrysin,  $258,2 \pm 96\%$  et  $386,0 \pm 112\%$ .

Ces augmentations sont de 2,5 à 4 fois par rapport au contrôle tandis que la TCDD engendre une hausse de CYP1A1 de 8 et 7 fois pour les traitements de 2 à 6 jours respectivement.

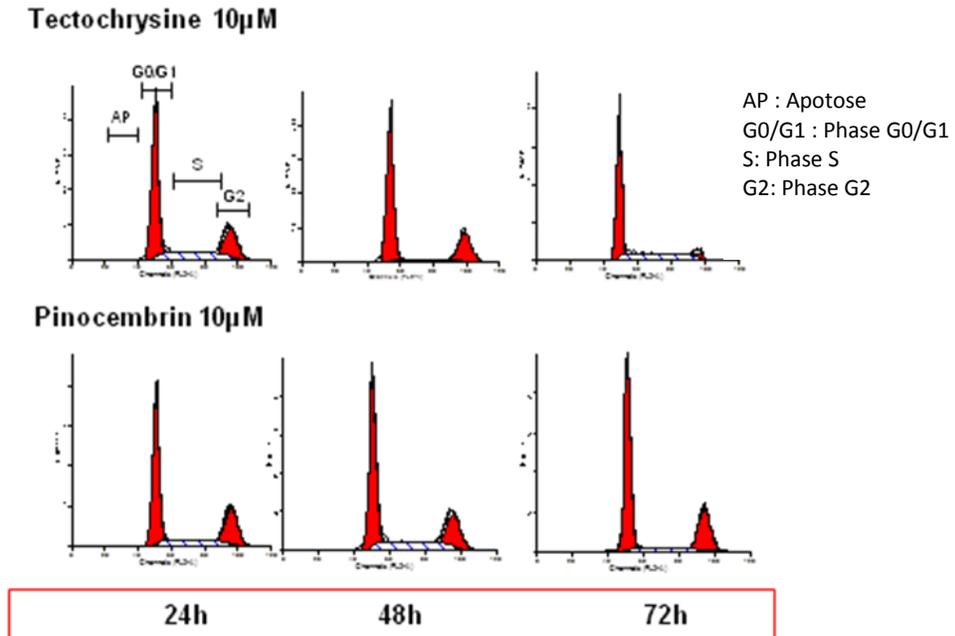
### 3.3. La tectochryisine et la pinocembrine augmentent le nombre de cellules en phase G0/G1 et diminuent les taux d'Akt et de c-myc



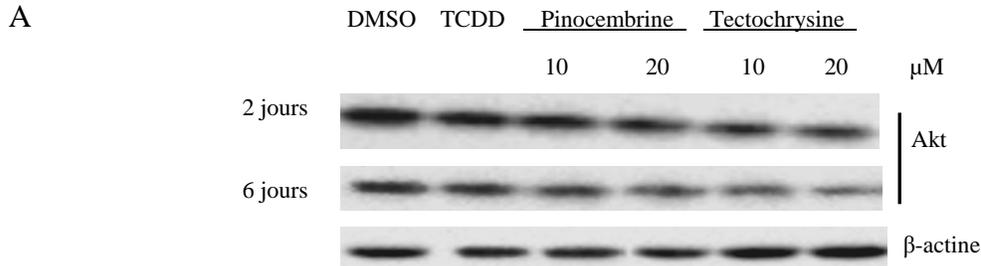
**Figure 3.7. Effets de la tectochryisine et de la pinocembrine sur le cycle cellulaire des cellules mammaires cancéreuses T47D.** Le pourcentage d'augmentation de la phase G0/G1 des cellules T47D par rapport au contrôle (DMSO) a été analysé par la cytométrie en flux. L'effet est évalué en fonction des concentrations respectives de la pinocembrine et de la tectochryisine (5, 10 et 30 µM) et également en fonction du temps (24, 48 et 72h). La compilation des résultats (moyenne ± SD %) est normalisée avec le contrôle (100%). \* p<0,05 \*\*p<0,01

L'analyse des résultats du cycle cellulaire montre que c'est à 10 µM que la tectochryisine et la pinocembrine ont un effet marqué sur la prolifération cellulaire et plus précisément dans le déroulement du cycle cellulaire (figures 3.7 et 3.8). En effet, des augmentations significatives (p<0,05) des cellules T47D en phase G0/G1 sont observées à partir de cette concentration. La pinocembrine et la tectochryisine entraînent respectivement 16,6% et 17,9% d'augmentation de cellules en phase G0/G1 (figure 3.7). Bien que notées à partir de 24h, ces variations sont plus prononcées après 48h. À 10 µM, la tectochryisine a l'effet le plus marqué dans le temps avec une augmentation de 12,7% de cellules en G0/G1 de 24h à 48h.

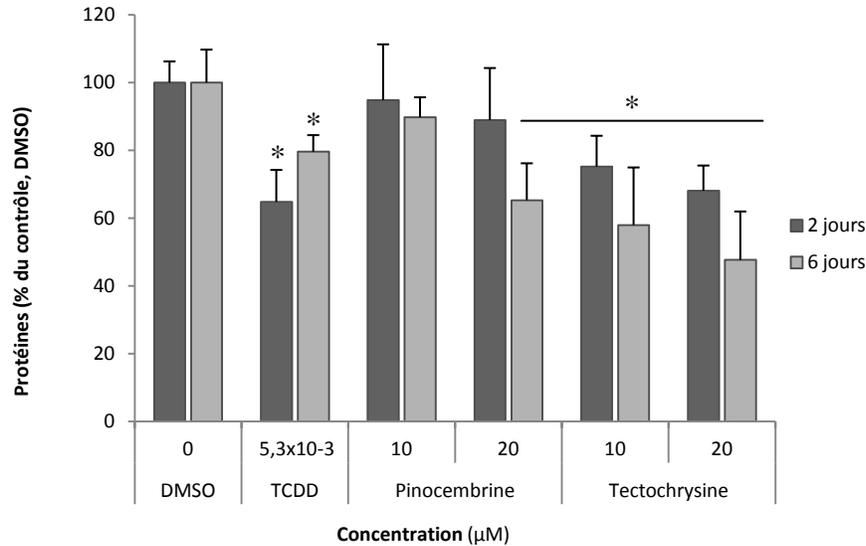
Une différence significative de 9,1% ( $p < 0,05$ ) entre la pinocembrine et la tectochryisine est perceptible pour une concentration de 30  $\mu\text{M}$  à partir de 48h de traitement. Les augmentations respectives observées sont de 21,1% et 30,2% .



**Figure 3.8. Profil du cycle cellulaire des cellules T47D suite aux traitements à 10  $\mu\text{M}$  de pinocembrine et de tectochryisine pour des périodes de 24, 48 et 72h.**



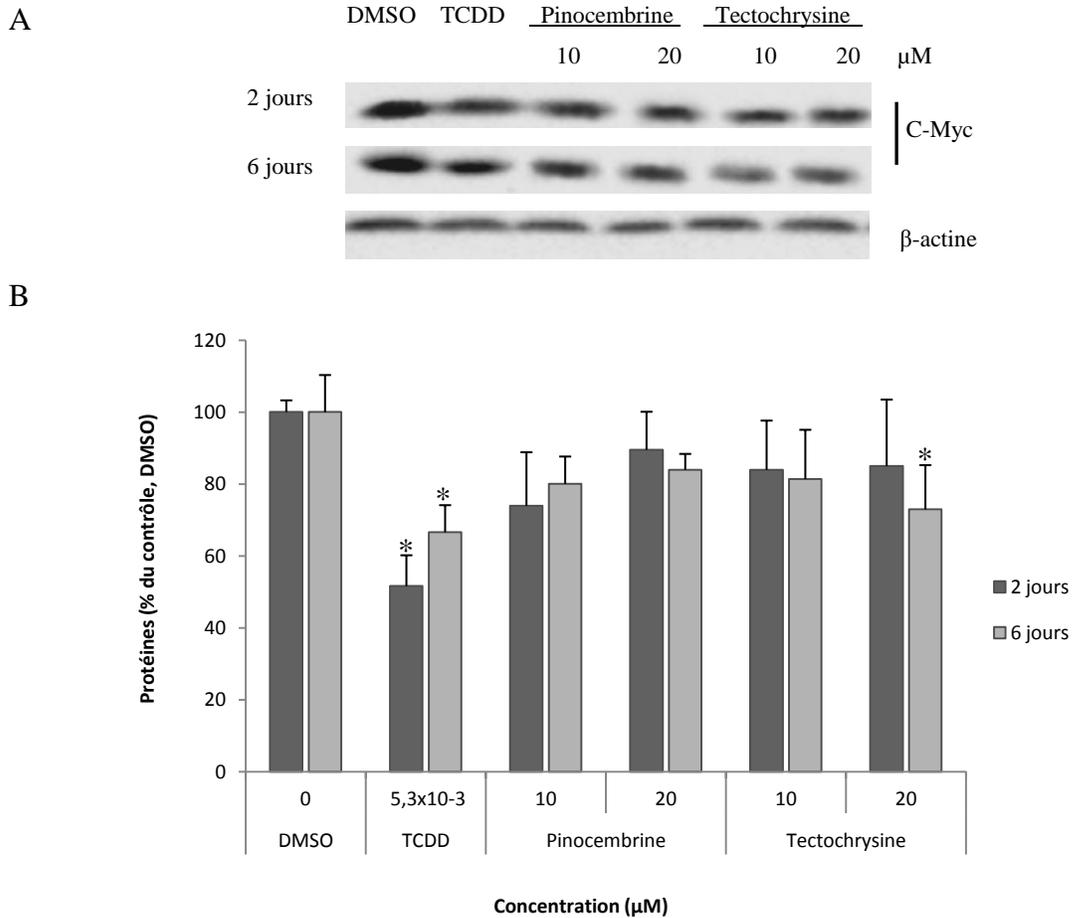
B



**Figure 3.9. La tectochrysin et la pinocembrine induisent une baisse de quantité totale de la protéine Akt.** Les cellules ont été traitées avec la tectochrysin et la pinocembrine aux concentrations indiquées pour des expositions de 2 et 6 jours. L'expression protéique a été déterminée par immunobuvardage de type Western, analysée par densitométrie et normalisée par rapport à l'expression de la β-actine. (A) Les résultats d'une expérience sur trois sont représentés. (B) La compilation des résultats (moyenne ± SD %) est normalisée avec le contrôle (DMSO) (100%). \* p<0,05

La protéine Akt joue un rôle dans la migration et la prolifération cellulaire. L'analyse de l'effet des différents composés sur la quantité totale d'expression de cette protéine a montré dans le cas de la pinocembrine, une diminution significative (p<0,05) des taux de Akt (65,2 ± 10,1%) par rapport au contrôle (DMSO) uniquement lors d'un traitement de 6 jours à 20 μM( figure 3.9).

En revanche, les traitements à la tectochryisine entraînent des baisses significatives ( $p < 0,05$ ) quelques soient les concentrations et temps d'exposition. Pour une même concentration de  $10 \mu\text{M}$ , les taux d'Akt passent de  $75,2 \pm 9,1\%$  à 2 jours pour atteindre les  $58,0 \pm 10,2\%$  après 6 jours de traitement. Lorsque la concentration est doublée, la diminution du taux d'Akt est plus importante : elle varie de  $68,1 \pm 7,4\%$  (2 jours) à  $47,7 \pm 12,1\%$  au terme de 6 jours.



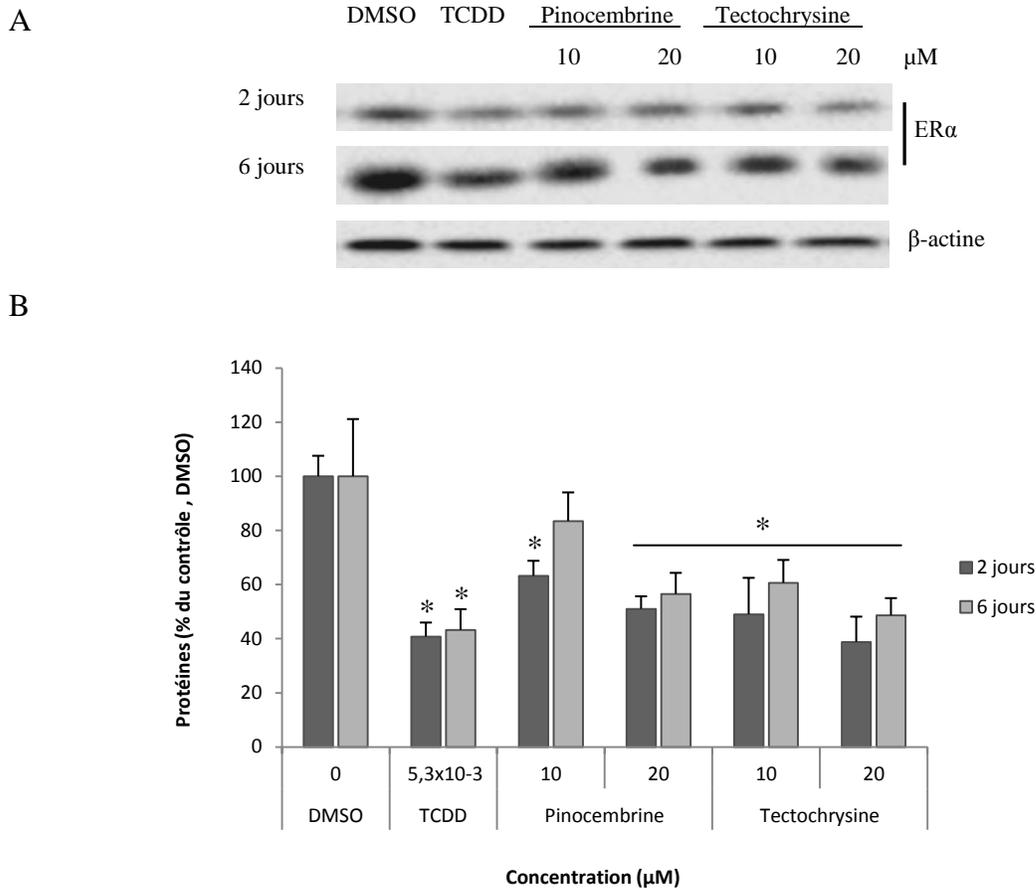
**Figure 3.10. La tectochryisine et la pinocembrine diminuent l'expression protéique de c-myc.** Les cellules ont été traitées avec la tectochryisine et la pinocembrine aux concentrations indiquées pour des expositions de 2 et 6 jours. L'expression protéique a été déterminée par immunobuvardage de type Western, analysée par densitométrie et normalisée par rapport à l'expression de la  $\beta$ -actine. (A) Les résultats d'une expérience sur trois sont représentés. (B) La compilation des résultats (moyenne  $\pm$  SD %) est normalisée avec le contrôle (100%). \*  $p < 0,05$

La protéine c-myc est un proto-oncogène qui a un rôle notamment dans la progression et la régulation du cycle cellulaire. Nous avons recherché d'éventuelles variations de l'expression de cette protéine suite à l'exposition à la pinocembrine et à la tectochrysin dans les conditions citées précédemment (10  $\mu$ M et 20  $\mu$ M; 2 et 6 jours).

Les résultats obtenus (Figure 3.10) montrent globalement une faible baisse de la protéine c-myc, en présence des deux molécules par rapport au contrôle (DMSO). Ainsi dans le cas de la pinocembrine, des taux de c-myc inférieurs au contrôle sont notés, pour les concentrations de 10  $\mu$ M et 20  $\mu$ M au bout de 2 et 6 jours de traitement. Il en est de même pour la tectochrysin après 2 jours à 10  $\mu$ M et 20  $\mu$ M (baisse de 20% de l'expression) et 6 jours avec les deux concentrations.

Il ressort également à la lumière de ces résultats, une diminution maximale de 20% de c-myc avec la pinocembrine à 20  $\mu$ M, suite à 6 jours de traitement. Cette même diminution est atteinte rapidement par la tectochrysin (2 jours) avec des concentrations deux fois plus basses.

### 3.4. La tectochryrine et la pinocembrine engendrent des diminution d'ER $\alpha$ et d'ErbB2

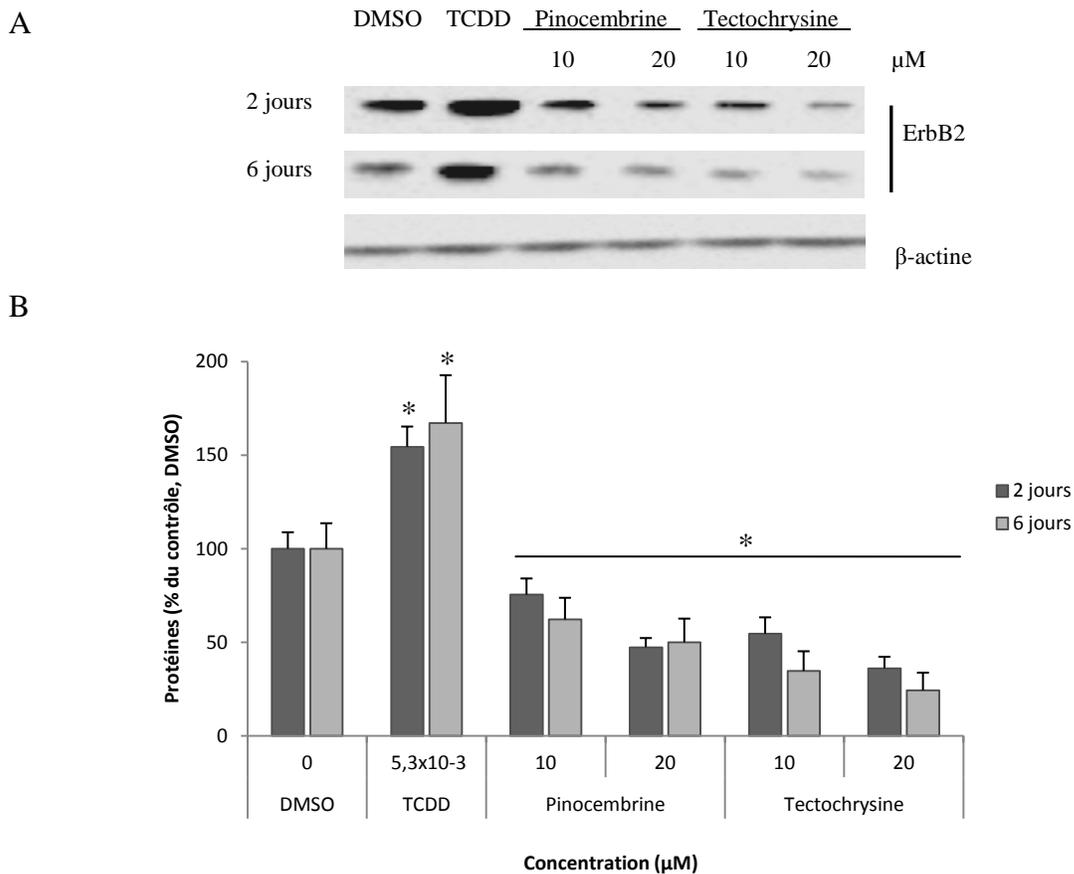


**Figure 3.11. Effets de la tectochryrine et de la pinocembrine sur les quantités totales des récepteurs à l'œstrogène alpha.** Les cellules ont été traitées avec la tectochryrine et la pinocembrine à des concentrations de 10 et 20  $\mu$ M pour des durées de 2 et 6 jours. L'expression protéique a été déterminée par immunobuvardage de type Western, analysée par densitométrie et normalisée par rapport à l'expression de la  $\beta$ -actine. (A) Les résultats d'une expérience sur trois sont représentés. (B) La compilation des résultats (moyenne  $\pm$  SD %) est normalisée avec le contrôle (100%) \* $p < 0,05$

Dans la régulation de la prolifération cellulaire et la différenciation des cellules mammaires cancéreuses, ER $\alpha$  joue un rôle pro-mitogène et nous avons évalué l'effet de la pinocembrine et de la tectochrysin sur les taux d'expression de ce récepteur.

Le traitement avec la pinocembrine et la tectochrysin entraîne des baisses de la quantité totale d'ER $\alpha$  en fonction du temps et de manière dose-dépendante (figure 3.11). L'effet est plus prononcé au bout de 2 jours de traitement pour les deux composés.

Dans le cas de la pinocembrine, une diminution du taux d'ER $\alpha$  de 37% est retrouvée pour une concentration de 10  $\mu$ M après 2 jours de traitement ( $63,2 \pm 5,9$  %). La diminution se maintient à 50% aussi bien pour une exposition de 2 ou 6 jours lorsque la concentration de ce composé est doublée. Cette même diminution ( $49,1 \pm 13,4$ %) est atteinte au bout de 2 jours d'exposition à la tectochrysin à 10  $\mu$ M.



**Figure 3.12. La tectochrysin et la pinocembrine diminuent l'expression protéique du récepteur ErbB2.** Les effets sont différents de la TCDD qui en cause une hausse. Les cellules ont été traitées avec la tectochrysin et la pinocembrine aux concentrations indiquées pour des expositions de 2 et 6 jours. L'expression protéique a été déterminée par immunobuvardage de type Western, analysée par densitométrie et normalisée par rapport à l'expression de la  $\beta$ -actine. (A) Les résultats d'une expérience sur trois sont représentés. (B) La compilation des résultats (moyenne  $\pm$  SD %) est normalisée avec le contrôle (100%). \*  $p < 0,05$

Le récepteur ErbB2 promeut la croissance des cellules mammaires cancéreuses et est à la fois un marqueur pronostique et une cible thérapeutique pour le traitement du cancer du sein. Nous avons exploré l'effet de nos deux composés flavonoïdes sur le taux de ce récepteur.

Les traitements avec la pinocembrine et la tectochrysin engendrent une diminution significative du récepteur ErbB2, en fonction du temps (2 et 6 jours) et de manière dose-dépendante (10  $\mu$ M et 20  $\mu$ M) par rapport au contrôle (DMSO) (figure 3.12). En effet, en présence de pinocembrine, des taux de récepteurs ErbB2 de 75,5% et 47,5% sont retrouvés pour des concentrations respectives de 10  $\mu$ M et 20  $\mu$ M pour une exposition de 2 jours. Pour les mêmes conditions, la tectochrysin a des effets plus marqués avec des taux de récepteurs de 54,6% et 36,7%.

Suite à une exposition plus longue (6 jours), les taux de ErbB2 en présence de pinocembrine à 10  $\mu$ M continuent de baisser (62,2%). Il en est de même pour la tectochrysin qui se caractérise par un effet deux fois plus important (34,7%).

La TCDD a cependant l'effet inverse sur le taux du récepteur ErbB2 avec des augmentations au-delà de 150% du contrôle.

## CHAPITRE 4 : DISCUSSION

L'activation de AhR est connue pour réguler l'expression de nombreux gènes se traduisant par des effets toxiques et/ou biologiques variant entre les espèces et les tissus. Les résultats d'études déjà publiés démontent que l'activation constitutive d'AhR promeut la carcinogenèse, la croissance ou l'invasion des cellules cancéreuses dans les cancers urogénital, du poumon, de l'estomac, du sein et d'autres [157].

Dans le cas du cancer du sein, les récepteurs hormonaux sont des cibles actuellement utilisées efficacement dans le traitement des cancers mammaires hormono-dépendants. Toutefois, leur présence relative varie grandement selon le sous-type de cancer et l'individu, faisant varier l'efficacité des traitements. De plus, les cancers mammaires hormono-indépendants ont un mauvais pronostic car notamment, les traitements ciblés manquent. En ce sens, AhR est évalué comme cible thérapeutique dans le traitement du cancer du sein. Effectivement, AhR est surexprimé dans les cellules mammaires cancéreuses et constitutivement activé dans les stades de cancer avancés. Les recherches des cinq dernières années abondent dans le sens qu'AhR serait un biomarqueur pour l'établissement de pronostic pour le cancer du sein.

AhR se lie à des ligands endogènes et exogènes, tel qu'amené précédemment. En outre, de nombreux composés alimentaires ont été signalés être des ligands agonistes d'AhR. Certains flavonoïdes ont des effets suppresseurs de tumeurs et bloquent la cancérogenèse. Ils induisent la biosynthèse de plusieurs enzymes du cytochrome et inhibent directement et indirectement les substances pro-carcinogènes et leurs interactions dans les voies mitogènes et apoptotiques, diminuant l'évolution de la carcinogenèse.

Les résultats de la présente recherche montrent que la tectochrysin et la pinocembrine, deux flavonoïdes, diminuent la croissance de cellules T47D par des mécanismes dépendants de AhR et d'ErbB2. Nos résultats montrent aussi que l'activation de AhR par ces molécules inhibe la prolifération cellulaire ainsi que la croissance de points

d'adhérence cellulaire, un signe de baisse de prolifération cellulaire, (figure 3.3) possiblement par un mécanisme impliquant l'interaction d'AhR et ER.

#### **4.1. La tectochrysin et la pinocembrine sont des agonistes de AhR et induisent la synthèse de CYP1A1**

Nous avons d'abord validé la tectochrysin et la pinocembrine comme ligand d'AhR dans les cellules humaines mammaires cancéreuses T47D. Étant donné que la tectochrysin et la pinocembrine montrent leurs premiers effets significatifs de diminution de la viabilité à une concentration de 20µM (figures 3.1 et 3.2), nous avons utilisé cette concentration et sa moitié (10 µM), pour les analyses par immunobuvardage de type Western.

Les deux flavonoïdes induisent une baisse de la concentration totale du récepteur Ah de manière dose-dépendante et en fonction du temps (figure 3.4). Ces résultats indiquent que AhR a été dégradé suite à son activation ou qu'une baisse de la synthèse du récepteur est survenue. L'augmentation des taux de l'enzyme CYP1A1 par les deux molécules vient confirmer l'induction de son expression, qui est dépendante de l'activation de AhR (figure 3.5). Les baisses d'AhR sont donc dues, en totalité ou en partie, à la dégradation du récepteur suite à son activation par les ligands. Une baisse de la synthèse du récepteur n'a cependant pas été investiguée, ce qui serait pertinent d'évaluer dans une étude future. Amakura et al. ont rapporté un degré d'affinité marqué de la tectochrysin et de la pinocembrine pour AhR suggérant qu'ils en sont des ligands naturels : les deux flavonoïdes ont induit l'activité de la luciférase via l'activation de AhR lors de tests CALUX [270, 271]. Par ailleurs, Bisson et al. ont montré que la tectochrysin et la pinocembrine induisent une forte activation du récepteur par arrimage moléculaire en plus de promouvoir la translocation d'AhR dans le noyau et l'activation de CYP1A1 dans les cellules hépatiques de souris [274].

L'induction de l'expression de l'enzyme CYP1A1 par la tectochrysin et la pinocembrine confère à ces molécules un pouvoir antiprolifératif sur les cellules mammaires cancéreuses exprimant les récepteurs à l'estrogène. Effectivement, la CYP1A1 a un effet catalytique sur l'oestradiol (E2) qui est enzymatiquement transformé en 2

hydroxyestradiol (2-OH-E2) et ensuite en 2-methoxy-E2 (2-MeOE2) par le catéchol *O*-méthyl transférase (COMT). Par conséquent, le taux d'œstrogène diminue, réduisant l'activation d'ER et conséquemment, l'expression de PR. De plus, le 2-methoxy-E2, qui est une molécule non-carcinogène, inhibe l'angiogenèse et la croissance de cellules mammaires tumorales [164, 165].

Nous avons ensuite regardé l'effet de la tectochrysine et de la pinocembrine sur la protéine HSP90 qui est une cible thérapeutique dans les traitements contre le cancer. En absence de ligand et en stade quiescent, AhR se lie à un complexe protéique, comprenant la protéine chaperonne HSP90, et plusieurs de ces protéines ont un impact sur son processus d'activation. HSP90 agit sur les segments b-HLH et PAS d'AhR pour préserver sa capacité d'interaction avec l'ADN, la fonctionnalité du site de fixation du ligand et sa capacité d'hétérodimérisation avec ARNT. L'ancrage du ligand brise la liaison AhR-HSP90. Des changements dans les résidus sérines de la protéine HSP90 engendrent une augmentation de son affinité pour AhR, ce qui se traduit par une augmentation du potentiel transcriptionnel du récepteur. Des sites de phosphorylation de HSP90 ont été identifiés (Sérines 225 et 254 pour HSP90 $\alpha$  et Sérine 230 pour HSP90 $\beta$ ) qui influenceraient l'expression génique dépendante de AhR. Effectivement, une fois phosphorylée, HSP90 possède une affinité plus forte pour AhR et potentialise ainsi l'activité transcriptionnelle du récepteur activé [306, 307].

La geldanamycine est une molécule qui occupe le site de liaison ADP/ATP de HSP90 et perturbe les fonctions de la protéine chaperonne de façon à ce qu'elle ne parvienne plus à stabiliser la protéine AhR, qui est alors plus sujette à la dégradation par les protéasomes [308]. L'EGCG, une catéchine du thé, se lie à HSP90 et inhibe la transcription induite par AhR [309]. Or nos résultats montrent que la tectochrysine et la pinocembrine n'affectent pas le niveau de la protéine HSP90. Basé sur cette observation, nous proposons que les effets anticarcinogènes observés ne sont pas liés à une interaction avec cette protéine chaperonne.

Néanmoins, il est important de souligner le rôle potentiel de HSP90 car elle compte parmi ses protéines cibles AhR [310, 311], le récepteur ErbB2 [312-315] et les kinases Akt [316-318] qui sont toutes des protéines pour lesquelles nous avons observé des modulations, de même que c-src et la télomerase [319-322]. Les données rapportées dans la littérature nous permettent de croire en l'implication de HSP90 dans la modulation des voies de signalisation dépendantes de AhR. Effectivement, l'inhibition de HSP90 par des inhibiteurs spécifiques, tel que la geldanmycine et ses dérivés, diminuent la croissance de cellules cancéreuses et la synthèse de CYP1A1 et CYP1B1 médiée par AhR [323, 324]. Étant donné que nos résultats ne montrent pas de diminution de HSP90, les modulations dans l'expression des protéines observées ne seraient pas tributaires d'une inhibition de HSP90 par la tectochrysin et la pinocembrine.

#### **4.2. La tectochrysin a des effets antiprolifératifs plus élevés que la pinocembrine**

Nos résultats montrent de manière générale que la tectochrysin a un effet plus marqué sur la diminution du taux de AhR, sur l'expression de CYP1A1 ainsi que sur l'inhibition de la croissance cellulaire. Étant donné que les ligands ayant un haut degré d'affinité pour AhR sont des molécules hautement lipophiles, nous émettons l'hypothèse que le groupement méthyle de la tectochrysin, lui conférant un plus haut degré de liposolubilité, ainsi que son caractère planaire serait à l'origine d'un plus grand degré d'affinité avec AhR. Dans ce sens, la méthylation du chrysène et du phénanthène, deux substances toxiques, augmente leur affinité avec AhR de deux à cinq fois [325, 326]. Les effets cytotoxiques de l'indirubine, un ligand d'AhR, sont liés à l'inhibition de kinases et seraient indépendants d'AhR. Cependant, Knockaert et al. montrent que les dérivés méthylés de l'indirubine induisent un arrêt marqué du cycle cellulaire en G1 indépendamment de l'inhibition de kinases. Cet aspect est intéressant car la substitution du groupement méthyle interfère avec la capacité de la molécule à se lier au site catalytique des cyclines dépendantes des kinases (Cdk). Ceci suggère que certains effets cytotoxiques et sur le cycle cellulaire des dérivés méthylés sont dépendants d'AhR [327].

#### **4.3. La tectochryisine et la pinocembrine diminuent la prolifération et la viabilité cellulaire des cellules T47D.**

L'évaluation de l'effet des deux molécules sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire ont révélé leurs effets antiprolifératifs. Suite à l'étude de la morphologie des cellules traitées, la diminution du caractère invasif des cellules suite au traitement à 10 et 20  $\mu\text{M}$  de tectochryisine et de pinocembrine est attestée : la réduction ou l'absence de points d'adhérence cellulaires et de protubérances de croissance sont observés après 6 jours de traitement (figure 3.3). Ces observations, attestées conjointement avec le profil morphologique similaire des cellules traitées avec 5,3 nM de TCDD, suggèrent que la diminution du caractère invasif des cellules serait liée à des mécanismes antiprolifératifs dépendants de l'activation du AhR. Il est possible que ces effets soient tributaires d'un mécanisme impliquant l'interaction d'AhR et l'expression des métalloprotéases (MMPs), ces enzymes participant à l'angiogenèse par le remodelage de la matrice cellulaire. La pinocembrine a d'ailleurs réduit l'expression de MMPs (MMP-1, MMP-3 et MMP-13) dans les chondrocytes [328].

Les voies de signalisation d'AhR et d'ER induisent l'expression des MMPs et l'augmentation du caractère invasif de plusieurs types de cellules malignes cancéreuses, notamment dans les cellules de carcinomes gastrique, urinaire et le mélanome [329-331]. Les MMPs ont un rôle important dans l'acquisition du caractère invasif des cellules mammaires cancéreuses [130, 162, 332]. Parallèlement, il est connu que l'activation d'AhR par la TCDD inhibe l'expression de gènes dépendants d'ER *in vitro* [162]. Dans les cellules de neuroblastome humain, un traitement avec l'estradiol a augmenté l'expression de sous-types de MMPs telles que MMP-2 et MMP-9 suggérant donc un lien entre l'activation d'ER et l'expression des MMPs [333]. De plus, dans les cellules cancéreuses mammaires T47D et ZR75-1 traitées avec la TCDD et l'estradiol, l'expression de MMPs induites dépendamment de l'estradiol a été contrecarrée par la TCDD [157]. Il est donc possible que la tectochryisine et la pinocembrine suppriment le caractère invasif des cellules mammaires cancéreuses par une régulation à la baisse de l'expression des MMPs via AhR et par une interaction entre AhR et ER. Dans cette

optique, il serait intéressant d'évaluer l'effet de la tectochrysin et du pinocembrin sur l'expression de MMPs dans les cellules mammaires cancéreuses. Nos observations morphologiques (figure 3.3) observées pour 6 jours de traitement suivent la tendance observée sur la viabilité cellulaire à (figure 3.1) engendrée par les deux molécules après 48h. La concentration de 20  $\mu\text{M}$  de tectochrysin et de pinocembrine a engendré des baisses de viabilité cellulaire de 25% et 17% respectivement en 48 heures.

La diminution de la viabilité cellulaire par la tectochrysin et la pinocembrine (figure 3.1) peut être due à divers mécanismes. Pour une même période de temps, des effets cytotoxiques ont été constatés (figure 3.2). La diminution de la viabilité cellulaire sur les cellules mammaires cancéreuses pourrait être tributaire de mécanismes dépendants de l'activation d'AhR. Effectivement, la tectochrysin présente une activité antitumorale modérée sur les cellules mammaires cancéreuses Hela ( $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ), qui ne répondent pas aux agonistes de AhR [273] tandis qu'une  $\text{IC}_{50}$  de 52,5  $\mu\text{M}$  a été montrée sur la lignée cellulaire hépatique HepG2 qui répond bien aux agonistes de AhR. Bien qu'il s'agisse de deux lignées de provenance distincte, elles n'expriment ni les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, ni ErbB2 [272]. Ces données suggèrent que la tectochrysin pourrait engendrer une cytotoxicité dépendante d'AhR. Nos résultats montrent une  $\text{IC}_{50}$  de 67,6  $\mu\text{M}$  pour la pinocembrine et 49,5  $\mu\text{M}$  pour la tectochrysin sur les cellules T47D (figure 3.1, tableau 3.1). Parallèlement, Khamis et al. ont montré une toxicité modérée ( $\text{IC}_{50}$  de 74,6  $\mu\text{M}$ ) de la tectochrysin sur les cellules mammaires cancéreuses MCF-7, une lignée exprimant les récepteurs aux œstrogènes [334].

Nos résultats montrent une cytotoxicité de la tectochrysin et de la pinocembrine par une baisse de viabilité cellulaire (figure 3.1) et une augmentation de la libération de LDH par rapport au contrôle, un indicateur de nécrose (figure 3.2). Toutefois, la libération de LDH engendrée par la tectochrysin et la pinocembrine est faible par rapport au maximum. Alors que ces deux types de mort cellulaire surviennent selon des mécanismes distincts, Szychowski et al. ont montré que l'activation de AhR dans les cellules neurales (avec et sans ARN interférant avec AhR) par le Triclosan induit l'activation de la caspase-3, un indicateur d'apoptose, et la libération de LDH [335]. Les deux modes de

mort cellulaire sont aussi induits dans les cellules cancéreuse KB (cellules cancéreuses du col de l'utérus) par la sanguinarine pour 2 et 3 $\mu$ M [336]. La sanguinarine est un alcaloïde de la famille des PAH dont la capacité de se lier à AhR est mitigée [337-339]

Dans des cellules du cancer du colon et du sein (MCF-7), la tectochrysin a montré induire l'apoptose en diminuant NF- $\kappa$ B [278], inhiber la phosphorylation de Stat3 [277], et ainsi induire l'expression des protéines pro-apoptotiques (caspase-3, Bax, cytochrome c, DR3, DR4, Fas) et la diminution de l'expression de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2 et IAP). Dans ces études, la tectochrysin a montré interagir directement avec NF- $\kappa$ B et Stat3, lui conférant donc un effet apoptotique indépendant d'AhR. Considérant que les cellules T47D surexpriment Bcl-2 [340] et que AhR a montré avoir des effets directs et indirects avec NF- $\kappa$ B [340], une diminution de la viabilité cellulaire des cellules T47D via AhR n'est pas exclue. La chrysin, un flavone ligand de AhR différant de la tectochrysin par un groupement hydroxyle à la place de son groupement méthyle, a montré une diminution de viabilité cellulaire sans manifestation d'apoptose à 20 $\mu$ M pour 48h d'exposition sur les cellules mammaires cancéreuses triple-négatives (MDA-MB-231). Toutefois, la chrysin a engendré l'apoptose via AhR dans des cellules du cancer du côlon à 100 $\mu$ M après 24h et 48h [341].

Par ailleurs, dans les cellules du cancer du côlon, la pinocembrine induit l'apoptose mitochondriale via l'interaction avec la protéine apoptotique Bax malgré une surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub>. L'apoptose induite par la pinocembrine ferait donc intervenir des mécanismes indépendants de la voie mitochondriale en interférant contre les mécanismes anti-apoptiques de Bcl-X<sub>L</sub> [285]. Ceci conférerait à la pinocembrine un aspect thérapeutique intéressant étant donné que l'évasion de l'apoptose dû à la surexpression de Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> est une cause de l'échec de certains traitements contre le cancer du sein [342]. Considérant nos résultats et les données de la littérature, il serait pertinent de traiter les cellules T47D au DAPI suite au traitement à la tectochrysin et à la pinocembrine afin d'évaluer si les composés engendrent la formation de corps apoptotiques. Parallèlement, il serait aussi intéressant

de mesurer la variation d'expression de protéines régulant l'apoptose, tel que Bax et Bcl-2, dont l'expression est régulée par AhR [343, 344].

Un niveau élevé de AhR constitutivement actifs est retrouvé dans certaines tumeurs mammaires cancéreuses, ce qui est associé à la progression de carcinomes mammaires vers des stades invasifs et métastatiques [153, 345]. L'activation d'AhR par la TCDD et plusieurs de ses ligands peut engendrer une diminution de la prolifération de cellules mammaires cancéreuses via l'inhibition des mécanismes prolifératifs de voies liées à la voie oestrogénique ainsi qu'à des voies de signalisation mitotiques. La tectochryisine a d'ailleurs montré avoir un effet cytotoxique dépendant d'AhR et indépendant des voies de signalisation hormonales liées à l'oestrogène, à la progestérone et à ErbB2 dans des cellules mammaires cancéreuses [346].

#### **4.4. La tectochryisine et la pinocembrine engendrent une augmentation des cellules en phase G0/G1 ainsi qu'une diminution des taux de protéines c-myc et Akt**

AhR est reconnu pour être un régulateur endogène du cycle cellulaire en absence de ligand exogène. Son rôle endogène est reflété dans la progression plus lente en phase G1 ainsi qu'un temps de doublement des cellules plus long dans cellules hépatiques et les fibroblastes de souris dans lesquelles il y a eu l'extinction génique d'AhR [347-349]. Effectivement, il favorise la progression du cycle cellulaire en l'absence de ligands exogènes, tandis que le traitement avec des ligands exogènes induit un arrêt du cycle cellulaire.

Les mécanismes impliqués dans l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire qui sont orchestrés par l'activation de AhR par la tectochryisine et la pinocembrine (figures 3.7 et 3.8) peuvent être multiples. Nos résultats montrent que la tectochryisine et la pinocembrine induisent une baisse des taux de c-myc (figure 3.10), qui est un régulateur positif des kinases cyclines dépendantes (CDK) responsables du passage de la phase G1 à S [350]. C-myc est une onco-protéine dont le promoteur contient six sites de liaison pour AhR. Ce récepteur influence l'expression de c-myc qui, lorsque surexprimée dans les

cellules cancéreuses, a un rôle critique dans le passage des cellules cancéreuses dans un stade malin. Effectivement, lorsqu'activé de manière constitutive sans ligands exogènes, AhR réprime l'expression de c-myc dans les cellules mammaires cancéreuses [351]. Nous ne savons pas si AhR est activé de manière constitutive les cellules T47D. Ceci dit, l'équipe de Chen et al. a montré que, dans les cellules mammaires cancéreuses résistantes aux traitement inhibant l'aromatase, c-myc était surexprimé par un mécanisme dépendant de l'interaction entre ErbB2 et ER $\alpha$  [352]. Or, nos résultats montrent des baisses d'ER $\alpha$  et d'ErbB2 suite aux traitements à la tectochrysine et à la pinocembrine. Il serait donc intéressant d'investiguer si ces baisses sont liées aux baisses de c-myc observées en évaluant l'expression de AP1, une protéine activatrice impliquée dans l'induction de l'expression de c-myc par ER $\alpha$ . Étant donné que la signalisation de MAPK induite par ErbB2 est impliquée dans l'activation constitutive de ER $\alpha$  dans les cellules mammaires cancéreuses, l'évaluation de taux de MAPK phosphorylé donnerait une indication sur la signalisation entre ErbB2 et ER $\alpha$  [352-354].

Au cours du cycle cellulaire, la progression de la phase G1 à la phase S est régulée par la phosphorylation séquentielle de la protéine du rétinoblastome (pRB) par les kinases dépendantes des cyclines (Cdk) 4/6, qui sont régulées par la cycline D1. AhR faciliterait la progression du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses mammaires par son interaction fonctionnelle avec Cdk4 et la cycline D1 en formant le complexe AhR/Cdk4/Cycline D1. Cette interaction est perturbée par les ligands exogènes, tel que la TCDD, qui induisent un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1 [355]. La liaison de la tectochrysine et de la pinocembrine à AhR perturbant le complexe AhR/Cdk4/Cycline D1 est un mécanisme par lequel ces deux flavonoïdes peuvent induire un arrêt du cycle cellulaire et une augmentation de cellules en phase G1.

Pour les cellules exposées aux agonistes de AhR, l'interaction entre AhR et la protéine du rétinoblastome (pRB) est un point de contrôle important du cycle cellulaire. En ce sens, nous savons que le recrutement de AhR au promoteur des gènes régulés par pRB entraîne la formation d'interactions protéiques spécifiques. Celles-ci obstruent le promoteur, empêchant ainsi l'accès à l'ADN par des protéines activatrices ce qui bloque ultimement

l'initiation de la transcription génique et donc, un arrêt au niveau du cycle cellulaire [126, 356]. L'évaluation de la tectochryisine et la pinocembrine sur la phosphorylation de pRB

Un autre mécanisme à l'origine d'un arrêt en G0/G1 est la métabolisation de l'estradiol via l'activation d'AhR. Nos cellules n'ont pas été traitées avec l'estradiol, mais il est bien connu que la prolifération de cellules mammaires cancéreuses induite par l'estradiol est inhibée suite à sa dégradation par CYP1A1 suite à l'activation d'AhR. C'est principalement un arrêt du cycle cellulaire qui est engendré [130, 357, 358]. Effectivement, une diminution d'estradiol dans les cellules mammaires cancéreuses induit l'inhibition de la synthèse de la cycline D1, réduisant l'activité de Cdk4 et Cdk2 ainsi que de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRB) subséquente [359]. La tectochryisine et la pinocembrine auraient donc le potentiel de contrecarrer une augmentation du cycle cellulaire induite par l'estradiol, ce qui serait intéressant d'investiguer.

Akt est un intermédiaire important dans la régulation du cycle cellulaire et est l'un des facteurs anti-apoptotiques majeurs dans la voie apoptotique. Une diminution de la protéine Akt par des molécules phytochimiques telles que par la curcumine dans des cellules du lymphome [205] et par la génistéine dans des cellules mammaires cancéreuses [206] mènent à un arrêt de la prolifération cellulaire. Effectivement, Gong et al. ont constaté une baisse de phosphorylation concomitante avec une baisse du taux de la protéine Akt avec un traitement à la génistéine dans les cellules MCF-7. Les mécanismes sous-jacents n'ont cependant pas été investigués, mais la curcumine et la génistéine sont deux agonistes de AhR.

Nos résultats montrent que la tectochryisine et la pinocembrine modulent à la baisse les taux cellulaires d'Akt dans les cellules T47D (figure 3.9). Ceci suggère que la baisse de prolifération et l'arrêt du cycle cellulaire constatés sont reliés à une baisse d'Akt. Une modulation d'AhR par la 3'-methoxy-4'-nitroflavone, un antagoniste d'AhR, a mené à une réduction significative du taux de phosphorylation d'Akt dans les cellules d'hépatome de souris [360], menant à une augmentation de l'apoptose. De plus, la

quercétine-6-C- $\beta$ -d-glucopyranoside, un analogue naturel de la quercétine, a engendré une baisse de la phosphorylation d'Akt via une activation d'AhR dans des cellules humaines du cancer de la prostate: une diminution de la prolifération cellulaire et un arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 ont été observés [361]. Étant donné que plusieurs agonistes de AhR induisent une diminution de la phosphorylation d'Akt, il serait pertinent d'évaluer les effets de la tectochrysin et de la pinocembrine sur la modulation du taux de phosphorylation d'Akt.

La dégradation des protéines dans les protéasomes par le recrutement d'ubiquitines ligases est important pour la régulation de nombreuses fonctions cellulaires, y compris pour la croissance et le cycle cellulaire. L'activation d'AhR peut mener au recrutement d'ubiquitines ligases et engendrer une telle dégradation, tel qu'il en est le cas avec l'activation d'AhR par l'indol-3-carbinol dans les cellules mammaires cancéreuses, occasionnant la dégradation d'ER $\alpha$  dans les protéasomes suite au recrutement de l'ubiquitine ligase E3- Rbx-1 par AhR [134]. Le recrutement d'ubiquitines ligases de type E3 est aussi impliqué dans la dégradation d'Akt. Les ubiquitines ligases E3 TTC3 [362] et NDDA-1 [363] sont recrutées pour la dégradation de kinases. Une dégradation d'Akt et d'ER $\alpha$  dans les protéasomes médiée par le recrutement d'ubiquitine ligase via AhR serait à investiguer dans notre modèle.

#### **4.5. La tectochrysin et la pinocembrine induisent une baisse d'expression d'ER $\alpha$ et d'ErbB2**

La signalisation induite par l'activation d'ER induit l'expression de gènes impliqués dans la progression du cancer du sein et dans son évolution vers le stade métastatique. ER $\alpha$  est le sous-type d'ERs le plus abondant dans l'épithélium mammaire et, surexprimé dans les carcinomes mammaires, son rôle est prépondérant dans la progression du cancer du sein [364]. L'interaction entre AhR et ER a été étudiée via la liaison d'AhR avec la TCDD *in vitro* et par le traitement à long terme sur les rats Sprague Dawley. Il a été observé que l'activation d'AhR inhibe l'activité d'ER par différents mécanismes et plusieurs études font l'état d'une diminution de l'expression des gènes induits par l'estradiol [365].

Nos résultats montrent une diminution du taux d'ER $\alpha$  en absence d'estradiol suite à l'exposition à la tectochrysin et à la pinocembrine (figure 3.11), tel qu'il l'a déjà été démontré dans les cellules mammaires cancéreuses traitées à la TCDD [163, 365, 366].

Un autre mécanisme pouvant expliquer une baisse du taux d'ER $\alpha$  serait le recrutement d'ER par AhR. Effectivement, Matthiew et al. ont montré par immunoprécipitation de chromatine qu'ER $\alpha$  est recruté au promoteur des gènes CYP1A1 et CYP1B1 régulés par AhR dans les cellules mammaires cancéreuses sans supplément d'estradiol et dépendant de l'exposition à la TCDD. ER $\alpha$  n'est cependant pas recruté aux promoteurs des gènes induits par l'estradiol [132]. Cette interaction interviendrait par une interaction protéine-protéine directe entre AhR et ER. Ceci suggère qu'ER $\alpha$  agit comme co-régulateur de la transcription génique d'AhR et que celui-ci peut réguler les taux de protéines d'ER $\alpha$ , et conséquemment, la réponse estrogénique [161, 162]. Ce même mécanisme a été montré avec l'aminoflavone (AF), un flavone synthétique agoniste d'AhR en phase clinique de développement comme traitement contre le cancer du sein avec AhR comme cible thérapeutique. L'activité antitumorale d'AF est liée à la translocation nucléaire du complexe AF-AhR et l'induction subséquente de CYP1A1/CYP1A2, l'activation de la sulfotransférase 1A1 (SULT1A1) et des dommages à l'ADN par certains de ses métabolites et des dérivés réactifs de l'oxygène [367, 368]. Callero et al. ont montré que le complexe nucléaire AF-AhR recrute ER $\alpha$  aux promoteurs des gènes CYP1A1 régulés par AhR dans les cellules mammaires cancéreuses humaines et par conséquent, augmente la cytotoxicité de l'aminoflavone [369]. Ceci suggère qu'un tel mécanisme pourrait être à l'origine de la baisse des taux d'ER $\alpha$  et de la cytotoxicité induite par la tectochrysin et la pinocembrine, ce qui serait intéressant d'investiguer avec les cellules T47D. Les signaux induisant le recrutement de AhR à ER $\alpha$  ne sont pas connus. Ceci dit, il est possible que ces signaux impliquent d'autres kinases étant donné que l'activation du domaine AF1 de ER $\alpha$ , qui est nécessaire à l'interaction protéine-protéine, implique des voies de signalisation induite par des kinases.

ER $\alpha$  affecte la transcription de gènes prolifératifs comme le PCNA et des gènes antiapoptotiques tels que la survivine et Bcl-2 [52]. D'autres gènes répondent également

aux ER $\alpha$  tels que les gènes WNT11 qui auraient un rôle inhibiteur de l'apoptose dans le cancer du sein. Ainsi plusieurs gènes cibles sont impliqués dans la transduction, la transcription et la coactivation et l'évaluation de la variation de la transcription de gènes dépendants d'ER $\alpha$  dans les cellules T47D serait une suite intéressante à notre étude.

Plusieurs types de cancer surexpriment les EGFR, notamment ErbB2 et ErbB3, particulièrement dans le cancer du sein [77]. Les voies de signalisation des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) et de la phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase (PI3K) sont initiées par tous les complexes récepteurs/ligands des EGFR. Dans les cellules T47D, la TCDD diminue les taux de récepteurs à l'œstrogène mais augmente le taux d'ErbB2 [370]. Les carcinomes mammaires qui surexpriment ErbB2 sont associés à la formation de métastases et à un mauvais pronostic. Les données de nos recherches montrent une diminution d'ErbB2 par la tectochrysin et la pinocembrine (figure 3.12), qui jusqu'ici démontraient des effets agonistiques de AhR. Une telle diminution attesterait d'un mécanisme antagoniste des deux molécules étant donné que la TCDD en cause une augmentation. Le mécanisme par lequel les deux flavonoïdes engendrent une baisse d'ErbB2 via AhR reste à déterminer.

Ceci dit, il est possible que nos molécules engendrent une diminution d'ErbB2 en agissant sur la protéine kinase C (PKC). La stimulation de la protéine kinase C alpha (PKC $\alpha$ ) induit l'expression de ErbB2 alors que son inhibition, par traitement pharmacologique et par ARN interférents spécifiques, a montré réguler à la baisse les taux de ErbB2 dans les cellules mammaires cancéreuses [371]. Or, plusieurs flavonoïdes inhibent PKC : l'inhibition directe de PKC purifiée de cellules neurales par des flavonoïdes a montré que les flavones et les flavonols sont les inhibiteurs les plus puissants de PKC. La fisétine, la quercétine, la myricétine et la luteoline, qui sont aussi des ligands d'AhR, ont les effets inhibiteurs maximaux dans ce modèle [372-374]. De surcroît, plusieurs flavonoïdes inhibent la promotion tumorale induite par 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), dont PKC est le récepteur et effecteur de ses effets cellulaires [375]. Par exemple, la galangine est un flavonol qui a inhibé les niveaux de PKC $\alpha$ , PKC $\delta$  et p-ERK1/2 induits par TPA dans les cellules cancéreuses hépatiques

HepG2. Une diminution des taux de NF- $\kappa$ B et AP-1 a aussi été observée [376]. Il est donc possible que la tectochryisine et la pinocembrine diminuent l'expression d'ErbB2 en agissant comme inhibiteur allostérique de PKC $\alpha$ .

De plus, dans les cellules du cancer du poumon, un traitement à la tectochryisine a montré inhiber la phosphorylation de Stat3 [277]. L'activation d'ErbB2 est en amont de l'activation de la voie de signalisation JAK1/Stat3. La tectochryisine a également montré diminuer l'expression de COX-2 [280] et Stat3 en est un facteur de transcription. Il serait intéressant d'investiguer dans les cellules T47D l'effet de la tectochryisine et la pinocembrine sur l'activité de PKA $\alpha$ , considérant nos résultats obtenus avec ErbB2, et la signalisation inflammatoire oncogénique induite par JAK1/Stat3.

Nos résultats montrent des effets opposés de la TCDD par rapport à la tectochryisine et à la pinocembrine sur l'expression d'ErbB2 (figure 3.12) et ceci pourrait être expliqué par leur action inverse sur PKC $\delta$ . La TCDD a montré activer PKC $\alpha$  et PKC $\delta$  dans les chondrocytes [377], alors que la pinocembrine a montré inhiber l'activation de PKC $\delta$  en occupant son site de liaison C1B dans les macrophages [301]. Les analyses de cancers mammaires exprimant ErbB2 montrent une surexpression de PKC $\delta$  et une corrélation négative entre son expression et le pronostic [378]. Allen-Peterson et al. montrent *in vivo* (souris transgéniques surexprimant ErbB2) et *in vitro* sur des cellules mammaires cancéreuses humaines, que l'activation de PKC $\delta$  est un régulateur de la croissance tumorale engendrée par ErbB2 en déclenchant la formation du complexe ErbB2/PKC $\delta$ /Src, initiant ainsi les voies de signalisation prolifératives en aval de ErbB2, tel que Src et MAPK/ERK [378].

Les recherches de Zhao et al. attestent que la voie de signalisation ErbB2/MEK/ERK induit l'augmentation de l'expression d'AhR dans les carcinomes mammaires, suggérant qu'ErbB2 est un effecteur de l'activation constitutive et de la surexpression d'AhR. De plus, ils montrent que l'activation d'AhR est nécessaire à l'induction de signaux prolifératifs enclenchés par ErbB2, dont l'induction d'interleukin-6 qui active la voie JAK1/Stat3, ainsi qu'à la formation de mammosphères dans les cellules mammaires

cancéreuses humaines. Un antagoniste sélectif d'AhR, le CH223191, a inhibé la formation de mammosphères dans les cellules MCF-7 et HER2-5 (une nouvelle lignée clonale de MCF-7 où ErbB2 est surexprimé de manière stable) [88]. Il est donc possible que la tectochrysine et la pinocembrine inhibent non seulement la synthèse d'ErbB2 mais inhibent par un mécanisme antagonistique la croissance des cellules mammaires cancéreuses en contrecarrant la signalisation oncogénique d'ErbB2 via leur interaction avec AhR. Considérant ces données de la littérature, il serait intéressant d'investiguer dans les cellules T47D et autres lignées cellulaires mammaires cancéreuses exprimant ErbB2 et AhR, les effets de la tectochrysine et de la pinocembrine sur l'activation de PKC $\delta$  et parallèlement, l'expression génique de ErbB2 et AhR.

## CONCLUSION

L'augmentation de la quantité de AhR contribue à l'agressivité tumorale et à la survie cellulaire dans les cancers mammaires, tandis que l'épuisement de ce récepteur réduit la croissance tumorale et les métastases *in vivo*. Étant présent dans les carcinomes mammaires triple-négatifs, les études abondent dans le sens qu'AhR est un candidat idéal pour la thérapie ciblée ainsi qu'un biomarqueur potentiel pour l'établissement de pronostic.

L'ensemble de nos résultats montre que le traitement à la tectochryisine et à la pinocembrine inhibe la prolifération des cellules mammaires cancéreuses humaines T47D de type luminal B en montrant une cytotoxicité modérée, en retardant le cycle cellulaire et en diminuant les taux d'ER $\alpha$  et d'ErbB2. De plus, la tectochryisine et la pinocembrine sont des ligands de AhR et la baisse de viabilité cellulaire semble être, en partie, liée à l'activation de ce récepteur. Le groupement méthyle et le caractère planaire de la tectochryisine en feraient un ligand d'AhR de plus haute affinité, ce qui expliquerait ses propriétés antiproliférative plus fortes que la pinocembrine. Il serait pertinent d'investiguer le co-traitement à la tectochryisine et à la pinocembrine afin de les comparer aux traitements isolés dans le but d'évaluer si une synergie émane de leur combinaison et s'ils compétitionnent pour l'activation d'AhR. Parallèlement, il serait intéressant d'évaluer si la tectochryisine et la pinocembrine compétitionnent avec la TCDD pour l'activation d'AhR.

Le développement de modulateurs sélectifs d'AhR peut se révéler bénéfique tant dans la prévention que dans le traitement du cancer du sein. La tectochryisine et la pinocembrine sont deux molécules qui montrent des propriétés antiprolifératives avantageuses pour le traitement du cancer du sein d'autant plus qu'elles sont des ligands d'AhR qui est une cible thérapeutique de grand intérêt, particulièrement pour le traitement des tumeurs du sous-type triple négatif du cancer du sein pour lesquelles aucun traitement ciblé n'est présentement disponible.

## RÉFÉRENCES

1. DeSantis, C.E., et al., *International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2015. **24**(10): p. 1495-506.
2. Jin, U.H., et al., *The aryl hydrocarbon receptor ligand omeprazole inhibits breast cancer cell invasion and metastasis*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 498.
3. Powell, J.B., G.D. Goode, and S.E. Eltom, *The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Target for Breast Cancer Therapy*. *J Cancer Ther*, 2013. **4**(7): p. 1177-1186.
4. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. E359-86.
5. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. *CA Cancer J Clin*, 2015. **65**(2): p. 87-108.
6. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2015*. *CA Cancer J Clin*, 2015. **65**(1): p. 5-29.
7. DeSantis, C., et al., *Breast cancer statistics, 2013*. *CA Cancer J Clin*, 2014. **64**(1): p. 52-62.
8. *Société Canadienne du Cancer: Statistiques sur le cancer du sein*. 2015 9 march 2015 ]; Available from: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/statistics/?region=qc>
9. Brewster, A.M., M. Chavez-MacGregor, and P. Brown, *Epidemiology, biology, and treatment of triple-negative breast cancer in women of African ancestry*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(13): p. e625-34.
10. Potten, C.S., et al., *The Effect of Age and Menstrual-Cycle Upon Proliferative Activity of the Normal Human-Breast*. *British Journal of Cancer*, 1988. **58**(2): p. 163-170.
11. Hennighausen, L. and G.W. Robinson, *Information networks in the mammary gland*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(9): p. 715-25.
12. Howard, B.A. and B.A. Gusterson, *Human breast development*. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2000. **5**(2): p. 119-137.
13. Newman, L.A., et al., *Meta-analysis of survival in African American and white American patients with breast cancer: ethnicity compared with socioeconomic status*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(9): p. 1342-9.
14. Bartsch, H., et al., *Genetic risk profiles for cancer susceptibility and therapy response*. *Recent Results Cancer Res*, 2007. **174**: p. 19-36.
15. Key, T.J., P.K. Verkasalo, and E. Banks, *Epidemiology of breast cancer*. *Lancet Oncol*, 2001. **2**(3): p. 133-40.
16. Rosner, B., G.A. Colditz, and W.C. Willett, *Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study*. *Am J Epidemiol*, 1994. **139**(8): p. 819-35.
17. Clavel-Chapelon, F. and E.N. Group, *Cumulative number of menstrual cycles and breast cancer risk: results from the E3N cohort study of French women*. *Cancer Causes Control*, 2002. **13**(9): p. 831-8.

18. McCormack, V.A. and I.D.S. Silva, *Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: A meta-analysis*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2006. **15**(6): p. 1159-1169.
19. Wang, Y.Y., et al., *Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer*. *Cancer Lett*, 2012. **324**(2): p. 142-51.
20. Willett, W.C., et al., *Relative and absolute excess risks of coronary heart disease among women who smoke cigarettes*. *N Engl J Med*, 1987. **317**(21): p. 1303-9.
21. Zheng, W., et al., *Well-done meat intake and the risk of breast cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(22): p. 1724-9.
22. Parkin, D.M., *International variation*. *Oncogene*, 2004. **23**(38): p. 6329-40.
23. Hulka, B.S. and P.G. Moorman, *Breast cancer: hormones and other risk factors*. *Maturitas*, 2008. **61**(1-2): p. 203-13; discussion 213.
24. *Société Canadienne du Cancer: Facteurs de risque du cancer du sein*. . 2015 26 march 2015]; Available from: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/risks/?region=qc>.
25. Burstein, H.J., et al., *Ductal carcinoma in situ of the breast*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(14): p. 1430-41.
26. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
27. Sadikovic, B., et al., *Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer*. *Curr Genomics*, 2008. **9**(6): p. 394-408.
28. Wren, B.G., *The origin of breast cancer*. *Menopause*, 2007. **14**(6): p. 1060-8.
29. Weigelt, B. and J.S. Reis, *Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy?* *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2009. **6**(12): p. 718-730.
30. Simpson, P.T., et al., *Molecular evolution of breast cancer*. *Journal of Pathology*, 2005. **205**(2): p. 248-254.
31. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. *Nature*, 2000. **406**(6797): p. 747-752.
32. Prat, A. and C.M. Perou, *Deconstructing the molecular portraits of breast cancer*. *Molecular Oncology*, 2011. **5**(1): p. 5-23.
33. Wesolowski, R. and B. Ramaswamy, *Gene Expression Profiling: Changing Face of Breast Cancer Classification and Management*. *Gene Expression*, 2011. **15**(3): p. 105-115.
34. Wetzels, R.H., et al., *Detection of basement membrane components and basal cell keratin 14 in noninvasive and invasive carcinomas of the breast*. *Am J Pathol*, 1989. **134**(3): p. 571-9.
35. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
36. van 't Veer, L.J., et al., *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. *Nature*, 2002. **415**(6871): p. 530-6.
37. Rivenbark, A.G., S.M. O'Connor, and W.B. Coleman, *Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine*. *Am J Pathol*, 2013. **183**(4): p. 1113-24.

38. Carey, L.A., et al., *Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study*. JAMA, 2006. **295**(21): p. 2492-502.
39. Guiu, S., et al., *Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement*. Annals of Oncology, 2012. **23**(12): p. 2997-3006.
40. Cho, H., S.M. Aronica, and B.S. Katzenellenbogen, *Regulation of progesterone receptor gene expression in MCF-7 breast cancer cells: a comparison of the effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, estradiol, insulin-like growth factor-I, and serum factors*. Endocrinology, 1994. **134**(2): p. 658-64.
41. Daniel, A.R., C.R. Hagan, and C.A. Lange, *Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer*. Expert Rev Endocrinol Metab, 2011. **6**(3): p. 359-369.
42. Edwards, D.P., *The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000. **5**(3): p. 307-24.
43. Boyd, S., *On Oophorectomy in the Treatment of Cancer*. Br Med J, 1897. **2**(1918): p. 890-6.
44. Kumar, V., et al., *Functional domains of the human estrogen receptor*. Cell, 1987. **51**(6): p. 941-51.
45. Higa, G.M. and R.G. Fell, *Sex hormone receptor repertoire in breast cancer*. Int J Breast Cancer, 2013. **2013**: p. 284036.
46. Soltysik, K. and P. Czekaj, *Membrane Estrogen Receptors - Is It an Alternative Way of Estrogen Action?* Journal of Physiology and Pharmacology, 2013. **64**(2): p. 129-142.
47. Planey, S.L., R. Kumar, and J.A. Arnott, *Estrogen receptors (ERalpha versus ERbeta): friends or foes in human biology?* J Recept Signal Transduct Res, 2014. **34**(1): p. 1-5.
48. Yakimchuk, K., M. Jondal, and S. Okret, *Estrogen receptor alpha and beta in the normal immune system and in lymphoid malignancies*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **375**(1-2): p. 121-9.
49. Lee, H.R., T.H. Kim, and K.C. Choi, *Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ERalpha and ERbeta, identified by estrogen receptor knockout mouse*. Lab Anim Res, 2012. **28**(2): p. 71-6.
50. Lazennec, G., et al., *ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells*. Endocrinology, 2001. **142**(9): p. 4120-4130.
51. Roger, P., et al., *Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors*. Cancer Research, 2001. **61**(6): p. 2537-2541.
52. Lin, Z.H., et al., *Novel estrogen receptor-alpha-binding sites and estradiol target genes identified by chromatin immunoprecipitation cloning in breast cancer*. Cancer Research, 2007. **67**(10): p. 5017-5024.
53. Chang, E.C., et al., *Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells*. Endocrinology, 2006. **147**(10): p. 4831-4842.

54. Pinton, G., et al., *Estrogen receptor-beta affects the prognosis of human malignant mesothelioma*. *Cancer Res*, 2009. **69**(11): p. 4598-604.
55. Bjornstrom, L. and M. Sjoberg, *Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes*. *Mol Endocrinol*, 2005. **19**(4): p. 833-42.
56. Edwards, D.P., *Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone*. *Annu Rev Physiol*, 2005. **67**: p. 335-76.
57. Tzahar, E., et al., *A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor*. *Molecular and Cellular Biology*, 1996. **16**(10): p. 5276-5287.
58. Tokunaga, E., et al., *Molecular mechanisms regulating the hormone sensitivity of breast cancer*. *Cancer Science*, 2014. **105**(11): p. 1377-1383.
59. Levin, E.R., *Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen*. *Mol Endocrinol*, 2005. **19**(8): p. 1951-9.
60. Dey, P., et al., *Insight into the mechanisms of action of estrogen receptor beta in the breast, prostate, colon, and CNS*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2013. **51**(3): p. T61-T74.
61. Le Romancer, M., et al., *Cracking the Estrogen Receptor's Posttranslational Code in Breast Tumors*. *Endocrine Reviews*, 2011. **32**(5): p. 597-622.
62. Giguere, V., et al., *Identification of a New Class of Steroid-Hormone Receptors*. *Nature*, 1988. **331**(6151): p. 91-94.
63. Misawa, A. and S. Inoue, *Estrogen-Related Receptors in Breast Cancer and Prostate Cancer*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015. **6**: p. 83.
64. Migliaccio, A., et al., *Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor*. *EMBO J*, 1998. **17**(7): p. 2008-18.
65. Rekawiecki, R., et al., *Regulation of progesterone synthesis and action in bovine corpus luteum*. *J Physiol Pharmacol*, 2008. **59 Suppl 9**: p. 75-89.
66. Clarke, C.L., *Cell-specific regulation of progesterone receptor in the female reproductive system*. *Mol Cell Endocrinol*, 1990. **70**(3): p. C29-33.
67. Taylor, A.H., et al., *The cytoplasmic 60 kDa progesterone receptor isoform predominates in the human amniochorion and placenta at term*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009. **7**: p. 22.
68. Graham, J.D. and C.L. Clarke, *Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells*. *Breast Cancer Res*, 2002. **4**(5): p. 187-90.
69. Condon, J.C., et al., *Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function*. *Mol Endocrinol*, 2006. **20**(4): p. 764-75.
70. Kariagina, A., M.D. Aupperlee, and S.Z. Haslam, *Progesterone receptor isoform functions in normal breast development and breast cancer*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2008. **18**(1): p. 11-33.
71. Mote, P.A., et al., *Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2002. **72**(2): p. 163-172.

72. Sartorius, C.A., T.J. Shen, and K.B. Horwitz, *Progesterone receptors A and B differentially affect the growth of estrogen-dependent human breast tumor xenografts*. Breast Cancer Research and Treatment, 2003. **79**(3): p. 287-299.
73. Arnett-Mansfield, R.L., et al., *Subnuclear distribution of progesterone receptors A and B in normal and malignant endometrium*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2004. **89**(3): p. 1429-1442.
74. Hubbard, S.R. and W.T. Miller, *Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling*. Current Opinion in Cell Biology, 2007. **19**(2): p. 117-123.
75. Zhang, J., P.L. Yang, and N.S. Gray, *Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(1): p. 28-39.
76. Bazley, L.A. and W.J. Gullick, *The epidermal growth factor receptor family*. Endocrine-Related Cancer, 2005. **12**: p. S17-S27.
77. Stern, D.F., *ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 duet in mammary development and breast cancer*. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2008. **13**(2): p. 215-223.
78. Sliwkowski, M.X., *Ready to partner*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(3): p. 158-9.
79. Boshier, J.M., et al., *A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma*. Oncogene, 1996. **13**(8): p. 1701-7.
80. Vernimmen, D., et al., *Identification of HTF (HER2 transcription factor) as an AP-2 (activator protein-2) transcription factor and contribution of the HTF binding site to ERBB2 gene overexpression*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 1): p. 323-9.
81. Scott, G.K., et al., *Ets regulation of the erbB2 promoter*. Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6490-502.
82. Sassen, A., et al., *Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(1): p. R2.
83. Flynn, J.F., C. Wong, and J.M. Wu, *Anti-EGFR Therapy: Mechanism and Advances in Clinical Efficacy in Breast Cancer*. J Oncol, 2009. **2009**: p. 526963.
84. Graus-Porta, D., et al., *ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling*. EMBO J, 1997. **16**(7): p. 1647-55.
85. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
86. Harari, D. and Y. Yarden, *Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer*. Oncogene, 2000. **19**(53): p. 6102-14.
87. Hartman, Z.C., et al., *HER2 overexpression elicits a proinflammatory IL-6 autocrine signaling loop that is critical for tumorigenesis*. Cancer Res, 2011. **71**(13): p. 4380-91.
88. Zhao, S., et al., *HER2 overexpression-mediated inflammatory signaling enhances mammosphere formation through up-regulation of aryl hydrocarbon receptor transcription*. Cancer Lett, 2013. **330**(1): p. 41-8.
89. Poland, A., E. Glover, and A.S. Kende, *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, 1976. **251**(16): p. 4936-46.

90. McIntosh, B.E., J.B. Hogenesch, and C.A. Bradfield, *Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation*, in *Annual Review of Physiology*. 2010. p. 625-645.
91. Jackson, D.P., Joshia, A. D. and Elferink, C. J. , *Ah receptor pathway intricacies; signaling through diverse protein partners and DNA-motifs*. *Toxicology Research*. **4**(5): p. 1143-1158.
92. Ma, Q., L. Dong, and J.P. Whitlock, Jr., *Transcriptional activation by the mouse Ah receptor. Interplay between multiple stimulatory and inhibitory functions*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(21): p. 12697-703.
93. Harper, P.A., et al., *Polymorphisms in the human AH receptor*. *Chem Biol Interact*, 2002. **141**(1-2): p. 161-87.
94. Rowlands, C.J., et al., *The human AHR: identification of single nucleotide polymorphisms from six ethnic populations*. *Pharmacogenet Genomics*, 2010. **20**(5): p. 283-90.
95. Shimizu, Y., et al., *Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(2): p. 779-82.
96. Fernandez-Salguero, P., et al., *Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor*. *Science*, 1995. **268**(5211): p. 722-6.
97. Mimura, J., et al., *Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor*. *Genes Cells*, 1997. **2**(10): p. 645-54.
98. Pandini, A., et al., *Structural and functional characterization of the aryl hydrocarbon receptor ligand binding domain by homology modeling and mutational analysis*. *Biochemistry*, 2007. **46**(3): p. 696-708.
99. Pandini, A., et al., *Detection of the TCDD Binding-Fingerprint within the Ah Receptor Ligand Binding Domain by Structurally Driven Mutagenesis and Functional Analysis*. *Biochemistry*, 2009. **48**(25): p. 5972-5983.
100. Kewley, R.J., M.L. Whitelaw, and A. Chapman-Smith, *The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators*. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004. **36**(2): p. 189-204.
101. Aarts, J.M., et al., *Species-specific antagonism of Ah receptor action by 2,2',5,5'-tetrachloro- and 2,2',3,3',4,4'-hexachlorobiphenyl*. *Eur J Pharmacol*, 1995. **293**(4): p. 463-74.
102. Denison, M.S. and S.R. Nagy, *Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003. **43**: p. 309-34.
103. Zhu, B.T., *On the general mechanism of selective induction of cytochrome P450 enzymes by chemicals: some theoretical considerations*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2010. **6**(4): p. 483-94.
104. Adachi, J., et al., *Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(34): p. 31475-8.
105. Heath-Pagliuso, S., et al., *Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites*. *Biochemistry*, 1998. **37**(33): p. 11508-15.
106. Oberg, M., et al., *Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls*

- the background aryl hydrocarbon receptor activity*. Toxicological Sciences, 2005. **85**(2): p. 935-943.
107. Schaldach, C.M., J. Riby, and L.F. Bjeldanes, *Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor*. Biochemistry, 1999. **38**(23): p. 7594-600.
  108. Kroetz, D.L. and D.C. Zeldin, *Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism*. Curr Opin Lipidol, 2002. **13**(3): p. 273-83.
  109. Phelan, D., et al., *Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin*. Arch Biochem Biophys, 1998. **357**(1): p. 155-63.
  110. Nguyen, L.P. and C.A. Bradfield, *The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor*. Chem Res Toxicol, 2008. **21**(1): p. 102-16.
  111. Pohjanvirta, R., et al., *Comparison of acute toxicities of indolo[3,2-b]carbazole (ICZ) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in TCDD-sensitive rats*. Food Chem Toxicol, 2002. **40**(7): p. 1023-32.
  112. Bjeldanes, L.F., et al., *Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9543-7.
  113. Kazlauskas, A., L. Poellinger, and I. Pongratz, *Evidence that the Co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(19): p. 13519-13524.
  114. Denison, M.S., et al., *Ligand binding and activation of the Ah receptor*. Chemicobiological Interactions, 2002. **141**(1-2): p. 3-24.
  115. Hoffman, E.C., et al., *Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor*. Science, 1991. **252**(5008): p. 954-8.
  116. Mimura, J., et al., *Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function*. Genes Dev, 1999. **13**(1): p. 20-5.
  117. Baba, T., et al., *Structure and Expression of the Ah Receptor Repressor Gene*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(35): p. 33101-33110.
  118. Denison, M.S., et al., *Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor*. Toxicol Sci, 2011. **124**(1): p. 1-22.
  119. Diani-Moore, S., et al., *Identification of the aryl hydrocarbon receptor target gene TiPARP as a mediator of suppression of hepatic gluconeogenesis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and of nicotinamide as a corrective agent for this effect*. J Biol Chem, 2010. **285**(50): p. 38801-10.
  120. Rogers, J.M. and M.S. Denison, *Analysis of the antiestrogenic activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human ovarian carcinoma BG-1 cells*. Molecular Pharmacology, 2002. **61**(6): p. 1393-1403.
  121. Tian, Y., et al., *Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 510-5.
  122. Backlund, M. and M. Ingelman-Sundberg, *Regulation of aryl hydrocarbon receptor signal transduction by protein tyrosine kinases*. Cell Signal, 2005. **17**(1): p. 39-48.
  123. Sutter, C.H., et al., *EGF receptor signaling blocks aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription and cell differentiation in human epidermal keratinocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(11): p. 4266-71.

124. Oesch-Bartlomowicz, B., et al., *Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(26): p. 9218-23.
125. Carlson, D.B. and G.H. Perdew, *A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins*. J Biochem Mol Toxicol, 2002. **16**(6): p. 317-25.
126. Puga, A., C. Ma, and J.L. Marlowe, *The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(4): p. 713-22.
127. Haarmann-Stemmann, T., H. Bothe, and J. Abel, *Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways*. Biochemical Pharmacology, 2009. **77**(4): p. 508-520.
128. Tian, Y., et al., *Transcriptional suppression of estrogen receptor gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1998. **67**(1): p. 17-24.
129. Spink, D.C., et al., *The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on estrogen metabolism in MCF-7 breast cancer cells: evidence for induction of a novel 17 beta-estradiol 4-hydroxylase*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1994. **51**(5-6): p. 251-8.
130. Safe, S., M. Wormke, and I. Samudio, *Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000. **5**(3): p. 295-306.
131. Ruegg, J., et al., *The transcription factor aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator functions as an estrogen receptor beta-selective coactivator, and its recruitment to alternative pathways mediates antiestrogenic effects of dioxin*. Molecular Endocrinology, 2008. **22**(2): p. 304-316.
132. Matthews, J., et al., *Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor alpha to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(13): p. 5317-28.
133. Ohtake, F., et al., *Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase*. Nature, 2007. **446**(7135): p. 562-566.
134. Marconett, C.N., et al., *Indole-3-carbinol triggers aryl hydrocarbon receptor-dependent estrogen receptor (ER)alpha protein degradation in breast cancer cells disrupting an ERalpha-GATA3 transcriptional cross-regulatory loop*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(7): p. 1166-77.
135. Fernandez-Salguero, P.M., et al., *Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice*. Vet Pathol, 1997. **34**(6): p. 605-14.
136. Andreola, F., et al., *Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR<sup>-/-</sup>) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism*. Cancer Res, 1997. **57**(14): p. 2835-8.
137. Lund, A.K., et al., *Characterizing the role of endothelin-1 in the progression of cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor (AhR) null mice*. Toxicol Appl Pharmacol, 2006. **212**(2): p. 127-35.
138. Abbott, B.D., et al., *Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse*. Toxicol Appl Pharmacol, 1999. **155**(1): p. 62-70.

139. Furness, S.G. and F. Whelan, *The pleiotropy of dioxin toxicity--xenobiotic misappropriation of the aryl hydrocarbon receptor's alternative physiological roles*. *Pharmacol Ther*, 2009. **124**(3): p. 336-53.
140. Linden, J., et al., *Dioxins, the aryl hydrocarbon receptor and the central regulation of energy balance*. *Front Neuroendocrinol*, 2010. **31**(4): p. 452-78.
141. Esser, C., *The immune phenotype of AhR null mouse mutants: Not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation*. *Biochemical Pharmacology*, 2009. **77**(4): p. 597-607.
142. Barouki, R., X. Coumoul, and P.M. Fernandez-Salguero, *The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(19): p. 3608-15.
143. Lindsey, S. and E.T. Papoutsakis, *The evolving role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in the normophysiology of hematopoiesis*. *Stem Cell Rev*, 2012. **8**(4): p. 1223-35.
144. Ma, C., J.L. Marlowe, and A. Puga, *The aryl hydrocarbon receptor at the crossroads of multiple signaling pathways*. *EXS*, 2009. **99**: p. 231-57.
145. Hernandez-Ochoa, I., B.N. Karman, and J.A. Flaws, *The role of the aryl hydrocarbon receptor in the female reproductive system*. *Biochem Pharmacol*, 2009. **77**(4): p. 547-59.
146. Le Provost, F., et al., *The aryl hydrocarbon receptor (AhR) and its nuclear translocator (Arnt) are dispensable for normal mammary gland development but are required for fertility*. *Genesis*, 2002. **32**(3): p. 231-9.
147. Mimura, J. and Y. Fujii-Kuriyama, *Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1619**(3): p. 263-8.
148. Horman, S., et al., *Changes in the phosphorylation status of the 27 kDa heat shock protein (HSP27) associated with the modulation of growth and/or differentiation in MCF-7 cells*. *Cell Prolif*, 1997. **30**(1): p. 21-35.
149. Vargas-Roig, L.M., et al., *Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples*. *Cancer Detect Prev*, 1997. **21**(5): p. 441-51.
150. Jeffy, B.D., R.B. Chirnomas, and D.F. Romagnolo, *Epigenetics of breast cancer: polycyclic aromatic hydrocarbons as risk factors*. *Environ Mol Mutagen*, 2002. **39**(2-3): p. 235-44.
151. Marlowe, J.L. and A. Puga, *Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis*. *J Cell Biochem*, 2005. **96**(6): p. 1174-84.
152. Puga, A., et al., *Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation*. *Toxicology*, 2002. **181-182**: p. 171-7.
153. Schlezinger, J.J., et al., *A role for the aryl hydrocarbon receptor in mammary gland tumorigenesis*. *Biol Chem*, 2006. **387**(9): p. 1175-87.
154. Bertazzi, P.A., et al., *Dioxin exposure and cancer risk: a 15-year mortality study after the "Seveso accident"*. *Epidemiology*, 1997. **8**(6): p. 646-52.
155. Bertazzi, P.A., et al., *Ten-year mortality study of the population involved in the Seveso incident in 1976*. *Am J Epidemiol*, 1989. **129**(6): p. 1187-200.
156. Kociba, R.J., et al., *Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1978. **46**(2): p. 279-303.

157. Saito, R., et al., *Aryl hydrocarbon receptor in breast cancer-a newly defined prognostic marker*. *Horm Cancer*, 2014. **5**(1): p. 11-21.
158. Goode, G.D., et al., *Knockdown of aberrantly upregulated aryl hydrocarbon receptor reduces tumor growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cell line*. *Int J Cancer*, 2013. **133**(12): p. 2769-80.
159. Feng, S., Z. Cao, and X. Wang, *Role of aryl hydrocarbon receptor in cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1836**(2): p. 197-210.
160. Ruegg, J., et al., *The transcription factor aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator functions as an estrogen receptor beta-selective coactivator, and its recruitment to alternative pathways mediates antiestrogenic effects of dioxin*. *Mol Endocrinol*, 2008. **22**(2): p. 304-16.
161. Beischlag, T.V. and G.H. Perdew, *ER alpha-AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(22): p. 21607-11.
162. Ohtake, F., et al., *Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor*. *Nature*, 2003. **423**(6939): p. 545-50.
163. Wormke, M., et al., *The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(6): p. 1843-55.
164. Fotsis, T., et al., *The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth*. *Nature*, 1994. **368**(6468): p. 237-9.
165. Raobaikady, B., et al., *Inhibition of MDA-MB-231 cell cycle progression and cell proliferation by C-2-substituted oestradiol mono- and bis-3-O-sulphamates*. *Int J Cancer*, 2005. **117**(1): p. 150-9.
166. Khan, S., et al., *Molecular mechanism of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor/Sp1 cross talk in breast cancer cells*. *Mol Endocrinol*, 2006. **20**(9): p. 2199-214.
167. Krishnan, V., X. Wang, and S. Safe, *Estrogen receptor-Sp1 complexes mediate estrogen-induced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(22): p. 15912-7.
168. Safe, S., S.O. Lee, and U.H. Jin, *Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as a drug target*. *Toxicol Sci*, 2013. **135**(1): p. 1-16.
169. Holst, F., et al., *Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer*. *Nat Genet*, 2007. **39**(5): p. 655-60.
170. Hall, J.M., et al., *Activation of the aryl-hydrocarbon receptor inhibits invasive and metastatic features of human breast cancer cells and promotes breast cancer cell differentiation*. *Mol Endocrinol*, 2010. **24**(2): p. 359-69.
171. Brooks, J. and S.E. Eltom, *Malignant transformation of mammary epithelial cells by ectopic overexpression of the aryl hydrocarbon receptor*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011. **11**(5): p. 654-69.
172. Zudaire, E., et al., *The aryl hydrocarbon receptor repressor is a putative tumor suppressor gene in multiple human cancers*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(2): p. 640-50.

173. Barkhem, T., et al., *Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(1): p. 105-12.
174. Bravo, L., *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutr Rev, 1998. **56**(11): p. 317-33.
175. Sawadogo, W.R., et al., *Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy*. Biochem Pharmacol, 2012. **84**(10): p. 1225-40.
176. Middleton, E., Jr., C. Kandaswami, and T.C. Theoharides, *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(4): p. 673-751.
177. Manach, C., et al., *Polyphenols: food sources and bioavailability*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(5): p. 727-47.
178. Gonzalez-Vallinas, M., et al., *Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives*. Nutr Rev, 2013. **71**(9): p. 585-99.
179. Wattenberg, L.W., *Chemoprevention of cancer*. Cancer Res, 1985. **45**(1): p. 1-8.
180. Ducasse, M. and M.A. Brown, *Epigenetic aberrations and cancer*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 60.
181. Scalbert, A., et al., *Dietary polyphenols and the prevention of diseases*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2005. **45**(4): p. 287-306.
182. Tomas-Barberan, F.A. and M.N. Clifford, *Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. **80**(7): p. 1024-1032.
183. Nakagawa, H., et al., *Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate*. Carcinogenesis, 2004. **25**(9): p. 1567-74.
184. Alia, M., et al., *Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide*. Toxicol Appl Pharmacol, 2006. **212**(2): p. 110-8.
185. Schwarz, D. and I. Roots, *In vitro assessment of inhibition by natural polyphenols of metabolic activation of procarcinogens by human CYP1A1*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **303**(3): p. 902-7.
186. Maliakal, P.P. and S. Wanwimolruk, *Effect of herbal teas on hepatic drug metabolizing enzymes in rats*. J Pharm Pharmacol, 2001. **53**(10): p. 1323-9.
187. Thangapazham, R.L., et al., *Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo*. Cancer Lett, 2007. **245**(1-2): p. 232-41.
188. Nam, S., D.M. Smith, and Q.P. Dou, *Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 13322-30.
189. Larrosa, M., F.A. Tomas-Barberan, and J.C. Espin, *The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway*. J Nutr Biochem, 2006. **17**(9): p. 611-25.

190. Surh, Y.J., *Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 768-80.
191. Park, H.K., et al., *Differential biological responses of green tea polyphenol in normal cells vs. cancer cells*. Current Applied Physics, 2005. **5**(5): p. 449-452.
192. Babich, H., et al., *In vitro cytotoxicity of a theaflavin mixture from black tea to malignant, immortalized, and normal cells from the human oral cavity*. Toxicology in Vitro, 2006. **20**(5): p. 677-688.
193. Wu, Q.K., et al., *Berry phenolic extracts modulate the expression of p21(WAF1) and bax but not Bcl-2 in HT-29 colon cancer cells*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(4): p. 1156-1163.
194. Feng, R.T., et al., *Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(18): p. 13468-13476.
195. Mouria, M., et al., *Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome c release and apoptosis*. International Journal of Cancer, 2002. **98**(5): p. 761-769.
196. Nguyen, T.T.T., et al., *The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells*. Carcinogenesis, 2004. **25**(5): p. 647-659.
197. Yokoyama, M., et al., *The tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate effects on growth, apoptosis, and telomerase activity in cervical cell lines*. Gynecologic Oncology, 2004. **92**(1): p. 197-204.
198. Hayakawa, S., et al., *Apoptosis induction by epigallocatechin gallate involves its binding to Fas*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **285**(5): p. 1102-1106.
199. Nishikawa, T., et al., *A green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of Bcl-2 family proteins*. Journal of Hepatology, 2006. **44**(6): p. 1074-1082.
200. Ahn, H.Y., et al., *Epigallocatechin-3 gallate selectively inhibits the PDGF-BB-induced intracellular signaling transduction pathway in vascular smooth muscle cells and inhibits transformation of sis-transfected NIH 3T3 fibroblasts and human glioblastoma cells (A172)*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(4): p. 1093-104.
201. Beevers, C.S., et al., *Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells*. Int J Cancer, 2006. **119**(4): p. 757-64.
202. Kim, W.K., et al., *Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells*. J Nutr Biochem, 2005. **16**(3): p. 155-62.
203. Pianetti, S., et al., *Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate inhibits Her-2/neu signaling, proliferation, and transformed phenotype of breast cancer cells*. Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 652-5.
204. Hussain, A.R., et al., *Cross-Talk between NFkB and the PI3-Kinase/AKT Pathway Can Be Targeted in Primary Effusion Lymphoma (PEL) Cell Lines for Efficient Apoptosis*. Plos One, 2012. **7**(6).

205. Shishodia, S., et al., *Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappa B activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma*. *Biochemical Pharmacology*, 2005. **70**(5): p. 700-713.
206. Gong, L.J., et al., *Inactivation of NF-kappa B by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells*. *Oncogene*, 2003. **22**(30): p. 4702-4709.
207. Suganuma, M., et al., *Discrete roles of cytokines, TNF-alpha, IL-1, IL-6 in tumor promotion and cell transformation*. *Int J Oncol*, 2002. **20**(1): p. 131-6.
208. Greenhough, A., et al., *The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment*. *Carcinogenesis*, 2009. **30**(3): p. 377-86.
209. Sarkar, A., et al., *beta-D-Glucoside suppresses tumor necrosis factor-induced activation of nuclear transcription factor kappaB but potentiates apoptosis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(32): p. 33768-81.
210. Porath, D., et al., *Epigallocatechin-3-gallate impairs chemokine production in human colon epithelial cell lines*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **315**(3): p. 1172-80.
211. Fujiki, H., et al., *New TNF-alpha releasing inhibitors as cancer preventive agents from traditional herbal medicine and combination cancer prevention study with EGCG and sulindac or tamoxifen*. *Mutat Res*, 2003. **523-524**: p. 119-25.
212. Subbaramaiah, K. and A.J. Dannenberg, *Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2003. **24**(2): p. 96-102.
213. Ye, F., et al., *Inhibition of cyclooxygenase-2 activity in head and neck cancer cells by genistein*. *Cancer Letters*, 2004. **211**(1): p. 39-46.
214. Wenzel, H., et al., *Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells*. *Cancer Research*, 2000. **60**(14): p. 3823-3831.
215. Hwang, J.T., et al., *Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway*. *Cancer Letters*, 2007. **247**(1): p. 115-121.
216. Schindler, R. and R. Mentlein, *Flavonoids and vitamin E reduce the release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor from human tumor cells*. *Journal of Nutrition*, 2006. **136**(6): p. 1477-1482.
217. Annabi, B., et al., *Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2002. **1542**(1-3): p. 209-220.
218. Yamakawa, S., et al., *(-)-Epigallocatechin gallate inhibits membrane-type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP, and tumor angiogenesis*. *Cancer Lett*, 2004. **210**(1): p. 47-55.
219. Labrecque, L., et al., *Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound*. *Carcinogenesis*, 2005. **26**(4): p. 821-6.
220. Favot, L., et al., *Involvement of cyclin-dependent pathway in the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis*. *Cardiovasc Res*, 2003. **59**(2): p. 479-87.

221. Bagli, E., et al., *Luteolin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis; inhibition of endothelial cell survival and proliferation by targeting phosphatidylinositol 3'-kinase activity*. *Cancer Res*, 2004. **64**(21): p. 7936-46.
222. Lee, Y.K., et al., *VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2004. **104**(3): p. 788-94.
223. Fingleton, B., *Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis*. *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 479-91.
224. Hadler-Olsen, E., J.O. Winberg, and L. Uhlin-Hansen, *Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets*. *Tumor Biology*, 2013. **34**(4): p. 2041-2051.
225. Roy, R., J. Yang, and M.A. Moses, *Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 2009. **27**(31): p. 5287-5297.
226. Gunther, S., et al., *Polyphenols prevent cell shedding from mouse mammary cancer spheroids and inhibit cancer cell invasion in confrontation cultures derived from embryonic stem cells*. *Cancer Lett*, 2007. **250**(1): p. 25-35.
227. Tanimura, S., et al., *Suppression of tumor cell invasiveness by hydrolyzable tannins (plant polyphenols) via the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 activity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **330**(4): p. 1306-13.
228. Bachmeier, B., et al., *The chemopreventive polyphenol Curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice*. *Cell Physiol Biochem*, 2007. **19**(1-4): p. 137-52.
229. Beecher, G.R., *Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake*. *Journal of Nutrition*, 2003. **133**(10): p. 3248s-3254s.
230. Fraga, C.G., *Plant phenolics and human health. Biochemistry, nutrition and pharmacology*. 2010: Wiley. 593.
231. Harborne, J.B. and C.A. Williams, *Advances in flavonoid research since 1992*. *Phytochemistry*, 2000. **55**(6): p. 481-504.
232. Kawai, M., et al., *Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances*. *Allergol Int*, 2007. **56**(2): p. 113-23.
233. Arts, I.C.W. and P.C.H. Hollman, *Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2005. **81**(1): p. 317s-325s.
234. Noble, M.E.M., J.A. Endicott, and L.N. Johnson, *Protein kinase inhibitors: Insights into drug design from structure*. *Science*, 2004. **303**(5665): p. 1800-1805.
235. Walker, E.H., et al., *Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine*. *Molecular Cell*, 2000. **6**(4): p. 909-919.
236. Virgili, F. and M. Marino, *Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2008. **45**(9): p. 1205-1216.
237. Spencer, J.P.E., et al., *Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: Gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2001. **3**(6): p. 1023-1039.

238. Ibrahim, A.R. and Y.J. Abulhadj, *Aromatase Inhibition by Flavonoids*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1990. **37**(2): p. 257-260.
239. Yamashita, Y., S.Z. Kawada, and H. Nakano, *Induction of Mammalian Topoisomerase-II Dependent DNA Cleavage by Nonintercalative Flavonoids, Genistein and Orobol*. Biochemical Pharmacology, 1990. **39**(4): p. 737-744.
240. Lee, K.W., et al., *Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine*. Cancer Research, 2008. **68**(3): p. 946-55.
241. Roberts, P.J. and C.J. Der, *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3291-3310.
242. Paul, M.K. and A.K. Mukhopadhyay, *Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer*. Int J Med Sci, 2004. **1**(2): p. 101-115.
243. Engh, R.A. and D. Bossemeyer, *Structural aspects of protein kinase control-role of conformational flexibility*. Pharmacol Ther, 2002. **93**(2-3): p. 99-111.
244. Fabbro, D., et al., *Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs*. Pharmacology & Therapeutics, 2002. **93**(2-3): p. 79-98.
245. Kim, J.E., et al., *MKK4 is a novel target for the inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced vascular endothelial growth factor expression by myricetin*. Biochemical Pharmacology, 2009. **77**(3): p. 412-421.
246. Jung, S.K., et al., *Myricetin suppresses UVB-induced skin cancer by targeting Fyn*. Cancer Research, 2008. **68**(14): p. 6021-6029.
247. Liu, Y. and N.S. Gray, *Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations*. Nature Chemical Biology, 2006. **2**(7): p. 358-364.
248. Nagar, B., et al., *Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571)*. Cancer Research, 2002. **62**(15): p. 4236-4243.
249. Wan, P.T.C., et al., *Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF*. Cell, 2004. **116**(6): p. 855-867.
250. Laskowski, R.A., F. Gerick, and J.M. Thornton, *The structural basis of allosteric regulation in proteins*. Febs Letters, 2009. **583**(11): p. 1692-1698.
251. Ohren, J.F., et al., *Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition*. Nature Structural & Molecular Biology, 2004. **11**(12): p. 1192-1197.
252. Barnett, S.F., et al., *Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors*. Biochemical Journal, 2005. **385**: p. 399-408.
253. Hwang, M.K., et al., *Fyn kinase is a direct molecular target of delphinidin for the inhibition of cyclooxygenase-2 expression induced by tumor necrosis factor-alpha*. Biochemical Pharmacology, 2009. **77**(7): p. 1213-1222.
254. Pike, L.J., X.L. Han, and R.W. Gross, *Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids - A shotgun lipidomics study*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(29): p. 26796-26804.

255. Remacle-Bonnet, M., et al., *Membrane rafts segregate pro- from anti-apoptotic insulin-like growth factor-I receptor signaling in colon carcinoma cells stimulated by members of the tumor necrosis factor superfamily*. Am J Pathol, 2005. **167**(3): p. 761-73.
256. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2000. **1**(1): p. 31-39.
257. Fraga, C.G., *Plant phenolics and human health. Biochemistry, nutrition and pharmacology*. Wiley, 2010: p. 1-593.
258. Pike, L.J. and L. Casey, *Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking*. Biochemistry, 2002. **41**(32): p. 10315-10322.
259. Adachi, S., et al., *(-)-epigallocatechin gallate causes internalization of the epidermal growth factor receptor in human colon cancer cells*. Carcinogenesis, 2008. **29**(10): p. 1986-1993.
260. Križková, L., et al., *The effect of flavonoids on ofloxacin-induced mutagenicity in Euglena gracilis*. Mutat Res, 1998. **416**(1-2): p. 85-92.
261. Novotny, L., et al., *Separation of structurally related flavonoids by GC/MS technique and determination of their polarographic parameters and potential carcinogenicity*. Neoplasma, 1999. **46**(4): p. 231-236.
262. Eng-Chong, T., et al., *Boesenbergia rotunda: From Ethnomedicine to Drug Discovery*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012.
263. Boutabet, K., et al., *Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin*. Indian J Nephrol., 2011. **21**(2): p. 101-6. [Indian journal of nephrology].
264. Jasprica, I., et al., *Evaluation of antioxidative activity of Croatian propolis samples using DPPH center dot and ABTS(center dot+) stable free radical assays*. Molecules, 2007. **12**(5): p. 1006-1021.
265. Martos, I., et al., *Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(8): p. 2824-2829.
266. Tomasbarberan, F.A., et al., *Phytochemical Evidence for the Botanical Origin of Tropical Propolis from Venezuela*. Phytochemistry, 1993. **34**(1): p. 191-196.
267. Hamasaka, T., et al., *Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan*. Food Science and Technology Research, 2004. **10**(1): p. 86-92.
268. Greenaway, W., T. Scaysbrook, and F.R. Whatley, *The Composition and Plant Origins of Propolis - a Report of Work at Oxford*. Bee World, 1990. **71**(3): p. 107-118.
269. Khalil, M.L., *Biological activity of bee propolis in health and disease*. Asian Pac J Cancer Prev, 2006. **7**(1): p. 22-31.
270. Amakura, Y., et al., *Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of commercial health foods*. Food Chem, 2011. **126**(4): p. 1515-20.
271. Amakura, Y., et al., *Tectochrysin in propolis is a potent natural aryl hydrocarbon receptor ligand*. Planta Medica, 2010. **76**(12): p. 1380-1380.

272. Haarmann-Stemmann, T., et al., *Analysis of the transcriptional regulation and molecular function of the aryl hydrocarbon receptor repressor in human cell lines*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(12): p. 2262-9.
273. Iwanari, M., et al., *Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoform-, and cell-specific differences*. Archives of Toxicology, 2002. **76**(5-6): p. 287-298.
274. Bisson, W.H., et al., *Modeling of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand binding domain and its utility in virtual ligand screening to predict new AhR ligands*. J Med Chem, 2009. **52**(18): p. 5635-41.
275. Khamis, S., et al., *Phytochemistry and preliminary biological evaluation of Cyathostemma argenteum, a malaysian plant used traditionally for the treatment of breast cancer*. Phytother Res, 2004. **18**(7): p. 507-10.
276. He, Z.H., et al., *Anti-angiogenic effects of the fruit of Alpinia oxyphylla*. J Ethnopharmacol, 2010. **132**(2): p. 443-9.
277. Oh, S.B., et al., *Anti-cancer effect of tectochrysin in NSCLC cells through overexpression of death receptor and inactivation of STAT3*. Cancer Letters, 2014. **353**(1): p. 95-103.
278. Park, M.H., et al., *Anticancer effect of tectochrysin in colon cancer cell via suppression of NF-kappaB activity and enhancement of death receptor expression*. Mol Cancer, 2015. **14**: p. 124.
279. Ahmed-Belkacem, A., et al., *Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2*. Cancer Res, 2005. **65**(11): p. 4852-60.
280. Cho, H., et al., *Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives*. Pharmacol Res, 2004. **49**(1): p. 37-43.
281. Kostourou, V., et al., *The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis*. Br J Cancer, 2011. **104**(1): p. 83-90.
282. Lee, S., et al., *In vivo anti-oxidant activities of tectochrysin*. Archives of Pharmacal Research, 2003. **26**(1): p. 43-46.
283. Sayre, C.L., et al., *Chiral analytical method development and application to pre-clinical pharmacokinetics of pinocembrin*. Biomedical Chromatography, 2012.
284. Yang, Q., et al., *Identification and synthesis of impurities in pinocembrin-A new drug for the treatment of ischemic stroke*. Chinese Journal of Chemistry, 2012. **30**(6): p. 1315-1319.
285. Kumar, M.A.S., et al., *Pinocembrin triggers Bax-dependent mitochondrial apoptosis in colon cancer cells*. Molecular Carcinogenesis, 2007. **46**(3): p. 231-241.
286. Li, D.J., J.F. Wang, and W. Li, *Protective effect of pinocembrin from propolis on human umbilical vein endothelial cells induced by lipopolysaccharide*. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2007. **11**(41): p. 8318-8320.
287. Komoda, Y., *Isolation of flavonoids from Populus nigra as delta 4-3-ketosteroid (5 alpha) reductase inhibitors*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1989. **37**(11): p. 3128-30.

288. Chen, C.Y.C., *De novo design of novel selective COX-2 inhibitors: From virtual screening to pharmacophore analysis*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2009. **40**(1): p. 55-69.
289. Gogoi, D., et al., *Insights from the docking analysis of biologically active compounds from plant Litsea Genus as potential COX-2 inhibitors*. Bioinformation, 2012. **8**(17): p. 812-5.
290. Zhao, J., et al., *Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (Turnera diffusa)*. Journal of Ethnopharmacology, 2008. **120**(3): p. 387-393.
291. Bennett, J.P., B.D. Gomperts, and E. Wollenweber, *Inhibitory Effects of Natural Flavonoids on Secretion from Mast-Cells and Neutrophils*. Arzneimittel-Forschung/Drug Research, 1981. **31-1**(3): p. 433-437.
292. Ribatti, D., et al., *Angiogenesis and mast cells in human breast cancer sentinel lymph nodes with and without micrometastases*. Histopathology, 2007. **51**(6): p. 837-842.
293. De Larco, J.E., B.R.K. Wuertz, and L.T. Furcht, *The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8*. Clinical Cancer Research, 2004. **10**(15): p. 4895-4900.
294. Gao, M., et al., *Pinocembrin prevents glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells via decrease of bax/bcl-2 ratio*. European Journal of Pharmacology, 2008. **591**(1-3): p. 73-79.
295. Gao, M., et al., *Pinocembrin protects the neurovascular unit by reducing inflammation and extracellular proteolysis in MCAO rats*. Journal of Asian Natural Products Research, 2010. **12**(5): p. 407-418.
296. Santos, A.C., et al., *Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria*. Free Radical Biology and Medicine, 1998. **24**(9): p. 1455-1461.
297. Sala, A., et al., *Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside*. European Journal of Pharmacology, 2003. **461**(1): p. 53-61.
298. Pietta, P.G., *Flavonoids as antioxidants*. Journal of Natural Products, 2000. **63**(7): p. 1035-1042.
299. Guang, H.M. and G.H. Du, *Protections of pinocembrin on brain mitochondria contribute to cognitive improvement in chronic cerebral hypoperfused rats*. European Journal of Pharmacology, 2006. **542**(1-3): p. 77-83.
300. Meng, F., et al., *Pinocembrin attenuates blood-brain barrier injury induced by global cerebral ischemia-reperfusion in rats*. Brain Research, 2011. **1391**: p. 93-101.
301. Kongpichitchoke, T., J.L. Hsu, and T.C. Huang, *Number of Hydroxyl Groups on the B-Ring of Flavonoids Affects Their Antioxidant Activity and Interaction with Phorbol Ester Binding Site of PKCdelta C1B Domain: In Vitro and in Silico Studies*. J Agric Food Chem, 2015. **63**(18): p. 4580-6.
302. Bremner, P.D. and J.J.M. Meyer, *Pinocembrin chalcone: An antibacterial compound from Helichrysum trilineatum*. Planta Medica, 1998. **64**(8): p. 777.
303. Maciejewicz, W. and T. Meresta, *Quantitative determination of the bacteriostatic activity against Staphylococcus aureus of certain flavonoids, phenolic acids and*

- esters occurring in propolis*. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 1999. **43**(1): p. 71-76.
304. Park, Y.K., et al., *Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms*. Current Microbiology, 1998. **36**(1): p. 24-28.
  305. Soell, M., et al., *Binding of Streptococcus mutans SR protein to human monocytes: production of tumor necrosis factor, interleukin 1, and interleukin 6*. Infect Immun, 1994. **62**(5): p. 1805-12.
  306. Ogiso, H., et al., *Phosphorylation analysis of 90 kDa heat shock protein within the cytosolic arylhydrocarbon receptor complex*. Biochemistry, 2004. **43**(49): p. 15510-9.
  307. Coumailleau, P., et al., *Definition of a minimal domain of the dioxin receptor that is associated with Hsp90 and maintains wild type ligand binding affinity and specificity*. J Biol Chem, 1995. **270**(42): p. 25291-300.
  308. Chen, H.S., S.S. Singh, and G.H. Perdew, *The Ah receptor is a sensitive target of geldanamycin-induced protein turnover*. Arch Biochem Biophys, 1997. **348**(1): p. 190-8.
  309. Yin, Z.Y., E.C. Henry, and T.A. Gasiewicz, *(-)-Epigallocatechin-3-gallate Is a Novel Hsp90 Inhibitor*. Biochemistry, 2009. **48**(2): p. 336-345.
  310. Denis, M., et al., *Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **155**(2): p. 801-7.
  311. Perdew, G.H., *Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein*. J Biol Chem, 1988. **263**(27): p. 13802-5.
  312. Citri, A., B.S. Kochupurakkal, and Y. Yarden, *The achilles heel of ErbB-2/HER2: regulation by the Hsp90 chaperone machine and potential for pharmacological intervention*. Cell Cycle, 2004. **3**(1): p. 51-60.
  313. Citri, A., et al., *Hsp90 restrains ErbB-2/HER2 signalling by limiting heterodimer formation*. EMBO Rep, 2004. **5**(12): p. 1165-70.
  314. Xu, W., et al., *Hsp90, not Grp94, regulates the intracellular trafficking and stability of nascent ErbB2*. Cell Stress Chaperones, 2002. **7**(1): p. 91-6.
  315. Xu, W., et al., *Sensitivity of mature Erbb2 to geldanamycin is conferred by its kinase domain and is mediated by the chaperone protein Hsp90*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3702-8.
  316. Basso, A.D., et al., *Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39858-66.
  317. Sato, S., N. Fujita, and T. Tsuruo, *Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(20): p. 10832-7.
  318. Cortes-Gonzalez, C., et al., *Opposite effect of Hsp90alpha and Hsp90beta on eNOS ability to produce nitric oxide or superoxide anion in human embryonic kidney cells*. Cell Physiol Biochem, 2010. **26**(4-5): p. 657-68.
  319. Keppler, B.R., A.T. Grady, and M.B. Jarstfer, *The biochemical role of the heat shock protein 90 chaperone complex in establishing human telomerase activity*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 19840-8.

320. Haendeler, J., et al., *Regulation of telomerase activity and anti-apoptotic function by protein-protein interaction and phosphorylation*. FEBS Lett, 2003. **536**(1-3): p. 180-6.
321. Holt, S.E., et al., *Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes*. Genes Dev, 1999. **13**(7): p. 817-26.
322. Forsythe, H.L., et al., *Stable association of hsp90 and p23, but Not hsp70, with active human telomerase*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 15571-4.
323. Hughes D., G.J.B., Marcus C.B., Subbaramaiah K. and Dannenberg A.J, *HSP90 Inhibitors Suppress Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Activation of CYP1A1 and CYP1B1 Transcription and DNA Adduct Formation*. Cancer Prev Res (Phila). 2008 2008(Nov; 1(6)): p. 485–493.
324. Miyata, Y., H. Nakamoto, and L. Neckers, *The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks*. Curr Pharm Des, 2013. **19**(3): p. 347-65.
325. Sun, Y., et al., *Methylated phenanthrenes are more potent than phenanthrene in a bioassay of human aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling*. Environ Toxicol Chem, 2014. **33**(10): p. 2363-7.
326. Machala, M., et al., *Effects of methylated chrysenes on AhR-dependent and -independent toxic events in rat liver epithelial cells*. Toxicology, 2008. **247**(2-3): p. 93-101.
327. Knockaert, M., et al., *Independent actions on cyclin-dependent kinases and aryl hydrocarbon receptor mediate the antiproliferative effects of indirubins*. Oncogene, 2004. **23**(25): p. 4400-12.
328. Zhang, D., et al., *Pinocembrin inhibits matrix metalloproteinase expression in chondrocytes*. IUBMB Life, 2015. **67**(1): p. 36-41.
329. Ishida, M., et al., *Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway enhances cancer cell invasion by upregulating the MMP expression and is associated with poor prognosis in upper urinary tract urothelial cancer*. Carcinogenesis, 2010. **31**(2): p. 287-95.
330. Peng, T.L., et al., *Aryl hydrocarbon receptor pathway activation enhances gastric cancer cell invasiveness likely through a c-Jun-dependent induction of matrix metalloproteinase-9*. BMC Cell Biol, 2009. **10**: p. 27.
331. Villano, C.M., et al., *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in A2058 melanoma cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2006. **210**(3): p. 212-24.
332. Nilsson, U.W., S. Garvin, and C. Dabrosin, *MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 2007. **102**(3): p. 253-61.
333. Merlo, S. and M.A. Sortino, *Estrogen activates matrix metalloproteinases-2 and -9 to increase beta amyloid degradation*. Mol Cell Neurosci, 2012. **49**(4): p. 423-9.
334. Khamis, S., et al., *Phytochemistry and preliminary biological evaluation of Cyathostemma argenteum, a malaysian plant used traditionally for the treatment of breast cancer*. Phytotherapy Research, 2004. **18**(7): p. 507-510.
335. Szychowski, K.A., et al., *Triclosan activates aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent apoptosis and affects Cyp1a1 and Cyp1b1 expression in mouse neocortical neurons*. Environ Res, 2016. **151**: p. 106-114.

336. Chang, M.C., et al., *Induction of necrosis and apoptosis to KB cancer cells by sanguinarine is associated with reactive oxygen species production and mitochondrial membrane depolarization*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **218**(2): p. 143-51.
337. Dvorak, Z., et al., *Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine do not affect transcriptional activity of aryl hydrocarbon receptor: analyses in rat hepatoma cell line H4IIE.luc*. Food Chem Toxicol, 2006. **44**(9): p. 1466-73.
338. Karp, J.M., et al., *Sanguinarine activates polycyclic aromatic hydrocarbon associated metabolic pathways in human oral keratinocytes and tissues*. Toxicol Lett, 2005. **158**(1): p. 50-60.
339. Dvorak, Z., et al., *Sanguinarine activates polycyclic aromatic hydrocarbon associated metabolic pathways in human oral keratinocytes and tissues*. Toxicol Lett, 2005. **158**(2): p. 164-5.
340. Tian, Y., A.B. Rabson, and M.A. Gallo, *Ah receptor and NF-kappaB interactions: mechanisms and physiological implications*. Chem Biol Interact, 2002. **141**(1-2): p. 97-115.
341. Hong, T.B., et al., *Potential effects of chrysin on MDA-MB-231 cells*. Int J Mol Sci, 2010. **11**(3): p. 1057-69.
342. Sjostrom, J., et al., *The predictive value of bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, fas, and fasL for chemotherapy response in advanced breast cancer*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(3): p. 811-6.
343. Krock, B.L., et al., *The aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator is an essential regulator of murine hematopoietic stem cell viability*. Blood, 2015. **125**(21): p. 3263-3272.
344. Matikainen, T.M., et al., *Ligand activation of the aromatic hydrocarbon receptor transcription factor drives Bax-dependent apoptosis in developing fetal ovarian germ cells*. Endocrinology, 2002. **143**(2): p. 615-20.
345. Dietrich, C. and B. Kaina, *The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth*. Carcinogenesis, 2010. **31**(8): p. 1319-28.
346. Haarmann-Stemmann, T., et al., *Analysis of the transcriptional regulation and molecular function of the aryl hydrocarbon receptor repressor in human cell lines*. Drug Metabolism and Disposition, 2007. **35**(12): p. 2262-2269.
347. Ma, Q. and J.P. Whitlock, Jr., *The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(5): p. 2144-50.
348. Elizondo, G., et al., *Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast*. Mol Pharmacol, 2000. **57**(5): p. 1056-63.
349. Chang, X., et al., *Ligand-independent regulation of transforming growth factor beta1 expression and cell cycle progression by the aryl hydrocarbon receptor*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(17): p. 6127-39.
350. Amati, B., K. Alevizopoulos, and J. Vlach, *Myc and the cell cycle*. Front Biosci, 1998. **3**: p. d250-68.

351. Yang, X., et al., *The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells*. *Oncogene*, 2005. **24**(53): p. 7869-81.
352. Chen, Z., et al., *Cross-talk between ER and HER2 regulates c-MYC-mediated glutamine metabolism in aromatase inhibitor resistant breast cancer cells*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015. **149**: p. 118-27.
353. Wang, C., et al., *Estrogen induces c-myc gene expression via an upstream enhancer activated by the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor*. *Mol Endocrinol*, 2011. **25**(9): p. 1527-38.
354. Atanaskova, N., et al., *MAP kinase/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling and tumor growth but does not confer tamoxifen resistance*. *Oncogene*, 2002. **21**(25): p. 4000-8.
355. Bar Hoover, M.A., et al., *Aryl hydrocarbon receptor regulates cell cycle progression in human breast cancer cells via a functional interaction with cyclin-dependent kinase 4*. *Mol Pharmacol*, 2010. **77**(2): p. 195-201.
356. Huang, G. and C.J. Elferink, *Multiple mechanisms are involved in Ah receptor-mediated cell cycle arrest*. *Mol Pharmacol*, 2005. **67**(1): p. 88-96.
357. Abdelrahim, M., R. Smith, 3rd, and S. Safe, *Aryl hydrocarbon receptor gene silencing with small inhibitory RNA differentially modulates Ah-responsiveness in MCF-7 and HepG2 cancer cells*. *Mol Pharmacol*, 2003. **63**(6): p. 1373-81.
358. Gierthy, J.F., et al., *Correlation of in vitro and in vivo growth suppression of MCF-7 human breast cancer by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. *Cancer Res*, 1993. **53**(13): p. 3149-53.
359. Wang, W., R. Smith, 3rd, and S. Safe, *Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenicity in MCF-7 cells: modulation of hormone-induced cell cycle enzymes*. *Arch Biochem Biophys*, 1998. **356**(2): p. 239-48.
360. Wu, R., et al., *Lack of the aryl hydrocarbon receptor leads to impaired activation of AKT/protein kinase B and enhanced sensitivity to apoptosis induced via the intrinsic pathway*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. **320**(1): p. 448-57.
361. Hamidullah, et al., *Quercetin-6-C-beta-d-glucopyranoside, natural analog of quercetin exhibits anti-prostate cancer activity by inhibiting Akt-mTOR pathway via aryl hydrocarbon receptor*. *Biochimie*, 2015. **119**: p. 68-79.
362. Suizu, F., et al., *The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt*. *Dev Cell*, 2009. **17**(6): p. 800-10.
363. Fan, C.D., et al., *Ubiquitin-dependent regulation of phospho-AKT dynamics by the ubiquitin E3 ligase, NEDD4-1, in the insulin-like growth factor-1 response*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(3): p. 1674-84.
364. Sanchez, A.M., et al., *Estrogen receptor-alpha promotes breast cancer cell motility and invasion via focal adhesion kinase and N-WASP*. *Mol Endocrinol*, 2010. **24**(11): p. 2114-25.
365. Safe, S. and M. Wormke, *Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action*. *Chem Res Toxicol*, 2003. **16**(7): p. 807-16.

366. Wormke, M., et al., *Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes*. FEBS Lett, 2000. **478**(1-2): p. 109-12.
367. Chen, C., et al., *Urinary metabolite profiling reveals CYP1A2-mediated metabolism of NSC686288 (aminoflavone)*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **318**(3): p. 1330-42.
368. McLean, L., et al., *Aminoflavone induces oxidative DNA damage and reactive oxidative species-mediated apoptosis in breast cancer cells*. Int J Cancer, 2008. **122**(7): p. 1665-74.
369. Callero, M.A. and A.I. Loaiza-Perez, *The role of aryl hydrocarbon receptor and crosstalk with estrogen receptor in response of breast cancer cells to the novel antitumor agents benzothiazoles and aminoflavone*. Int J Breast Cancer, 2011. **2011**: p. 923250.
370. Angus, W.G., M. Campaigne Larsen, and C.R. Jefcoate, *TCDD elevates erbB2 expression and signaling in T47D cells by reversing serum potentiation of estrogen receptor activity, independent of estrogen levels and enhanced ER down-regulation*. Mol Cell Endocrinol, 2000. **170**(1-2): p. 1-13.
371. Magnifico, A., et al., *Protein kinase Calpha determines HER2 fate in breast carcinoma cells with HER2 protein overexpression without gene amplification*. Cancer Res, 2007. **67**(11): p. 5308-17.
372. Agullo, G., et al., *Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition*. Biochem Pharmacol, 1997. **53**(11): p. 1649-57.
373. Ferriola, P.C., V. Cody, and E. Middleton, Jr., *Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships*. Biochem Pharmacol, 1989. **38**(10): p. 1617-24.
374. Middleton, E., Jr., P. Ferriola, and G. Drzewiecki, *Effect of flavonoids on tumor promoter-induced basophil histamine release and protein kinase C*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 1989. **100**: p. 47-56.
375. Fujiki, H., et al., *Inhibition of tumor promotion by flavonoids*. Prog Clin Biol Res, 1986. **213**: p. 429-40.
376. Chien, S.T., et al., *Galangin, a novel dietary flavonoid, attenuates metastatic feature via PKC/ERK signaling pathway in TPA-treated liver cancer HepG2 cells*. Cancer Cell Int, 2015. **15**: p. 15.
377. Lee H.G., Y.J.H., *PKC- $\delta$  mediates TCDD-induced apoptosis of chondrocyte in ROS-dependent manner*. Chemosphere, 2010. **81**(8): p. 1039-44.
378. Allen-Petersen, B.L., et al., *Protein kinase Cdelta is required for ErbB2-driven mammary gland tumorigenesis and negatively correlates with prognosis in human breast cancer*. Oncogene, 2014. **33**(10): p. 1306-15.