

N° d'ordre : 3571

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET SCIENCES DE LA SANTE

PAR

Charlotte CARREAU

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : NUTRITION

Propriétés œstrogéniques des phyto-œstrogènes dans une lignée de cancer du sein. Implication des domaines de transactivation du récepteur aux œstrogènes alpha.

Soutenue le 27 Mars 2008

Après avis de :

Michèle SABBAAH (CR1 - CNRS, Paris)
Martine PERROT-APPLANAT (DR - CNRS, Paris)

Rapporteur
Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Jean-François NARBONNE (PR - Université Bordeaux 1)
Michèle SABBAAH (CR1 - CNRS, Paris)
Martine PERROT-APPLANAT (DR - CNRS, Paris)
Gilles FLOURIOT (CR1 - CNRS, Rennes)
Marie-Chantal CANIVENC-LAVIER (DR - INRA, Dijon)
Catherine BENNETAU-PELISSERO (PR - ENITA, Bordeaux)
Mylène POTIER (IR - ENITA, Bordeaux)

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Rapporteur de soutenance
Co-Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse

- 2008 -

A mes grands-parents ...

J'exprime mes vifs remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger mon travail :

Mr Jean-François Narbonne de présider le jury lors de ma soutenance de thèse.

Mme Michèle Sabbah et Mme Martine Perrot-Applanat d'avoir aimablement accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci de me consacrer un peu de votre temps et de m'apporter vos connaissances. Je vous témoigne de ma profonde gratitude.

Mr Gilles Flouriot d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse. Merci pour vos précieux conseils quant au déroulement de cette thèse et lors des soumissions des articles. Je vous témoigne de ma profonde reconnaissance.

Mme Marie-Chantal Canivenc-Lavier d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

Je remercie également le personnel de l'ENITA de Bordeaux où ce travail de thèse a été effectué :

Mme Catherine Bennetau-Pelissero de m'avoir accueillie au sein de son unité, d'avoir encadré une partie de ce travail et de m'avoir fait confiance durant ces trois années.

Mme Mylène Potier d'avoir encadré ce travail de thèse, d'avoir su aiguiller ce travail lors des moments de doute et d'avoir toujours été présente pour moi durant ces trois années. Merci pour tout.

Mr Patrick Sauvant de l'aide que vous m'avez apportée pour les corrections de ce manuscrit, de votre soutien pendant la dernière ligne droite, et des pauses café que vous avez si bien animées ...

Melle Valérie Lamothe grâce à qui les mauvais moments l'étaient un peu moins et les bons encore un peu plus. Merci de ta franchise, de ta simplicité et de ton amitié.

Merci à l'ensemble du personnel, des étudiants en thèse et des stagiaires qui ont rythmé la vie de l'ENITA.

Merci à Jean Magne de m'avoir accueillie à l'ENITA.

Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont eu à me supporter, j'avoue maintenant que ça n'a pas du être facile tous les jours ..!

Mes parents et mes sœurs qui m'ont toujours soutenue.

Caroline, merci pour tout.

Stéphane, Sébastien, Katleen, Laurent et Sabrina qui ont toujours réussi à me faire retrouver le sourire.

*Fabien, pour être toujours là quand il ne faut pas et malheureusement pas là le jour J..!
Merci pour ton amitié et ton soutien.*

Aurélien, pour tout ce que tu as su m'apporter pendant ces années, et pour ce que tu m'apporteras....

Propriétés œstrogéniques des phyto-œstrogènes dans une lignée de cancer du sein.

Implication des domaines de transactivation du récepteur aux œstrogènes alpha.

Les phyto-œstrogènes (PE), molécules d'origine végétale, possèdent des homologies structurales avec les œstrogènes leur permettant de se lier aux récepteurs spécifiques aux œstrogènes (RE) et d'agir comme des molécules pro- ou anti-œstrogéniques. Les œstrogènes et les RE sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques, notamment le cancer du sein. Il existe deux formes de RE α (66 et 46 kDa) qui diffèrent par leur partie N-terminale, où est situé le domaine de transactivation AF-1. Le deuxième domaine de transactivation AF-2, ligand dépendant, est similaire dans les deux RE α . L'objet de cette étude est de trouver parmi les PE testés ceux capables de moduler spécifiquement le RE (appelés SERM) dans une lignée cancéreuse mammaire, les MCF-7, afin de mieux comprendre leur impact sur le cancer du sein. Ainsi, il apparaît que les propriétés pro-œstrogéniques de certains PE sont associées à leur capacité à mobiliser le domaine AF-1 dans l'activation transcriptionnelle du RE α . A l'inverse, les composés mobilisant préférentiellement le domaine AF-2 du RE α induisent une faible activation transcriptionnelle et n'ont pas d'effets œstrogéniques. C'est le cas de l'entérolactone et la naringénine, SERM potentiels qui pourraient être de bons candidats dans un cadre de nutrition préventive contre le cancer du sein.

Mots clés : phyto-œstrogènes, récepteurs aux œstrogènes, domaines de transactivation, MCF-7, modulateurs spécifiques des récepteurs aux œstrogènes.

Estrogenic properties of phytoestrogens in a breast cancer cell line. Respective contribution exerted by estrogen receptor alpha transactivation functions.

Phytoestrogens (PE) are plants compounds sharing structural similarities with estrogens. These compounds, which bind to estrogen receptors (ER), may induce or inhibit estrogen action and have the potential to disrupt estrogen signalling. Estrogens and ER are involved in numerous physiological and/or pathological processes, in particular in breast cancer. The human ER α (hER α) gene can be alternatively spliced into proteins of 66 and 46 kDa respectively, which differ on their N-terminal where is located the transactivation domain AF-1. The second transactivation domain AF-2, which is ligand-dependant, is present in both ER. To elucidate the yet unclear mechanisms of ER activation/inhibition by PE in further details and find selective estrogen receptor modulators (SERM), we performed a comprehensive analysis and potency comparison of hER α transactivation by PE in a human breast cancer cell line, MCF-7. We show that estrogenic properties of some PE are linked to their capacity to induce an AF-1-dependant transactivation of hER α . In contrast, the PE inducing an AF-2-dependant transactivation of hER α are weak agonists and more importantly, they do not display any estrogenic properties. Such compounds, as enterolactone and naringenine, are interesting SERM, and further investigations should be performed to evaluate their potentials as candidates for a nutritional prevention of breast cancer.

Key words: phytoestrogens, estrogen receptors, transactivation functions, MCF-7, selective estrogen receptor modulators.

BIBLIOGRAPHIE

1. CARREAU C., FLOURIOT G., BENNETAU-PELISSERO C., POTIER M. “Enterodiol and enterolactone, two major diet-derived polyphenol metabolites, act in opposite fashion on ER α transcriptional activation in human breast cancer cells”, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, (2008) doi:10.1016/j.jsbmb.2008.03.032.

2. CARREAU C., FLOURIOT G., BENNETAU-PELISSERO C., POTIER M. “Impact of isoflavones and equol on the respective contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity. Consequence on breast cancer cell proliferation” soumis à *Molecular Nutrition and Food Research*, Février 2008.

ABSTRACTS

1. CARREAU C., FLOURIOT G., BENNETAU-PELISSERO C., SAUVANT P., POTIER M. “ER α transcriptional activity induced by phytoestrogens differs as a function of the cellular context” 5th PhytoHealth Congress, Norwich, UK, 2005 (Poster).
2. CARREAU C., FLOURIOT G., BENNETAU-PELISSERO C., SAUVANT P., POTIER M. “Enterolignans stimulate both hRE α 66 and hER α 46 isoforms in transfected MCF-7 cells” 1st International Congress on Food Safety, Budapest, Hungary, 2006 (Poster).
3. CARREAU C., FLOURIOT G., BENNETAU-PELISSERO C., SAUVANT P., POTIER M. “Effets des phyto-œstrogènes sur deux domaines de transactivation de hRE α : Importance des contextes cellulaires” Journée de l’école doctorale de l’Université de Bordeaux 1, Bordeaux, France, 2006 (Poster).
4. CARREAU C., FLOURIOT G., BENNETAU-PELISSERO C., SAUVANT P., POTIER M. “Effets des entéro-lignanes sur hRE dans les cellules cancéreuses humaines” Journée de l’école doctorale de Bordeaux 2, Arcachon, France, 2007 (Poster).
5. CARREAU C., FLOURIOT G., BENNETAU-PELISSERO C., POTIER M. “Estrogenic effects of isoflavones: Role of the two activation functions AF-1 and AF-2 of hRE α ” 10th European Nutrition Conference, Paris, France, 2007 (Poster).
6. CARREAU C., FLOURIOT G., BENNETAU-PELISSERO C., POTIER M. “Activation Function 1 of hRE α Mediates Estrogenic Effects of Mammalian Lignans” 10th European Nutrition Conference, Paris, France, 2007 (Poster). Prix “Young Scientist FENS AWARD”.

ABREVIATIONS

8-PN : 8-Prényl-Naringénine
AF : Domaine de transactivation
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
Akt : Protéine kinase B
AP-1 : Activator Protein 1
Boîte A : Boîte Activatrice
C : Coumestrol
CBP : CREB Binding Protein
CDK : Cyclin Dependant Kinase
CHIP : C-Terminus of hsp70-Interacting Protein
CREB : cAMP response element binding protein
D : Daïdzéine
DBD : DNA Binding Domain
DES : DiEthylStilbestrol
E : Equol
E₁ : œstrone
E₂ : 17 β-œstradiol
E₃ : œstriol
ED : Entérodol
EGF : Epidermal Growth Factor
EL : Entérolactone
eNOS : endothelial NO Synthase
ERA : Estrogen Replacement and Atherosclerosis
ERE : Estrogen Response Element
ERK : extracellular-signal regulated kinase
FSH : Folliculo Stimulating hormone
G : Génistéine
GnRH : Gonadotrophin Releasing Hormone
GRIP-1 : Glucocorticoid receptor Interacting
HDL : High Density Lipoprotein
HERS : Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study
Hip : Hsp Interacting Protein
Hop : Hsp Organizing Protein
Hsp : Heat Shock protein
ICI : ICI 182,780
IGF : Insulin-like growth factor

IP : Immunophiline
LBD : Ligand Binding Domain
LDL : Low Density Lipoprotein
LDL-R : LDL Receptor
LH : Luteinizing Hormone
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MMP : Matrix Metalloprotéases
Nar : Naringénine
NF- κ B : facteur nucléaire κ B
NLS : Nuclear Localization Signal
NO : Nitric Oxyde
NR : Nuclear Receptor
PE : Phyto-œstrogènes
PK : Protein Kinase
PI₃K : PhosphoInositol-3 Kinase
pS2 : trefoil facteur 1
R : Resvératrol
RE : Récepteur aux œstrogènes
RP : Récepteur à la Progestérone
S : Sérine
SERD : Selective Estrogen Receptor Down regulator
SERM : Selective Estrogen Receptor Modulator
SHBG : Sex Hormone Bonding Globulin
Sp1 : Specificity Protein 1
Src : sarcoma virus tyrosine kinase
SRC-1 : Steroid Receptor Coactivator 1
STAR : Study of Tamoxifen And Raloxifen
STAT-5 : Signal Transducer and Activator of Transcription
T₃, T₄ : Hormones thyroïdiennes
Tam : Tamoxifène
TGF : Transforming Growth Factor
THS : Traitement Hormonal Substitutif
TK : Thymidine Kinase
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRAP : Thyroid hormone receptor activating protein
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VENUS : Vegetable Estrogens in Nutrition and the Skeleton
WHI : Women Health Initiative
WHIMS : Women's Health Initiative Memory Study

FIGURES

Figure 1. Homologies structurales entre les œstrogènes et les phyto-œstrogènes : exemple de l'E₂ et de la daïdzéine

Figure 2. Structure chimique d'un coumestane : le coumestrol

Figure 3. Structures chimiques des lignanes et des entérolignanes

Figure 4. Structure de base des flavonoïdes

Figure 5. Structures chimiques de deux flavanones : la naringénine et la 8-prényl-naringénine

Figure 6. Structures chimiques de deux isoflavones : la génistéine et la daïdzéine

Figure 7. Structure chimique d'un stilbène : le trans-resvératrol

Figure 8. Un métabolite de la daïdzéine ayant des propriétés œstrogéniques : l'équol

Figure 9. Métabolisme des phyto-œstrogènes

Figure 10. Structure chimique des œstrogènes

Figure 11. Voie de synthèse des œstrogènes

Figure 12. Représentation fonctionnelle simplifiée de l'axe gonadotrope

Figure 13. Distribution tissulaire de RE α et de RE β

Figure 14. Structures, régions fonctionnelles et pourcentages d'homologies de séquences de RE α et de RE β

Figure 15. Les différentes boîtes d'activation et de répression composant les domaines A/B du RE α

Figure 16. Structures de RE α 66 et RE α 6

Figure 17. Régulation des RE par les protéines chaperonnes

Figure 18. Schéma de la voie de signalisation « classique »

Figure 19. Les différentes voies transcriptionnelles régulées par le récepteur aux œstrogènes

Figure 20. Schéma montrant la complexité des actions génomiques et non génomiques des récepteurs aux œstrogènes

Figure 21. Contrôle du développement et de la maturation des follicules ovariens par les œstrogènes

Figure 22. Effet de l'E₂ sur différents facteurs influençant l'activité des ostéoclastes

Figure 23. Schéma représentant l'activation par l'E₂ de la eNOS

Figure 24. Pharmacologie tripartite du récepteur aux œstrogènes

Figure 25. Conformations majeures induites par les agonistes et les antagonistes du récepteur aux œstrogènes

Figure 26. Structures des principaux ligands du récepteur aux œstrogènes

Figure 27. Coupe de sein

Figure 28. Evolution de l'architecture de la glande mammaire

Figure 29. Initiation, promotion et progression d'une cellule tumorale : rôle de l'équilibre entre anti et pro-oncogènes

Figure 30. Schéma de l'implication de l'E₂ dans la progression du cycle cellulaire dans les cellules du sein

Figure 31. Schéma des différentes constructions utilisées

Figure 32. Effet de l'E₂ sur l'activation transcriptionnelle de RE α 66 et de RE α 46 dans les lignées HeLa et HepG2

Figure 33. Effet du Tam sur l'activation transcriptionnelle de RE α 66 dans les lignées HeLa et HepG2

Figure 34. Effet de l'E₂ sur l'activation transcriptionnelle de RE α 66 et de RE α 46 dans les lignées CHO et MCF-7

Figure 35. Western Blot des RE α transfections transitoires et contrôles positifs

Figure 36. Effets de l'E₂ sur l'activation transcriptionnelle de RE α 66 et de RE β dans les CHO, HeLa et HepG2

Figure 37. Effets des isoflavones sur l'activation transcriptionnelle des différentes formes de RE α dans les HeLa et les HepG2

Figure 38. Effets des entérolignanes sur l'activation transcriptionnelle des différentes formes de RE α dans les HeLa et les HepG2

Figure 39. Effets du coumestrol et du resvératrol sur l'activation transcriptionnelle des différentes formes de RE α dans les HeLa et les HepG2

Figure 40. Effets des flavanones sur l'activation transcriptionnelle des différentes formes de RE α dans les HeLa et les HepG2

Figure 41. Structures chimiques de la Nar et de la 8-PN

Figure 42. Effets de l'E₂, la Nar et la 8-PN sur l'activation transcriptionnelle de RE α 66 et de RE β dans les MCF-7

Figure 43. Effets de l'E₂, la Nar et la 8-PN sur l'activation transcriptionnelle des différentes constructions du RE α dans les MCF-7

Figure 44. Effets de l'E₂, la Nar et la 8-PN sur l'activation transcriptionnelle du RE α 66 dans les HeLa et HepG2

Figure 45. Effets de l'E₂, la Nar et la 8-PN sur l'activation transcriptionnelle des différentes constructions du RE α dans les HeLa et HepG2

Figure 46. Effets de l'E₂, la Nar et la 8-PN sur l'expression de RE α 66 et RE α 46

Figure 47. Effets de l'E₂, la Nar et la 8-PN sur l'expression de l'ARNm de pS2

Figure 48. Effets de l'E₂, la Nar et la 8-PN sur la prolifération des MCF-7

Figure 49. Différence de conformation induite par l'E₂ et la génistéine

TABLEAUX

Tableau 1. Concentrations en lignanes de quelques aliments, en μg pour 100 g de poids frais

Tableau 2. Sources alimentaires des flavanones totales (mg/100 g de poids frais ou mg/L)

Tableau 3. Sources alimentaires de la génistéine et la daïdzéine, en μg /100 g de poids frais

Tableau 4. Concentrations en isoflavones d'aliments dérivés du soja, en mg/100 g ou en mg/100 mL

Tableau 5. Concentrations en resvératrol dans divers produits alimentaires

Tableau 6. Distribution tissulaire de RE α et de RE β

Tableau 7. Composition du mélange réactionnel et programme de RT

Tableau 8. Mélange pour un tube pour la PCR

Tableau 9. Programme PCR

Tableau 10. Numéro de séquences des gènes cibles, séquences et T_m des amorces utilisées pour les PCR, tailles attendues des fragments amplifiés

Tableau 11. Effets des différents PE sur l'activation transcriptionnelle de RE α 66 et de RE β dans les HeLa, HepG2 et CHO

Tableau 12. Effets des PE sur l'activation transcriptionnelle des différentes formes de RE α dans les CHO

Tableau 13. RBA (Relative Binding Affinity) de divers phyto-œstrogènes pour RE α et RE β

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	18
I. Les phyto-œstrogènes.....	19
A. Origine et diversité des phyto-œstrogènes	19
1. Historique, définition et structure générale.....	19
2. Les différentes classes de phyto-œstrogènes	20
a) Les coumestanes.....	20
b) Les lignanes.....	20
c) Les flavonoïdes	21
d) Les stilbènes	23
B. Sources alimentaires et biodisponibilité des phyto-œstrogènes chez l'Homme	24
1. Sources alimentaires et exposition des populations.....	25
2. La biodisponibilité des phyto-œstrogènes	30
II. Œstrogènes, récepteurs aux œstrogènes	33
A. Les œstrogènes : structure, synthèse et concentrations circulantes.....	33
B. Les récepteurs aux œstrogènes	36
1. Présentation générale	36
2. Localisation des récepteurs aux œstrogènes	37
3. Structure des récepteurs aux œstrogènes	38
4. Les différentes formes de récepteurs aux œstrogènes.....	41
C. Voies de signalisation des récepteurs aux œstrogènes	42
1. Régulation des récepteurs aux œstrogènes par les protéines chaperonnes	42
2. Modifications post-traductionnelles des récepteurs aux œstrogènes	44
a) Phosphorylations	44
b) Acétylations.....	44
c) Ubiquitylations.....	45
d) Sumoylations.....	45
e) Prénylations	45
3. Voie de signalisation génomique « classique »	46

4.	Voies de signalisation génomiques dites « ERE- indépendantes ».....	47
5.	Corégulateurs des récepteurs aux œstrogènes.....	49
a)	Coactivateurs	49
b)	Corépresseurs	51
6.	Voies de signalisation non génomiques	53
7.	Voies de signalisation ligand indépendantes	54
III.	Des œstrogènes aux phyto-œstrogènes : Impact sur la santé humaine	56
A.	Rôles physiologiques des œstrogènes et des récepteurs aux œstrogènes.....	56
1.	Invalidation des récepteurs aux œstrogènes.....	56
2.	Effets physiologiques et cellulaires des œstrogènes	57
a)	Les œstrogènes et la fonction de reproduction.....	57
b)	Les œstrogènes et le tissu osseux	60
c)	Les œstrogènes, la cognition et les maladies neurodégénératives.....	61
d)	Les œstrogènes et le système cardio-vasculaire	62
3.	Utilisation thérapeutique des œstrogènes.....	64
B.	SERM et visée thérapeutique	66
1.	Notion de SERM.....	66
2.	Utilisation thérapeutique des SERM.....	68
3.	Utilisation thérapeutique des anti-œstrogènes	69
C.	Les effets des phyto-œstrogènes	72
1.	Les phyto-œstrogènes, la fonction de reproduction et la ménopause	72
2.	Les phyto-œstrogènes et l'ostéoporose	72
3.	Les phyto-œstrogènes et le système nerveux central	73
4.	Les phyto-œstrogènes et le système cardio-vasculaire	73
IV.	Impact des œstrogènes, des SERM et des phyto-œstrogènes sur le cancer du sein.....	75
A.	Le cancer du sein.....	75
1.	Epidémiologie	75
2.	Développement de la glande mammaire.....	76
3.	Mécanisme de cancérogenèse mammaire	78

4.	Œstrogènes et les récepteurs aux œstrogènes dans le cancer du sein	79
5.	Divers traitements existants	81
B.	L'hormonothérapie, les SERM et les phyto-œstrogènes dans le cancer du sein.....	82
1.	L'hormonothérapie	82
2.	Données expérimentales sur les SERM et les phyto-œstrogènes dans le cancer du sein	83
a)	Les SERM	83
b)	Les SERD	85
c)	Les phyto-œstrogènes.....	85
	OBJECTIFS	88
	MATERIEL ET METHODES	91
I.	MATERIEL.....	92
A.	Lignées cellulaires utilisées.....	92
1.	Une lignée cancéreuse mammaire : la lignée MCF-7	92
2.	Des lignées modèles d'étude.....	92
a)	La lignée HepG2	92
b)	La lignée HeLa	92
c)	La lignée CHO	93
B.	Milieus de culture	93
C.	Produits chimiques	93
D.	Plasmides utilisés	94
II.	METHODES	96
A.	Culture cellulaire	96
B.	Etude de la prolifération cellulaire	97
C.	Transformation, amplification et purification de l'ADN plasmidique.....	97
D.	Transfections transitoires	98
E.	Mesure des gènes rapporteurs	99
1.	L'activité β -galactosidase	99
2.	L'activité luciférase.....	99

F.	Analyse de l'expression des ARNm.....	100
1.	L'extraction des ARN totaux	100
2.	La transcription inverse et l'amplification	101
G.	Analyse de l'expression des protéines	103
1.	L'extraction des protéines totales	103
2.	L'analyse de l'expression protéique par Western Blot	104
H.	Analyse de l'activité des métalloprotéases de la matrice	106
1.	La préparation des échantillons.....	106
2.	L'électrophorèse et la révélation.....	106
I.	Expression des résultats et analyses statistiques	107
	RESULTATS	109
I.	PREAMBULE.....	110
A.	Validation des modèles d'étude	110
1.	Contextes cellulaires	110
2.	Détection protéique après transfections transitoires	112
3.	Effet de l'E ₂ sur l'activation transcriptionnelle des RE α et RE β dans trois lignées cellulaires modèles	113
B.	Effets des phyto-œstrogènes sur l'activation transcriptionnelle de RE α et de RE β ..	114
C.	Rôles des domaines AF-1 et AF-2 dans l'activation transcriptionnelle des RE α induite par les phyto-œstrogènes	116
1.	Les isoflavones.....	117
2.	Les entérolignanes	118
3.	Le coumestrol et le resvératrol.....	119
4.	Les flavanones	120
D.	Conclusion.....	121

II.	LES ENTEROLIGNANES, ARTICLE 1	122
A.	Contexte de l'étude.....	122
B.	Enterodiol and enterolactone, two-major diet-derived polyphenol metabolites have different impact on ER α transcriptional activation in human breast cancer cells	124
III.	LES ISOFLAVONES, ARTICLE 2.....	134
A.	Contexte de l'étude.....	134
B.	Respective contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor α induced transcriptional activity by isoflavones and equol: Consequence on breast cancer cell proliferation	135
IV.	LES FLAVANONES, RESULTATS PRELIMINAIRES	151
A.	Contexte de l'étude.....	151
B.	Effets de la Nar et la 8-PN sur l'activation transcriptionnelle des RE dans les MCF-7	152
C.	Rôle des domaines de transactivation AF dans l'activation transcriptionnelle de RE	153
D.	Rôles des domaines de transactivation AF dans l'activation transcriptionnelle des différentes formes de RE α	154
E.	Effets œstrogéniques des flavanones dans les cellules MCF-7.....	157
1.	Détection protéique de RE α	157
2.	Régulation du gène codant pS2.....	158
3.	Prolifération des MCF-7	159
F.	Conclusion.....	160
	DISCUSSION	161
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	174

INTRODUCTION

I. Les phyto-œstrogènes

A. Origine et diversité des phyto-œstrogènes

1. Historique, définition et structure générale

L'existence de perturbateurs endocriniens dans le monde végétal a été mise en évidence dans les années 1940. En effet, des brebis australiennes paissant dans des prairies riches en trèfle et en luzerne connaissaient des problèmes d'infertilité, des avortements précoces ainsi que des anomalies au niveau de leur appareil reproducteur (Bennetts *et al.*, 1946). De plus, les mâles castrés présentaient des anomalies de la prostate et de la glande bulbo-urétrale et sécrétaient un fluide mammaire. Par la suite, de nombreuses études ont rapporté d'autres effets de substances végétales sur la fertilité des herbivores. Ces perturbateurs endocriniens ont pris le nom de phyto-œstrogènes (PE) dans la littérature à la fin des années 1980.

Les PE (par exemple la daïdzéine) sont des molécules issues du monde végétal, présentant des homologies structurales avec les œstrogènes endogènes, comme le 17 β -œstradiol (E₂) (**figure 1**). De par la présence d'un noyau phénolique, ils sont capables de se lier aux récepteurs spécifiques aux œstrogènes (RE) et peuvent agir comme des agonistes ou des antagonistes des œstrogènes.

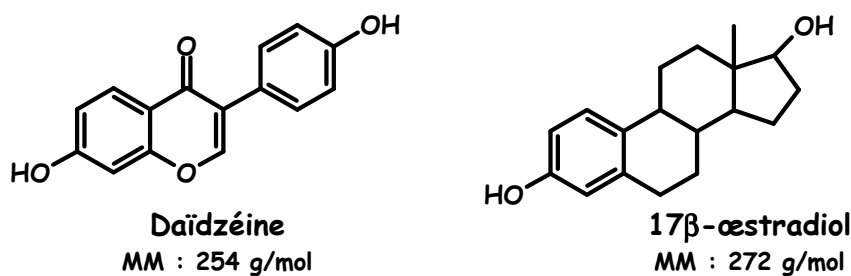


Figure 1. Homologies structurales entre les œstrogènes et les PE : exemple de l'E₂ et de la daïdzéine

Les PE sont trouvés dans un grand nombre de végétaux et en quantité variable. Ce sont des molécules de faible poids moléculaire, possédant un ou plusieurs cycles aromatiques porteurs d'au moins un groupe hydroxyle. Ces substances appartiennent à la grande famille des polyphénols.

Les PE sont présents sous formes conjuguées à différents types de radicaux sucrés et sont ainsi appelés glycosides : les β -glucosides, associés à un radical glucose, les acétyles, associés à un glucoside acétylé et les malonyles, associés à un glucoside malonylé. Les malonyles ne sont pas présents naturellement dans les aliments *à priori*, mais obtenus par transformation lors des processus de cuisson.

2. Les différentes classes de phyto-œstrogènes

Les coumestanes, les lignanes ou entérolignanes, les flavonoïdes et les stilbènes représentent les différentes classes de PE.

a) Les coumestanes

Les principaux coumestanes présentant une activité œstrogénique sont le coumestrol et le 4'méthoxycoumestrol. Le coumestrol est le composé le plus œstrogénique de la famille (**figure 2**).

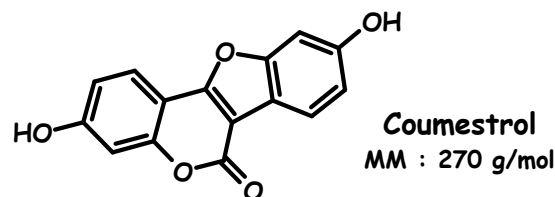


Figure 2. Structure chimique d'un coumestane : le coumestrol

Dans les plantes, les coumestanes apparaissent lors d'une attaque fongique ou bactérienne, ce qui leur confère le rôle de phytoalexine (Le Bars et Le Bars, 1987). Ils sont trouvés majoritairement dans les germes de trèfle et de soja, les légumes et la luzerne (Cornwell *et al.*, 2004).

b) Les lignanes

Les lignanes sont caractérisés par une structure C6-C3-C3-C6. Le matairésinol et le sécoisolaricirésinol sont les lignanes les plus étudiés. Ces deux molécules ne possèdent pas d'activité œstrogénique, mais peuvent être converties par la flore intestinale en entérodiol et entérolactone (**figure 3**), appelés entérolignanes, qui eux possèdent une activité œstrogénique (Setchell *et al.*, 1981).

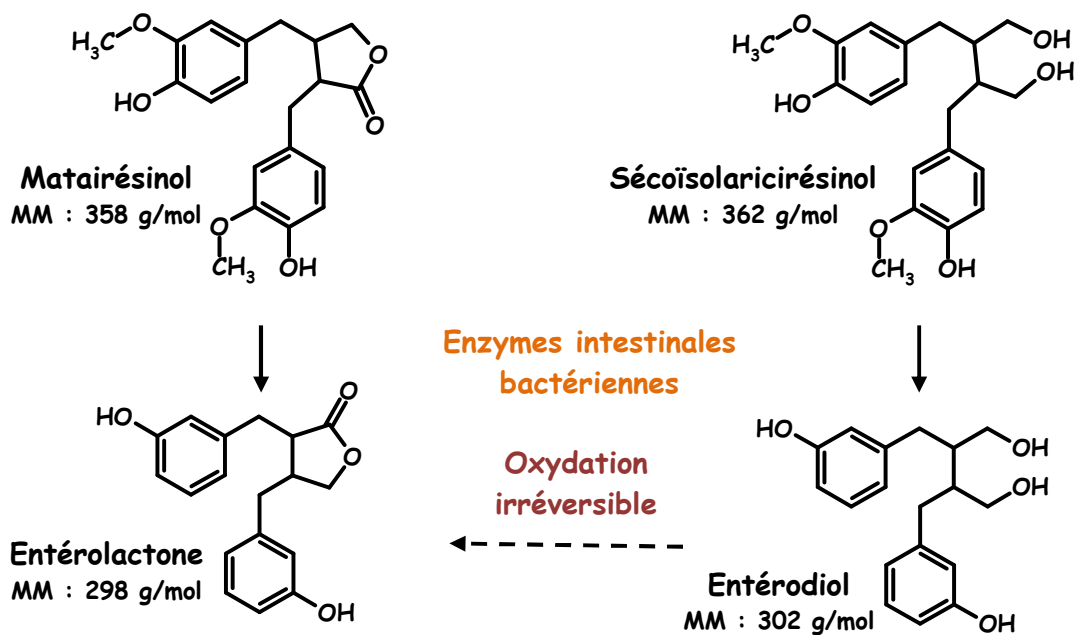


Figure 3. Structures chimiques des lignanes et des entérolignanes (Duncan *et al.*, 2003)

Le matairésinol et le sécoisolaricirésinol ont longtemps été considérés comme les principaux précurseurs des entérolignanes. Cependant, il a récemment été démontré que le pinorésinol et le laricirésinol, abondants dans l'alimentation, peuvent aussi être des précurseurs d'entérolignanes (Milder *et al.*, 2005). Par ailleurs, il a été montré chez le rat que la lignine, un polymère glycosylé, peut être clivée en éléments plus simples, eux-mêmes métabolisables en entérolignanes (Begum *et al.*, 2004).

Les lignanes sont principalement retrouvés dans la graine de lin, mais également en très faible quantité dans quelques céréales, fruits ou légumes.

c) Les flavonoïdes

Cette classe regroupe plus de 5000 molécules de grande variabilité structurale (Nijveldt *et al.*, 2001). La structure de base des flavonoïdes est une structure diphenylpropane C6-C3-C6, formant deux cycles aromatiques (A et B) liés par trois carbones formant un hétérocycle C (**figure 4**).

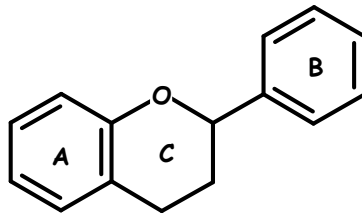


Figure 4. Structure de base des flavonoïdes (Ross et Kasum, 2002)

Les flavonoïdes sont classés selon la nature des substitutions présentes sur les cycles de ce motif de base et selon la nature du cycle C. Il s'agit de glycosylations, d'hydrogénations, d'hydroxylations, de malonylations, de méthylations et d'acétylations.

De ce fait, les flavonoïdes peuvent être divisés en six sous classes : les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanols ou catéchines, les anthocyanidines et les isoflavones. Compte tenu du grand nombre de molécules, cet exposé se limitera aux flavanones et aux isoflavones, composés qui nous intéressent plus particulièrement pour la suite de nos travaux.

- **Les principales flavanones sont** la naringénine, la 8-prényl-naringénine, l'hespérétine, l'isosakuranétine et l'ériodictyol (**figure 5**). Les flavanones sont caractéristiques des agrumes et sont concentrées dans la peau et l'albédo, la partie blanche et spongieuse localisée entre la peau et la chair.

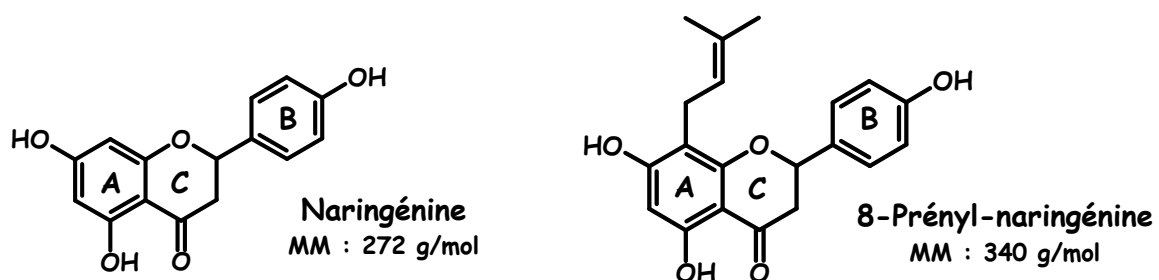


Figure 5. Structures chimiques de deux flavanones : la naringénine et la 8-prényl-naringénine

- **Les principales isoflavones** sont la génistéine et son précurseur la biochanine A, la daïdzéine et son précurseur la formononétine et la glycitéine.

Ces molécules sont caractérisées par l'attachement du cycle B en position 3 de l'hétérocycle. Elles ne présentent pas de carbone asymétrique et ont donc une structure plane. Par conséquent, leur structure est très proche de celle de l'E₂, avec notamment une distance entre les deux groupements hydroxyles de 12 Å et un angle dièdre entre ces derniers (Katzenellenbogen, 1980). Cette étude bibliographique et nos travaux se focaliseront sur la génistéine et la daïdzéine, représentées dans la **figure 6**.

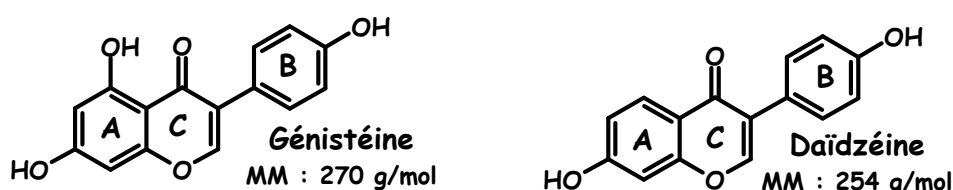


Figure 6. Structures chimiques de deux isoflavones: la génistéine et la daïdzéine

Les isoflavones peuvent exister sous forme d'aglycones, mais le plus souvent, dans les plantes, elles se présentent à l'état de glycosides. Elles sont très majoritairement présentes dans les plantes de la famille des légumineuses comme le soja, le trèfle, la luzerne, les pois et haricots en grain, ainsi que dans une racine (le kudzu) longtemps utilisée dans la pharmacopée chinoise.

d) Les stilbènes

Ils sont constitués de deux noyaux aromatiques liés par un groupe éthylénique. Le principal stilbène connu est une phytoalexine, le resvératrol (**figure 7**). Il existe en fait deux isomères de cette molécule, mais seule la forme *trans* est douée d'activité œstrogénique (Cornwell *et al.*, 2004). Les stilbènes sont peu répandus et principalement retrouvés dans les baies de raisin, donc dans le jus de raisin et le vin (Gehm *et al.*, 2004).

Le resvératrol est également présent dans les cacahuètes et ses produits dérivés, ainsi que dans certaines plantes médicinales, plus particulièrement dans des racines utilisées en médecine traditionnelle chinoise (Chung *et al.*, 1992).

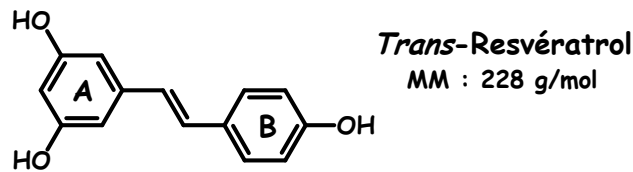


Figure 7. Structure chimique d'un stilbène : le *trans-resvératrol*

B. Sources alimentaires et biodisponibilité des phyto-œstrogènes chez l'Homme

Les PE sont apportés dans l'alimentation par les produits végétaux. Ils peuvent également se retrouver chez des animaux ayant une alimentation végétale. Cependant, les données de biodisponibilité acquises par exemple chez le rat et le poisson tendent à montrer que ces composés ne s'accumulent pas dans les tissus ou les produits dérivés. Aussi, l'exposition humaine *via* les produits animaux n'est pas significative (Gontier-Latonnelle *et al.*, 2007).

Il existe une grande diversité, mais aussi une grande variation, des effets des PE observés chez l'Homme. Ceci s'explique, d'une part, car la relation entre les quantités ingérées et les effets physiologiques n'est pas établie de façon correcte chez l'Homme (AFSSA et AFSSAPS, 2005). D'autre part, il existe de réelles variations entre la quantité ingérée de PE et les concentrations circulantes, dues à différents paramètres :

- La variabilité des formes d'apport, s'il s'agit d'aliments ou de gélules (Hubert *et al.*, 2005 ; Vergne *et al.*, 2008a).
- La variabilité dans la composition des mélanges, suggérant une incidence sur la biodisponibilité des molécules.
- La variabilité interindividuelle, comme la diversité de la flore intestinale. Par exemple, Mathey a montré que pour 100 mg d'isoflavones ingérés de façon réitérée, les concentrations circulantes pouvaient varier de 1 à 10 μ M selon les individus (Mathey *et al.*, 2006).

1. Sources alimentaires et exposition des populations

Il existe des bases de données exclusivement consacrées aux concentrations des PE trouvées dans les plantes et les produits alimentaires dérivés : ces bases de données sont issues notamment du programme européen VENUS (Vegetable Estrogens in Nutrition and the Skeleton), ainsi qu'une étude américaine menée par l'équipe de Horn-Ross (Horn-Ross *et al.*, 2000 ; Kiely *et al.*, 2003).

Les principales sources alimentaires de coumestanes sont les légumes. Cependant, ils restent très peu répandus dans l'alimentation humaine. En effet, les concentrations de coumestrol sont très faibles, de l'ordre de quelques dizaines de μg /100 g de poids sec de certains légumes (pois, choux de Bruxelles, haricots Pinto...), jusqu'à des quantités inférieures au μg /100 g de pain au sésame (Thompson *et al.*, 2006). Les germes de soja et de trèfle ont des concentrations plus élevées, respectivement 7 et 28 mg/100 g de poids sec (Cornwell *et al.*, 2004).

La plus grande source connue de lignanes est la graine de lin, faiblement consommée dans un régime alimentaire traditionnel. Les graines de lin contiennent 153 μg de matairesinol et 375 mg de sécoisolaricirésinol pour 100 g de poids sec. Les autres sources alimentaires de lignanes sont les céréales, les fruits secs et certains légumes. L'analyse de différents thés noirs ou verts a révélé des quantités de l'ordre de 8 à 12 μg de lignanes pour 100 g de poids sec (Thompson *et al.*, 2006).

L'ubiquité des lignanes, la diversité des précurseurs d'entérolignanes dans les végétaux et leur abondance dans les céréales, en particulier complètes, en font une des principales sources de PE dans l'alimentation des populations occidentales non consommatrices de soja (Bhakta *et al.*, 2006). De plus, l'utilisation récente et croissante de graines de lin dans la fabrication de pains mais aussi dans l'alimentation des animaux tendra certainement à augmenter les apports en lignanes. Le **tableau 1** récapitule les concentrations en lignanes de divers aliments.

Tableau 1. Concentrations en lignanes de quelques aliments, en μg pour 100g de poids frais (Thompson *et al.*, 2006)

	MAT	SECO	LAR	PINO
GRAINES				
Graine de soja	1,8	79,1	99,6	88,7
Graine de sésame	123,1	7,3	1 052,4	6 814,5
NOIX				
Marron	0,5	172,7	7,8	5,6
Pistache	0,1	44,6	123	31,2
LEGUMES				
Chou vert	0,4	5,9	66,7	24,8
Ail	4,8	42,0	54,4	481,9
FRUITS SECS				
Abricot sec	0,6	147,6	62,1	190,1
Datte séchée	0,3	106,2	116,9	100,0

MAT : matairesinol ; SECO : sécoisolaricirésinol ; LAR : laricirésinol ; PINO : pinorésinol

Les flavanones sont assez répandues dans l'alimentation humaine, notamment dans les agrumes, majoritairement sous forme glycosylée avec un glucose ou avec des disaccharides comme le rutinose ou le néohespéridose. Chaque catégorie d'agrumes est caractérisée par un profil particulier de flavanones : les glycosides présentant un rutinose comme l'hésperidine (hésperétine glycosylée) sont sans saveur et principalement présents dans le citron, la mandarine et l'orange, alors que ceux présentant un néohespéridose comme la naringine (dérivé sucré de la naringénine) confèrent un goût amer caractéristique du pamplemousse et de l'orange amère.

Comme les jus d'agrumes sont les jus de fruits les plus consommés dans le monde, ils contribuent donc fortement à l'apport de PE dans l'alimentation (SCEES, 2006). Les principales sources alimentaires de flavanones sont consignées dans le **tableau 2**.

Tableau 2. Sources alimentaires des flavanones totales (mg/100 g de poids frais ou mg/L) (Silberberg, 2005)

Pamplemousse	440 - 880
Peau de pamplemousse	1 468 - 2 746
Jus de pamplemousse	96 - 543
Orange	270 - 600
Jus d'orange amère	487 - 584
Jus de mandarine	230 - 440
Jus de citron	131 - 290

Concernant les isoflavones, les études de Liggins ont établi les concentrations de génistéine et de daïdzéine dans divers fruits, légumes et noix (Liggins *et al.*, 2000a ; b), dont les valeurs sont rapportées dans le **tableau 3**. Il apparaît ainsi que les concentrations les plus élevées se trouvent dans les graines de soja.

Tableau 3. Sources alimentaires de la génistéine et la daïdzéine, en $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de poids frais (Liggins *et al.*, 2000a ; b)

	GENISTEINE	DAIDZEINE
LEGUMES		
Lentilles	8	14
Graines de soja	83 800	58 300
FRUITS		
Fruit de la passion	11	7
Groseille	178	46
Raisin	125	59
NOIX		
Cacahuète	16	8
Noisette	19	6
Noix de coco	11	8

Il existe deux catégories d'aliments traditionnels asiatiques : ceux de première transformation, obtenus par pressages et trempages successifs et ceux obtenus par fermentation. Le produit le plus connu obtenu par trempages successifs est le tofu et des doses d'isoflavones allant de 3,6 à 67,5 mg pour 100 g de tofu ont été rapportées (Cornwell *et al.*, 2004). Les produits obtenus après fermentation sont les nattos (suite à l'action de *Bacillus natto*), les misos (suite à l'action d'*Aspergillus oryzae*) et les tempehs (suite à l'action de *Rhizopus oligosporus*).

Ces produits sont consommés tels quels, ou rentrent dans la formulation d'autres produits alimentaires. De nombreux produits à base de soja sont disponibles sur les marchés occidentaux tels que les jus de soja, les yaourts, les crèmes desserts, les steaks de soja, les saucisses... Le **tableau 4** présente les concentrations en isoflavones de quelques uns de ces produits dérivés.

Tableau 4. Concentration en isoflavones d'aliments dérivés du soja, en mg/100 g ou en mg/ 100 mL, (Thompson *et al.*, 2006 ; Vergne *et al.*, 2008a)

Fromage de soja	65,0
Yaourts au soja	10,0
Crème dessert vanillée	1,8
Lait de soja pour nourrissons	1,8 à 3,8

Par ailleurs, de nombreux compléments alimentaires à base de PE et plus particulièrement d'isoflavones de soja sont aujourd'hui disponibles sur le marché, qui a nettement augmenté ces dix dernières années dans les pays occidentaux. Actuellement, environ 150 compléments alimentaires sont disponibles sur le marché français. Ces compléments sont principalement destinés aux femmes ménopausées pour compenser le déficit naturel en œstrogènes et pallier les symptômes de la ménopause.

Les concentrations en isoflavones de plusieurs compléments alimentaires commercialisés en France ont été mesurées et l'apport journalier peut être compris entre 2 et 100 mg selon les prises recommandées par les industriels des compléments alimentaires (Vergne *et al.*, 2008a).

Au niveau mondial, toutes les populations sont exposées aux isoflavones, à des concentrations diverses selon leur situation géographique et/ou leur régime alimentaire.

Les populations asiatiques ont une consommation élevée en légumes et particulièrement en soja, aliment traditionnel depuis plus de 4000 ans, ce qui représente 25 à 50 mg d'isoflavones par jour en moyenne (Messina *et al.*, 2006).

Dans les pays occidentaux, la consommation de soja reste faible depuis son apparition dans les années 1940, mais les apports moyens en isoflavones dans une alimentation occidentale typique ont été estimés à 0,4 mg/jour (AFSSA et AFSSAPS, 2005).

Il existe toutefois des exceptions, il s'agit des végétariens et des végétaliens ou encore des orthorexiques. En effet, dans ces populations, le soja est largement consommé car il constitue une source importante de protéines. Ainsi, il a été montré que les végétariens présentent des concentrations plasmatiques jusqu'à 50 fois plus élevées que les omnivores (Peeters *et al.*, 2007).

Des teneurs faibles en isoflavones ont été retrouvées dans des laits commerciaux de vaches qui reçoivent des concentrés à base de soja pour augmenter leur production laitière. Deux études réalisées en Australie et en France rapportent que des concentrations en isoflavones peuvent varier de 1 à 1000 µg/L selon les saisons (étable ou pâturage) et l'alimentation (concentré ou herbe) des animaux (King *et al.*, 1998 ; Antignac *et al.*, 2003). Les laits fermentés, les fromages et les desserts lactés sont donc susceptibles de contenir de faibles quantités d'isoflavones (AFSSA et AFSSAPS, 2005). Ainsi, une poule nourrie avec une alimentation fortement concentrée en soja produit des œufs dont le jaune contient des isoflavones (Saitoh *et al.*, 2001).

Les stilbènes, dernière famille de PE, sont assez peu répandus dans l'alimentation. Le resvératrol se trouve principalement dans certains vins rouges (de 0,1 à 15 mg/L en fonction des cépages, notamment les Bourgognes) et dans les cacahuètes (**tableau 5**).

Tableau 5. Concentrations en resvératrol dans divers produits alimentaires (Cornwell *et al.*, 2004)

JUS DE RAISIN	5,0
VINS (en mg/L)	
Cabernet sauvignon	0,4 - 8,9
Merlot	1,0 - 15,3
Vin blanc	0,0 - 0,3
CACAHUETES (en mg/100 g)	
Cacahuète verte	0,20 - 0,70
Beurre de cacahuète	0,02 - 1,00

En conclusion, les sources des PE et l'exposition des populations à ces composés peuvent être très variables, mais leur simple présence n'implique pas forcément un effet physiologique. En effet, pour être actif au niveau tissulaire, un nutriment doit être absorbé, métabolisé, puis transporté jusqu'aux cellules cibles, tandis qu'une autre partie est éliminée. La biodisponibilité des PE est donc un paramètre important à considérer dans l'interprétation des effets physiologiques de ces molécules.

2. *La biodisponibilité des phyto-œstrogènes*

La biodisponibilité d'un nutriment se définit comme la fraction de l'apport alimentaire capable de remplir un rôle biologique. Elle prend donc en compte les notions d'absorption, de transport, de métabolisme, de distribution, de stockage et d'élimination de ce nutriment (Duncan *et al.*, 2003). La plupart des PE sont sous forme de glycosides (glucosylés, acétylés ou malonylés) dans les végétaux et sont donc inactifs biologiquement. Ces formes conjuguées sont hydrolysées par les glycosidases des entérocytes (Rowland *et al.*, 2003). Les composés aglycones ainsi obtenus, en raison de leur caractère lipophile, peuvent alors être absorbés et rejoindre le foie, organe clé du métabolisme des PE. Au niveau du foie, les PE sont hydroxylés, sulfatés ou glucuronidés afin de permettre leur élimination par voie biliaire ou leur distribution dans la circulation générale. Une partie des PE, non absorbée dans l'intestin, se retrouve au niveau du colon où ils vont subir l'action d'enzymes issues du métabolisme bactérien qui les transformeront en métabolites actifs (l'entérodol ou l'équol par exemple).

Ainsi, les lignanes peuvent être convertis en molécules bioactives, les entérolignanes, par déhydroxylation et déméthylation (Axelson *et al.*, 1982 ; Xie *et al.*, 2003). L'entérodol par exemple, peut être alors directement absorbé, ou subir une oxydation irréversible pour donner l'entérolactone. Cette conversion n'est pas systématique, puisque certains lignanes (sécoïsoaricirésinol, matairésinol) ont été détectés dans les urines (Duncan *et al.*, 2003).

Les isoflavones peuvent subir des transformations similaires. Ainsi, la génistéine peut être transformée en para-éthyl-phénol et la daïdzéine en équol, une isoflavane qui a des propriétés œstrogéniques (**figure 8**) et/ou en O-desméthylangolensine.

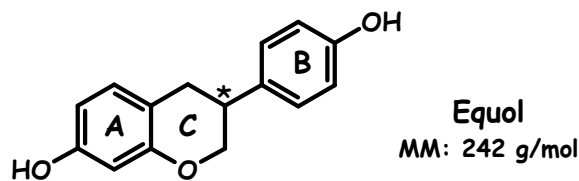


Figure 8. Un métabolite de la daïdzéine ayant des propriétés œstrogéniques :
l'équol

Le carbone asymétrique est représenté par une étoile

L'équol a un carbone asymétrique. Il existe donc deux énantiomères, le R-équol et le S-équol. Cependant, il semblerait que seule la forme S soit produite par les bactéries intestinales (Setchell *et al.*, 2005). La proportion de producteurs d'équol varierait de 30 à 50% selon les études, les méthodes d'analyse, les populations étudiées et probablement les modes alimentaires (Setchell *et al.*, 2002 ; Mathey *et al.*, 2006).

L'ensemble des PE circule majoritairement sous forme conjuguée dans le sang, soit sous forme libre, soit lié à des protéines plasmatiques comme la *Sex Hormone Binding Globulin* (SHBG) ou l'albumine jusqu'aux tissus cibles (Shelnutt *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2003). Les PE sont éliminés majoritairement dans les urines (80%), seulement 5% étant éliminés dans les fèces. Chez l'Homme, les formes excrétées sont pratiquement toutes des formes glucuronidées (Shelnutt *et al.*, 2002 ; Rowland *et al.*, 2003).

Les concentrations des PE dans les fluides biologiques augmentent proportionnellement avec les apports alimentaires, démontrant que l'absorption est dose-dépendante (Karr *et al.*, 1997 ; Lampe *et al.*, 1999). Toutefois, l'absorption ne semble pas être un phénomène linéaire, car au-delà d'une certaine dose ingérée, les systèmes entérocytaire ou hépatique semblent saturés (Setchell *et al.*, 2003).

Ainsi, les concentrations circulantes de PE sont variables et plusieurs études sur la biodisponibilité des isoflavones montrent des concentrations de 0,5 à 5 μM , voire de 10 μM (Setchell *et al.*, 2001 ; Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003 ; Mathey *et al.*, 2006). Des populations ayant une consommation occidentale traditionnelle peuvent avoir des concentrations plasmatiques d'entérolignanes de l'ordre de 10 à 270 nM (Lampe, 2003). Un régime particulièrement riche en lignanes peut cependant donner des concentrations plus élevées, de l'ordre du μM (Lampe, 2003 ; Peeters *et al.*, 2007). Des concentrations circulantes de 6 à 7

μM de naringénine ont été mises en évidence chez l'Homme (Erlund *et al.*, 2002 ; Kanaze *et al.*, 2007).

Les effets tissulaires des PE vont dépendre de leur concentration locale, de la spécificité du tissu, ou encore de la compétition avec d'autres molécules. Ainsi, de nombreux facteurs peuvent influencer la biodisponibilité des PE : la microflore intestinale, le sexe, l'âge, l'ethnie de l'individu ou encore la composition chimique du nutriment ingéré (Rowland *et al.*, 2003). Enfin, une adaptation physiologique de l'individu est possible au cours d'une exposition chronique aux PE (Setchell, 1985). La **figure 9** représente schématiquement la formation des métabolites de PE après ingestion.

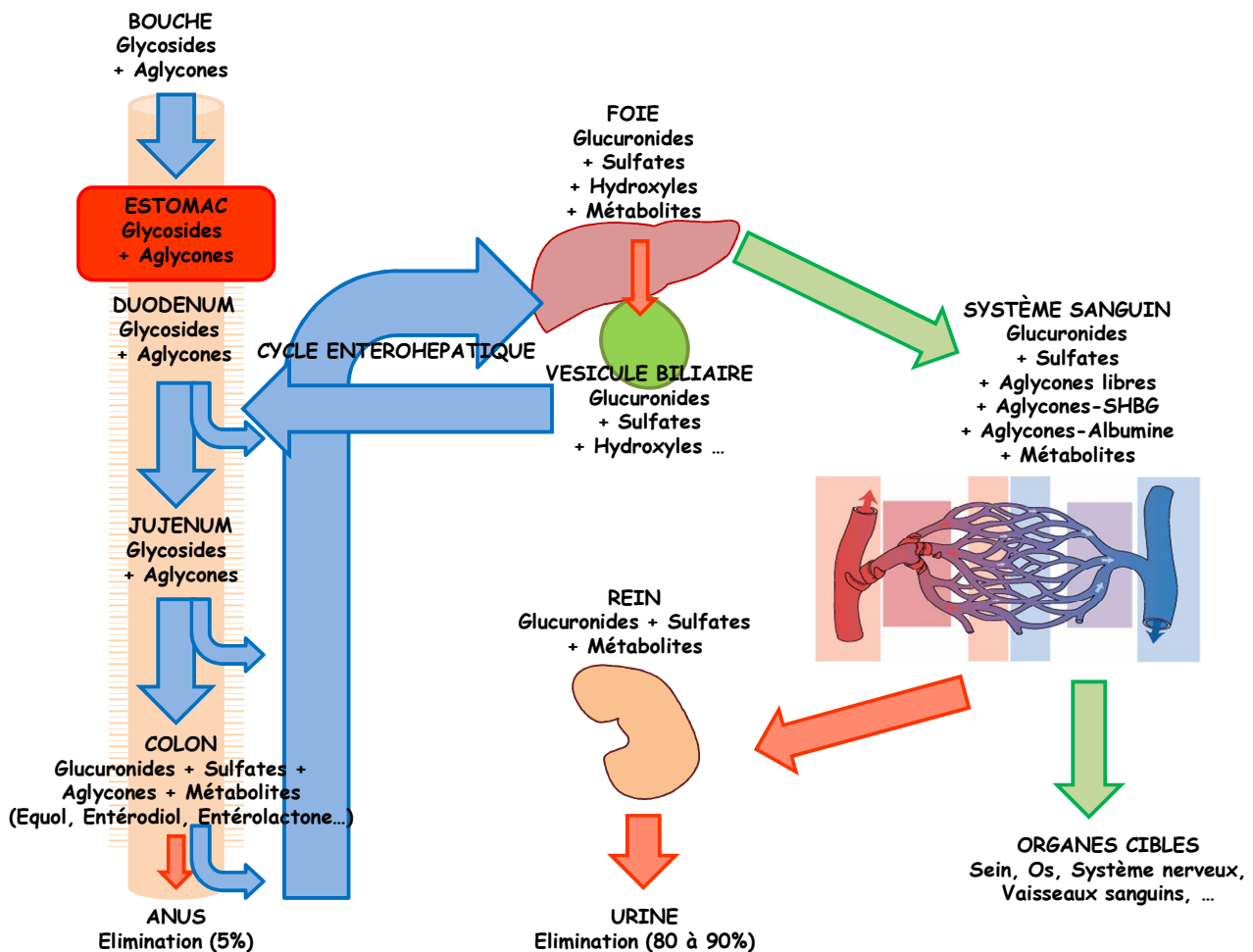


Figure 9. Métabolisme des phyto-œstrogènes

Les PE sont ingérés sous forme de glycosides ou d'aglycones, puis subissent diverses transformations. Les métabolites passent ainsi dans le système sanguin et peuvent agir sur les tissus cibles

➡ Absorption
 ➡ Distribution
 ➡ Elimination

II. Œstrogènes, récepteurs aux œstrogènes

Dans les tissus des mammifères, bien que produits localement, les œstrogènes exercent des effets biologiques essentiels à la manifestation d'un grand nombre de processus physiologiques et physiopathologiques. Ces effets sont véhiculés par des récepteurs spécifiques, également facteurs de transcription, exprimés au niveau des nombreux tissus cibles. Même si les œstrogènes sont principalement associés à la reproduction chez les femmes, leur importance sur le système reproducteur masculin et certaines fonctions non liées à la reproduction, comme la régulation du système cardio-vasculaire ou la formation osseuse a aussi été établie. Ils peuvent également avoir des actions sur le cerveau, le rein, le système immunitaire et le foie. Ainsi, toute perturbation de la concentration des œstrogènes peut conduire à certaines pathologies, notamment la carcinogenèse de tissus cible.

A. Les œstrogènes : structure, synthèse et concentrations circulantes

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdes lipophiles à 18 atomes de carbone, synthétisées principalement dans les ovaires et les testicules, mais aussi, dans une moindre mesure, dans les tissus périphériques. Les œstrogènes endogènes existent sous trois formes : l'œstrone (E_1), responsable de « l'hyperœstrogénisme » relatif chez les obèses, le 17β -œstradiol (E_2), l'œstrogène endogène le plus puissant et l'œstriol (E_3), « produit de dégradation » se retrouvant essentiellement chez la femme enceinte (**figure 10**).

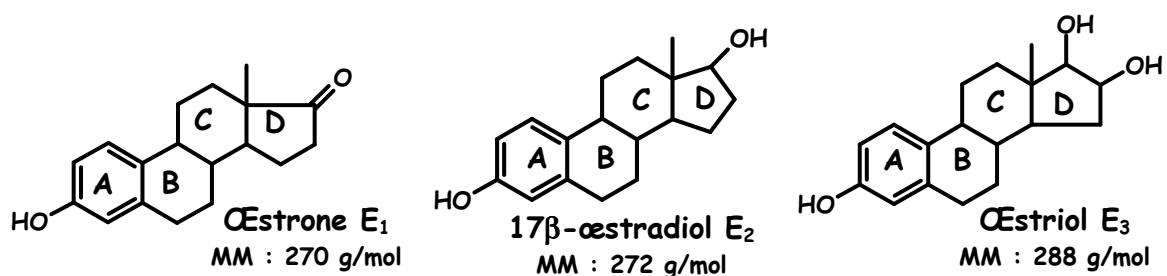


Figure 10. Structure chimique des œstrogènes

Chez la femme pré-ménopausée, la synthèse des œstrogènes s'effectue à partir du cholestérol, principalement au niveau des ovaires pendant la phase folliculaire (**figure 11**).

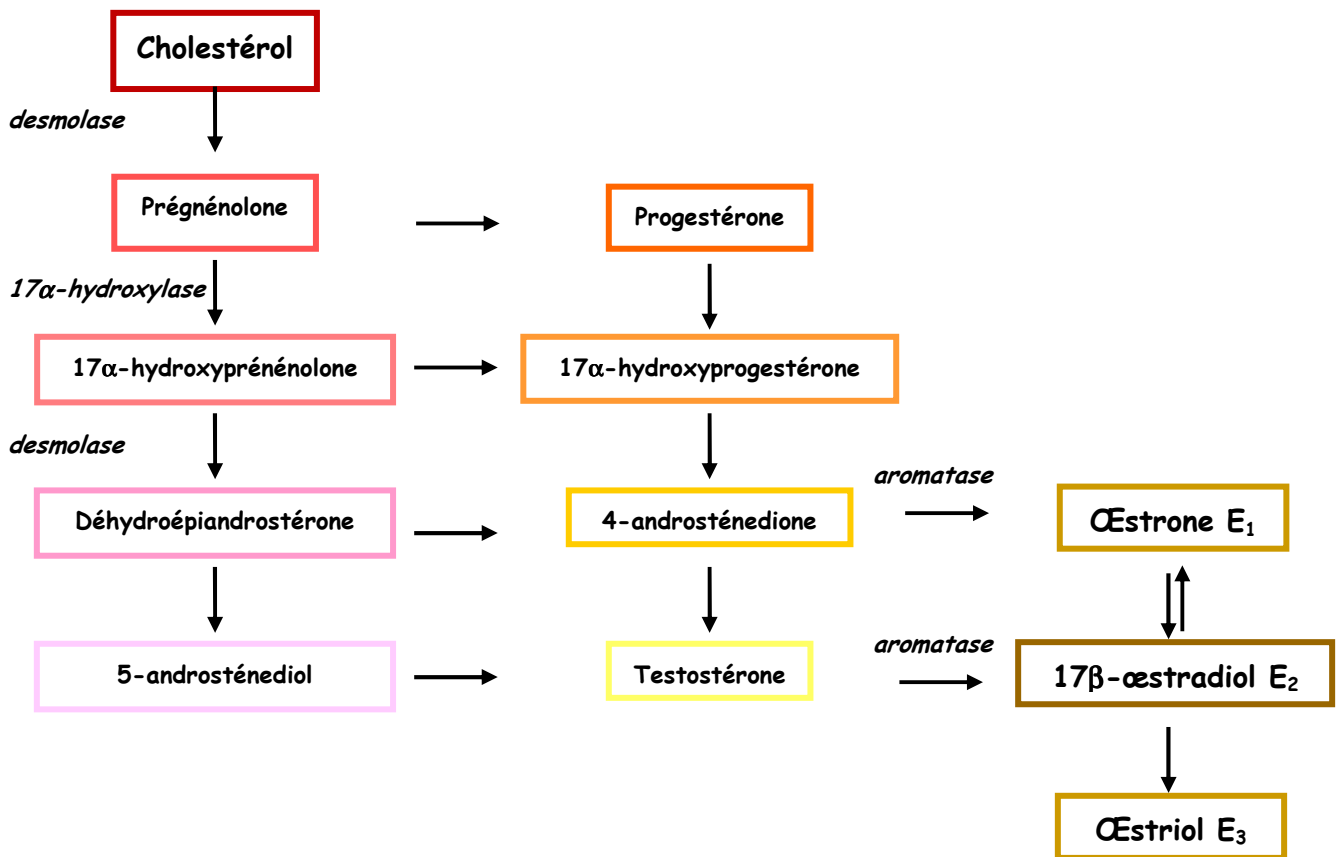


Figure 11. Voie de synthèse des œstrogènes

La dégradation de la chaîne latérale du cholestérol ainsi que de multiples réactions d'oxydoréduction et d'hydrolyses conduisent à la formation d'androgènes, précurseurs des œstrogènes. Le cholestérol, jusqu'alors mis en réserve, est métabolisé en androgènes par les cellules de la thèque interne. Les cellules de la granulosa importent ensuite ces androgènes produits et les transforment en œstrogènes grâce à l'activité aromatase. Il existe également une synthèse d'œstrogènes au niveau des glandes corticosurrénales, qui possèdent aussi l'activité aromatase (Thibault et Levasseur, 2001).

Chez la femme ménopausée, les ovaires cessent de produire des œstrogènes. Cette synthèse s'effectue alors, comme chez l'homme, au niveau des tissus périphériques tels que le foie, les cellules du tissu adipeux du sein, les cellules osseuses, les cellules de l'endothélium vasculaire, les glandes surrénales ou encore diverses cellules du cerveau (Simpson, 2003). L'action de ces œstrogènes sera alors beaucoup plus localisée.

La régulation de la synthèse des œstrogènes suit un axe physiologique appelé « axe gonadotrope » (**figure 12**). Des neurones hypothalamiques secrètent une neuro-hormone, la gonadolibérine, ou GnRH (*Gonadotrophin Releasing Hormone*). Cette sécrétion présente la particularité d'être pulsatile : elle se réalise par "pic" toutes les 60 à 90 minutes en moyenne. La GnRH est véhiculée par le système porte hypothalamo-hypophysaire, de l'hypothalamus à l'adénohypophyse et va alors stimuler la sécrétion de deux hormones par les cellules endocrines gonadotropes de l'adénohypophyse : la FSH (*Folliculo Stimulating Hormone*) et la LH (*Luteinizing Hormone*). La FSH et la LH sont véhiculées par la circulation sanguine et vont stimuler les cellules endocrines de l'ovaire, qui vont alors sécréter deux types d'hormones : les œstrogènes et la progestérone. Ces hormones mobilisent les réserves en cholestérol, induisent l'expression des enzymes nécessaires à la production d'œstrogènes, augmentent la synthèse de testostérone par les cellules de la thèque ou encore facilitent l'aromatase de la testostérone en E₂ dans les cellules de la granulosa. Les œstrogènes, véhiculés par la circulation sanguine, agissent au niveau de divers organes cibles, permettant notamment la réalisation de la fonction de reproduction. De plus, comme tout stéroïde, les œstrogènes contrôlent leur propre synthèse, en agissant de façon rétroactive au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse (Leung et Armstrong, 1980).

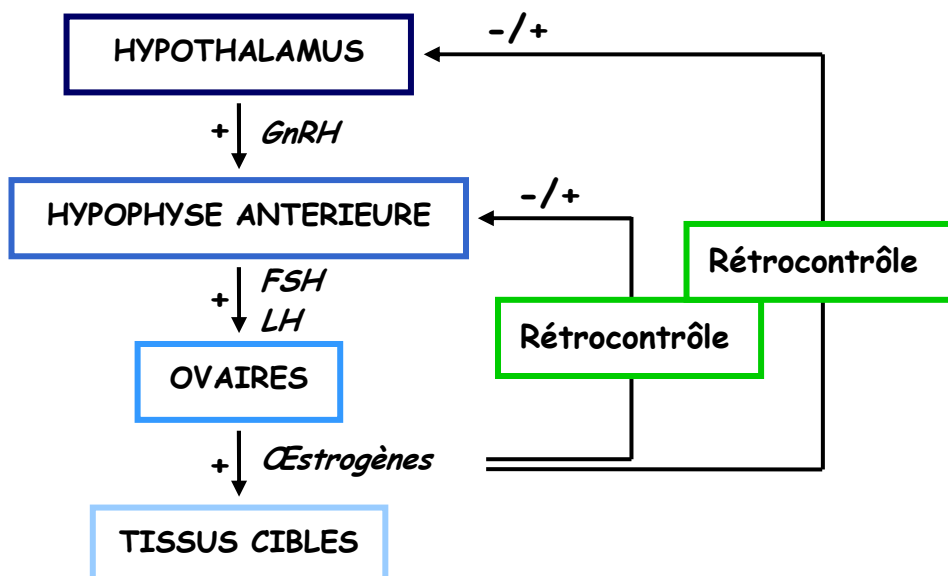


Figure 12. Représentation fonctionnelle simplifiée de l'axe gonadotrope

Les œstrogènes sécrétés sont véhiculés au niveau sanguin sous forme sulfatée ou glucuronidée (60%), liés spécifiquement à la SHBG (20%), de manière non spécifique à des protéines plasmatiques comme l'albumine (15%) ou enfin sous forme libre (5%).

Chez la femme pré-ménopausée, les concentrations circulantes d'E₂ varient en fonction du cycle ovarien, d'environ 0,36 nM pendant la phase folliculaire jusqu'à 2,80 nM au moment de l'ovulation. Lors d'une grossesse, la concentration d'E₂ peut atteindre 70 nM, grâce à la production placentaire. Après la ménopause, ces concentrations chutent pour atteindre des concentrations équivalentes à celles trouvées chez l'homme, de l'ordre de 0,04 à 0,21 nM (Chambliss et Shaul, 2002).

Les œstrogènes ont de nombreuses cibles d'action. De par leur caractère lipophile, ils peuvent traverser la membrane plasmique et se lier spécifiquement à des protéines intracellulaires, provoquant ainsi une réponse œstrogéno-dépendante. Dans de nombreux cas, cette réponse nécessite une liaison avec des protéines particulières, les RE.

B. Les récepteurs aux œstrogènes

1. Présentation générale

Dans les années 1960, une protéine capable de lier spécifiquement l'E₂ est découverte dans l'utérus de ratte, dont la séquence ne fut connue que bien plus tard (Walter *et al.*, 1985 ; Green *et al.*, 1986). Une seconde protéine capable de lier spécifiquement les œstrogènes fut découverte dans les années 1990 (Kuiper *et al.*, 1996 ; Mosselman *et al.*, 1996). La protéine initialement trouvée a alors pris la dénomination de récepteur aux œstrogènes α (RE α), la seconde de récepteur aux œstrogènes β (RE β). Depuis, diverses isoformes ont été identifiées. Les RE appartiennent à la super famille des récepteurs nucléaires, à laquelle est rattachée une très large variété de facteurs de transcription ligand-dépendants tels que le récepteur à la progestérone, aux minéralocorticoïdes, aux glucocorticoïdes, aux hormones thyroïdiennes, à la vitamine D... (Committee, 1999 ; Germain *et al.*, 2006). Tous ces facteurs de transcription sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement, la reproduction ou la différenciation cellulaire. Les deux formes de RE appartiennent à la troisième sous-famille du groupe A des récepteurs nucléaires, la famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes. Elle comprend des récepteurs tous composés de 6 différents domaines (A à F) (Committee, 1999).

Le gène codant la protéine RE α se nomme NR3A1 (Nuclear Receptor 3A1) et est situé sur le chromosome 6 (6Q25.1) et celui codant la protéine RE β , appelé NR3A2, est situé sur le chromosome 14 (14Q23.2). Ces deux gènes distincts proviennent de la duplication d'un gène ancestral il y a environ 450 millions d'années (Germain *et al.*, 2006).

2. Localisation des récepteurs aux œstrogènes

Les deux RE (α et β) sont exprimés différemment selon les tissus, aussi bien chez la souris que chez l'Homme (Enmark *et al.*, 1997). La connaissance du niveau d'expression du RE, de sa distribution tissulaire ainsi que de la forme prépondérante dans un tissu permet de mieux comprendre les effets des RE dans les tissus cibles (**tableau 6** et **figure 13**) (Mueller et Korach, 2001).

Tableau 6. Distribution tissulaire de RE α et de RE β
(Gustafsson, 1999 ; Setchell et Cassidy, 1999)

	SNC	SCV	TGI	rein	utérus	os	prostate	foie	sein
RE α	+	+	-	++	++	+	+	+	+
RE β	++	+	+	+	+	++	++	-	+

Les niveaux d'expression de RE varient d'un tissu à l'autre :

- absent ; + expression modérée ; ++ forte expression ; SNC : système nerveux central ; SCV : système cardio-vasculaire ; TGI : tractus gastro-intestinal.

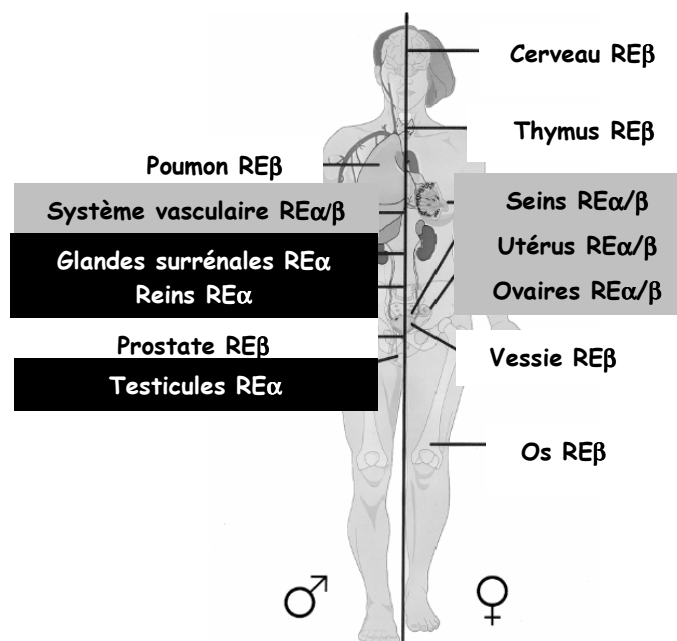


Figure 13. Distribution tissulaire de RE α et de RE β (Setchell et Cassidy, 1999)

L'expression du gène codant le RE α est forte dans l'épididyme, les testicules, l'hypophyse, l'ovaire, l'utérus et le rein et plus faible dans la prostate, le foie, le thymus et le cœur. En revanche, celle du gène codant le RE β est forte dans la prostate et l'ovaire et plus modérée dans l'utérus et le poumon (Kuiper *et al.*, 1997 ; Setchell et Cassidy, 1999 ; Pearce et Jordan, 2004).

Les deux RE α et RE β ont été détectés au niveau du tissu mammaire. Le cerveau contient également les deux formes de RE en particulier dans les régions de l'hypothalamus, l'hypophyse et les territoires impliqués dans les fonctions de reproduction (aire sexuellement dimorphique du noyau supra optique) et mnésiques (Thibault et Levasseur, 2001). Cette distribution tissulaire hétérogène a été reliée à une sélectivité d'action de l'E₂.

3. Structure des récepteurs aux œstrogènes

Les RE sont composés de 6 domaines nommés A, B, C, D, E et F (figure 14).

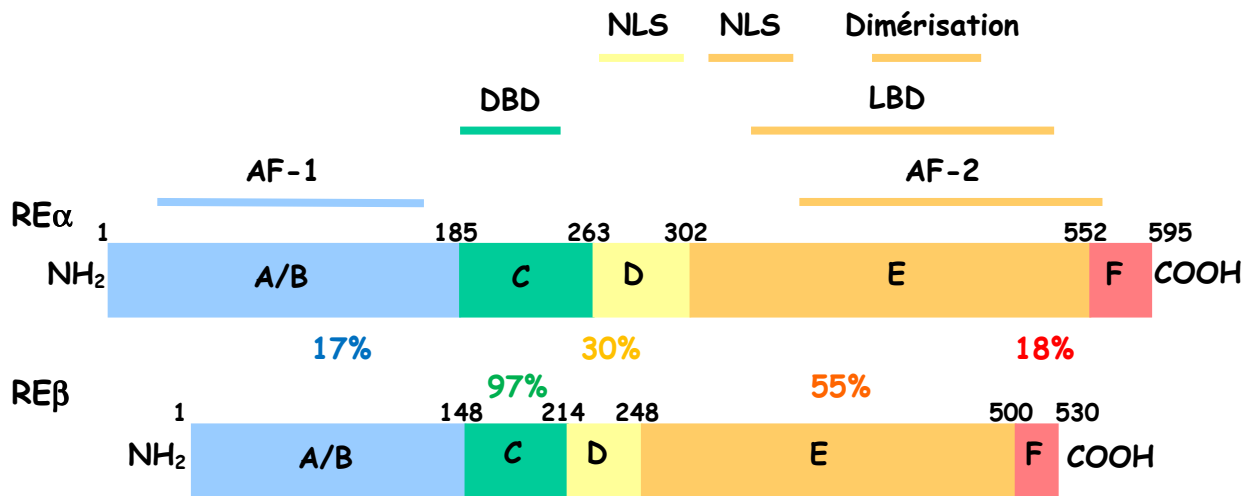


Figure 14. Structures, régions fonctionnelles et pourcentages d'homologies de séquences de RE α et de RE β (Klinge, 2000 ; Metivier *et al.*, 2001)

AF : transactivation fonction ; DBD : DNA binding domain ;
NLS : nuclear localization domain; LBD : ligand binding domain.

La région amino-terminale (NH₂), qui contient les domaines A/B. Cette région est peu conservée entre les récepteurs nucléaires : elle présente une forte variabilité en séquence primaire ainsi qu'en longueur. Elle possède une fonction d'activation de la transcription

indépendante de la liaison du ligand : le domaine AF-1, ou TAF 1 (transactivation function 1). Les activités transcriptionnelles issues de ce domaine sont dépendantes du promoteur et du type cellulaire, signifiant que cette région peut interagir avec des corégulateurs spécifiques d'un type cellulaire (Berry *et al.*, 1990). L'activation de ce domaine est aussi associée à l'état de différenciation de la cellule (Merot *et al.*, 2004 ; Huet *et al.*, 2008).

Le domaine C, ou domaine de liaison à l'ADN, le DBD (DNA Binding Domain).

Ce domaine est très conservé et contient deux structures en doigt de zinc, qui vont établir des contacts avec des séquences nucléotidiques spécifiques, appelées éléments de réponse. Dans le cas des RE, ces séquences spécifiques se nomment les ERE (Estrogen Response Element). Ce sont des séquences palindromiques de la forme **AGGTCA_{xxx}TGACCT**.

La première structure en doigt de zinc contient un sous-domaine, appelé boîte P, impliqué dans la reconnaissance directe des ERE. La deuxième structure en doigt de zinc contient un sous-domaine, appelé boîte D, impliqué dans le processus de dimérisation (formation d'homo ou d'hétéro-dimères), mais qui détermine également l'orientation et la structure spatiale du récepteur.

Le domaine D, domaine charnière ayant un rôle conformationnel. Après fixation du ligand, ce domaine va permettre le changement de conformation et le maintien de la structure tridimensionnelle de la protéine. Il va également permettre la localisation nucléaire des RE grâce à une région NLS (Nuclear Localization Signal). Par ailleurs, il contient une zone d'interaction avec la protéine de choc thermique de 90 kDa, la Hsp90 (Heat shock protein). Ce domaine contribue à la spécificité et la polarité de la fixation du récepteur à l'ADN.

La région carboxy-terminale (COOH), qui contient les domaines E/F. C'est le domaine de liaison du ligand, le LBD (Ligand Binding Domain). C'est un domaine très conservé, multifonctionnel, qui permet, en plus de la liaison du ligand, la dimérisation, la localisation nucléaire, l'interaction avec des Hsp et des corégulateurs (en absence de ligand). Il possède un second domaine de transactivation : AF-2, ou TAF 2. Dans le cas des RE, ce domaine est constitué de 12 hélices α organisées en trois segments antiparallèles. Elles vont former une cavité hydrophobe où le ligand va pouvoir s'insérer (Duax et Weeks, 1980). La

présence du ligand provoque le déplacement de l'hélice 12 : le domaine AF-2 va pouvoir être fonctionnel (Moras et Gronemeyer, 1998). Le domaine AF-2 est donc un domaine ligand-dépendant. Tout comme le domaine AF-1, les activités transcriptionnelles issues du domaine AF-2 sont dépendantes du promoteur et du type cellulaire, ainsi que de l'état de différenciation de la cellule (Berry *et al.*, 1990). La fonction de la région F, absente de certains récepteurs nucléaires, reste peu connue. Dans le cas des RE, elle jouerait un rôle dans la spécificité du ligand et influencerait l'activation transcriptionnelle (Weatherman et Scanlan, 2001).

Il existe des similarités structurales et fonctionnelles plus ou moins fortes entre le RE α et le RE β . Les pourcentages d'homologie varient significativement d'un domaine à l'autre (**figure 14**). Ainsi, le DBD est conservé à près de 97%, ce qui signifie que les deux RE peuvent se fixer sur les mêmes séquences nucléotidiques et donc activer la transcription de gènes cibles identiques. En revanche, il n'y a que 55% d'homologie au niveau du LBD, signifiant qu'elles n'ont pas la même spécificité de liaison aux ligands. Enfin, le RE β ne possède qu'une forme tronquée d'AF-1, limitant ainsi sa capacité de transactivation (Hall et McDonnell, 1999 ; Pearce et Jordan, 2004).

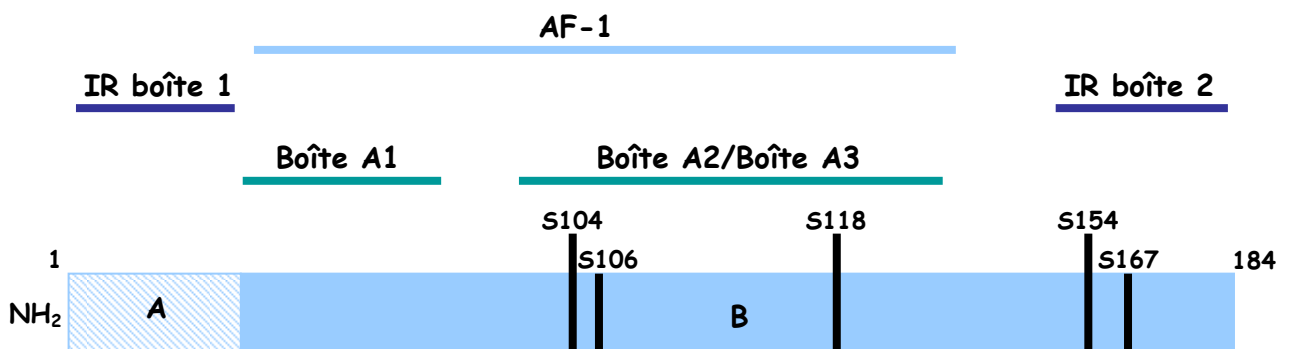


Figure 15. Les différentes boîtes d'activation et de répression composant les domaines A/B du RE α (Metivier *et al.*, 2001 ; Huet *et al.*, 2008)

Dans les domaines A/B (**figure 15**) se trouvent des régions inhibitrices (IR) et de nombreux résidus sérines (S) pouvant être phosphorylés par les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) lors de modifications post-traductionnelles. En particulier, la S118 est un site de phosphorylation important, qui sera étudié dans ce travail. De plus, le domaine AF-1 est composé de boîtes activatrices (A) bien distinctes, nommées boîte A1 et boîte A2/boîte A3 (Metivier *et al.*, 2001).

L'existence d'un récepteur membranaire aux œstrogènes a été découverte à la fin des années 1970 (Pietras et Szego, 1977). Diverses études tendent à prouver que ce récepteur membranaire est structuralement similaire aux RE classiques et que les deux formes α et β seraient représentées (Pappas *et al.*, 1995 ; Razandi *et al.*, 1999 ; Chambliss et Shaul, 2002). Récemment, des sites de liaison aux œstrogènes localisés au niveau membranaire et dans le cytoplasme ont été mis en évidence dans les MCF-7 (Harrington *et al.*, 2006). Si la structure exacte de ce récepteur membranaire n'est pas connue, il semblerait qu'une palmitoylation de la forme classique de RE soit nécessaire à cet adressage membranaire (Levin, 2005).

4. Les différentes formes de récepteurs aux œstrogènes

Chacun des deux gènes codant les RE peut donner différentes protéines, grâce à un épissage alternatif au niveau de l'ARNm. Ainsi, il existe au moins six variants issus du gène NR3A1 codant le RE α , impliquant six promoteurs différents. Ces promoteurs vont être utilisés préférentiellement selon la lignée cellulaire dans laquelle ils sont exprimés. La plupart de ces variants ne diffèrent qu'au niveau de leur 5'UTR (Untranslated Region) et vont être traduits en forme longue de RE α , ou RE α 66 (Flouriot *et al.*, 1998). Cependant, une autre isoforme a été découverte : le RE α 46 (**figure 16**). La forme de 46 kDa est issue d'un épissage alternatif de l'exon 1A de l'ARNm (Flouriot *et al.*, 2000). Après traduction, la protéine obtenue est tronquée des 173 premiers acides aminés de la forme longue de 66 kDa. La protéine RE α 66 est donc composée de 595 acides aminés, alors que le RE α 46 n'en possède que 422. Les deux isoformes de RE α sont capables d'induire une réponse physiologique après fixation d'un ligand.

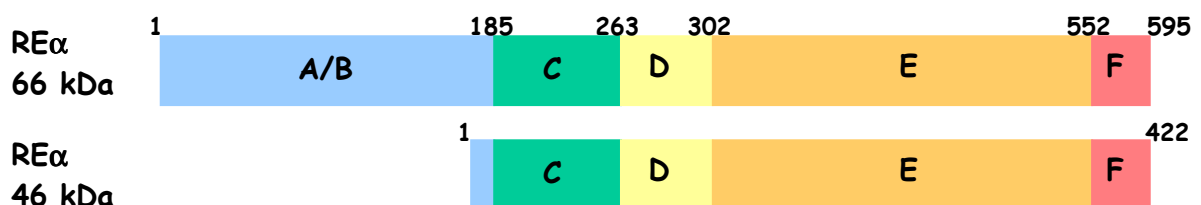


Figure 16. Structures de RE α 66 et RE α 46

Plus récemment, une nouvelle isoforme de RE α a été mise en évidence : le RE α 36. Elle est dépourvue des domaines de transactivation AF-1 et AF-2, possède un DBD et un LBD partiel. Les premiers travaux sur cette forme de RE α suggèrent une localisation membranaire (Wang *et al.*, 2006).

Cinq isoformes majeures ont également été décrites pour RE β (Moore *et al.*, 1998 ; Heldring *et al.*, 2007). Elles sont capables de moduler l'activation induite par l'E₂ et auraient un impact sur la régulation de gènes œstrogéno-dépendants (Ramsey *et al.*, 2004 ; Leung *et al.*, 2006).

C. Voies de signalisation des récepteurs aux œstrogènes

Historiquement, il a été montré que les œstrogènes agissent en régulant la transcription de gènes cibles grâce à leur interaction avec les RE, qui vont alors jouer le rôle de facteurs de transcription ligand-dépendants (Jensen et DeSombre, 1973). Ce paysage s'est complexifié progressivement avec la découverte de RE β (Mosselman *et al.*, 1996), des diverses isoformes de RE α et de RE β ainsi que d'un récepteur membranaire (Wang *et al.*, 2006). Par ailleurs, il existe des gènes œstrogéno-dépendants ne possédant pas un ERE dans leur séquence promotrice, permettant d'envisager des interactions avec divers cofacteurs de transcription (Paech *et al.*, 1997 ; Sabbah *et al.*, 1999 ; Kushner *et al.*, 2000 ; Safe, 2001). Cette diversité permet ainsi l'implication de nombreuses voies de signalisation et va donc permettre différentes réponses physiologiques que nous allons détailler.

1. Régulation des récepteurs aux œstrogènes par les protéines chaperonnes

Dans toute cellule eucaryote, les chaperonnes moléculaires, notamment la Hsp90, sont requises pour optimiser le repliement et la localisation de nombreuses protéines néosynthétisées, dont les RE (Redeuilh *et al.*, 1987). L'association entre la Hsp90 et les RE est capitale pour leur capacité de liaison à un ligand et pour leur rôle transactivateur. Cette interaction maintient les récepteurs dans un état inactif associé à une incapacité transactivatrice, levée par la liaison de l'hormone (Renoir *et al.*, 1986). En absence d'hormone, le RE est sous forme d'hétéro-oligomères comprenant la Hsp90, la Hsp70, la Hop

(Hsp70-Hsp90 organizing protein), la Hip (Hsp70-interacting protein), la protéine chaperonne p23 et une immunophiline (IP) (Richter et Buchner, 2001).

Si la Hsp90 ne peut correctement jouer son rôle de chaperonne moléculaire, les RE immatures sont rapidement ubiquitinylés selon un mécanisme impliquant l'ubiquitine-ligase CHIP (C-terminus of Hsp70-interacting protein) et sont le plus souvent dégradés par le protéasome (Connell *et al.*, 2001) (**figure 17**).

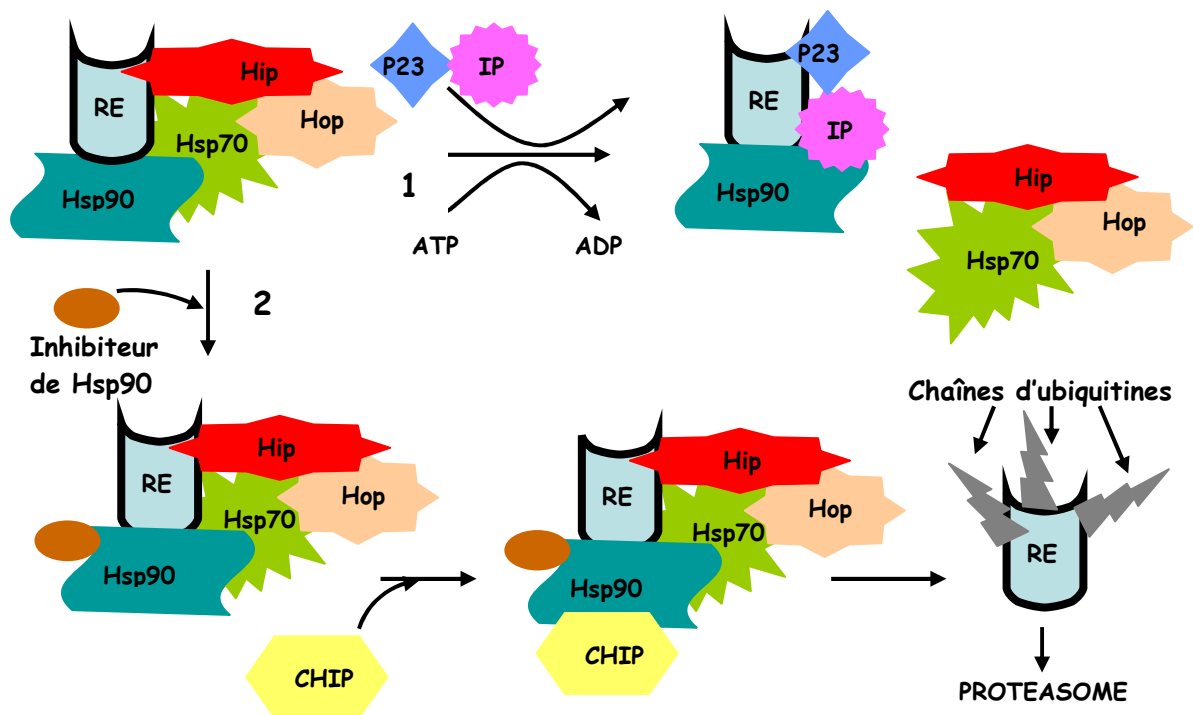


Figure 17. Régulation des RE par les protéines chaperonnes

1- Maturation du RE par fixation d'IP et de P23

2- Fixation d'un inhibiteur de Hsp90 qui induit la fixation de CHIP.

L'ubiquitinylation du RE par CHIP amène alors une dégradation protéasomale

Les IP sont recrutées au niveau de l'hétéro-complexe par interaction avec la Hsp90. Ces co-chaperonnes possèdent une activité peptidyl prolyl isomérase (PPIase) qui participe au repliement des RE.

La maturation des RE est ATP-dépendante : classiquement, le récepteur néosynthétisé est pris en charge par un complexe appelé « foldosome », constitué d'un dimère de Hsp90 et d'autres protéines de choc thermique (comme Hsp70 ou Hop), qui va alors aider à la maturation du RE. Selon un mécanisme ATP-dépendant, des séquences de dissociations/associations de protéines co-chaperonnes aboutissent à un complexe mature au

sein duquel le RE possède une fonctionnalité maximale (Pratt et Toft, 2003). Au cours de sa maturation, le RE acquiert une conformation lui conférant une affinité maximale pour son ligand, due à l'ouverture progressive de la poche de liaison au ligand.

Lors de la fixation d'un ligand, le RE subit de nombreuses modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations, des acétylations, des sumoylations, des prénylations ou encore une ubiquitinylation.

2. Modifications post-traductionnelles des récepteurs aux œstrogènes

a) Phosphorylations

De nombreux résidus sérine, thréonine ou tyrosine du RE peuvent être phosphorylés, après la liaison d'un ligand, à des facteurs de croissance ou encore à des cytokines. Les kinases impliquées sont notamment les PKA (protein kinase A), Akt (protéine kinase B), src (sarcoma virus tyrosine kinase) ou encore les MAPK (Murphy *et al.*, 2006). De nombreuses études ont mis en évidence que la fixation d'un ligand donné au RE et les phosphorylations qui en résultent influencent la stabilité du récepteur et donc sa demi-vie (entre 3 et 5 heures). Ainsi, les ERK (extracellular-signal regulated kinase) inhibent la dégradation du complexe RE/E₂ (Marsaud *et al.*, 2003). Ces phosphorylations peuvent modifier l'activité transcriptionnelle du RE. Notamment, la phosphorylation de la S118 du RE α par une CDK (Cyclin dependant kinase) en réponse à l'E₂ (Joel *et al.*, 1998) ou par les MAPK, en réponse aux facteurs de croissance (Kato *et al.*, 1995), augmente sa capacité de transactivation. La phosphorylation du résidu tyrosine en position 537 par src contrôlerait l'activité AF-2 dépendante de RE α , en influençant la conformation du LBD, en réponse à la liaison de l'hormone (Yudt *et al.*, 1999).

b) Acétylations

Les acétylations sont, pour la plupart, le fait de protéines à activité histone-acétyltransférase (HAT), généralement cofacteurs des RE. Le niveau d'acétylation des protéines est contrôlé par un processus inverse impliquant l'intervention de protéines à activité déacétylase. Ainsi, l'addition de groupements acétyles au niveau de quatre résidus lysine situés en 266/268 et 302/303 du RE α augmente son activité transcriptionnelle en présence d'E₂ (Wang *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 2006).

c) Ubiquitylations

La molécule d'ubiquitine est activée par une enzyme d'activation E1 nécessitant l'hydrolyse d'ATP. La molécule d'ubiquitine activée est ensuite prise en charge par différents types d'enzymes de conjugaison, E2. Même si certaines E2 peuvent réaliser un transfert direct de l'ubiquitine sur la protéine cible, dans la majorité des cas, les E2 transfèrent l'ubiquitine aux E3 ubiquitine-ligases, avant sa liaison finale directe ou indirecte à la protéine cible. Parmi les enzymes E3 se trouve notamment la protéine CHIP (Faus et Haendler, 2006). Les enzymes E3 constituent les déterminants essentiels de la spécificité de reconnaissance des protéines dégradées ensuite par le protéasome.

De nombreuses études ont montré l'implication de la voie ubiquitine/protéasome dans le recyclage des RE en présence de ligands agonistes et d'anti-œstrogènes (Wijayarathne et McDonnell, 2001). L'inhibition de cette voie catabolique réduit l'activité transcriptionnelle du RE α et l'immobilise au niveau du noyau (Stenoien *et al.*, 2001). La demi-vie du RE α est de 5 heures environ en présence d'E₂ et de 3 heures en son absence (Marsaud *et al.*, 2003).

d) Sumoylations

La protéine SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) identifiée chez la levure est représentée sous trois formes paralogues chez les mammifères. Selon un processus similaire à l'ubiquitylation, SUMO est greffée sur des résidus lysine situés dans des séquences protéiques particulières ψ KxE (ψ = leucine, isoleucine, valine ou phénylalanine ; K=lysine ; E=glutamate). Récemment, il a été montré que SUMO pouvait être greffée au niveau de la région charnière de RE α , au niveau des lysines 299, 302 et 303. Le RE α , ainsi sumoylé, possède alors, notamment en présence d'E₂ et d'hydroxytamoxifène, une capacité de transactivation accrue (Sentis *et al.*, 2005).

e) Prénylations

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe « a) Phosphorylations », le RE α peut être phosphorylé par activation de la voie des MAPK. Cette voie de signalisation dépend de l'activité des petites protéines G de la famille Ras (Kato *et al.*, 1995). L'activité GTPase de ces protéines est notamment régulée par des processus de prénylation, impliquant les enzymes farnésyltransférase et géranyltransférase. La fixation de radicaux farnésyl (lipide en C15) et géranylgéranyl (lipide en C20) au niveau des protéines cibles favorise leur ancrage membranaire et leur activation (Zhang et Casey, 1996).

Il existe encore d'autres voies de régulation que nous ne détaillerons pas ici comme la neddylation, ou encore celle qui implique le corps du signalosome.

Le RE peut moduler la transcription des gènes œstrogéno-dépendants par interaction directe ou indirecte avec l'ADN. La première interaction directe mise en évidence est une interaction avec les ERE, qualifiée de voie de signalisation génomique « classique ».

3. Voie de signalisation génomique « classique »

En absence de ligand, le RE est séquestré au niveau cytoplasmique au sein d'un complexe inhibiteur organisé autour d'un hétéro-complexe avec notamment les Hsp70 et Hsp 90. La fixation d'un ligand va provoquer la dissociation de l'hétéro-complexe, diverses modifications post-traductionnelles et induire un changement conformationnel du RE. Tout ceci va alors activer la dimérisation du récepteur (homodimérisation α/α ou β/β , ou hétérodimérisation α/β). Ce dimère va alors avoir une forte affinité pour les ERE (Hall *et al.*, 2001). Cette fixation du ligand permet également le recrutement de cofacteurs de transcription, dont certains sont déjà bien connus, par exemple SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator 1), GRIP-1 (Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1), CBP/p300 (CREB Binding Protein) ou encore TRAP220 (thyroid hormone receptor activating protein) (McKenna *et al.*, 1999).

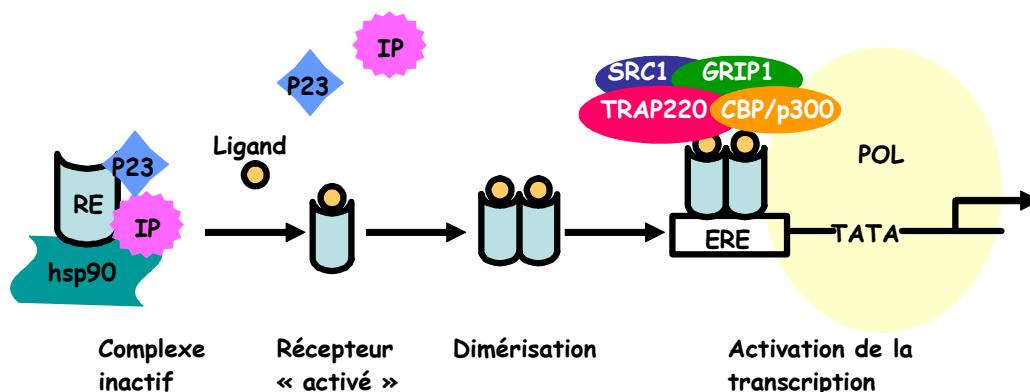


Figure 18. Schéma de la voie de signalisation « classique »

RE : Récepteur aux œstrogènes ; POL : polymérase ;
IP : immunophilines ; ERE : élément de réponse aux œstrogènes

Cette voie « classique », représentée dans la **figure 18**, nécessite l'activité des deux domaines de transactivation AF-1 et AF-2. Ces deux domaines vont permettre le recrutement séquentiel et cyclique de différents cofacteurs de transcription (Metivier *et al.*, 2001).

La séquence consensus ERE (AGGTCAxxxTGACCT) peut être modifiée au niveau d'un ou plusieurs nucléotides, ce qui n'empêche pas la reconnaissance par le RE. C'est le cas pour le promoteur du gène codant la protéine pS2, dont la séquence consensus présente une substitution de l'adénine en position 4 par une guanine et de la thymine en position 7 par une adénine (AGGTCAxxxTGGCCA). De même, pour le promoteur du gène codant la protéine du complément C3, deux nucléotides sont modifiés (AGGTGGxxxTGACCT) (Gruber *et al.*, 2004).

Il est maintenant évident que cette voie de signalisation « classique » est loin d'être unique et que les RE peuvent réguler l'expression de gènes par de nombreux autres mécanismes génomiques.

4. Voies de signalisation génomiques dites « ERE- indépendantes »

La plupart des gènes régulés par l'E₂ n'ont pas dans leur région promotrice une séquence consensus palindromique aussi parfaite qu'un ERE. Ces voies « ERE- indépendantes » (**figure 19**) impliquent une interaction de RE avec l'ADN *via* d'autres facteurs de transcription. Dans ce cas, la région DBD ne se lie pas à l'ADN, mais est impliquée dans l'interaction protéine-protéine, ou dans le recrutement de protéines corégulatrices. Ces voies ERE- indépendantes permettent aux RE de réguler l'expression de nombreux gènes. Ce mécanisme d'action est fréquemment utilisé par les récepteurs nucléaires, ce qui rajoute de la complexité dans les effets induits par les RE (Gottlicher *et al.*, 1998).

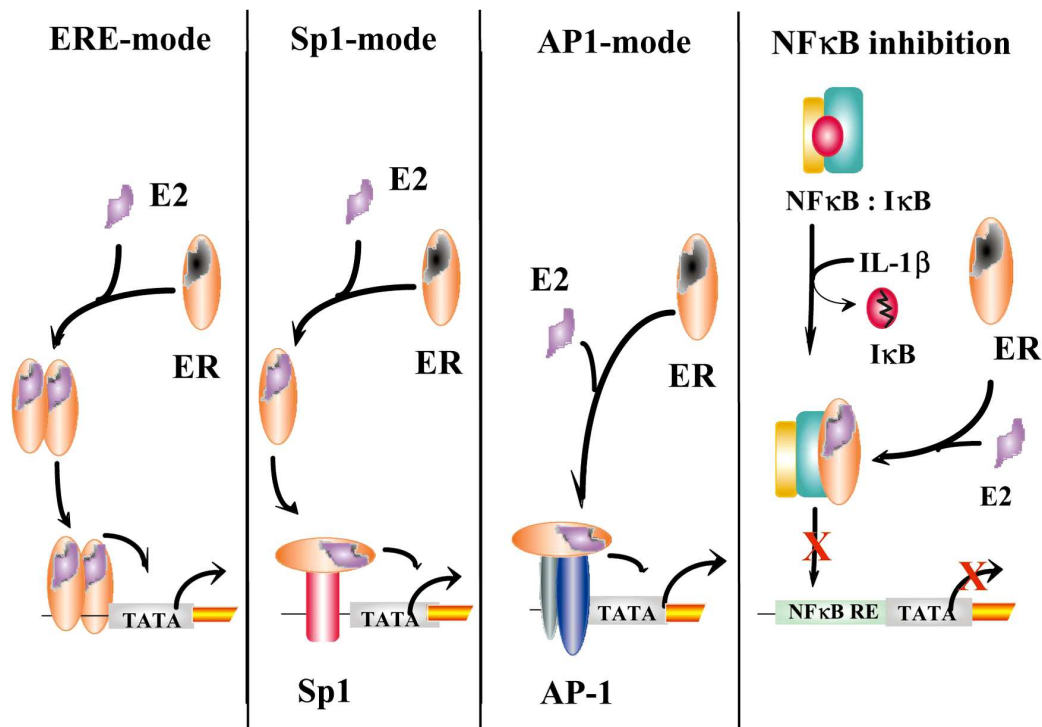


Figure 19. Les différentes voies transcriptionnelles régulées par les RE (Nilsson *et al.*, 2001)

C'est le cas de l'interaction de RE avec les protéines c-fos/c-jun après liaison de l'E₂ (**figure 19, mode AP-1**). Ce complexe va alors se lier spécifiquement à l'ADN au niveau des sites AP-1 (Activator Protein 1). Ce mécanisme contrôle la régulation de gènes comme celui de l'ovalbumine, ou encore de l'IGF-1 (Insulin Growth Factor 1). Les mécanismes d'interaction entre les RE et c-fos/c-jun requièrent les deux domaines AF-1 et AF-2. En effet, le domaine AF-2 va lier des coactivateurs p160 (SRC-1 ou GRIP-1), qui vont stabiliser le complexe protéique contenant le RE α et c-fos/c-jun. Ce complexe, stabilisé et activé, va se fixer à l'ADN au niveau du site AP-1 et réguler la transcription de gènes cibles (Paech *et al.*, 1997 ; Webb *et al.*, 1999 ; Kushner *et al.*, 2000 ; Ascenzi *et al.*, 2006).

De la même façon, des gènes comme celui du LDL-R (Low Density Lipoprotein Receptor), ou de la cycline D1 (Ascenzi *et al.*, 2006), avec des séquences promoteurs riches en GC peuvent être régulés grâce à une interaction entre le RE et le facteur de transcription Sp1 (Specificity Protein 1) (**figure 19 mode Sp1**). Cette voie de transactivation est dépendante du domaine AF-1 et varie en fonction du ligand, du type cellulaire ainsi que du sous-type de RE. Il semblerait notamment que le complexe RE β /Sp1 ne soit pas actif (Kim *et al.*, 2003).

Il existe également une régulation de la transcription de gènes ayant dans leur région promotrice des sites de liaison au facteur de transcription STAT-5 (Signal Transducer and Activator of Transcription). Ainsi, le gène codant la protéine β -caséine contient au niveau de son promoteur deux sites GAS (γ activated sequence), qui sont reconnus spécifiquement par STAT-5. Même si une interaction entre le RE et STAT-5 a clairement été identifiée, les effets de cette interaction paraissent moins clairs : certains auteurs pensent que cette interaction provoquerait une inhibition de la transcription induite par STAT-5 et que cette inhibition serait dépendante d'AF-2 (Faulds *et al.*, 2001). D'autres auteurs pensent qu'elle serait indépendante d'AF-1 et AF-2 et qu'elle augmenterait l'activité transcriptionnelle de STAT-5 selon la lignée cellulaire (Bjornstrom *et al.*, 2001).

L'E₂ peut aussi contrôler la répression de la transcription de certains gènes comme notamment celui codant l'interleukine 6 (IL-6), qui intervient dans le métabolisme osseux. Cette répression est induite par l'interaction de RE avec deux facteurs de transcription : le facteur nucléaire κ B (NF- κ B) et CCAAT/enhancer binding protein β (Stein et Yang, 1995). Cette voie est la seule connue de répression transcriptionnelle par les RE (**figure 19, inhibition par NF- κ B**).

Toutes ces voies génomiques vont faire appel à l'intervention séquentielle de divers corégulateurs de transcription.

5. *Corégulateurs des récepteurs aux œstrogènes*

Comme nous l'avons vu précédemment, la fixation d'un ligand aux RE conduit à un changement conformationnel du récepteur, induisant un recrutement séquentiel et cyclique de corégulateurs pouvant activer ou inhiber la transcription des gènes cibles.

a) **Coactivateurs**

La fixation d'un ligand agoniste comme l'E₂ conduit à une modification de la structure tridimensionnelle des RE, marquée par un repositionnement de l'hélice 12 contre les hélices 3, 5 et 11 du LBD (Brzozowski *et al.*, 1997). Ainsi le domaine AF-2 va former une poche hydrophobe permettant l'interaction spécifique du récepteur avec des coactivateurs possédant un motif caractéristique LxxLL de liaison aux récepteurs nucléaires. De nombreux coactivateurs possèdent ce motif de liaison :

Les coactivateurs de la famille p160, dont les représentants majeurs sont SRC-1 (NCoA-1), SRC-2 (TIF-2/GRIP-1/NCoA-2) et SRC-3 (AIB1/ACTR/RAC3), présentent une assez forte homologie de séquence entre eux (40%), qui est associée à un effet similaire de ces trois coactivateurs sur l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires. Cette similarité suggère l'existence d'une certaine redondance fonctionnelle entre eux. Cependant, des expériences d'inactivation génique chez la souris indiquent qu'ils jouent des rôles physiologiques différents. Les souris SRC-1 KO sont résistantes aux hormones stéroïdes et présentent une croissance réduite de leurs organes stéroïdo-sensibles (Xu *et al.*, 1998). Les souris SRC-2 Knock Out (KO) sont infertiles, suggérant son rôle essentiel dans les fonctions de reproduction (Gehin *et al.*, 2002). Les souris SRC-3 KO ont quant à elles une petite taille, une puberté retardée accompagnée d'une fonction reproductive altérée et un développement réduit de la glande mammaire (Xu *et al.*, 2000). SRC-3 joue également un rôle important dans l'oncogénèse puisqu'il est surexprimé dans des cancers du sein et des ovaires.

Les protéines cointégratrices CBP et p300. Ces protéines sont majoritairement recrutées par les coactivateurs de la famille p160 et font le lien avec la machinerie transcriptionnelle basale. CBP et p300 agissent en synergie pour moduler l'activité transcriptionnelle des RE (Smith *et al.*, 1996).

TRAP 220 (thyroid hormone receptor activating protein, 220 kDa). Sous-unité du complexe DRIP (vitamin D receptor interacting protein)/ARC, elle est capable de s'associer aux deux formes liées du RE et de recruter l'ARN polymérase II (Burakov *et al.*, 2002).

La protéine PELP-1 (proline, glutamic acid, leucin-rich protein 1). Identifiée dans des cellules de cancer du sein, elle possède, comme son nom l'indique, un taux élevé de proline, de leucine et d'acide glutamique ainsi que neuf motifs LxxLL. Comme les protéines P160, PELP peut recruter CBP/p300 (Vadlamudi *et al.*, 2001).

Les cointégrateurs ASC-1 et ASC-2 (activating signal cointegrator). ASC-1, initialement cloné sur la base de son interaction avec le récepteur des hormones thyroïdiennes, s'est révélé être un coactivateur des RE. ASC-2, identifié en 2000, est surexprimé dans de nombreux cancers humains (prostate, ovaire). Ces cointégrateurs sont capables de moduler

l'activité des RE, seul ou en coopération avec d'autres cofacteurs, tels que SRC-1 ou CBP/p300 (Kim *et al.*, 1999).

La protéine PGC-1 (*PPAR γ coactivator-1*). C'est un régulateur clé de la thermogénèse au niveau du tissu adipeux brun et du muscle squelettique. PGC-1 est aussi un coactivateur de RE pouvant se lier à sa région AF-2 par son motif N-terminal LxxLL en présence d'E₂ mais également au domaine charnière D, de manière hormono-indépendante (Tcherepanova *et al.*, 2000).

La protéine MLL (*mixed lineage leukemia*). Impliquée dans la translocation chromosomique à l'origine de leucémies, elle appartient aussi à certains complexes possédant une activité histone-méthyltransférase (HMT). La protéine MLL-2 interagit avec le RE α *via* son motif LxxLL (Mo *et al.*, 2006).

Ces différents coactivateurs, par leur activité histone acétyltransférase (HAT) intrinsèque (p160, CBP/p300) ou par le recrutement de protéines possédant une telle activité, induisent l'acétylation des histones. La neutralisation de la charge des histones par les groupements carboxyles empêche leur interaction avec l'ADN chargé négativement et aboutit à une décompaction de la chromatine, permettant la liaison des RE et conduisant à une activation transcriptionnelle. La transconformation du récepteur consécutive à la fixation d'un ligand agoniste permet également le recrutement d'autres types de coactivateurs *via* différents domaines fonctionnels ou séquences consensus, comme par exemple les coactivateurs à activité ATPase. Certains coactivateurs peuvent se lier au domaine AF-1 des RE. En particulier, l'ARN SRA (steroid receptor activator), surexprimé dans de nombreux cancers (sein, utérus et ovaire), est impliqué dans la transactivation de la forme α du RE (Lanz *et al.*, 2003). L'hélicase p68 agit en synergie avec SRA et les membres de la famille p160 pour une activation transcriptionnelle maximale du RE α en présence d'E₂ (Watanabe *et al.*, 2001).

b) Corépresseurs

La fixation d'un ligand antagoniste mixte de type raloxifène ou tamoxifène aboutit quant à lui, à une conformation du récepteur caractérisée par un repositionnement de l'hélice 12 masquant le site de fixation du récepteur aux coactivateurs de type LxxLL et permettant le recrutement préférentiel de différents corépresseurs par les RE.

Les corépresseurs N-CoR et SMRT (silencing mediator for retinoid- and thyroid-hormone receptors). La fixation d'un ligand aux RE conduit à la dissociation de SMRT et N-CoR, rendant possible leur association aux différents coactivateurs. Ces deux corépresseurs sont également capables de réprimer l'activité des RE en présence d'antagonistes par inhibition de leur activité AF-1-dépendante (Smith et O'Malley, 2004). Ces cofacteurs s'associent aux domaines AF-2 et peuvent également se lier à des corépresseurs secondaires pour former des complexes présentant une activité histone-déacétylase (HDAC). La déacétylation des histones renforçant l'interaction histones/ADN, la chromatine est plus compacte, le recrutement des coactivateurs est donc limité et la transcription des gènes cibles réduite.

Les corépresseurs secondaires peuvent eux-mêmes posséder une activité HDAC ou recruter d'autres complexes protéiques la possédant.

La protéine L-CoR (ligand-dependent corepressor). Ce corépresseur peut interagir avec le domaine LBD du RE α (région 283-377) de manière œstrogéno-dépendante et est capable d'interagir avec les HDAC 3 et 6 (Fernandes *et al.*, 2003).

La protéine RIP140 (receptor interacting protein, 140 kDa). Elle bloque l'accès des coactivateurs de type AF-2 grâce à son motif LxxLL et recrute les diverses HDAC 1, 2, 3, 5 et 6 (Castet *et al.*, 2004).

La protéine RTA (repressor of tamoxifen transcriptional activity). Cette protéine s'associe au niveau du domaine AF-1 du RE α et limite ainsi l'activité agoniste du tamoxifène (Norris *et al.*, 2002).

La protéine REA (repressor of estrogen activity). Elle limite l'association de SRC-1 au RE en présence d'E₂ et peut également s'associer aux HDAC 1 et 5 (Kurtev *et al.*, 2004).

La protéine MTA-1 (metastatic tumor antigen-1). Elle est capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle du RE par recrutement des HDAC 1 et 2 et par dissociation des coactivateurs. Elle inhibe également les voies non génomiques œstrogéno-dépendantes en séquestrant le RE au niveau du cytoplasme (Cheng *et al.*, 2002).

Le récepteur orphelin Dax-1 (DSS-ACH critical region on the X-chromosome gene 1). Il peut inhiber l'activation transcriptionnelle des deux formes de RE en présence de ligand soit par association directe *via* un motif LxxLL, soit par un recrutement différentiel de corépresseurs (Zhang *et al.*, 2000).

L'identification de tous ces cofacteurs a largement compliqué la compréhension des mécanismes d'activation transcriptionnelle et soulevé de nombreuses questions : expression différentielle selon les tissus, régulations post-traductionnelles des cofacteurs, recrutement spécifique de certains types de cofacteurs au niveau de certains promoteurs... Cependant deux modèles de recrutement des coactivateurs sont envisagés :

- un modèle combinatoire où les différents types de complexes sont recrutés au même moment au niveau du promoteur et agissent de concert pour le remodelage de la chromatine.

- un modèle séquentiel où les complexes possédant des protéines à activité HAT sont les premiers recrutés au niveau du promoteur. Leur dissociation conduit au recrutement du complexe TRAP, puis de l'ARN polymérase. Dans les cellules de cancer du sein MCF-7, l'ordre d'association des cofacteurs au niveau du promoteur pS₂ a été identifié comme étant ER α /AIB1/p300/TRAP/ARN POL II (Shang *et al.*, 2000).

Parallèlement à ces voies génomiques, il est apparu que de nombreux effets des œstrogènes étaient trop rapides pour être la conséquence d'une activation transcriptionnelle, suggérant l'existence de voies de signalisation non génomiques des RE.

6. Voies de signalisation non génomiques

Une action non génomique se définit comme toute action qui ne va pas initier ni directement influencer, l'expression d'un gène. Elle induit des effets rapides comme l'activation d'une voie de signalisation en cascades, incompatibles avec l'activation de gènes.

L'E₂ modulerait ainsi la concentration intracellulaire de calcium ou la production d'AMPC et activerait des voies de signalisation comme la voie des MAPK, ou encore celle de PI₃K (PhosphoInositol 3 Kinase) (Marino *et al.*, 2002). Tous ces effets ne sont pas modifiés par des inhibiteurs de transcription (actinomycine D) ou de traduction (cycloheximide) (Losel et Wehling, 2003), ce qui confirme qu'ils ne dépendent pas d'une action génomique. Ces

effets sont très rapides, de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes. En 1998, Beyer et Raab, en couplant l'E₂ à la BSA (Bovine Serum Albumin), l'empêchant ainsi de franchir la membrane plasmique, ont observé que l'E₂ modulait la concentration intracellulaire de calcium (Beyer et Raab, 1998). Ainsi, ils suggèrent que cette action serait induite par un RE membranaire.

Enfin, il existe des voies où les RE, sans liaison à un ligand, peuvent être activés.

7. Voies de signalisation ligand indépendantes

En absence d'E₂, les RE peuvent être activés par phosphorylations *via* les protéines kinases A ou C, par des signaux extracellulaires comme des facteurs de croissance, par des neurotransmetteurs ou des cytokines, ou par des régulateurs du cycle cellulaire (Le Goff *et al.*, 1994). L'EGF (Epidermal Growth Factor) mime ainsi les effets de l'E₂ dans l'utérus de souris. De même, l'insuline, l'IGF-1, la dopamine ou encore le TGF- β (Transforming Growth Factor β) peuvent activer les RE. Les cibles principales de ces facteurs de croissance sont les nombreux résidus S présents dans le domaine AF-1 du RE (Nilsson *et al.*, 2001).

En résumé, les œstrogènes sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation, permettant ainsi une régulation fine des actions cellulaires et tissulaires (**figure 20**).

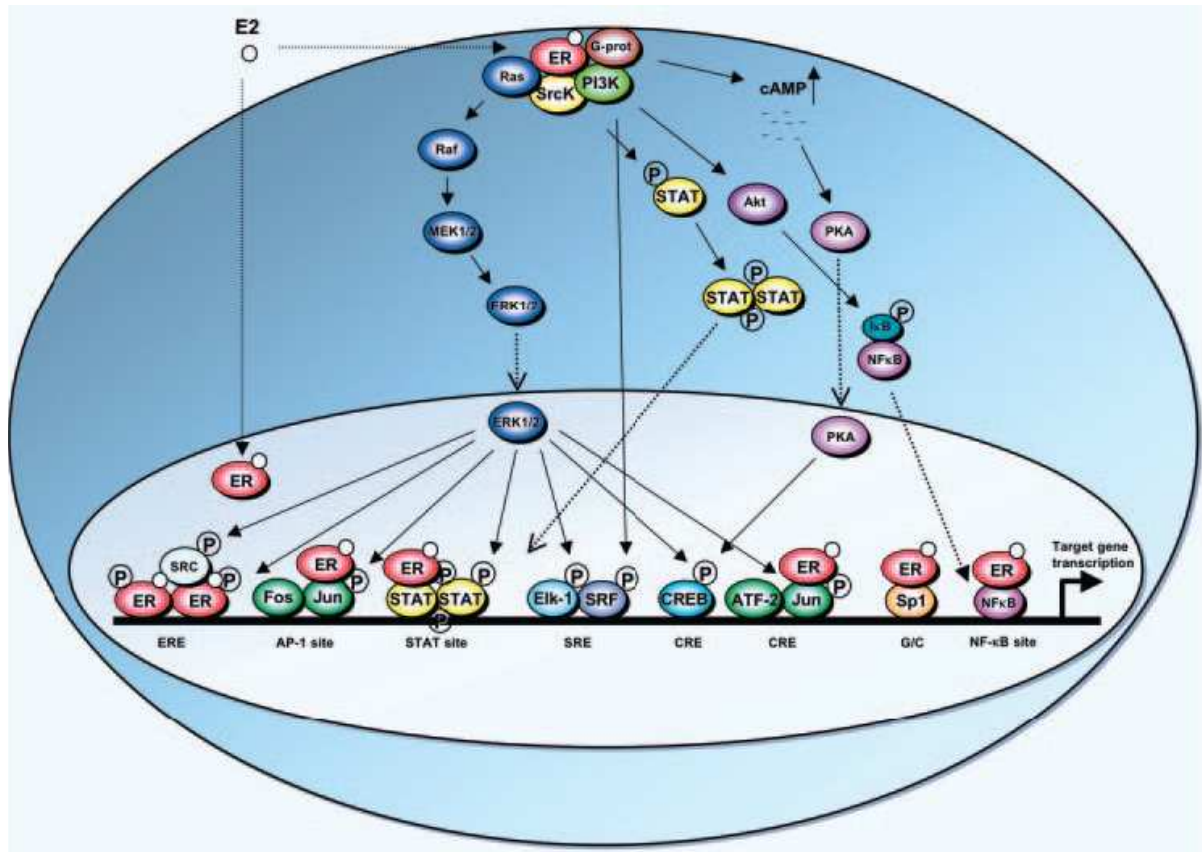


Figure 20. Schéma montrant la complexité des actions génomiques et non génomiques des RE (Bjornstrom et Sjoberg, 2005)

Le complexe nucléaire E_2 -RE peut se lier à l'ERE et aux complexes AP-1, STAT, c-jun, Sp1 ou NF- κ B, eux-mêmes liés à l'ADN au niveau de leur propre site de reconnaissance.

Les complexes membranaires E_2 -RE activent la cascade des protéines kinases conduisant à la phosphorylation des facteurs de transcription comme AP-1, STAT, SRF (serum response factor) CREB (cAMP response element binding protein) et NF- κ B.

La phosphorylation conduit à l'activation de la transcription et/ou à la modulation de l'activité transcriptionnelle de RE/AP-1, RE/STAT-5, RE/Sp1 ou RE/NF- κ B au niveau du promoteur.

La cascade des protéines kinases a également pour cible les RE eux-mêmes et les coactivateurs des récepteurs stéroïdiens, augmentant ainsi l'activité transcriptionnelle des RE au niveau des ERE.

Les actions distinctes des RE par de multiples sites se traduisent par une extrême finesse dans le contrôle de la régulation de la transcription des gènes cibles.

III. Des œstrogènes aux phyto-œstrogènes : Impact sur la santé humaine

Les œstrogènes sont des hormones endogènes, quasiment ubiquitaires, avec des effets physiologiques multiples. Ils sont essentiels pour le développement des caractères sexuels, mais assurent également des fonctions dans le développement et la physiologie du système osseux, du système rénal, du système nerveux central ou encore du système cardio-vasculaire. Chez l'homme, les œstrogènes jouent un rôle dans la spermatogenèse et dans l'activité prostatique (Deroo et Korach, 2006). Les œstrogènes jouent un rôle prépondérant dans la reproduction et la croissance cellulaire (prolifération et différenciation).

A. Rôles physiologiques des œstrogènes et des récepteurs aux œstrogènes

1. *Invalidation des récepteurs aux œstrogènes*

Une grande partie des rôles physiologiques des RE a été mise en évidence par la réalisation de modèles murins expérimentaux, où les gènes codant les RE ont été invalidés. Ces sont les souris KO.

Dans les modèles murins RE α KO, les deux genres mâle et femelle présentent une absence de comportement sexuel. Chez la femelle, il apparaît une hypoplasie de l'utérus et une insensibilité aux œstrogènes, comme pour le vagin. Les structures du tractus reproductif sont immatures. Au niveau des ovaires, des anomalies sont visibles, puisque les follicules sont hémorragiques et sans corps lutéal, la thèque est hypertrophiée. Au niveau de la glande mammaire, le développement, normal jusqu'à la puberté, s'arrête à ce stade. Chez le mâle est observée une atrophie testiculaire et une diminution de la quantité de sperme et de spermatozoïdes. Enfin, il existe des différences notables au niveau du tissu osseux, avec notamment une réduction du diamètre, de la longueur et de la densité des os. Le système cardio-vasculaire est lui aussi altéré, avec un taux basal de NO (Nitric Oxide) faible (Couse *et al.*, 1999 ; Couse et Korach, 1999 ; Curtis Hewitt *et al.*, 2000 ; Carreau *et al.*, 2003).

Le RE α est donc impliqué dans la fertilité, le développement de la glande mammaire ainsi que dans le maintien de la densité minérale osseuse.

Chez les souris RE β KO, les altérations du système reproducteur sont beaucoup moins marquées. Chez la femelle, le développement de l'utérus et de la glande mammaire, ainsi que le comportement sexuel, ne semblent pas différents des souris sauvages. Seules quelques anomalies ovariennes ont été détectées, notamment au niveau de la maturation folliculaire. Chez le mâle adulte, il y a une hyperplasie des cellules épithéliales au niveau de la prostate et de la vésicule séminale (Krege *et al.*, 1998 ; Couse et Korach, 1999).

Dans les modèles murins double KO, les femelles sont infertiles et présentent une hyperplasie utérine. A la puberté, un phénomène de réversion sexuelle apparaît et les cellules ovariennes se redifférencient en cellules de Sertoli. Des structures semblables à des tubes séminifères se développent. Les mâles n'ont pas de comportement sexuel et présentent une diminution de leur production de spermatozoïdes (Couse *et al.*, 1999).

Dans les années 1990, un jeune homme de 28 ans avec une mutation provoquant l'inactivation du gène codant RE α a été étudié afin d'identifier le phénotype associé à l'absence de RE α fonctionnel. Ses principales caractéristiques étaient une grande taille avec une poursuite lente de sa croissance ainsi qu'un net retard de sa formation osseuse, couplé à une ostéoporose. Ces observations soulignent l'implication des œstrogènes dans la minéralisation osseuse lors de la puberté (Smith *et al.*, 1994).

2. Effets physiologiques et cellulaires des œstrogènes

a) Les œstrogènes et la fonction de reproduction

Les œstrogènes sont des molécules essentielles dans la fonction de reproduction. Ils interviennent lors du développement des caractères sexuels primaires et secondaires de la femme et ont des effets bien connus au niveau de l'utérus, des ovaires, des glandes mammaires, ainsi qu'au niveau de la régulation des cycles menstruels à travers son rétrocontrôle sur l'axe gonadotrope (Hewitt et Korach, 2003).

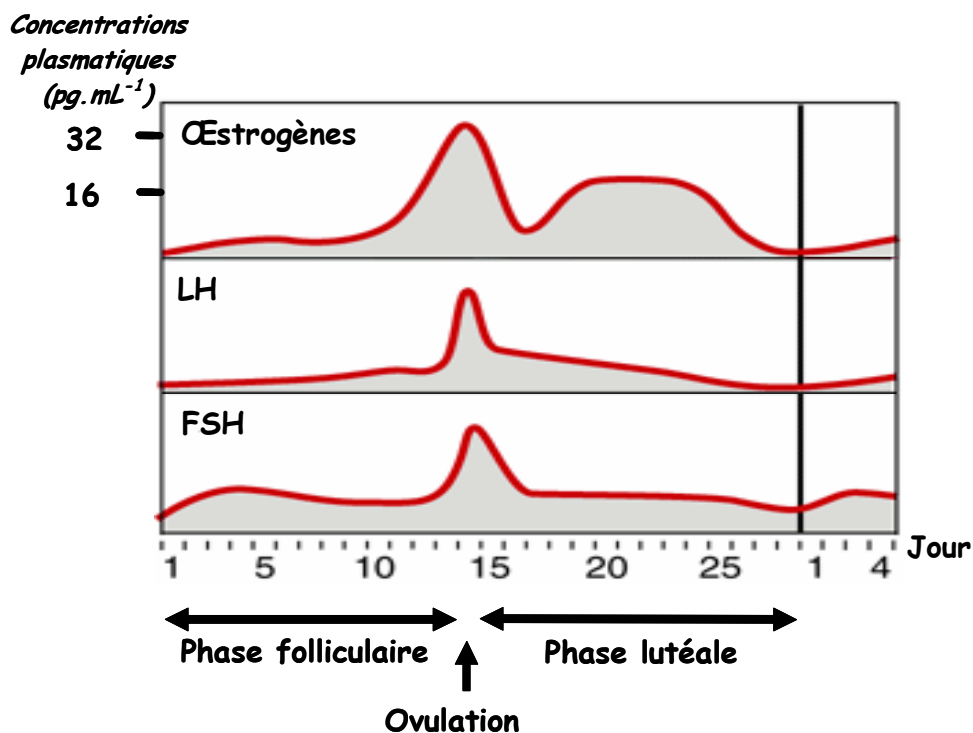


Figure 21. Contrôle du développement et de la maturation des follicules ovariens par les œstrogènes

Au niveau de l'hypophyse, l'E₂ est responsable de la régulation de la production des gonadotrophines LH et FSH et de la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus. Les œstrogènes contrôlent ainsi le développement et la maturation des follicules ovariens, le mécanisme d'ovulation et la formation du corps lutéal au niveau des ovaires (**figure 21**).

La fonction utérine est sous le contrôle des œstrogènes, puisqu'ils induisent l'expression de divers facteurs de croissance (EGF, IGF-1) et permettent la différenciation des cellules utérines, pour l'implantation de l'embryon. Ils sont également indispensables au développement des cellules des glandes mammaires lors de la puberté et de la lactation en stimulant la sécrétion de prolactine.

Au moment de la ménopause, les ovaires arrêtent progressivement de produire des œstrogènes, à la suite de l'épuisement du stock d'ovocytes. Cet arrêt de la synthèse des œstrogènes est en général précédé de quelques mois par l'arrêt de la sécrétion de la progestérone. Ce changement physiologique normal survient le plus souvent vers l'âge de 50 ans. Les multiples conséquences de cette hypo-œstrogénie (bouffées de chaleur, insomnies,

irritabilité, fatigue, sècheresse et atrophie vaginales ...) touchent une large population : en 2004, 10 millions de françaises étaient ménopausées et environ 400000 femmes entrent en ménopause chaque année.

La présence ou l'absence d'œstrogènes peut également provoquer ou accentuer certaines pathologies, notamment les risques de maladies cardiovasculaires, divers cancers (seins, endomètre, ovaires) ou encore l'ostéoporose.

Au niveau cellulaire, le rôle des œstrogènes sur l'endomètre est complexe et se combine à celui de la progestérone (Punyadeera *et al.*, 2003). L'E₂ est impliqué dans la multiplication des cellules de l'endomètre, qui a lieu à la fin de la phase folliculaire et au début de la phase lutéale. Il s'agit d'assurer à l'embryon putatif un environnement convenable à son implantation. L'expression des RE et des récepteurs à la progestérone (RP) est induite par l'E₂ au niveau du tissu endométrial. Là encore, des phénomènes de modulations, non génomiques pour la plupart, induisent des régulations fines des RP et des RE en fonction du cycle menstruel (Matsuzaki *et al.*, 1999). La concentration locale d'E₂ est aussi importante dans la régulation de l'endomètre. Les cellules utérines expriment majoritairement le RE α , mais également le RE β (Punyadeera *et al.*, 2003). Cette distribution explique que chez les souris RE α KO, l'utérus apparaît hypoplasique avec une insensibilité aux œstrogènes tandis que celui des souris RE β KO suit le cycle classique de prolifération et sécrétion (Krege *et al.*, 1998).

Chez le mâle, il existe une activité aromatasase chargée de convertir les androgènes issus des tissus périphériques en œstrogènes. Ainsi, l'E₂ est responsable du développement du comportement sexuel du mâle, ce qui en explique l'altération chez le mâle RE α KO. Bien que les mécanismes d'action ne soient pas encore bien connus, les œstrogènes exerceraient également un rôle dans la spermatogenèse (Carreau *et al.*, 2003).

Cependant, le système reproducteur n'est pas la seule cible des œstrogènes. Nous avons donc décidé, à titre d'exemple, de décrire certains des effets de l'E₂ sur le tissu osseux, le système nerveux central et le système cardio-vasculaire.

b) Les œstrogènes et le tissu osseux

Les œstrogènes ont un rôle essentiel dans la régulation du remodelage osseux. Dans les années 1940, l'équipe d'Albright a associé le statut œstrogénique aux descriptions cliniques de l'ostéoporose, maladie du squelette caractérisée par une diminution de la densité minérale osseuse et une détérioration de la micro architecture de l'os chez des femmes ovariectomisées (Reifenstein et Albright, 1947). L'étude récente « Women Health Initiative » (WHI) réalisée chez des femmes ménopausées a démontré l'intérêt d'un traitement hormonal substitutif (THS) à base d'œstrogènes sur la prévention des fractures et l'augmentation de la densité minérale osseuse (Cauley *et al.*, 2003).

Les souris femelles RE α KO présentent des os plus courts et plus fins que les souris sauvages, ce qui confirme ces observations épidémiologiques et cliniques (Curtis Hewitt *et al.*, 2000).

Les cellules osseuses, ostéoclastes et ostéoblastes, expriment les deux formes de RE (Zallone, 2006). En conditions normales, les ostéoclastes contribuent à la résorption osseuse par l'élimination continue de portions microscopiques d'os. Les lacunes ainsi formées sont ensuite comblées par l'action des ostéoblastes, qui produisent la nouvelle matrice osseuse. L'E₂ augmente la formation osseuse en inhibant l'apoptose des ostéoblastes, mais surtout en stimulant l'apoptose des ostéoclastes (Manolagas *et al.*, 2002).

La diminution des œstrogènes circulants lors de la ménopause peut donc provoquer une importante résorption de l'os au niveau des travées, affaiblissant son architecture puisque la perte est plus rapide que la formation osseuse, conduisant à l'ostéoporose.

La culture d'ostéoblastes de souris a permis de montrer que l'effet anti-apoptotique de l'E₂ pouvait être induit par l'activation rapide de la voie Src/ERK (Kousteni *et al.*, 2001 ; Edwards, 2005 ; Wessler *et al.*, 2006). De plus, l'E₂ induit une diminution de la production de cytokines pro-résorptives telles que IL-1, IL-6, TNF- α (Tumor necrosis factor) ou encore M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), ainsi qu'une augmentation de la production de TGF- β , qui induit l'apoptose des ostéoclastes (Syed et Khosla, 2005).

Enfin, l'E₂ est capable d'inhiber RANK-L (Receptor Activator of NF- κ B - Ligand) et d'augmenter la production d'OPG (osteoprotegerin), deux cytokines fortement impliquées dans le remodelage osseux (**figure 22**).

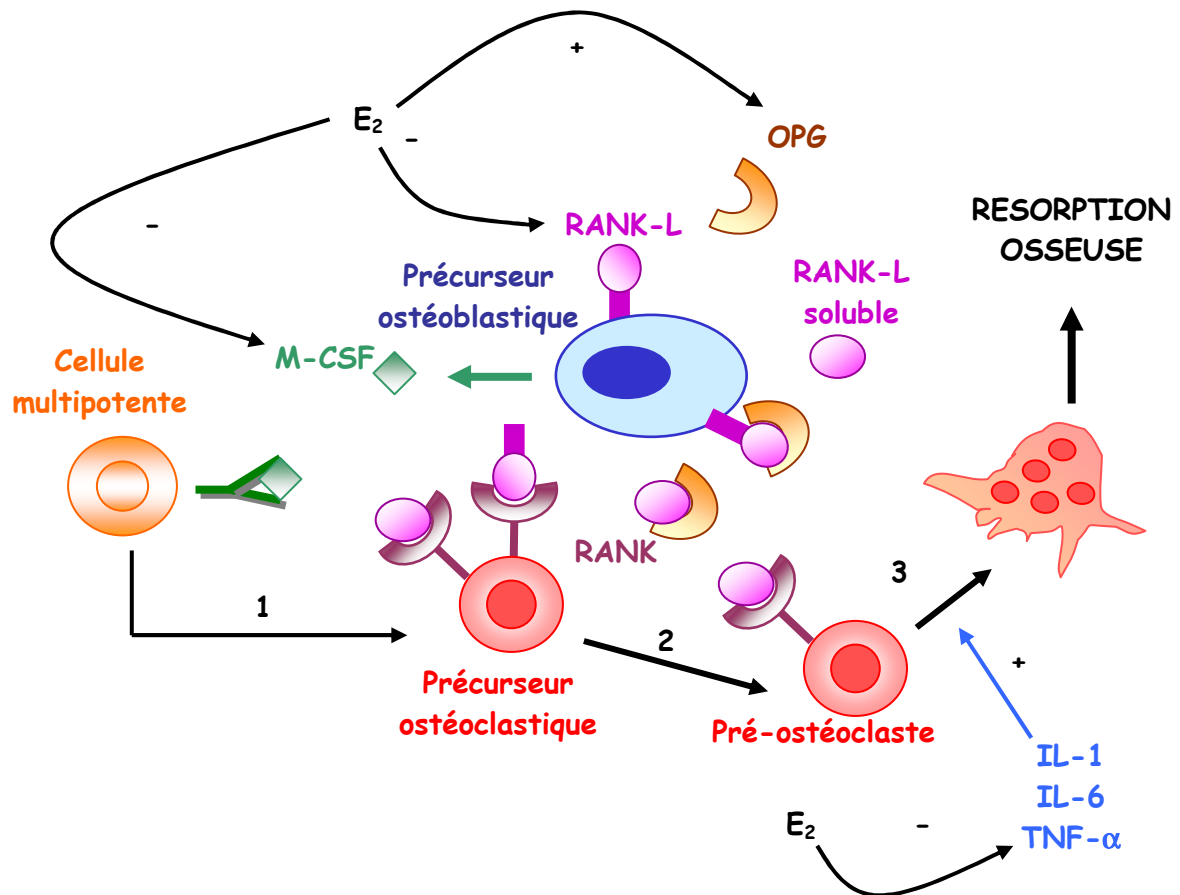


Figure 22. Effet de l'E₂ sur différents facteurs influençant l'activité des ostéoclastes (Hofbauer *et al.*, 2000)

1 : La cellule multipotente est stimulée par M-CSF, qui lié à son récepteur, fait proliférer la cellule, qui devient un précurseur ostéoclastique.

2 : La liaison de RANK-L à son récepteur induit la différenciation de la cellule, qui devient alors un ostéoclaste en pré-fusion. L'OPG peut bloquer cet effet en neutralisant RANK-L.

3 : RANK-L, ainsi que les cytokines IL-1, IL-6 ou le TNF- α , stimulent la fusion des cellules. Les ostéoclastes sont alors activés et prêts à résorber l'os.

c) Les œstrogènes, la cognition et les maladies neurodégénératives

Les RE sont exprimés dans de nombreuses régions du cerveau, dont l'hypothalamus, l'hippocampe, le striatum, le cortex cérébral ou encore le cervelet, ce qui suggère un rôle des œstrogènes dans les fonctions cérébrales (Chakraborty et Gore, 2004).

Des études épidémiologiques pour évaluer l'impact des œstrogènes sur la cognition ont été réalisées. En particulier, l'étude «Women's Health Initiative Memory Study»

(WHIMS) et l'étude « Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study » (HERS), ont pu mettre en évidence des pertes de fonctions cognitives chez des femmes traitées avec des œstrogènes (Grady *et al.*, 2002 ; Rapp *et al.*, 2003). Au contraire, l'étude de Yaffe en 2006 ne met pas en évidence d'effets de l'E₂ sur la cognition (Yaffe *et al.*, 2006).

Ils auraient également des effets sur certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou encore la maladie de Parkinson. En effet, la maladie d'Alzheimer est en partie liée à l'accumulation de plaques β -amyloïdes, ce qui provoque une détérioration progressive des fonctions intellectuelles, dont la mémoire. Les œstrogènes diminueraient l'accumulation de β -amyloïdes par une action catabolique de leurs précurseurs (Amantea *et al.*, 2005). La maladie de Parkinson résulte d'une dégénérescence des neurones synthétisant la dopamine. Or, les œstrogènes peuvent réguler la synthèse de la dopamine en inhibant la dégénération dopaminergique par de nombreux mécanismes comme la réduction de l'apoptose ou la régulation de facteurs de croissance neurotrophiques (Shulman *et al.*, 2002). Ces régulations pourraient donc avoir une incidence sur la maladie de Parkinson. Un rôle bénéfique a également été attribué aux œstrogènes dans certains cas de dépression (Grigoriadis et Kennedy, 2002).

Chez des rattes ovariectomisées, un traitement avec de l'E₂ diminuerait l'anxiété et le comportement dépressif (Spencer *et al.*, 2007).

Même si les mécanismes d'action des œstrogènes sur le système nerveux central ne sont pas connus, il semble que les œstrogènes faciliteraient la réponse aux neurotrophines, molécules importantes dans la formation des synapses (Kretz *et al.*, 2004).

Au niveau des neurones, l'expression de RE β est stable et constante durant le développement, tandis que celle de RE α a lieu lors du développement néonatal. L'E₂ peut réguler l'expression de facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) dans l'hippocampe ou le cortex et diminuer l'expression du facteur pro-apoptotique Bad (Bcl-2 antagonist of cell death) (Heldring *et al.*, 2007).

d) Les œstrogènes et le système cardio-vasculaire

De nombreuses études cliniques observationnelles ont attribué des effets bénéfiques aux œstrogènes sur le système cardio-vasculaire. En effet, le THS diminuerait les risques de maladies coronariennes jusqu'à 50% et jouerait donc un rôle cardio-protecteur (Grodstein *et al.*, 1999).

Toutefois, les études cliniques prospectives HERS, ERA (Estrogen Replacement and Atherosclerosis) et WHI n'ont pas démontré de protection du système cardio-vasculaire par les œstrogènes chez des femmes post-ménopausées. Elles ont démontré en revanche une augmentation du risque d'infarctus du myocarde ou encore des problèmes thromboemboliques veineux. L'étude HERS a été arrêtée prématurément en raison de l'augmentation de problèmes coronariens et thromboemboliques chez les femmes ayant un THS (Hulley *et al.*, 1998). L'étude ERA n'a pas montré non plus d'effets bénéfiques du THS sur l'athérosclérose (Herrington *et al.*, 2000). L'étude WHI a, elle aussi, mis en évidence une augmentation de risques cardio-vasculaires chez les femmes ayant un traitement à base d'œstrogènes (Rossouw, 2002). Il existe donc une discordance entre les études épidémiologiques et les études cliniques prospectives.

Le rôle des œstrogènes au niveau de la synthèse de lipoprotéines sériques impliquées dans le transport des lipides a été étudié. La synthèse des HDL (High Density Lipoprotein, assimilés au « bon cholestérol ») augmente alors que celle des LDL (Low Density Lipoprotein, le « mauvais cholestérol ») diminue (Sacks et Walsh, 1994). Les risques d'athérosclérose (rétrécissement des artères par des dépôts lipidiques) ou de thrombose (formation de caillots de sang coagulé) s'en trouvent donc limités. Les œstrogènes ont aussi une action sur les diverses lipases impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines et des lipases lipoprotéique et hépatique. Toutes ces données évoquent un effet protecteur des œstrogènes vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (Clarkson, 2007).

Les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires expriment les RE. Ces cellules ont un rôle majeur dans la vasodilatation des vaisseaux et également dans l'initiation de l'athérosclérose, l'agrégation plaquettaire et les processus d'inflammation (Arnal *et al.*, 2004 ; Landmesser *et al.*, 2004). Ainsi, l'E₂ stimule la libération rapide de NO des cellules endothéliales en activant la eNOS (endothelial cell Nitric Oxide Synthase) de façon calcium-dépendante. Cette libération de NO induit une inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses et de l'adhésion des leucocytes dans les dépôts de plaques lipidiques. Cet effet non génomique de l'E₂ pourrait être dû à un récepteur membranaire localisé au niveau des *caveolae* (**figure 23**), des microdomaines membranaires caractérisés par une composition particulière en lipides et en protéines (Simoncini *et al.*, 2002).

Par ailleurs, sur des cultures de cellules endothéliales, l'E₂ active rapidement la protéine anti-apoptotique p38b, membre de la famille des MAPK et inhibe la protéine pro-apoptotique p38a (Edwards, 2005).

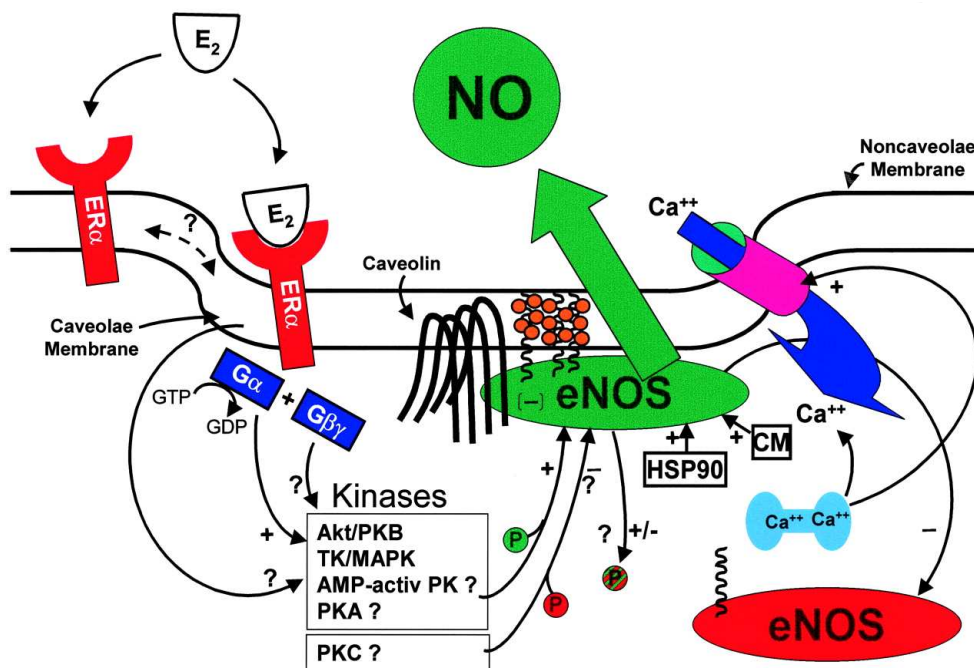


Figure 23. Schéma représentant l'activation par l'E₂ de la eNOS (Chambliss et Shaul, 2002)

Des RE α membranaires ont été localisés au niveau des *caveolae* des cellules endothéliales. La liaison de l'E₂ sur ces récepteurs induit l'activation de la protéine G α_1 , entraînant alors une cascade d'activation, dont les voies MAPK, ainsi que des perturbations des concentrations de Ca²⁺ intracellulaire.

Ainsi, les concentrations d'œstrogènes régulent de nombreux processus physiologiques. Une modification de ces concentrations peut provoquer l'apparition de symptômes gênants particulièrement dans le cas de la ménopause, ou des pathologies telles que les cancers œstrogéno-dépendants.

3. Utilisation thérapeutique des œstrogènes

L'œstrogène de synthèse majeur utilisé est l'éthinyl-œstradiol. En association avec un progestatif, il est utilisé comme moyen de contraception, en pilule normodosée ou minidosée ou encore sur des stérilets hormonaux.

Un autre agoniste de synthèse a été utilisé en France : le diéthylstilbestrol (DES). Il était préconisé pour la prévention d'avortements spontanés et d'autres complications de grossesse. En 1971, « The United States Food and Drug Administration » a mis en garde

contre l'utilisation du DES chez les femmes enceintes en raison, entre autres, d'un plus grand risque d'adénocarcinome du vagin et du col de l'utérus des futures jeunes filles exposées *in utero* à cette molécule. Le DES, commercialisé en France de 1948 à 1977, a alors été retiré du marché (Schrager et Potter, 2004 ; Newbold *et al.*, 2006).

L'utilisation d'œstrogènes de synthèse est aussi fréquente lors de la ménopause. Pour pallier le déficit des œstrogènes endogènes et donc éviter les effets indésirables de la ménopause, un THS a été mis en place. Ce traitement consiste à administrer, par voie orale, nasale ou transdermique, de l'E₂, souvent associé à un progestatif, tous deux de synthèse. L'E₂ de synthèse est utilisé en France et plus globalement en Europe. Dans d'autres pays comme les Etats-Unis, les œstrogènes utilisés dans ce traitement sont d'origine équine. En 2004 en France, la proportion de femmes de 48 à 64 ans sous THS était de l'ordre de 30 à 50% (Azoulay, 2004).

Jusqu'à une période récente, le rapport bénéfices/risques du THS était considéré comme largement favorable. Les seules contre-indications étaient les cas avérés ou les antécédents familiaux de cancers du sein ou d'autres cancers œstrogéno-dépendants ainsi que les troubles thrombo-emboliques veineux. Le THS a donc montré des bénéfices potentiels sur l'atténuation des symptômes de la ménopause et sur la limitation des risques d'ostéoporose et d'accidents cardio-vasculaires (AFSSAPS, 2005).

Cependant, de récentes études cliniques prospectives ont remis en cause la balance bénéfices/risques de ces traitements, semant le doute dans l'esprit du public (Azoulay, 2004). En particulier, les études HERS et WHI ont mis en évidence de forts risques d'accidents cardio-vasculaires avec le THS (Hulley *et al.*, 2002). De plus, l'étude WHI a également montré des risques importants de développer un cancer du sein. Initialement prévue pour durer 8 ans et demi, elle a dû être arrêtée en 2002 par le conseil de suivi et d'éthique au début de la sixième année. Le rapport bénéfices/risques pour le THS a alors été jugé défavorable (Azoulay, 2004).

La « Million Women Study » menée aux Royaume-Uni confirme le sur-risque de cancer du sein associé au THS chez les femmes européennes et montre également que ce risque augmente avec la durée de la prise de THS (Beral, 2003). Cette observation a été confirmée par une récente étude européenne d'observation, l'« E3N-European Prospective Into Cancer », (E3N-EPIC). Par ailleurs, ce risque devient significatif, même sur une courte

période de prise, lorsque le THS est composé d'œstrogènes et de progestérone synthétiques (Fournier *et al.*, 2005).

L'AFSSAPS a publié une « mise au point » sur le THS français en septembre 2005 et sur les THS en général en juin 2006, en tenant compte de toutes les études épidémiologiques récentes. Elle conclut qu'il existe un sur-risque de cancer du sein, augmentant avec la durée du traitement, chez les femmes utilisant un THS œstro-progestatif, quels que soient la voie et le schéma d'administration. Ce risque est toutefois relativement faible puisque sur une année, le nombre de cancers du sein « THS-induits » est compris entre 3% et 6% des cas (AFSSAPS, 2005 ; 2006).

Dans le cas de pathologies œstrogéno-dépendantes, divers traitements à base de molécules œstrogéniques et/ou anti-œstrogéniques ont été élaborés. Ces molécules peuvent moduler l'effet des œstrogènes endogènes. La notion de SERM, « Selective Estrogen Receptor Modulator » est alors apparue.

B. SERM et visée thérapeutique

1. Notion de SERM

Les SERM sont des ligands des RE présentant une activité mixte agoniste et antagoniste en fonction des tissus considérés. Afin d'expliquer ce phénomène de molécule modulatrice, l'équipe de Katzenellenbogen (Katzenellenbogen et Katzenellenbogen, 2000) a développé un concept de pharmacologie tripartite. Ainsi, trois facteurs influenceraient l'action sélective du récepteur : la nature du ligand, le type d'isoforme avec lequel le ligand forme le complexe ligand/récepteur et l'interaction ligand/récepteur avec les facteurs de transcription (**figure 24**).

Ce qui va déterminer l'activité agoniste ou non d'un composé est moins l'affinité pour le RE que la faculté qu'il aura à placer le RE dans la même configuration que le ferait l'E₂ (ligand endogène) (Dutertre et Smith, 2000).

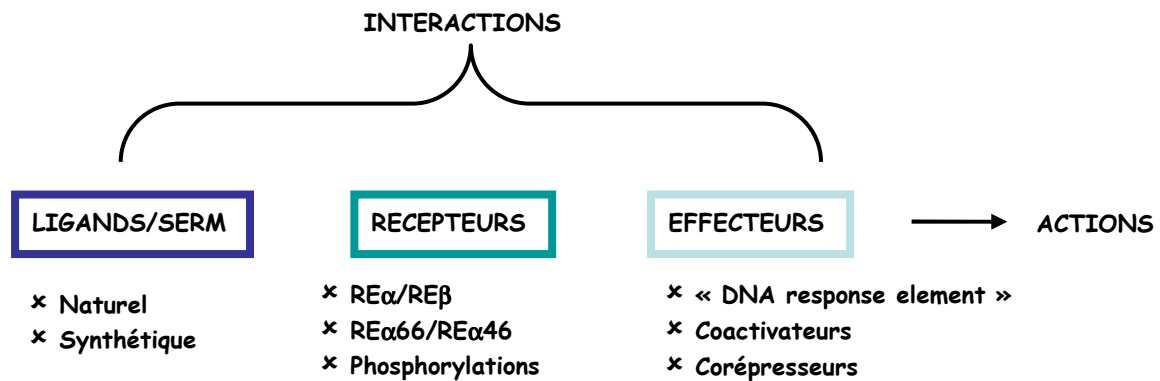


Figure 24. Pharmacologie tripartite du récepteur aux œstrogènes
(Katzenellenbogen et Katzenellenbogen, 2000)

Comme nous l'avons vu précédemment, en présence d'agonistes comme les œstrogènes, l'hélice 12 du domaine de liaison du RE se replie au-dessus de la cavité où se retrouve le ligand et forme des liens entre les hélices 3, 5, 6 et 11 du domaine de liaison au ligand. Ainsi, le domaine AF-2 forme une poche hydrophobe qui permet une interaction avec des coactivateurs spécifiques possédant le motif caractéristique LxxLL. En présence d'un SERM comme le raloxifène ou le tamoxifène, l'hélice 12 ne peut se replier au-dessus de la cavité car la chaîne latérale du SERM s'y retrouve. L'hélice 12 se replie donc dans une cavité entre l'hélice 5 et la partie carboxyle terminale de l'hélice 3 (Brzozowski *et al.*, 1997 ; Shiau *et al.*, 1998). Ce mouvement de l'hélice 12 cache un résidu lysine très important pour le recrutement de certains cofacteurs dépendants de l'hormone. Cette nouvelle conformation permet le recrutement préférentiel de différents co-répresseurs par le RE.

En présence d'un antagoniste total comme l'ICI 182,780 (ICI), la conformation de RE est complètement modifiée et ne permet plus d'interaction entre l'hélice 12 et le reste du domaine de liaison du ligand. Cette conformation empêche alors toute activation du RE (**figure 25**).

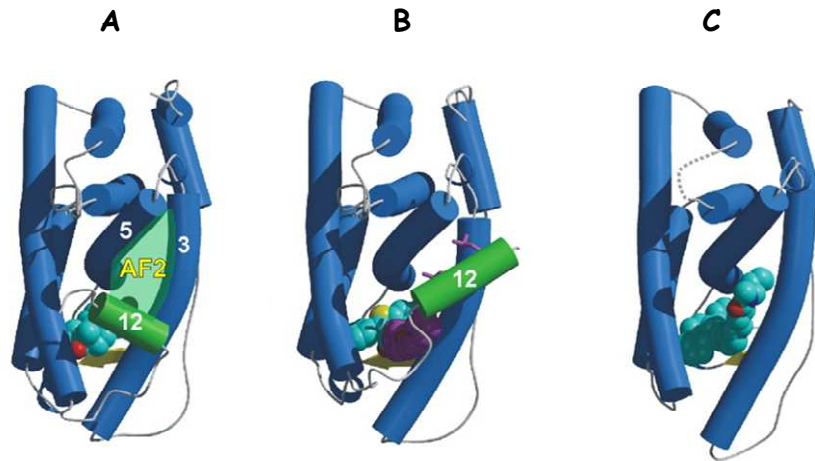


Figure 25. Conformations majeures induites par les agonistes et les antagonistes du RE (Heldring *et al.*, 2007)

A : conformation lorsque le RE est lié à un agoniste comme l'E₂

B : conformation lorsque le RE est lié à un SERM comme le tamoxifène

C : conformation lorsque le RE est lié à un antagoniste comme l'ICI

2. Utilisation thérapeutique des SERM

Il existe différentes classes de SERM, qui évoluent en fonction du temps et leur utilisation varie selon les pathologies ciblées. Ces molécules sont représentées dans la **figure 26**.

La première classe de SERM est la famille des triphényléthylènes, dont la molécule de référence est le tamoxifène, SERM le plus couramment utilisé dans la prévention et le traitement de cancers œstrogéno-sensibles. Il diminue significativement le risque de cancer du sein chez les femmes pré et post-ménopausées, module le métabolisme des lipides en diminuant les concentrations plasmatiques en LDL et est associé à une diminution du nombre d'infarctus du myocarde (Goldstein *et al.*, 2000 ; Jordan, 2007).

Cependant, le tamoxifène est controversé puisqu'il augmente considérablement le risque de cancer de l'endomètre et est à l'origine de nombreux effets secondaires, tels que les bouffées de chaleur, l'absence de règles, ou encore des problèmes de cataracte ou des risques de thrombose (Fisher *et al.*, 1998). Enfin, le taux de résistance au tamoxifène est assez élevé. D'autres molécules de la famille des triphényléthylènes existent, dont les plus importantes sont le torémifène ou encore le clomiphène. Le torémifène a une activité réduite au niveau de l'os, mais comparable au tamoxifène pour les autres effets négatifs, comme l'augmentation du

risque de cancer de l'endomètre (Goldstein *et al.*, 2000). Il est utilisé en deuxième intention pour le cancer du sein métastasé chez la femme ménopausée.

Le clomiphène est lui composé d'un mélange de deux stéréoisomères, le zuclomiphène et l'enclomiphène. Il est aujourd'hui utilisé contre l'infertilité. Il augmente la sécrétion de la GnRH, donc de LH et de FSH, ce qui va induire l'ovulation (Goldstein *et al.*, 2000).

La deuxième classe de SERM est la famille des benzothiophènes, dont la molécule la plus connue est le raloxifène. Il s'agit de SERM de deuxième génération. La demi-vie dans le plasma du raloxifène étant beaucoup plus courte que celle du tamoxifène (28 heures pour le raloxifène contre 5 à 7 jours pour le tamoxifène), il doit être utilisé en plus grande quantité (Goldstein *et al.*, 2000). Il démontre les mêmes propriétés que le tamoxifène (Walsh *et al.*, 1998). Par contre, il n'augmente pas les risques d'endométriose (This et Guyot, 2004). Le raloxifène est maintenant principalement utilisé dans le traitement de l'ostéoporose, puisqu'il réduit significativement le risque de fracture associé à la ménopause, comme l'a démontré l'étude MORE (Multiple Outcomes of Raloxifen Evaluation trial) (Kanis *et al.*, 2003). Le raloxifène ne semble pas avoir d'effet sur la cognition, mais est associé à l'augmentation du risque thromboembolique veineux (Martino *et al.*, 2004).

Un autre benzothiophène, l'arzoifène est en cours d'étude. C'est un antagoniste de l'E₂ plus efficace que le tamoxifène ou le raloxifène *in vitro* et *in vivo* sur des modèles de cancer du sein (Detre *et al.*, 2003). Les études précliniques confirment également que l'arzoifène a une plus grande activité agoniste que le raloxifène sur le métabolisme osseux et sur celui du cholestérol. Il inhibe également l'effet des œstrogènes sur l'endomètre et l'utérus (Sporn, 2004).

3. *Utilisation thérapeutique des anti-œstrogènes*

Il existe une deuxième catégorie de molécules, celle des anti-œstrogènes purs, ou SERD (Selective Estrogen Receptor Down-regulator). Les membres de cette famille vont empêcher, par encombrement stérique, la dimérisation du récepteur et favoriser son adressage au protéasome. Les SERD sont caractérisés par leur forte affinité pour le RE, leur capacité à contrer l'effet de l'E₂ et à bloquer la prolifération de cellules résistantes au tamoxifène. Les SERD les plus connus sont l'ICI, les ZK-253 et ZK-703, ou encore l'EM-800 (**figure 26**) (Hoffmann *et al.*, 2004).

L'ICI a une affinité forte pour le RE et a obtenu son autorisation de mise sur le marché en janvier 2004 pour les cancers du sein résistants au tamoxifène. Les ZK-253 et ZK-703 sont respectivement administrés par voies orale et sous-cutanée, ils inhibent la progression tumorale de cellules de cancer du sein et diminuent le niveau d'expression de RE sur des modèles murins (Hoffmann *et al.*, 2004).

Il existe donc de nombreuses molécules avec une action pro ou anti-œstrogénique selon le tissu ciblé, mais aucune ne semble être suffisamment spécifique. C'est pourquoi il nous paraît intéressant de mieux comprendre les effets physiologiques des PE, ainsi que leur mécanisme d'action au niveau du RE, afin de trouver parmi ces molécules des SERM, ce qui ouvrirait la voie pour une éventuelle utilisation en nutrition préventive des pathologies œstrogéno-dépendantes.

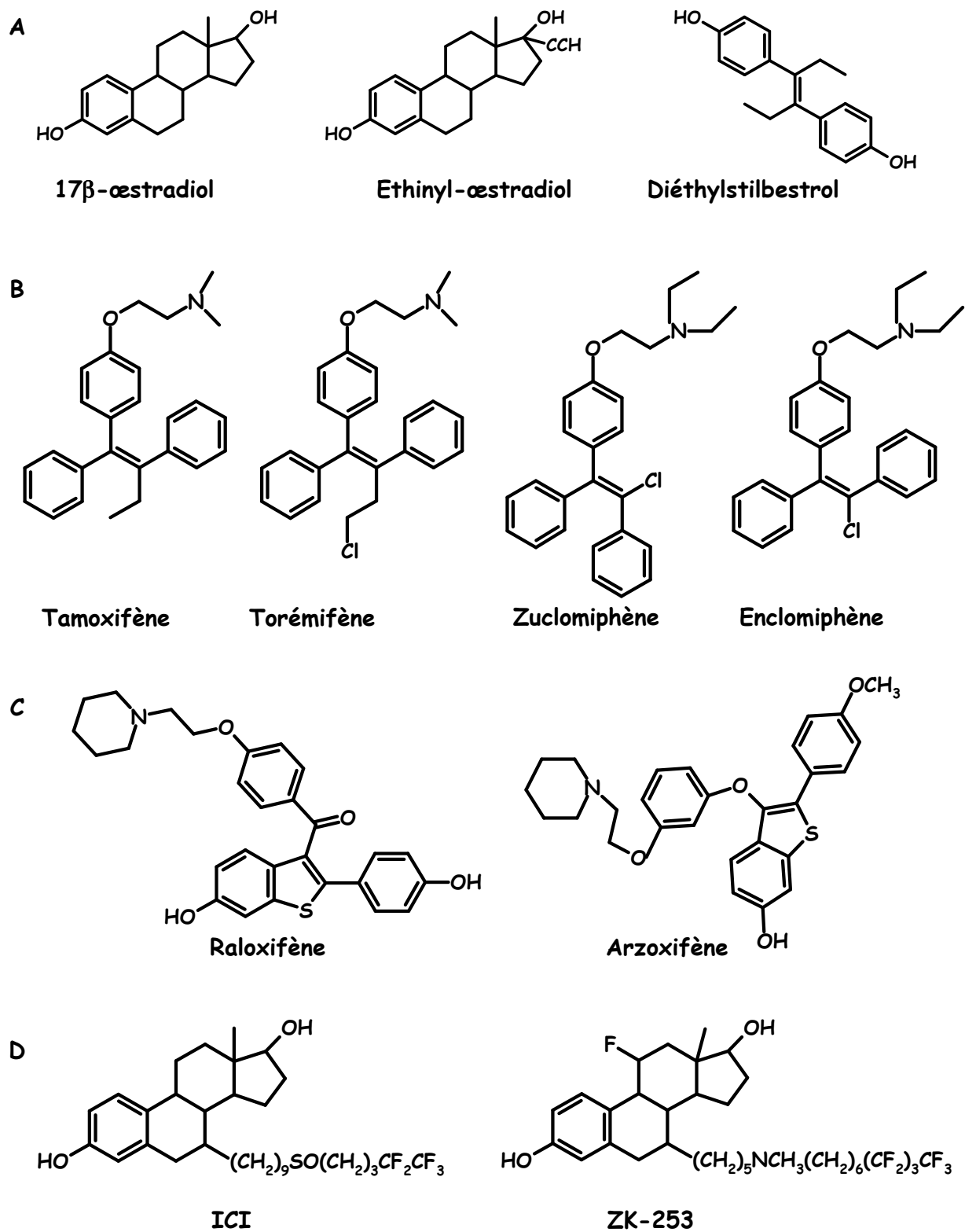


Figure 26. Structures des principaux ligands du récepteur aux œstrogènes

A : ligands agonistes ; B : principaux SERM dérivés du tamoxifène ;
 C : principaux SERM dérivés du raloxifène ; D : principaux SERD

C. Les effets des phyto-œstrogènes

De nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont été effectuées ces dernières années pour évaluer les effets de la prise de PE sur la santé humaine. Les revues de Teresa Cornwell en 2004 et d'Aedin Cassidy en 2006 énumèrent la plupart de ces études. L'ensemble de ces données montre la complexité d'interpréter les effets des PE, en fonction de la forme et de la quantité ingérées, ou encore de l'âge des personnes composant les études (Cornwell *et al.*, 2004 ; Cassidy *et al.*, 2006).

1. *Les phyto-œstrogènes, la fonction de reproduction et la ménopause*

Chez les femmes pré-ménopausées, la prise de PE (45 mg d'isoflavones/jour) provoque une modification du cycle menstruel (Cassidy *et al.*, 1995) et plus particulièrement un allongement de la phase folliculaire du cycle ainsi qu'une diminution du taux de LH et de FSH. Ces effets sur le cycle menstruel n'ont pas été retrouvés dans une étude plus récente (Duncan *et al.*, 1999). Chez les femmes ménopausées, les études se sont intéressées aux effets des PE sur les symptômes de la ménopause, notamment les bouffées de chaleur, les insomnies ou les problèmes de concentration. L'ensemble de ces études montre une réduction de ces symptômes, mais rapporte également un effet placebo particulièrement élevé (Albert *et al.*, 2002 ; Kurzer, 2003). Les données actuelles ne permettent donc pas de conclure concernant l'efficacité des PE sur les symptômes liés à la ménopause.

2. *Les phyto-œstrogènes et l'ostéoporose*

Chez les femmes ménopausées, l'influence des PE sur la densité minérale osseuse a fait l'objet de nombreuses études, dont la plupart démontrent un effet bénéfique. Ainsi, une première étude a montré que les femmes consommant le plus d'isoflavones avaient une densité minérale osseuse lombaire plus importante que les autres groupes, notamment celui des femmes pré-ménopausées (Mei *et al.*, 2001). De même, la génistéine (54 mg/jour) présente un effet positif sur la résorption osseuse (Morabito *et al.*, 2002). Cependant, d'autres études ne montrent pas d'effet des PE sur l'os (Dalais *et al.*, 2003).

Chez l'animal et *in vitro*, il y a une action positive des PE sur la minéralisation osseuse, la différenciation ostéoblastique et l'inhibition de l'activité ostéoclastique (Rassi *et al.*, 2002). Récemment, notre équipe a montré que la daïdzéine et l'équol stimulaient l'activité de la phosphatase alcaline des ostéoblastes en culture (Vergne *et al.*, 2008b).

3. Les phyto-œstrogènes et le système nerveux central

Des études récentes concernant les effets des PE sur le système nerveux central ont été menées. Un régime riche en isoflavones (100 mg/jour) serait associé à une amélioration des mémoires à court et à long terme (File *et al.*, 2001). De même, il y aurait une amélioration des mémoires verbale et logique chez les femmes ménopausées consommant 69 mg/jour d'isoflavones pendant 6 mois (Kritz-Silverstein *et al.*, 2003). Ces observations de l'impact des PE sur les fonctions cognitives restent à confirmer (Fournier *et al.*, 2007).

Des études comportementales chez le rat ont montré des effets bénéfiques des PE sur les performances mnésiques et sur l'apprentissage (Lund et Lephart, 2001).

In vitro, les PE (notamment la génistéine) ne démontrent pas ou peu d'effet protecteur contre la formation de plaques β -amyloïdes (Zhao *et al.*, 2002 ; Bang *et al.*, 2004). Cependant, l'équipe de Schreihofner indique que les PE, comme la génistéine et la daïdzéine, sont capables d'induire une activation transcriptionnelle des RE similaire à celle de l'E₂ dans une lignée neuronale (Schreihofner, 2005).

4. Les phyto-œstrogènes et le système cardio-vasculaire

Les isoflavones et les lignanes semblent diminuer le LDL cholestérol et le cholestérol total, même si ces résultats sont sujets à controverse (Howes *et al.*, 2000). Chez l'Homme, il existe un lien entre la concentration sérique en entérolactone et la diminution du risque cardio-vasculaire (Vanharanta *et al.*, 2003). De même, une consommation régulière de vin rouge (« French Paradox ») limite les risques de maladies cardio-vasculaires. Cette observation pourrait être liée à la présence de resvératrol dans le vin rouge (Renaud et Ruf, 1994).

Les mécanismes cellulaires par lesquels les PE pourraient avoir un effet sur le système cardio-vasculaire sont encore flous. La génistéine active la eNOS rapidement (10 minutes) *via* une série de phosphorylations et une augmentation d'AMPc, et ces effets ne sont pas inhibés par des antagonistes spécifiques des voies de signalisation classiques des œstrogènes (Liu *et al.*, 2004).

D'une manière générale, tous ces travaux, aux résultats divergents, rendent difficile les conclusions quant aux effets physiologiques des PE chez l'Homme. Ainsi, les PE ne sont pas utilisés dans un but thérapeutique, mais de nombreux compléments alimentaires à base de PE sont vendus. Ces produits ont une grande popularité auprès des consommatrices car les PE présentent l'intérêt d'être naturels. De plus, les récentes études risques/bénéfices publiées sur les THS de la ménopause, fortement médiatisées, ont suscité une relative appréhension chez les femmes ménopausées, les conduisant à rechercher des alternatives dans le traitement de leur ménopause. Cependant, l'impact des PE sur la santé et donc sur les cancers œstrogéno-dépendants restent encore à éclaircir. En particulier, les effets des PE sur le cancer du sein, largement répandu, semblent encore méconnus et requièrent de plus amples études.

IV. Impact des œstrogènes, des SERM et des phyto-œstrogènes sur le cancer du sein

A. Le cancer du sein

1. Épidémiologie

Le cancer du sein est la première cause de mortalité par tumeur maligne chez la femme. Cette tendance touche tous les pays occidentaux industrialisés, les populations asiatiques étant moins touchées. Depuis 2000, chaque année en France, environ 42 000 nouveaux cas sont diagnostiqués et 12 000 décès sont recensés. Actuellement, une femme sur dix est/sera confrontée à cette maladie dans sa vie et son incidence avant 50 ans a doublé depuis 20 ans. Cette augmentation est en partie due à une généralisation du dépistage du cancer du sein. Ce dépistage précoce de la maladie permet d'améliorer la survie des patientes (65% à 5 ans et 48% à 10 ans).

Le cancer du sein est une maladie plurifactorielle dont il est difficile de déterminer une cause exacte. Il existe cependant un grand nombre de facteurs de risques :

- La prédisposition génétique, responsable de 5 à 10% des cas. Il s'agit alors d'une transmission héréditaire d'une anomalie génétique au niveau de gènes impliqués dans les processus de cancérisation. Ces gènes sont appelés « breast cancer susceptibility genes », comme BRCA-1, muté dans 40 à 45% des cas de cancers du sein héréditaires et BRCA-2 (Goldberg et Borgen, 2006).

- L'exposition prolongée aux hormones endogènes, l'E₂ en particulier. Cette exposition peut être liée à une puberté précoce (apparition des règles avant 12 ans), une ménopause tardive (après 55 ans), une absence de grossesse menée à terme avant 30 ans ou même une absence totale de grossesse (Keen et Davidson, 2003 ; Oldenburg *et al.*, 2007). De plus, l'exposition à des hormones exogènes, comme la prise d'un THS, ou encore la prise de contraception orale, augmente également les risques de cancer du sein (Oldenburg *et al.*, 2007). En revanche, une grossesse avant l'âge de 24 ans ainsi que l'allaitement semblent diminuer ces risques (Russo *et al.*, 2005).

- Les facteurs dits environnementaux. Ainsi, la consommation d'alcool, une alimentation trop riche en sucres et en graisses, ou encore le manque d'exercice physique augmenteraient les risques de cancer du sein. D'autres facteurs environnementaux sont

reconnus comme étant impliqués dans l'apparition du cancer du sein, notamment l'exposition à de fortes irradiations, comme ce fut le cas de femmes à Nagasaki ou à Hiroshima.

Les cancers du sein sont cliniquement classés en deux catégories : les cancers dits RE positifs (RE+) et les cancers dits RE négatifs (RE-), selon le niveau d'expression de RE dans une biopsie de tumeur. Les tumeurs de sein RE+ représentent 50 à 80% de la totalité des tumeurs du sein et leur proportion augmente avec l'âge. La présence de RE est actuellement corrélée avec un meilleur pronostic de survie (Hall *et al.*, 2006).

2. Développement de la glande mammaire

Le sein est une glande exocrine qui se développe au cours de la vie d'une femme, du stade fœtal jusqu'à la ménopause, sous l'influence de facteurs de croissance (IGF) d'hormones thyroïdiennes (T₃, T₄) et d'hormones sexuelles comme la progestérone et les œstrogènes (Thibault et Levasseur, 2001). La **figure 27** représente une coupe de sein.

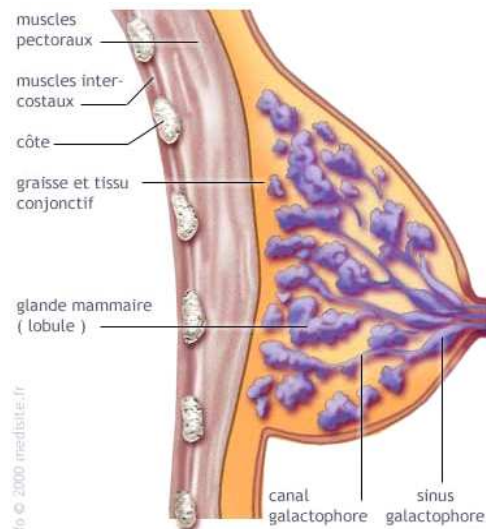


Figure 27. Coupe de sein

La glande mammaire est constituée de deux compartiments cellulaires : la couche mésenchymateuse, contenant nerfs, vaisseaux sanguins, fibroblastes ou encore tissu adipeux, et la couche épithéliale, avec les canaux galactophores et les lobules. Les lobules sont composés d'alvéoles. Une coopération existe entre ces deux compartiments tout au long du développement de la glande.

Durant la vie foetale, seulement quelques structures mammaires sont formées, avec assez peu de canaux galactophores et de lobules. Après la naissance, cette structure reste quiescente jusqu'à la puberté. C'est à cette période que les ovaires se mettent à produire les hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone), qui vont jouer un rôle essentiel dans le développement de la glande mammaire, puisqu'elles vont induire la croissance et la prolifération des canaux galactophores, lobules et alvéoles (Russo *et al.*, 2005). Ce développement va alors contribuer à la formation des lobules dits de type 1, structures de base de la glande. Ces lobules évoluent ensuite vers des lobules de type 2, puis de type 3, notamment sous l'influence d'œstrogènes, de progestérone et de facteurs de croissance.

En absence de grossesse, la structure de type 1 est la plus représentée, même si certaines structures de type 2 et 3 peuvent apparaître. Lors d'une grossesse, en revanche, la structure prédominante est la structure de type 3 (Polyak, 2001 ; Russo et Russo, 2004). En fin de grossesse et pendant la lactation, ces structures de type 3 évoluent encore jusqu'aux lobules dits de type 4 : ces structures ont pour but de produire du lait. Les alvéoles commencent alors une régression à partir du sevrage. Il s'effectue une involution des structures 3 et 4 vers des structures de type 2, puis de type 1 à la période de la ménopause. Ce cycle est schématisé dans la **figure 28**.

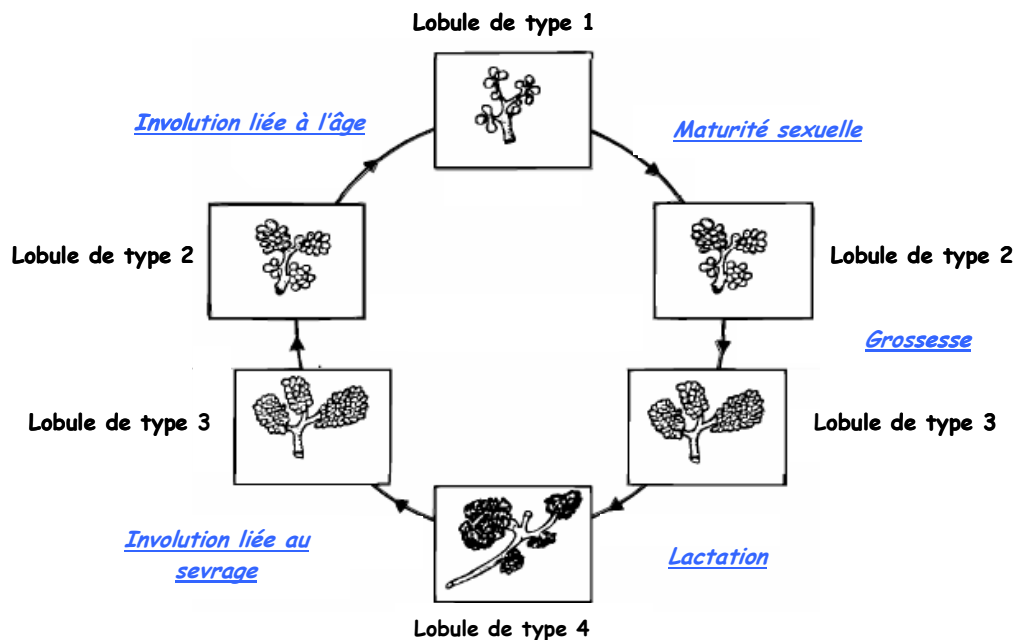


Figure 28. Evolution de l'architecture de la glande mammaire (Russo et Russo, 1998)

La glande mammaire est donc en évolution constante au cours de la vie de la femme. Le nombre de ses cellules en différenciation et en croissance étant très important, elle plus sensible aux processus de cancérisation (Olsson, 2000).

3. Mécanisme de cancérogenèse mammaire

Une cellule cancéreuse diffère d'une cellule dite « saine » par un certain nombre de caractéristiques, acquises tout au long du développement tumoral : mutation au niveau de gènes dits de « susceptibilité au cancer », insensibilité aux signaux régulant la croissance cellulaire, échappement au système d'apoptose, ou encore invasion tissulaire.

La cancérisation commence par une phase d'initiation, où de nombreuses mutations génétiques vont s'accumuler dans la cellule. Il va alors y avoir une surexpression de facteurs pro-oncogènes. La cellule reste tout de même contrôlée par l'environnement cellulaire grâce aux jonctions « gap ». Ensuite suit la phase de promotion, où la cellule devient indépendante suite à la perte de communication intercellulaire. Il peut également y avoir la perte de fonctionnalité d'anti-oncogènes : la cellule perd le contrôle sur sa croissance cellulaire. Ce processus est schématisé dans la **figure 29**.

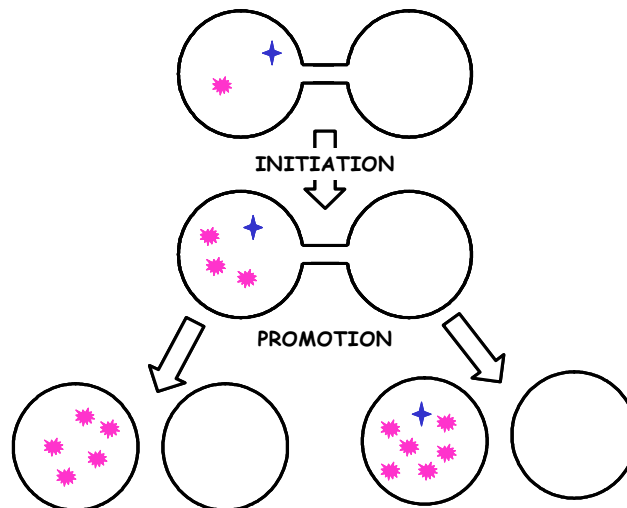


Figure 29. Initiation, promotion et progression d'une cellule tumorale : rôle de l'équilibre entre anti et pro-oncogènes

★ : anti-oncogène ★ : pro-oncogène

En se multipliant de manière incontrôlée, les cellules cancéreuses finissent par former une tumeur. Dans 95% des cas, les cancers du sein se développent à partir des cellules épithéliales des canaux galactophores et des lobules et se nomment alors des adénocarcinomes (Cancer, 2007).

Il existe deux situations (Cancer, 2007):

- Les cellules cancéreuses se trouvent uniquement à l'intérieur des canaux galactophores et des lobules, sans infiltration des tissus environnants : ce sont les cancers *in situ*. Ce type de cancer est plutôt considéré comme un facteur de risque de cancer du sein que comme un cancer du sein à proprement parler.

- Des cellules cancéreuses infiltrent les tissus avoisinants, il s'agit de cancers infiltrants. Cette infiltration nécessite la formation de nouveaux vaisseaux (angiogenèse tumorale) par migration et prolifération de cellules endothéliales issues des vaisseaux pré-existants (Boudreau et Myers, 2003). Les cellules tumorales vont sécréter divers facteurs qui enclenchent l'angiogenèse, comme des facteurs de croissance pro-angiogéniques, VEGF par exemple (vascular endothelial growth factor) ou des enzymes spécifiques appelées les MMP (métalloprotéases de la matrice), qui ont la capacité de dégrader la matrice extracellulaire (Van Hinsbergh *et al.*, 2006). Ces MMP sont fortement exprimées lors de tumeurs avancées et sont impliquées dans la progression, l'invasion de cancers ainsi que le processus de métastase. Ce nouveau réseau de vaisseaux permet alors à la tumeur de se développer et de mettre en place les processus d'envahissement métastatiques. La dissémination métastatique d'un cancer mammaire se fait aussi par le système lymphatique (lymphangiogenèse). La présence de métastases indique un stade critique de la maladie, stade final dit d'échappement thérapeutique, car les principales thérapies perdent leur efficacité.

4. Œstrogènes et les récepteurs aux œstrogènes dans le cancer du sein

Les femmes avec des concentrations circulantes élevées d'E₂ et de testostérone présentent un risque significativement plus élevé de développer un cancer du sein œstrogéno-dépendant (Cauley *et al.*, 1999). Chez la femme ménopausée, les sources principales de testostérone sont les glandes surrénales et celle d'E₂ est l'aromatization périphérique dans le tissu adipeux de testostérone en E₂. Les femmes en surpoids ou en situation de stress présentent donc plus de risques. De plus, les femmes sous THS ont un risque accru de développer des tumeurs RE⁺ et RP⁺, ce qui suggère qu'elles soient considérées différemment des RE⁻ et RP⁻ pour leur prise en charge thérapeutique (Chen *et al.*, 2004).

En Inde, les tumeurs mammaires observées sont essentiellement des tumeurs RE-, vraisemblablement dû au fait que ces populations utiliseraient relativement peu de contraceptifs ou de THS à base d'œstrogènes (Tewari *et al.*, 2007).

Au niveau cellulaire, certains auteurs considèrent, compte tenu des données épidémiologiques et du sur-risque de cancer associé aux œstrogènes, que l'effet de l'E₂ intervient dès la phase d'initiation. Ainsi, l'E₂ serait capable de provoquer des mutations géniques à l'origine des processus tumoraux (Yue *et al.*, 2003).

La promotion des tumeurs peut suivre l'initiation, si le système immunitaire est déficient. Celle-ci nécessite un mécanisme de réponse aux œstrogènes, reconnus comme facteurs de croissance. Or, au niveau du sein, les RE sont exprimés dans certains types cellulaires, comme les cellules épithéliales pour le RE α et le RE β , ou encore dans les cellules myoépithéliales pour le RE β . La liaison de l'E₂ aux RE dans ces cellules leur permet de jouer les rôles de sondes et ainsi d'influer sur la prolifération, en faisant notamment fluctuer la sécrétion de facteurs de croissance (Anderson, 2002).

Le rôle de l'E₂ dans la prolifération de ces cellules est principalement dû à son implication dans la progression du cycle cellulaire. Cet effet de l'E₂ dans le cancer du sein passe notamment par la régulation de c-myc, mise en évidence aussi bien sur des cellules normales ou cancéreuses du sein (Leygue *et al.*, 1995). Cette régulation est schématisée dans la **figure 30**.

Les complexes cyclines-CDK, qui contrôlent la progression du cycle cellulaire sont aussi des cibles de régulation de l'E₂. En particulier, en présence d'anti-œstrogènes, une diminution de l'ARNm de la protéine cycline D1 est observée, protéine activant CDK4 et CDK6, ce qui entraîne une diminution de la phosphorylation de pRB (protéine du rétinoblastome) et donc une inhibition de la progression du cycle cellulaire (Doisneau-Sixou *et al.*, 2003 ; Butt *et al.*, 2005). Le rôle majeur de l'E₂ sur la progression du cycle cellulaire est donc sa régulation sur la cycline D1 et sur c-myc (Mawson *et al.*, 2005), qui entraîne l'activation du complexe cycline E/CDK2 (**figure 30**).

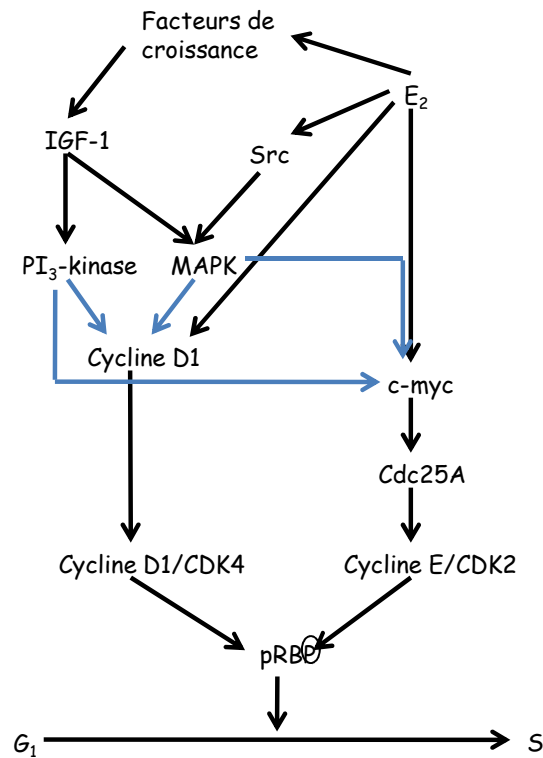


Figure 30. Schéma simplifié de l'implication de l'E₂ dans la progression du cycle cellulaire dans les cellules du sein
(Doisneau-Sixou *et al.*, 2003 ; Mawson *et al.*, 2005)

- ▶ Voie directe d'activation
- ▶ Voie indirecte, faisant intervenir des cascades d'activations

5. Divers traitements existants

Un bilan pré-thérapeutique est réalisé afin de choisir le traitement le plus adapté. De nombreux facteurs orientent ce choix : type de cancer (*in situ* ou infiltrant), âge et état général du patient, ou encore sensibilité aux hormones. Quatre types de traitements sont ainsi proposés, seuls ou en association :

- La chirurgie, technique la plus ancienne dans le cas de cancer du sein. La mastectomie a quasiment disparue, laissant place à une mammectomie moins large.
- La radiothérapie, qui a pour but de diminuer les récives du cancer du sein. Les complications sont rares, mais il peut apparaître parfois des œdèmes du sein, ou des altérations pulmonaire et cardiaque.

- La chimiothérapie, qui est indiquée pour des stades avancés de cancer du sein avec métastases. Les molécules utilisées peuvent être classées en différentes familles en fonction de leur mode d'action : antimétabolites, agents alkylants, anti-métabolites ou encore inhibiteurs de topoisomérase (enzymes assurant la spiralisation/déspiralisation de l'ADN). Le problème majeur de ce traitement est la cytotoxicité des molécules et la sélectivité des tissus visés. En effet, la chimiothérapie est aussi toxique sur des tissus sains à renouvellement élevé, comme la moelle osseuse ou le tube digestif.

Le dernier type de traitement utilisé est l'hormonothérapie, chez les personnes atteintes d'un cancer du sein hormono-dépendant.

B. L'hormonothérapie, les SERM et les phyto-œstrogènes dans le cancer du sein

Les hormones, plus particulièrement les œstrogènes, jouent un rôle essentiel dans le déclenchement mais aussi le développement du cancer du sein (Yager et Davidson, 2006).

1. *L'hormonothérapie*

L'efficacité de l'hormonothérapie n'est avérée que sur des cellules tumorales exprimant en forte quantité les RE et les RP. Depuis les années 1960, de nombreuses approches ont été utilisées afin de réduire la concentration et/ou les effets des œstrogènes circulants (Bush, 2007).

Dans le cas des cellules tumorales exprimant les RP, des progestatifs de synthèse sont utilisés pour les stades avancés de cancer du sein. Les molécules les plus utilisées sont le mégestrol ou la médroxyprogestérone. En moyenne, 30 à 50% des cancers répondent à ce type de traitement.

Les ovaires étant la majeure source d'œstrogènes chez la femme pré-ménopausée, une drogue agoniste de la GnRH peut être utilisée afin de bloquer la production d'œstrogènes par les ovaires (castration pharmacologique réversible). Les molécules utilisées sont la goséreline ou la leuprolide.

Une autre alternative pour un traitement hormonal est l'utilisation d'inhibiteurs d'aromatases, visant à diminuer la production œstrogénique, puisqu'elles sont responsables de la synthèse des œstrogènes à partir des androgènes. Plusieurs générations d'anti-aromatases se

sont succédées, mais les inactivateurs de troisième génération se sont progressivement imposés comme hormonothérapie de référence. Il existe deux types d'agents de troisième génération : les inactivateurs stéroïdiens, qui bloquent irréversiblement le site de fixation de l'androsténone à l'aromatase et les inhibiteurs non stéroïdiens, qui se fixent réversiblement à l'hème du cytochrome P450, coenzyme du complexe à activité aromatase. Ces inhibiteurs d'aromatases ne sont recommandés que chez les femmes ménopausées, leurs effets chez les femmes pré-ménopausées n'étant pas encore connus (Bush, 2007).

Enfin, une autre stratégie vise à bloquer les effets des œstrogènes sur les cellules cancéreuses, sans pour autant diminuer les concentrations circulantes d'œstrogènes. Pour cela, les molécules utilisées sont les SERM et les SERD. La molécule de référence pour le traitement des cancers du sein est à l'heure actuelle le tamoxifène, qui bloque l'action des œstrogènes en se liant aux RE (Katzenellenbogen et Katzenellenbogen, 2000). De nombreuses études ont montré les effets bénéfiques du tamoxifène et déterminé une durée optimale de traitement à 5 ans (Fisher *et al.*, 1998 ; Tan-Chiu *et al.*, 2003). Cependant, à cause de son activité œstrogénique sur certains tissus, il peut aussi être la cause, entre autres, d'apparition d'autres cancers comme le cancer de l'endomètre. Cette double action du tamoxifène, ajoutée à l'apparition fréquente de résistance des cellules de cancer du sein, ont conduit à rechercher des dérivés plus efficaces, ayant moins d'effets secondaires. Le torémifène est alors utilisé en deuxième intention. Enfin, en cas de résistance, l'ICI peut être utilisé.

2. Données expérimentales sur les SERM et les phyto-œstrogènes dans le cancer du sein

Afin de trouver des molécules adéquates pour le traitement du cancer du sein, de nombreuses études cliniques, ainsi que des études expérimentales *in vivo* et *in vitro* ont été réalisées ces dernières années.

a) Les SERM

Une première étude clinique, nommée « Breast Cancer Prevention Trial », a permis d'évaluer l'effet du tamoxifène sur le développement du cancer du sein chez des femmes dites à haut risque. Cette étude, menée sur 5 ans, a montré une diminution d'environ 50% du risque de développer un cancer du sein avec 20 mg/jour de tamoxifène. Cette étude a révélé que cette diminution touchait principalement les cancers RE+ (Fisher *et al.*, 1998). Une deuxième

étude, « Italian Tamoxifen Prevention Study », a été réalisée avec le tamoxifène chez des femmes ayant des risques faibles à modérés de cancers du sein. S'il n'y a pas eu de différence significative entre les deux groupes, il apparaît, chez les femmes ayant un plus fort risque de cancer du sein, un plus faible risque de cancer RE+ avec le tamoxifène (Veronesi *et al.*, 2003). L'étude « Royal Marsden Hospital » ainsi que l'étude « International Breast Cancer Intervention Study » ont également montré les effets bénéfiques du tamoxifène sur l'apparition de cancer du sein RE+ (Cuzick *et al.*, 2003). Il semble donc que le tamoxifène a un impact significatif sur la prévention des cancers du sein chez les femmes à haut risque (Jordan, 2007).

Dans le traitement du cancer du sein évolué, deux essais de phase II ont testé l'efficacité du raloxifène (This et Guyot, 2004). En raison de son efficacité modeste dans ces études, le raloxifène n'a pas été évalué au-delà dans le traitement du cancer du sein. La STAR (Study of Tamoxifen And Raloxifen) a comparé pendant 5 ans l'efficacité du tamoxifène (20 mg/jour) et du raloxifène (60 mg/jour) chez des femmes ménopausées et à haut risque de cancer du sein. Ainsi, le raloxifène est aussi efficace que le tamoxifène pour réduire les risques de cancer du sein (Jordan, 2007).

Des études cliniques ont confirmé que l'efficacité et la sécurité du torémifène étaient cliniquement équivalentes au tamoxifène dans le traitement de patientes présentant des tumeurs RE+. Le torémifène est indiqué pour des femmes ménopausées n'ayant pas de problème d'insuffisance hépatique ni d'hyperplasie de l'endomètre (Goldstein *et al.*, 2000).

L'arzoifène, lui, est similaire au raloxifène. Les études pré-cliniques ont trouvé un fort effet anti-œstrogénique sur le sein. En phase d'étude I, ses effets secondaires les plus communs sont les bouffées de chaleur. Actuellement, les études continuent en phase II et III.

De nombreux travaux expérimentaux sur des modèles murins et sur des lignées cellulaires ont été effectués. Ils montrent que le tamoxifène pourrait prévenir l'initiation et la promotion de tumeurs mammaires chez le rat (modèle dit « thérapeutique » où les tumeurs mammaires sont induites par un carcinogène chimique, le diméthylbenzanthracène, DMBA). Le raloxifène réduit, mais dans une moindre mesure que le tamoxifène, la croissance de tumeurs mammaires chez le rat. Dans d'autres modèles, le tamoxifène apparaît plus efficace que le raloxifène pour prévenir l'apparition ou le développement de tumeurs mammaires (This et Guyot, 2004).

Dans un modèle de xénogreffe tumorale chez des souris « nude » athymiques ovariectomisées, l'arzoixifène inhibe la progression tumorale de façon plus puissante que le tamoxifène ou le raloxifène (Schafer *et al.*, 2001).

Le tamoxifène seul induit une faible prolifération des cellules MCF-7, lignée humaine issue d'un cancer du sein, tandis qu'il a un effet anti-prolifératif en présence d'E₂ (This et Guyot, 2004). En présence d'œstrogènes, le raloxifène a un effet anti-prolifératif dans les MCF-7 supérieur à celui du tamoxifène (This et Guyot, 2004).

b) Les SERD

L'intérêt de trouver des molécules ayant les mêmes effets antagonistes que les SERM, sans avoir leurs effets agonistes a poussé vers l'étude des SERD et notamment l'ICI, qui est le plus étudié (Howell, 2006).

Une première étude clinique effectuée sur 19 femmes post-ménopausées avec une résistance au tamoxifène a montré que les deux tiers de ces femmes ont obtenu des bénéfices cliniques suite à un traitement avec l'ICI et ceci sur une longue période de traitement (Osborne *et al.*, 1995). Deux études cliniques en phase II chez des femmes ménopausées avec un cancer du sein ont confirmé les bénéfices de l'ICI (Howell *et al.*, 2002). En 2005, Steger a montré sur 126 patientes que l'ICI était efficace et bien toléré chez des patientes ayant au préalable subi une hormonothérapie (Steger *et al.*, 2005).

Dans un modèle de xénogreffe tumorale (MCF-7) chez des souris « nude » athymiques, l'ICI inhibe la progression tumorale résistante au tamoxifène (Osborne *et al.*, 1995). Au niveau cellulaire, l'ICI provoque la dégradation de RE α et inhibe la prolifération des cellules MCF-7 (Gaddy *et al.*, 2004).

c) Les phyto-œstrogènes

Un effet protecteur des PE sur le cancer du sein a été envisagé lors de l'analyse des données épidémiologiques obtenues dans les populations asiatiques par rapport aux populations occidentales. En effet, il existe une association entre l'importante consommation de soja des populations asiatiques et leur plus faible fréquence de cancers œstrogéno-dépendants (Jakes *et al.*, 2002).

Précisons cependant que cet effet favorable n'étant retrouvé principalement que chez les femmes asiatiques, d'autres facteurs tels que l'importance de la dose consommée par ces femmes (12 à 40 mg/jour d'isoflavones), la durée d'exposition (souvent depuis l'enfance, voire *in utero*), ainsi que les interactions avec d'autres nutriments notamment les acides gras oméga 3 sont également à considérer (Cassidy *et al.*, 2006). En Occident, la consommation des PE n'est pas associée à une diminution du risque de cancer du sein et au contraire dans certains cas à une augmentation (AFSSA et AFSSAPS, 2005).

L'ensemble de ces études suggère que les PE auraient effectivement un rôle protecteur plus important chez les femmes pré-ménopausées que chez les femmes ménopausées (Duffy *et al.*, 2007).

L'impact de l'administration de lignanes a également été étudié sur la prévalence du cancer du sein par des études rétrospectives (Boccardo *et al.*, 2006). Ainsi, l'analyse de Horn-Ross de 2001, effectuée sur une population pluri-éthnique aux Etats Unis, n'a pas montré d'effet de la prise de matairesinol et de sécoisolaricirésinol sur les femmes pré et ménopausées. Au contraire, l'étude de Leinseisen de 2004, menée sur une population germanique, a montré une diminution du risque de cancer du sein avec la prise de matairesinol et une corrélation inverse entre les concentrations sériques en entérolignanes et le risque de cancer du sein. Enfin, l'étude de Mc Cann de 2004, menée aux Etats Unis, montre une réduction du risque de cancer du sein dans le groupe de femmes pré-ménopausées. Ces résultats sont confirmés par des travaux plus récents montrant une corrélation inverse entre la consommation de lignanes et les concentrations circulantes d'entérolignanes avec le risque de cancer du sein (Piller *et al.*, 2006 ; Touillaud *et al.*, 2007). Au contraire, l'étude de Keinan-Boker n'a pas pu mettre en évidence de corrélation entre lignanes/entérolignanes et prévention du cancer du sein (Keinan-Boker *et al.*, 2004).

La génistéine administrée par voie orale induit, de façon dose dépendante, une prolifération des tumeurs (MCF-7) implantées chez des souris « nude » athymiques (Allred *et al.*, 2001). De même, la génistéine stimule les tumeurs mammaires induites par le DMBA chez des souris sauvages, mais pas chez les souris RE α KO (Day *et al.*, 2001). Cependant, d'autres études sur des souris « nude » implantées avec des MCF-7 ou avec des cellules MDA-MB-231 (cellules de cancer du sein RE -) n'ont pas montré d'effet de la génistéine ni de la daïdzéine (Gallo *et al.*, 2006). En particulier, le traitement avec de la génistéine induit une

différenciation et non une prolifération des tumeurs MCF-7 et MDA-MB-468 de souris « nude » (Constantinou *et al.*, 1998).

Des effets anti-prolifératifs des lignanes chez des souris « nude » athymiques ovariectomisées ayant des tumeurs mammaires MCF-7 ont été montrés (Bergman *et al.*, 2007 ; Saarinen *et al.*, 2007). La génistéine a un effet prolifératif à long terme sur des tumeurs MCF-7 de souris « nude » tandis que l'entérodol et l'entérolactone la réduisent. En combinaison, les entérolignanes inhibent la stimulation induite par la génistéine (Power *et al.*, 2006).

Au niveau cellulaire, les PE se lient aux RE et ont des effets qui peuvent être similaires à ceux induits par l'E₂ sur la prolifération des MCF-7 (Hsieh *et al.*, 1998). La génistéine, la daïdzéine et le coumestrol (10 µM) stimulent la prolifération des MCF-7 en culture (Schmidt *et al.*, 2005). Cependant, le consensus actuel est qu'*in vitro*, les isoflavones ont un effet prolifératif à de faibles concentrations (physiologiques, de 1 nM à 1 µM) et un effet anti-prolifératif à de fortes concentrations (doses supra physiologiques) sur les MCF-7 (Messina et Loprinzi, 2001 ; Adlercreutz, 2003 ; Matsumura *et al.*, 2005 ; Rice et Whitehead, 2007)

Des résultats similaires ont été retrouvés avec les entérolignanes et les flavanones. Ainsi, les lignanes stimuleraient la prolifération des MCF-7 pour des concentrations de 1 à 50 µM, mais inhiberaient cette prolifération en présence d'E₂ (Mousavi et Adlercreutz, 1992).

La 8-prényl-naringénine aurait un effet œstrogénique dans les MVLN, cellules dérivées des MCF-7. D'une manière générale, le groupement prényl confère à cette molécule une affinité élevée pour le LBD du RE α , et une activité œstrogénique importante *in vivo* et *in vitro* (Milligan *et al.*, 2002 ; Zierau *et al.*, 2005). Les effets de la naringénine *in vitro* sont encore controversés (Schaefer *et al.*, 2003 ; Harris *et al.*, 2005).

Les résultats de ces études cliniques et expérimentales concernant la relation entre effets des PE et le cancer du sein sont donc controversés, puisque des rôles à la fois protecteurs et stimulateurs ont été mis en évidence. Cette diversité montre l'intérêt de mieux connaître leurs effets cellulaires, ainsi que leur mécanisme d'activation au niveau des RE, afin de comprendre leurs effets sur des tissus œstrogéno-dépendants. Ces résultats permettraient de trouver, parmi ces PE, des candidats potentiels SERM à une éventuelle utilisation en nutrition préventive sur des pathologies œstrogéno-dépendantes.

OBJECTIFS

Les nombreuses études menées à l'heure actuelle sur les PE ne permettent pas de conclure quant aux effets réels de ces molécules sur de nombreux problèmes de santé publique, en particulier sur la ménopause et le cancer du sein. Alors que beaucoup d'études épidémiologiques ou cliniques ont été réalisées, assez peu de travaux se sont intéressés à la compréhension de leurs mécanismes d'action cellulaires et moléculaires. Or, même si ces molécules appartiennent à la grande famille des polyphénols, des différences notamment structurales doivent influencer leur capacité à induire une réponse physiologique.

Dans ce contexte, le travail que nous avons entrepris avait essentiellement deux objectifs :

- Réaliser une analyse comparative des mécanismes d'activation transcriptionnelle de $RE\alpha$ par l' E_2 et une collection de PE.
- Rechercher un lien entre les mécanismes d'activation transcriptionnelle du $RE\alpha$ et les effets œstrogéniques des PE sur la lignée cellulaire MCF-7, un modèle d'étude de cancer du sein.

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'activation transcriptionnelle de $RE\alpha$ par les PE. En particulier, il s'agissait d'identifier les domaines de transactivation AF impliqués dans cette activation. Nous avons ensuite étudié plus en détail des molécules issues de trois sous familles de PE, les entérolignanes, les isoflavones et les flavanones et analysé leurs propriétés pro- ou anti-œstrogéniques dans les MCF-7 en se focalisant sur les critères suivants : (1) la régulation de gènes œstrogéno-dépendants, (2) la prolifération cellulaire et (3) la régulation de l'activité des métalloprotéases de la matrice.

L'**article 1** de ce manuscrit présente les résultats obtenus avec les entérolignanes. Cette sous-famille paraît la plus intéressante puisque l'entérodiol et l'entérolactone présentent des profils d'activation distincts et qui diffèrent avec celui de l' E_2 . Le but de ce travail a donc été de mieux comprendre les rôles respectifs des domaines AF et des différentes boîtes composant le domaine AF-1 dans l'activation transcriptionnelle de $RE\alpha$ dans les MCF-7. Différents mécanismes œstrogéno-dépendants, connus pour être impliqués dans le processus de cancérisation, ont également été étudiés. Cette étude a permis de caractériser les mécanismes d'action et les propriétés pro- ou anti-œstrogéniques de l'entérodiol et de l'entérolactone, afin de définir leurs actions en tant que SERM potentiels. Puisque l'entérolactone induit l'activation transcriptionnelle de $RE\alpha$ préférentiellement *via* le domaine

AF-2 et n'a pas d'effets pro-œstrogéniques, cette molécule présenterait des potentialités en tant que SERM, dans le cadre d'une protection nutritionnelle contre le cancer du sein.

L'**article 2** rassemble les résultats obtenus avec les isoflavones. Cette sous-famille de PE est très étudiée depuis quelques années, mais les conclusions sur leurs propriétés œstrogéniques restent très controversées. Pour tenter d'expliquer les résultats divergents observés, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires de l'activation transcriptionnelle de RE α induite par les isoflavones et à leurs effets sur certaines propriétés œstrogéno-dépendantes. Ce travail a montré que les isoflavones ont des propriétés pro-œstrogéniques, quel que soit le contexte cellulaire.

La dernière partie de ce travail présente les premiers résultats obtenus avec la sous famille des flavanones. Les profils d'activation transcriptionnelle obtenus lors de cette étude préliminaire montrent une différence de mécanisme d'activation transcriptionnelle de RE α entre la naringénine et la 8-prényl-naringénine. Nous avons donc cherché à comprendre leurs mécanismes d'activation respectifs. La naringénine, comme l'entérolactone, semble impliquer préférentiellement le domaine AF-2 alors que la 8-prényl naringénine serait un agoniste pur de RE α , comme l'E₂.

Enfin, la dernière partie de ce manuscrit sera consacrée à l'interprétation et à la discussion générale de nos résultats.

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

A. Lignées cellulaires utilisées

1. Une lignée cancéreuse mammaire : la lignée MCF-7 (numéro ATCC : HTB 22)

Cette lignée est fréquemment utilisée comme modèle d'étude *in vitro* de cancer du sein. Ce sont des cellules épithéliales d'un adénocarcinome mammaire, issu en 1970 d'une patiente de type caucasien âgée de 69 ans. Ce sont des cellules adhérentes, qui ont une forme pseudo-circulaire avec de rares prolongements cytoplasmiques. Elles se présentent souvent sous forme de petits amas cellulaires. Cette lignée est dite « différenciée ». Les deux formes de RE α , de 66 et 46 kDa, sont exprimées de façon endogène et sont majoritaires par rapport au RE β (Flouriot *et al.*, 2000 ; Penot *et al.*, 2005).

2. Des lignées modèles d'étude

Nous avons utilisé 3 lignées de cellules épithéliales adhérentes, qui n'expriment pas les RE mais qui représentent des modèles d'étude *in vitro* très utiles pour une meilleure compréhension du mode d'activation moléculaire de RE α (Berry *et al.*, 1990 ; Tzukerman *et al.*, 1994 ; Metivier *et al.*, 2001).

a) La lignée HepG2 (numéro ATCC : HB 8065)

Cette lignée, issue d'un carcinome hépatique d'un jeune homme argentin de 15 ans, date de 1975. Cette lignée est dite « différenciée » et la transactivation du RE α après transfection passe par le domaine AF-1 (Merot *et al.*, 2004).

b) La lignée HeLa (numéro ATCC : CCL 2)

Cette lignée est issue d'un carcinome utérin d'une femme noire de 31 ans, prélevé en 1951. La transactivation du RE α après transfection passe par le domaine AF-2. Cette lignée est dite « dé-différenciée » (Merot *et al.*, 2004).

c) **La lignée CHO (numéro ICLC : HTL 95003)**

Cette lignée, issue d'un ovaire de hamster, est dite « dé-différenciée » et la transactivation du RE α après transfection passe de façon équivalente par les domaines AF-1 et AF-2.

B. Milieux de culture

Toutes les lignées cellulaires utilisées sont cultivées en routine dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (Sigma) contenant 1% d'antibiotiques (pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 μ g/mL, Sigma) et 5% de sérum de veau fœtal (SVF, Sigma) préalablement décomplémenté, qui permet l'apport de facteurs de croissances. La décomplémentation du SVF s'effectue par chauffage à 56°C pendant 20 min.

Pour les expérimentations, un « milieu expérimental » est utilisé : il s'agit d'un milieu DMEM/F12 (Invitrogen), ne contenant pas de rouge de phénol (indicateur coloré de pH) et contenant 2,5% de SVF décomplémenté et déstéroïdé afin d'éviter toute interaction avec les stéroïdes éventuellement contenus dans le SVF. Sont ajoutés également 1% d'antibiotiques et du bicarbonate de sodium (1,2 g/L). La déstéroïdation consiste en deux agitations d'une heure dans de la glace du SVF préalablement décomplémenté et mélangé à du charbon végétal actif 1% (Sigma) et à du dextran 0,1% (Sigma). Le charbon et le dextran sont ensuite éliminés par centrifugation (30 min, 900 g), le SVF est stérilisé par filtration (0,22 μ , Nalgene).

C. Produits chimiques

L'E₂, la naringénine (Nar), la 8-prényl-naringénine (8-PN) ainsi que le tamoxifène (Tam) proviennent des laboratoires Sigma.

La génistéine (G), la daïdzéine (D), l'équol (E) en mélange racémique, l'entérodiol (ED) et l'entérolactone (EL), sont issus de synthèses chimiques réalisées par le Dr. Svitlana Shinkaruk-Poix au Laboratoire de Chimie Organique et Organométallique (LCOO) de l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM), UMR 5255 CNRS, Bordeaux. La pureté de ces produits est \geq à 95% par analyse RMN.

Le coumestrol (C) et le resvératrol (R) proviennent de la société APIN fine chemical basée à Abingdon Oxon (UK).

La solution stock d'E₂ est préparée à 10⁻³ M dans de l'éthanol (EtOH). Des solutions mères sont préparées à 10⁻² M dans du DMSO (Di Methyl Sulfoxide, Sigma) pour les entérolignanes ou dans de l'EtOH pour toutes les autres molécules. L'ICI provient du fournisseur Tocris, la solution stock à une concentration de 10⁻² M dans du DMSO.

Ces solutions sont stockées à 4°C (E₂, G, D, E, ICI) ou à -20°C (ED, EL, C, R, Nar, 8-PN), à l'abri de la lumière.

D. Plasmides utilisés

Les différentes constructions plasmidiques utilisées ont été aimablement fournis par le Dr. Gilles Flouriot de l'équipe « Récepteur des œstrogènes et destinée cellulaire » de l'UMR CNRS 6026 à Rennes, sauf le pSG5RE β qui a été fourni par le département du Pr. J.A. Gustafsson (Dpt Biosciences and Medical Nutrition, Karolinska Institute, Sweden).

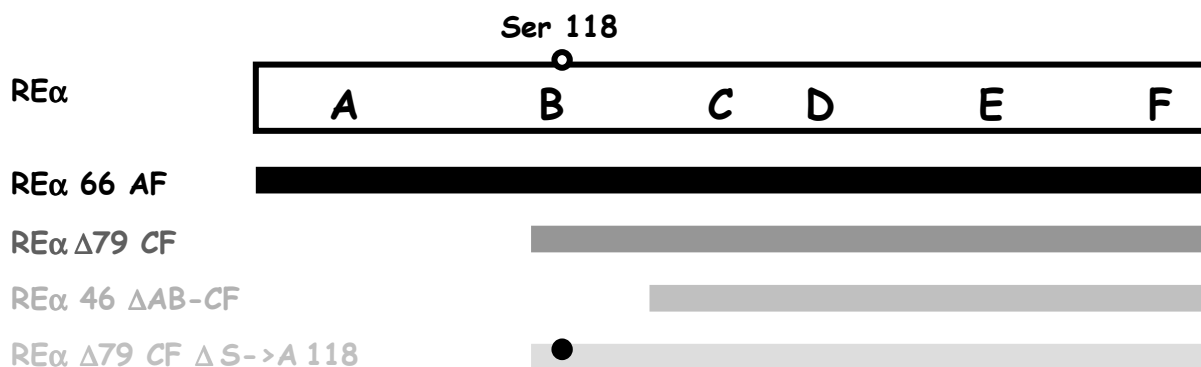


Figure 31. Schéma des différentes constructions utilisées

Les pSG5, pSGRE α 66 (HEO), pSGRE α Δ79, pSGRE α 46 et pSG5RE β sont des vecteurs d'expression eucaryotes ne contenant aucune séquence codante (plasmide vide pSG5) ou contenant respectivement les séquences codantes (ADNc) de RE α 66, RE α Δ79, RE α 46 et RE β . Les constructions du RE α sont représentées schématiquement dans la **figure 31**. Le pSGRE α Δ79 contient l'ADNc codant une forme tronquée de RE α 66, c'est à dire déléetée des 79 premiers acides aminés. Il a été obtenu à partir du plasmide pSGhRE α 66 (Ali *et al.*, 1993 ; Flouriot *et al.*, 2000).

Le pSGRE $\alpha\Delta 79$ S118A contient l'ADNc codant le RE $\alpha\Delta 79$, avec une mutation ponctuelle au niveau de la S118, qui a été remplacée par une alanine. Ce changement ne permet plus la phosphorylation du récepteur sur cette sérine en position 118. Ce plasmide a été obtenu à partir du plasmide pSGRE $\alpha 66$ S118A (Ali *et al.*, 1993).

Le pCMV- β Galactosidase (Promega), est un plasmide contenant le gène bactérien Lac-Z codant l'enzyme β -galactosidase, qui donne une réaction colorée en présence du substrat ONPG (O Nitro-Phényl β -D-Galactopyranoside, Sigma). Ce plasmide est utilisé comme témoin de transfection et permet de déterminer l'efficacité de la transfection.

Les plasmides pC3-LUC et pERE-TK-LUC sont tous deux des vecteurs rapporteurs. Ils contiennent en amont de la séquence codant la luciférase, le promoteur humain du complément C3 ou la séquence consensus ERE devant le promoteur du gène codant la thymidine kinase (TK) (Flouriot *et al.*, 2000 ; Metivier *et al.*, 2001 ; Merot *et al.*, 2004).

Contrairement au plasmide rapporteur pC3-LUC, le plasmide rapporteur pERE-TK-LUC peut être activé par les RE endogènes exprimés dans les cellules MCF-7 (Penot *et al.*, 2005). Afin de discriminer l'activation par le récepteur endogène et par le récepteur transfecté, nous avons donc utilisé le plasmide pC3-LUC pour les transfections dans les cellules MCF-7. En revanche, dans les cellules HeLa, HepG2 et CHO, qui n'expriment pas de façon endogène le RE, nous avons utilisé le plasmide pERE-TK-LUC, qui présentait une meilleure activation que pC3-LUC dans ces trois lignées cellulaires.

II. METHODES

A. Culture cellulaire

Toutes les opérations de culture cellulaire sont réalisées dans des conditions stériles, sous hotte à flux laminaire vertical (Eurocyt 120, ESI FluFrance). La culture des cellules est réalisée dans un incubateur (Hera Cell), qui permet le maintien des conditions de température (37°C) et de concentration en CO₂ (5%). Les cultures sont effectuées dans des flacons de culture de 75 ou de 182 cm² (Greiner Bio One).

Lorsque les cellules atteignent la subconfluence, des repiquages sont réalisés. Pour cela, le milieu de culture est éliminé et les cellules rincées par du PBS (Phosphate Bufer Saline) pour éliminer toute trace de SVF. Après addition de trypsine 2,5% (Invitrogen), une incubation à 37°C pendant 2 à 5 min permet le décollement et la dissociation des cellules. L'action de la trypsine est neutralisée par l'ajout de milieu de culture contenant du SVF. Les cellules sont comptées à l'aide d'un compteur de cellules (Beckman Coulter), puis une partie de la suspension cellulaire est utilisée pour ensemercer de nouveaux flacons de culture, tandis qu'une autre partie est utilisée, après dilution adéquate, pour ensemercer des plaques multipuits (24 ou 96, Greiner Bio One) ou des boîtes de Pétri (Greiner Bio One) pour la réalisation des différentes expérimentations.

Des lots de congélation sont réalisés régulièrement afin de limiter le nombre de repiquages. Une partie de la suspension cellulaire est centrifugée et le culot cellulaire est repris dans un tampon de congélation constitué de 70% de DMEM, de 20% de SVF décomplémenté et de 10% de DMSO, à raison de 3.10⁶ cellules par mL. Ce mélange est alors réparti dans des cryotubes (Greiner Bio One) à -20°C pendant 4 h, puis à -80°C, afin d'avoir une congélation progressive. A l'inverse, la décongélation s'effectue rapidement en reprenant les cellules dans du milieu de culture.

B. Etude de la prolifération cellulaire

Pour étudier la prolifération cellulaire, les cellules MCF-7 sont ensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 25000 cellules par puits dans du DMEM contenant 5% de SVF. Après 24 h, les cellules ont adhéré, le milieu de culture est éliminé, puis du milieu expérimental contenant les molécules à tester est ajouté (10^{-8} M pour l'E₂, 10^{-6} M ou 10^{-5} M pour les PE, 10^{-6} M pour l'ICI), seules ou en combinaison avec l'E₂ et/ou l'ICI, ou le solvant seul (EtOH ou DMSO à 0,1%).

Les cellules sont comptées à l'aide du compteur de cellules après 1, 3 ou 5 jours de traitement. Deux types de traitement ont été effectués. Les traitements de 24 h ou 72 h sont réalisés dans du milieu expérimental ne contenant pas de SVF, tandis que celui durant 5 jours est réalisé dans du milieu expérimental contenant 2,5% de SVF décomplémenté déstéroïdé.

C. Transformation, amplification et purification de l'ADN plasmidique

Afin d'amplifier l'ADN plasmidique, une transformation bactérienne est tout d'abord nécessaire. Tous nos plasmides contiennent le gène de résistance à l'ampicilline et sont introduits par choc thermique dans la souche bactérienne compétente d'*Escherichia coli* contenue du kit « One Shot TOP 10 competent cells » (Invitrogen). Les tubes (50 µL) sont donc placés dans de la glace pendant 30 min, puis soumis à un choc thermique de 42°C pendant 30 s. Du milieu riche (250 µL) permettant d'améliorer l'efficacité de transformation est alors rajouté, puis les tubes sont mis en agitation 10 g à 37°C pendant 1h. La suspension de bactéries transformées est ensuite étalée sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB (Luria Bertani)-agar, composé de 1% de Tryptone (Becton Dickinson), 1% de NaCl, 0,5% d'extrait de levure (Fisher Bioblock) et de 1,5% de Agar (Becton Dickinson), avec de l'ampicilline (100 µg/mL, Euromedex).

Après une incubation d'une nuit à 37°C, une colonie de bactéries isolée, transformée par le plasmide recombinant, est repiquée dans du milieu LB contenant le facteur de sélection des bactéries transformées (ampicilline).

La culture bactérienne est amplifiée à partir de cette colonie et l'ADN plasmidique peut être purifié selon le protocole de purification plasmidique du kit « Midi Prep » (Qiagen). La quantité d'ADN plasmidique est dosée par spectrophotométrie UV. L'absorbance est lue à

260 nm, puis à 280 nm. La concentration en ADN plasmidique est calculée, selon la formule ci-dessous et les ADN plasmidiques sont alors conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

$$[\text{ADN}] \text{ en } \mu\text{g/mL} = (\text{DO}_{260\text{nm}} - \text{DO}_{\text{blanc}}) \times 50 \times \text{facteur dilution}$$

La qualité de l'ADN récupéré est un facteur important pour obtenir, par la suite, une bonne efficacité de transfection. Ainsi, le rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀, qui reflète la pureté de la préparation d'ADN plasmidique est calculé. Celui-ci doit être compris entre 1,8 et 2,1.

D. Transfections transitoires

La transfection cellulaire permet l'expression de gènes d'intérêt dans une cellule donnée. Pour cela, nous utilisons la technique de transfert d'ADN plasmidique par les liposomes.

Pour l'étude de l'activation transcriptionnelle des RE, les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits de façon à obtenir 80% de confluence au moment de la transfection, 24 h après l'ensemencement. Cela représente 12500 cellules/puits pour les lignées MCF-7 et HepG2, et 2 500 cellules/puits pour les lignées HeLa et CHO.

Pour l'étude de l'expression protéique, les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits (Greiner Bio One), ce qui représente 500000 cellules/puits pour les MCF-7 et HepG2 et 100000 cellules/puits pour les HeLa et les CHO. Dans l'heure qui précède la transfection, le milieu de culture est remplacé par du milieu expérimental.

Les quantités totales d'ADN plasmidique sont de 50 ng par puits pour les plaques 96 puits et de 1 µg par puits pour les plaques 6 puits. L'ADN total transfecté est composé du plasmide contenant le gène d'intérêt (respectivement 10 ng et 200 ng pour les plaques 96 et 6 puits), du plasmide contenant le gène rapporteur et du plasmide codant la β-Galactosidase (respectivement 20 ng et 400 ng de chaque plasmide pour les plaques 96 puits et 6 puits). Les transfections s'effectuent alors grâce au FuGENE™ (Roche).

L'ADN et le FuGENE™ sont mélangés à température ambiante, puis, après une incubation de 30 min, ce mélange est ajouté au milieu expérimental sur les cellules pendant 24 h à 37°C. Après ces transfections, le traitement est effectué dans du milieu expérimental contenant les différentes concentrations des molécules à tester (de 10⁻⁸ M à 10⁻⁵ M pour les PE, de 10⁻¹² M à 10⁻⁶ M pour l'E₂, 10⁻⁶ M pour le Tam et l'ICI), seules ou en combinaison, ou

contenant uniquement 0,1% de solvant (EtOH ou DMSO). Après 24 h de traitement, le milieu est éliminé et les cellules sont rincées avec du PBS.

Dans le cas des transfections en plaque 96 puits, du tampon de lyse RLB (Reporter Lysis Buffer 5X, Promega) est distribué dans chaque puits (120 µl/puits). Les lysats cellulaires sont récupérés et conservés à -20°C dans l'attente des dosages des activités β -galactosidase et luciférase.

Concernant les transfections en plaque 6 puits, le tampon de lyse cellulaire (décrit dans le paragraphe « extraction protéique ») est rajouté (100 µL/puits). Les lysats cellulaires sont récupérés et conservés à -20°C en attendant d'effectuer l'extraction des protéines.

E. Mesure des gènes rapporteurs

1. *L'activité β -galactosidase*

La co-transfection du plasmide contenant le gène codant pour la β -galactosidase est un moyen rapide de vérifier l'insertion plasmidique et ainsi l'efficacité de transfection, puisqu'il est considéré que le taux d'insertion des plasmides est identique quel que soit le plasmide inséré. Le lysat cellulaire (55 µL) est incubé à 37°C avec 200 µL d'une solution de substrat constituée de $MgCl_2/\beta$ -MercaptoEtOH (240 µL, $MgCl_2$ 0,1 M, β -MercaptoEtOH 4,5 M, Sigma) de tampon phosphate (13,67 mL, 0,1 M, pH = 7,3) et de solution de substrat ONPG (5,28 mL, 4 mg/mL, Sigma) jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune (1 à 5 h selon les lignées). Les mesures d'absorbance sont effectuées à 405 nm par un spectrophotomètre (VICTOR, Perkin Elmer).

2. *L'activité luciférase*

L'activité luciférase reflète l'activation des promoteurs contenant des éléments de réponse aux RE. La mesure de cette activité s'effectue à l'aide du kit « Luciferase Assay System » (Promega). Le réactif luciférine (20 µL, avec ATP et Mg^{2+}) est ajouté à 40 µL de lysat cellulaire dans une plaque 96 puits. La lecture immédiate se fait à l'aide d'un luminomètre (VICTOR, Perkin Elmer). L'activité luciférase est exprimée en unité relative de luminescence (URL) émise par seconde.

F. Analyse de l'expression des ARNm

1. L'extraction des ARN totaux

Pour l'évaluation des taux d'ARNm, les MCF-7 sontensemencées dans des boîtes de Pétri de façon à obtenir 80% de confluence au moment du traitement, c'est-à-dire 5 jours après l'ensemencement. Le traitement est effectué, pendant 24 h, dans du milieu expérimental ne contenant pas de SVF, mais contenant les molécules étudiées (1 et 10 μM pour les PE, 10 nM pour l'E₂, 1 μM pour l'ICI), seules ou en combinaison, ou contenant uniquement 0,1% de solvant.

L'extraction des ARN totaux est réalisée selon la méthode basée sur la technique de Chomczynski et Sacchi (Chomczynski et Sacchi, 1987), au guanidium-thiocyanate-phénol-chloroforme en utilisant du Tri-Reagent® (Euromedex).

Avant l'extraction, les cellules sont rincées avec du PBS, puis 400 μL de Tri-Reagent® sont ajoutés pendant 5 min à température ambiante. Le lysat cellulaire est récupéré dans des tubes, 40 μL de BCP (Bromo-Chloropropane, Molecular Research Center) sont ajoutés. Après une agitation vigoureuse de quelques secondes, les tubes sont incubés 10 min à température ambiante, puis centrifugés (18 000 g, 15 min, 4°C). La phase aqueuse supérieure contenant les ARN est ensuite récupérée. Une incubation de 10 min avec 200 μL d'isopropanol pur est effectuée afin de faire précipiter les ARN totaux. Après centrifugation (18 000 g, 15 min, 4°C), le culot d'ARN obtenu est rincé par de l'EtOH (70% v/v, 400 μL). Ce dernier est enlevé après centrifugation (18 000 g, 5 min, 4°C). Une fois séché, le culot d'ARN est repris dans 20 μL d'H₂O DEPC (Diéthylpyrocarbonate, Invitrogen).

La concentration d'ARN est dosée par spectrophotométrie UV (VICTOR, Perkin Elmer). L'absorbance est lue à 260 nm, puis à 280 nm. Le rapport 260/280 reflète la pureté de la préparation. La concentration d'ARN est alors calculée, selon la formule ci-dessous et les ARN conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

$$[\text{ARN}] \text{ en } \mu\text{g/mL} = (\text{DO}_{260\text{nm}} - \text{DO}_{\text{blanc}}) \times 40 \times \text{facteur dilution}$$

2. *La transcription inverse et l'amplification*

La transcription inverse ou reverse (RT) permet de transcrire l'ARNm en ADNc par la transcriptase reverse qui synthétise le brin complémentaire d'ADN à partir d'une amorce polydT hybridée avec la queue polyA des ARNm. La RT s'effectue à partir de 2 µg d'ARN totaux.

La première étape consiste en une incubation de l'ARN pendant 10 min à 70°C. Ensuite, pour chaque échantillon d'ARN, le mélange décrit ci-dessous est ajouté à raison d'un volume total de 20 µL par tube. Chaque tube est incubé selon le protocole décrit ci-dessous dans un thermocycleur (Mastercycler Gradient, Eppendorf). Pour chaque RT, un témoin négatif est réalisé dans un tube ne contenant pas d'ARN. La composition du mélange réactionnel et le programme utilisé pour la RT sont indiqués dans le **tableau 7**. L'ADNc ainsi synthétisé se conserve à -20°C jusqu'à utilisation.

Tableau 7. Composition du mélange réactionnel et programme de RT

Mélange pour un tube		Protocole d'incubation de RT	
ARN	2 µg		
MgCl ₂ 25 mM	5 mM	42 °C	15 min
RT tampon 10X	1X	95 °C	5 min
dNTP 10 mM	1 mM	5 °C	5 min
RNase inhibiteur 2500 U	0,5 U		
Amorces oligodT	0,5 µg		
RT 1500 U	15 U		
H ₂ O	qsp 20 µL total		

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique permettant d'amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN déterminé. Ici, l'amplification se fait sur de l'ADNc et reflète donc le niveau d'expression de l'ARNm recherché.

L'amplification s'effectue à partir d'1 µL d'ADNc de chaque échantillon, auquel est ajouté le mélange décrit ci-dessous pour obtenir un volume total de 20 µL par tube.


Un témoin négatif est réalisé pour chaque amplification sur un échantillon où l'ADNc est remplacé par de l'H₂O DEPC. Le **tableau 8** récapitule le mélange réactionnel pour un tube.

Tableau 8. Mélange pour un tube pour la PCR

ADNc	1 μ L
Tampon 10 X/MgCl ₂	1X
dNTP 10 mM	200 μ M
Amorce sens	50 pmol
Amorce anti-sens	50 pmol
H ₂ O	qsp 20 μ L

Les mélanges sont placés dans le thermocycleur pour subir le programme PCR (**tableau 9**).

Tableau 9. Programme PCR

Activation de l'enzyme	94 °C	3 min	
Dénaturation des brins d'ADNc	94 °C	45 sec	* 
Hybridationspécifique des amorces avec l'ADNc (Tm)	50/60 °C	30 sec	
Elongation des brins nouvellement synthétisés	72 °C	30 sec	
* : Ces 3 étapes sont reproduites entre 30 et 40 cycles selon les fragments à amplifier			
Terminaison de la synthèse des néobrans	72 °C	7 min	

Le **tableau 10** indique la position des amorces sur les séquences correspondantes d'ADNc recherché, la taille des fragments de PCR, ainsi que le nombre de cycles et les températures d'hybridation (Tm) utilisées pour chaque réaction d'amplification.

Tableau 10. Numéro de séquences des gènes cibles, séquences et Tm des amorces utilisées pour les PCR, tailles attendues des fragments amplifiés

ADNc cible	Séquences	Taille	Tm
RE α NM-000125.2	F2 : 5' AATTCAGATAATCGACGCCAG 3' R3 : 5' GTGTTTCAACATTCTCCCTCCTC 3'	344 pb	50 °C
RP NM-000926	F : 5' ACAGGACCCCTCCGACGAAAA 3' R : 5' AGCTGTCTCCAACCTTGCACC 3'	328 pb	50 °C
pS2 NM-003225	F : 5' GCCCAGACAGAGACGTGTACAGT 3' R : 5' CTGGAGGGACGTGATGGTATTAG 3'	160 pb	50 °C
β -actine NM-001101	F : 5' CCCAGGCACCAGGGCGTGAT 3' R : 5' GGTCACTTCTCGCGGTTGGCCTTGGGGT 3'	250 pb	60 °C

L'ADN amplifié peut alors être stocké à 4°C avant d'être visualisé après électrophorèse. Pour la visualisation, 10 µL des échantillons sont déposés sur gel d'agarose 2% préparé dans du TAE (Tris Acetate EDTA) 1X contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg/mL) avec du tampon de charge (Blue/orange 6X loading dye, Promega). La migration s'effectue à 100 V pendant 25 min.

Les tailles des fragments sont estimées à l'aide de marqueurs de poids moléculaires, qui migrent dans les mêmes conditions expérimentales (échelle de 100 pb, BenchTop 100 pb DNA Ladder, Promega). Les tailles sont ensuite comparées aux tailles théoriquement attendues.

L'analyse densitométrique des bandes obtenues est effectuée à l'aide du logiciel ImageJ 1.17 (National Institutes of Health, USA).

L'amplification du gène d'intérêt est déterminée de façon semi-quantitative par le calcul des intensités des bandes obtenues, qui sont normalisées ensuite à celle d'un contrôle interne, la β -actine. Le contrôle expérimental est représenté par les cellules MCF-7 traitées par du solvant (0,1% EtOH) et dont l'indice d'amplification est égal à 1. Pour ce faire, la mesure de l'amplification des gènes cibles doit être réalisée dans la zone exponentielle d'amplification. Il est donc nécessaire de réaliser au préalable une étude de l'amplification des gènes cibles et du contrôle interne en fonction du nombre de cycles d'amplification. Le nombre de cycles à effectuer a donc été fixé à 22 pour pS2, 25 pour la β -actine, 32 pour le RP et 40 pour le RE.

G. Analyse de l'expression des protéines

1. *L'extraction des protéines totales*

Pour l'évaluation des taux protéiques, le protocole est le même que celui décrit pour l'analyse de l'expression des ARNm. Les MCF-7 sontensemencées dans des boîtes de Pétri de façon à obtenir 80% de confluence au moment du traitement, 5 jours après l'ensemencement. Pour les cellules transfectées (HeLa, HepG2, CHO), l'ensemencement, la transfection et le traitement sont réalisés selon le protocole décrit pour les transfections transitoires. Le traitement est effectué pendant 24 h dans du milieu expérimental comme précédemment.

Les cellules sont lysées à l'aide d'un tampon d'extraction. Le tampon d'extraction est composé d'une solution de base (Glycérol 10%, Tris HCl 20 mM, NaCl 140 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, NaF 10 mM, Na₃VO₄ 2 mM, EDTA 3 mM, pH 7,4, Sigma) à laquelle il faut rajouter extemporanément des inhibiteurs de protéases, à savoir l'aprotinine 10 µg/mL, la leupeptine 10 µg/mL, le phénylméthylsulfonidenfluoride (dilué au 1/100^{ème} dans de l'EtOH) 8,7 µg/mL, la benzamidine 234 µg/mL et du Triton X[®]-100 1% (v/v, Sigma).

Les lysats cellulaires sont récupérés puis centrifugés (14000 rpm ou 18 000 g, 30 min, 4°C). Les surnageants, contenant les protéines totales, sont récupérés et conservés à -80°C. La concentration protéique de chaque échantillon est déterminée par la technique colorimétrique de Bradford utilisant le bleu de Coomassie (Bio-Rad) (Bradford, 1976). La détermination de la concentration protéique se fait par rapport à une gamme étalon d'albumine bovine sérique (BSA de 0 à 1,5 mg/ml, Sigma) par lecture au spectrophotomètre à 590 nm.

2. L'analyse de l'expression protéique par Western Blot

Les extraits protéiques (20 à 40 µg de protéines) sont mélangés à du tampon de charge contenant du bleu de bromophénol 1 mg/mL, du Tris pH 6,8, 25%, du glycérol 10%, du SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 50 mg/mL (Sigma) et auquel il faut rajouter extemporanément du β-MercaptoEtOH 12,5%, puis dénaturés à 100°C pendant 5 min. Les protéines sont alors séparées sur un gel d'électrophorèse dénaturant 10% SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) (Laemmli, 1970). La migration s'effectue pendant 2 h à 130 V dans du tampon de migration (Tris base 25 mM, de la glycine 192 mM, et du SDS 0,1%). Après la migration, les protéines sont transférées sur membrane polyvinylidifluoride (Amersham) pendant 2 h à 100 mA, dans du tampon de transfert (Tris base 12 mM, glycine 96 mM, SDS 0,01%, méthanol 20%).

En parallèle des échantillons, un marqueur de poids moléculaire (SeeBlue[®] Plus2 Prestained Standard, Invitrogen) et des contrôles positifs sont aussi séparés par électrophorèse dans les mêmes conditions expérimentales. Ces contrôles positifs sont des protéines recombinantes obtenues par transcription/traduction *in vitro* réalisées à l'aide du kit « TNT Quick Master Mix » (Promega), à partir des plasmides pSGREα66, pSGREαΔ79 et pSGREα46.

Après le transfert, la membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante dans un tampon de blocage appelé BLOTTO A (TBS à pH = 8 contenant du Tris-base 10 mM, du NaCl 0,1 M, 0,05% de Tween20[®] (tampon TBS Tween) et 5% de lait écrémé en poudre) afin de saturer les sites aspécifiques.

Après avoir éliminé le tampon de blocage, la membrane est incubée une nuit sous agitation à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du tampon de blocage :

- anticorps polyclonal de lapin HC-20 anti-ER α (TEBU Bio) dilué au 1/1000^{ème} dans du BLOTTO A.

- anticorps monoclonal de souris Ac-15 anti- β -actine (Sigma) dilué au 1/5000^{ème} dans du BLOTTO A.

Après incubation, les anticorps non liés à la membrane sont éliminés par 3 lavages successifs de 5, 10 et 15 minutes avec du tampon TBS Tween. La membrane est incubée 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires appropriés, des anti-IgG (Immunoglobuline G) correspondants conjugués à la peroxydase (anti IgG de lapin ou de souris, TEBU Bio et Sigma), dilué au 1/5000^{ème} et au 1/10000^{ème} respectivement, dans du tampon de blocage.

Trois rinçages successifs de 5, 10 et 15 min avec du tampon TBS Tween, permettent d'éliminer l'excès d'anticorps secondaire. La révélation des complexes antigène-anticorps spécifiques sur la membrane se fait par une réaction de chimioluminescence en utilisant le kit « western blotting luminol reagent » (TEBU Bio) selon les recommandations du fournisseur. Les membranes sont exposées à des films (Hyperfilm ECL, Amersham) pendant des durées allant de 20 s à 1 min selon l'intensité du signal. Le poids moléculaire des bandes spécifiques ainsi révélées est déterminé grâce à la migration du marqueur de poids moléculaires connus et l'utilisation des protéines recombinantes des différents RE.

Lors de la présence de plusieurs bandes, la spécificité de celles-ci est vérifiée par des incubations avec l'anticorps secondaire en omettant l'anticorps primaire.

Les signaux sont numérisés et l'intensité relative des bandes spécifiques est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ 1.17, afin de déterminer les quantités relatives de protéines

H. Analyse de l'activité des métalloprotéases de la matrice

Les activités gélatinolytiques des MMP-2 et MMP-9 contenues dans le surnageant des cellules en culture peuvent être mesurées par zymographie. Le principe de cette analyse consiste en une séparation électrophorétique des protéines dans un gel SDS-PAGE imprégné de gélatine. Les gélatinases (MMP-2, 72 kDa et MMP-9, 96 kDa) sont mises en évidence par leur capacité à dégrader leur substrat, ce qui se traduit, après coloration de la gélatine, par des bandes blanches sur fond bleu (Kleiner et Stetler-Stevenson, 1994).

1. *La préparation des échantillons*

Pour l'évaluation des activités gélatinolytiques, le protocole est identique à celui décrit pour l'étude de la prolifération cellulaire. A savoir, pour les MCF-7, ces cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 25000 cellules/puits.

Après 24 h, le milieu de culture est remplacé par du milieu expérimental pendant 1 h, puis par du milieu expérimental sans SVF, mais avec le traitement indiqué.

Le surnageant est collecté après 24 et 72 h de traitement et le nombre de cellules dans chaque puits compté à l'aide du compteur de cellule.

Pour éliminer les débris cellulaires, le surnageant prélevé est centrifugé (200 g, 5 min, 4°C). Le culot de débris cellulaire est éliminé, puis 900 µL de ce surnageant sont repris dans un nouveau tube. Les MMP-2 et MMP-9 étant faiblement exprimées dans les cellules MCF-7, une étape de lyophilisation est effectuée pour les concentrer 10 fois et le lyophilisat est repris dans 90 µL d'H₂O.

Les lyophilisats sont mélangés à du tampon de charge 5X, en condition non réductrice (SDS 50 mg/mL, Tris-HCl 48 mg/mL, Glycérol 20%, bleu de bromophénol 30%). Le volume de lyophilisat pour chaque échantillon est normalisé par rapport au nombre de cellules par puits. Les échantillons sont alors chargés sur gel SDS-PAGE 10% contenant 10% de gélatine (zymogramme, Invitrogen, EC-6175) à raison de 35 µL par puits.

2. *L'électrophorèse et la révélation*

La migration s'effectue dans du tampon de migration (identique à celui décrit dans le paragraphe Western Blot), pendant 1h30 à 130 V. Après la migration, le gel est incubé 1 h sous agitation dans une solution de renaturation (TRITON[®]X-100 2,5%) à température ambiante, permettant d'éliminer le SDS. Le gel est ensuite rincé dans de l'eau et incubé

pendant 36 h à 37°C dans un « tampon gélatinase » constitué de Tris-HCl 50 mM, de NaCl 200 mM, de CaCl₂ 5 mM, et de Brij-30 0,065% à pH 7,5.

La coloration est effectuée par incubation du gel pendant 1 h à température ambiante dans une solution de coloration au bleu de Coomassie (Coomassie 0,5%, Sigma, dans une solution contenant un mélange de méthanol 30%, d'acide acétique 10%). Le gel est ensuite décoloré dans un tampon de décoloration (méthanol 30%, acide acétique 10%) et séché.

L'activité gélatinolytique apparaît alors comme des bandes claires de différentes intensités sur un fond coloré en bleu. La taille des bandes d'intérêt MMP-2 et MMP-9 (respectivement 72 et 96 kDa) est confirmée par la migration d'un marqueur de poids moléculaires en parallèle.

Une image du gel numérisé permet de mesurer l'intensité relative des bandes spécifiques à l'aide du logiciel ImageJ 1.17.

I. Expression des résultats et analyses statistiques

Pour l'étude de l'activation transcriptionnelle : l'activité du gène rapporteur finale induite par les molécules testées est obtenue après normalisation de l'activité luciférase par l'activité β -galactosidase. Les résultats sont alors exprimés sous forme d'histogrammes en valeur relative par rapport à la réponse obtenue dans les conditions témoins (transfections réalisées avec le plasmide vide). Toutes les conditions expérimentales sont réalisées en *triplicata* et les expérimentations ont été réalisées au minimum 8 fois.

Pour l'analyse de l'expression d'ARNm, de l'expression protéique et des activités des MMP: l'intensité relative des bandes est déterminée grâce au logiciel Image J 1.17 et les résultats sont exprimés sous forme d'histogrammes en valeur relative par rapport à la réponse obtenue dans les conditions témoins (traitement avec le milieu expérimental seul). Toutes les conditions expérimentales sont réalisées en *duplicata* et les expérimentations ont été réalisées entre 3 et 5 fois.

Pour la prolifération cellulaire : le nombre de cellules est représenté sous forme d'histogrammes, soit en valeur brute, soit en valeur relative par rapport à la réponse obtenue dans les conditions témoins (traitement avec le milieu expérimental seul). Toutes les conditions expérimentales sont réalisées en *duplicata* et les expérimentations sont réalisées un minimum de 6 fois.

Toutes les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (écart standard à la moyenne). L'analyse statistique des variations obtenues entre les valeurs des différentes conditions expérimentales a été effectuée par un « one-way ANOVA » suivi d'un post-test de Dunnett à comparaison multiple ou par un « student's t-test ». Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism®. Les différences statistiques sont respectivement indiquées par 1, 2 ou 3 symboles pour $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$.

RESULTATS

I. PREAMBULE

A. Validation des modèles d'étude

La première partie de ce travail de thèse a consisté à valider tous nos modèles d'étude.

1. Contextes cellulaires

Pour confirmer les contextes cellulaires des lignées HeLa et HepG2, nous avons mesuré, après transfections, l'activation transcriptionnelle de RE α 66 ou RE α 46 induite après 24h de traitement avec l'E₂ (**figure 32**). D'autre part, nous avons mesuré l'effet d'un agoniste partiel AF-1, le Tam, sur l'activation transcriptionnelle de RE α 66 (**figure 33**). Dans les HeLa et les HepG2, le gène rapporteur utilisé est un ERE-TK-LUC.

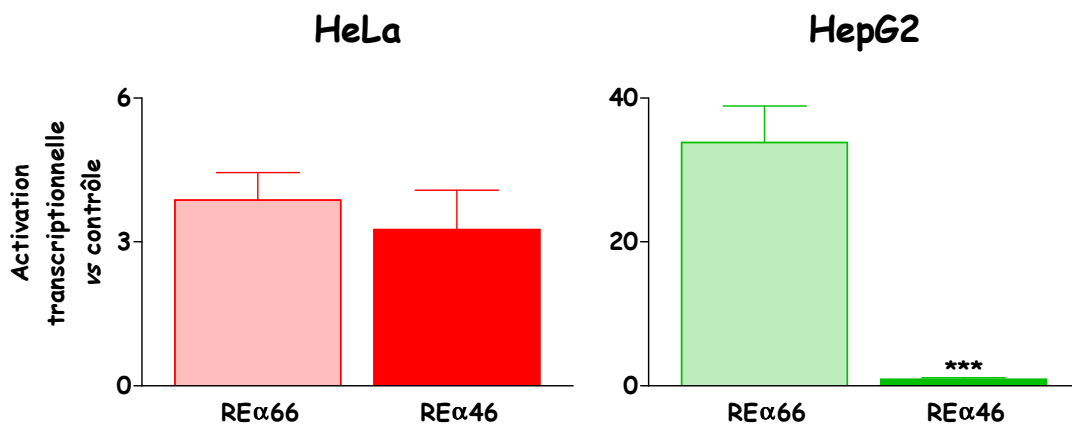


Figure 32. Effet de l'E₂ (10⁻⁸ M) sur l'activation transcriptionnelle de RE α 66 et de RE α 46 dans les lignées HeLa et HepG2

Les graphes représentent l'activation transcriptionnelle de RE α 66 et RE α 46 obtenue après 24h de traitement avec 10⁻⁸M d'E₂ par rapport à l'activation transcriptionnelle obtenue lorsque les cellules transfectées sont traitées avec une solution contrôle, qui a été normalisée à 1 et qui n'est pas représenté sur le graphe.*** (p<0,001) pour la comparaison entre RE α 66 et RE α 46

Dans les HeLa, il n'y a pas de différence entre l'activation transcriptionnelle de RE α 66 et de RE α 46 induite par l'E₂ (3,9 ± 0,6 et 3,3 ± 0,8). Au contraire, dans les HepG2, l'activation transcriptionnelle de RE α 66 est supérieure à celle de RE α 46 (25,5 ± 3,1 et 1,4 ± 0,3, p< 0,001). Ces résultats confirment les contextes des deux lignées : AF-1 pour les HepG2 et AF-2 pour les HeLa.

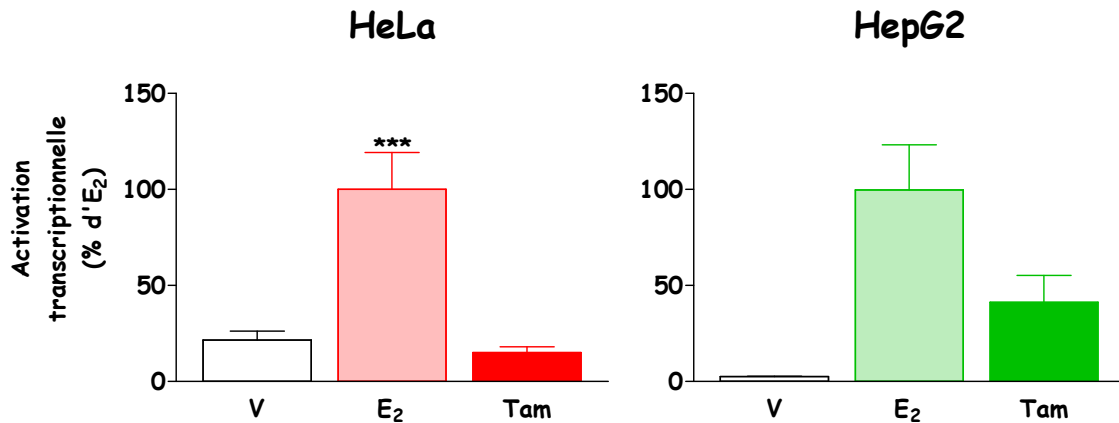


Figure 33. Effet du Tam (10^{-6} M) sur l'activation transcriptionnelle de RE α 66 dans les HeLa et les HepG2

Les graphes représentent l'activation transcriptionnelle de RE α 66 et RE α 46 obtenue après 24h de traitement avec une solution contrôle (V) ou après 24h de traitement avec 10^{-8} M d'E₂ ou 10^{-6} M de TAM. L'activation transcriptionnelle obtenue avec l'E₂ a été normalisée à 100%. *** (p<0,001) pour la comparaison entre V et E₂

Le Tam induit une activation transcriptionnelle de RE α 66 dans les HepG2, mais pas dans les HeLa, ce qui confirme bien les contextes cellulaires.

L'étude de l'activation transcriptionnelle de RE α 66 et de RE α 46 par l'E₂ a été réalisée dans les CHO (avec un ERE-TK-LUC) et les MCF-7(avec un C3-LUC) (figure 34).

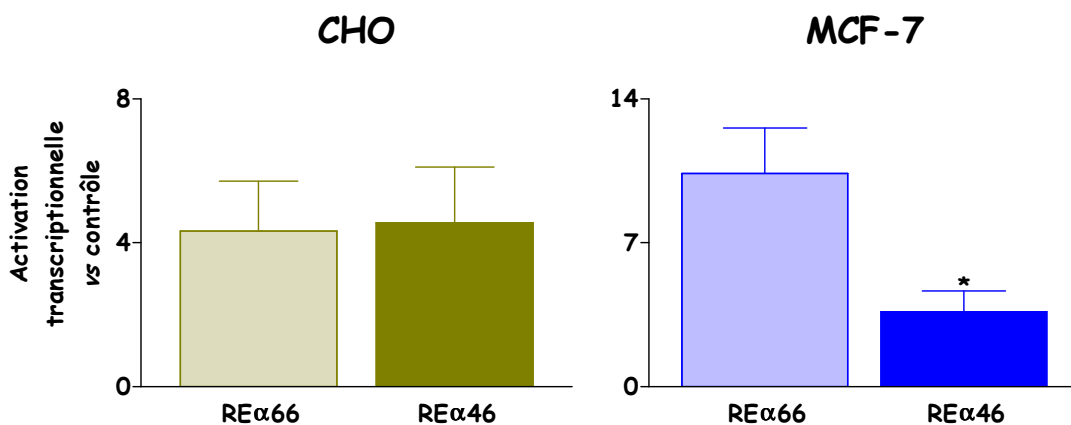


Figure 34. Effet de l'E₂ (10^{-8} M) sur l'activation transcriptionnelle de RE α 66 et de RE α 46 dans les CHO et les MCF-7

Les graphes représentent l'activation transcriptionnelle de RE α 66 et RE α 46 obtenue après 24h de traitement avec 10^{-8} M d'E₂ par rapport à celle obtenue lorsque les cellules transfectées sont traitées avec une solution contrôle, qui à été normalisée à 1 et qui n'est pas représenté sur le graphe. * (p<0,05) pour la comparaison entre RE α 66 et 46

Les deux domaines AF-1 et AF-2 sont impliqués dans l'activation transcriptionnelle de RE α induite par l'E₂ dans ces deux lignées cellulaires. Cependant, si dans les CHO l'activation est identique avec les deux RE α , dans les MCF-7 l'activation transcriptionnelle de RE α 66 est supérieure à celle de RE α 46. Ces résultats suggèrent un contexte cellulaire AF-1 préférentiel des MCF-7, confirmant ainsi les résultats publiés (Penot *et al.*, 2005).

2. Détection protéique après transfections transitoires

A la suite des transfections transitoires réalisées dans les différentes lignées, nous avons recherché la présence des RE α par Western Blot (**figure 35**). Les taux d'expression diffèrent selon les lignées cellulaires et correspondent à des efficacités de transfection différentes (de l'ordre de 80% pour les CHO et les HeLa et de 20% pour les HepG2).

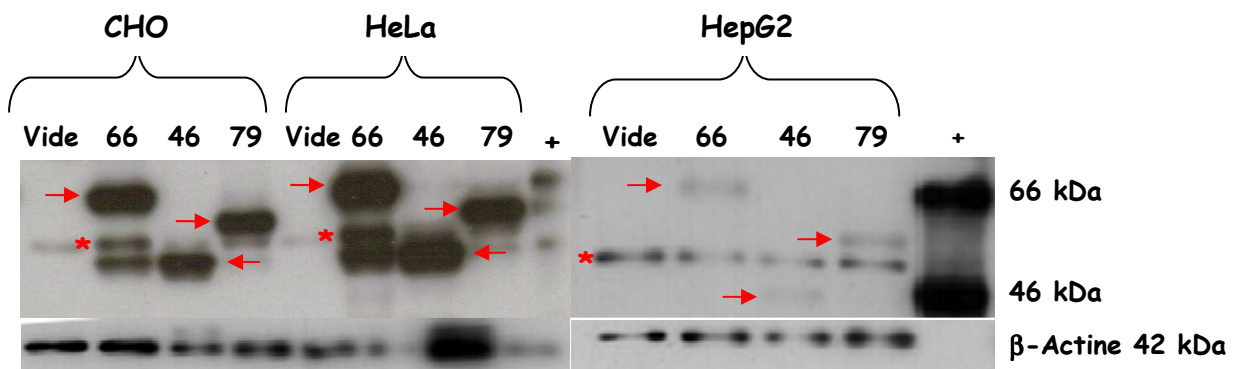


Figure 35. Western Blot des RE α après transfection transitoires et contrôles positifs (protéines recombinantes)

- * : Bandes non spécifiques
- : Bandes spécifiques
- 66 : RE α 66
- 46 : RE α 46
- 79 : RE α Δ 79

3. Effet de l'E₂ sur l'activation transcriptionnelle des RE α et RE β dans trois lignées cellulaires modèles

Pour étudier l'activation transcriptionnelle des RE par l'E₂, des transfections ont été réalisées avec les vecteurs d'expression RE α ou RE β et le vecteur rapporteur ERE-TK-LUC. Les résultats sont présentés dans la **figure 36**. L'activation obtenue dans les conditions témoins (transfection avec le plasmide pSG5) a été normalisée à 1 et n'est pas représentée sur les graphes. L'E₂ induit une activation transcriptionnelle de RE α et de RE β dans les trois lignées cellulaires utilisées et ces effets sont inhibés par l'ICI.

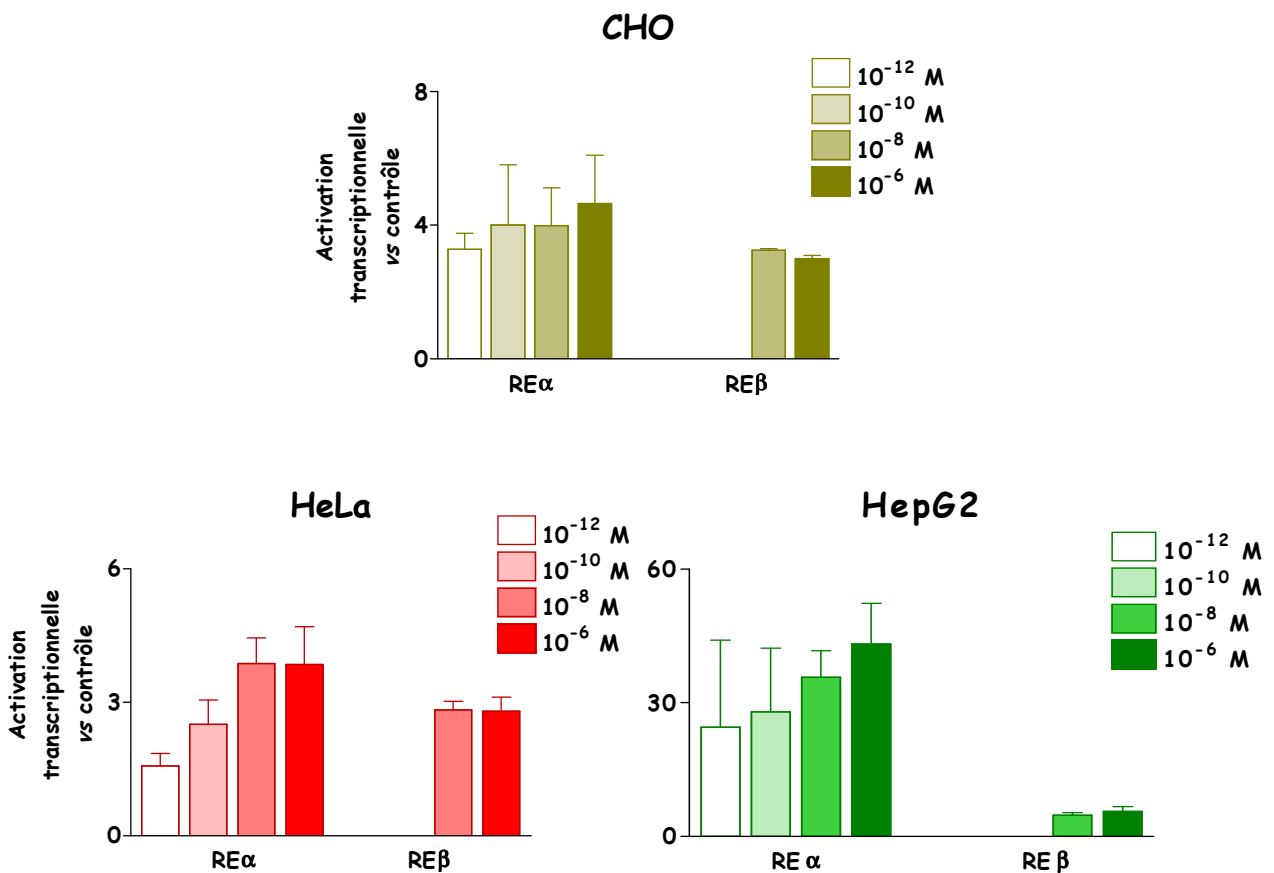


Figure 36. Effets de l'E₂ sur l'activation transcriptionnelle de RE α et de RE β dans les CHO, HeLa et HepG2

Les graphes représentent l'activité transcriptionnelle obtenue par rapport à celle obtenue lorsque les cellules transfectées sont traitées avec une solution contrôle, qui a été normalisée à 1 et qui n'est pas représentée sur le graphe

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 3 à 10 expériences de transfections indépendantes réalisées chacune en triplicata

L'activation transcriptionnelle de RE α 66 est dose dépendante dans les trois modèles ($r^2 = 0,89$ dans les CHO, $r^2 = 0,90$ dans les HeLa et $r^2 = 0,96$ dans les HepG2). L'activation transcriptionnelle maximale de RE β est obtenue pour les concentrations de 10 nM et 1 μ M. En effet, l'E₂ induit des effets similaires pour les deux doses testées dans les trois lignées cellulaires.

Pour la suite de ce travail, nous utiliserons l'E₂ à 10 nM. Cette concentration, classiquement trouvée dans la littérature et correspondant aux concentrations circulantes physiologiques d'œstrogènes, induit l'activation transcriptionnelle de RE α et de RE β .

Nous avons mesuré l'activation transcriptionnelle des RE induite par différentes sous familles de PE trouvés dans l'alimentation, afin de mieux définir les propriétés de SERM et de mieux appréhender les propriétés pro- ou anti-œstrogéniques de ces molécules. Ainsi, les PE sélectionnés appartiennent à cinq sous familles : les isoflavones (G, D et le métabolite E), les entérolignanes (ED et EL), les coumestanes (C) les stilbènes (R) et les flavanones (Nar et 8-PN).

Après avoir déterminé une dose efficace pour chaque molécule, les activations transcriptionnelles de RE α 66, RE α 46 ainsi que de RE α Δ 79, ont été mesurées pour mieux comprendre les mécanismes d'activation des RE α par les PE.

B. Effets des phyto-œstrogènes sur l'activation transcriptionnelle de RE α et de RE β

L'activation transcriptionnelle des RE induite par les PE a été mesurée en réalisant des transfections avec RE α ou avec RE β et le vecteur rapporteur ERE-TK-LUC. Les résultats obtenus sont consignés dans le **tableau 11**.

Tableau 11. Effets de différentes doses de PE sur l'activation transcriptionnelle de RE α 66 et de RE β dans les HeLa, HepG2 et CHO

Le tableau représente l'activation transcriptionnelle de RE α et de RE β obtenue après les différents traitements par rapport à celle obtenue lorsque les cellules transfectées sont traitées avec une solution contrôle, qui a été normalisée à 1

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 3 à 10 expériences de transfections indépendantes réalisées chacune en triplicata

RE α	HeLa				HepG2				CHO			
	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	r ²	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	r ²	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	r ²
G	3,6 \pm 0,7	4,8 \pm 0,9	5,4 \pm 1,3	0,97	24,5 \pm 3,3	38,8 \pm 9	48,3 \pm 5,5	0,98	3,6 \pm 0,9	4,0 \pm 0,5	6,4 \pm 1,8	0,83
D	3,8 \pm 1,2	4,1 \pm 0,6	10 \pm 2,5	0,79	19,4 \pm 2,7	30,2 \pm 7,1	47,5 \pm 4,0	0,98	3,7 \pm 0,9	5,7 \pm 1,7	9,0 \pm 2,0	0,98
E	2,9 \pm 0,6	4,3 \pm 0,9	5,5 \pm 1,2	0,99	30,4 \pm 9,5	31,5 \pm 6,6	39,0 \pm 8,0	0,85	2,9 \pm 0,5	3,4 \pm 0,4	5,4 \pm 1,4	0,90
ED	2,2 \pm 0,5	2,6 \pm 0,3	2,9 \pm 0,6	0,99	11,3 \pm 1,3	23,1 \pm 3,2	27,8 \pm 5,8	0,94	3,7 \pm 0,1	4,1 \pm 0,6	4,4 \pm 0,5	0,99
EL	1,8 \pm 0,2	2,2 \pm 0,3	3,2 \pm 0,7	0,91	7,4 \pm 0,3	12,0 \pm 2,3	19,5 \pm 1,6	0,98	3,3 \pm 0,6	3,4 \pm 1,2	3,3 \pm 0,3	
C	1,5 \pm 0,3	3,8 \pm 0,8	6,5 \pm 1,5	0,99	29,7 \pm 10	32,8 \pm 9,3	33,0 \pm 6,6	0,80	4,1 \pm 1,1	4,8 \pm 1,6	8,3 \pm 3,5	0,88
R	1,7 \pm 0,1	3,4 \pm 0,2	3,5 \pm 0,1	0,80	18,9 \pm 5,3	27 \pm 4,1	50,7 \pm 6,8	0,93	2,3 \pm 0,2	3,6 \pm 0,7	7,7 \pm 2,6	0,92
Nar	2,1 \pm 0,3	3,0 \pm 0,6	2,8 \pm 0,6	0,55	7,3 \pm 3,8	8,5 \pm 3,1	16,9 \pm 11,2	0,84				
8-PN	4,5 \pm 0,8	4,8 \pm 1	2,8 \pm 0,5	0,64	17,2 \pm 3,2	21 \pm 2,5	24,5 \pm 6,4	0,99				

RE β	HeLa				HepG2				CHO			
	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	r ²	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	r ²	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	r ²
G	2,8 \pm 0,4	3,4 \pm 0,5	4,7 \pm 0,7	0,96	2,7 \pm 0,4	6,3 \pm 1,6	7,3 \pm 1,0	0,91	3,2 \pm 0,5	3,7 \pm 0,3	3,7 \pm 1,0	0,75
D	1,8 \pm 0,3	2,3 \pm 0,4	3,7 \pm 0,5	0,94	1,5 \pm 0,3	3,2 \pm 0,8	4,5 \pm 0,6	0,99	2,1 \pm 0,4	2,8 \pm 0,4	3,3 \pm 0,4	0,99
E	2,9 \pm 0,3	3,1 \pm 0,2	4,4 \pm 0,2	0,84	2,2 \pm 0,8	4,4 \pm 0,9	5,2 \pm 1,0	0,93	3,1 \pm 0,6	3,4 \pm 0,9	3,9 \pm 1,3	0,96
ED	1,3 \pm 0,2	1,5 \pm 0,1	2,1 \pm 0,2	0,90	1,3 \pm 0,2	1,6 \pm 0,3	2,6 \pm 0,6	0,93	1,0 \pm 0,2	1,5 \pm 0,3	2,1 \pm 0,4	0,99
EL	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,4 \pm 0,2		0,9 \pm 0,5	1,1 \pm 0,3	1,2 \pm 0,3		1,0 \pm 0,1	1,1 \pm 0,3	1,3 \pm 0,3	
Nar	3,3 \pm 0,6	5,2 \pm 1,1	6,9 \pm 1,2	0,99	0,6 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2	2,6 \pm 0,5	0,83				
8-PN	6,9 \pm 2,0	7,4 \pm 1,7	5,5 \pm 1,4	0,51	1,3 \pm 0,2	3,2 \pm 1,0	4,3 \pm 1,2	0,97				

Dans les trois lignées HeLa, HepG2 et CHO, les isoflavones et l'ED activent le RE α et le RE β et ceci de manière dose dépendante. L'EL en revanche n'induit pas de façon dose dépendante le RE α dans les CHO, et n'active pas le RE β . Les coefficients de détermination

ne sont donc pas indiqués dans le **tableau 11**. La sous famille des flavanones (Nar et 8-PN) a été étudiée seulement dans les HeLa et HepG2 et un effet cloche au niveau de l'activation transcriptionnelle des RE a été observé.

Les PE induisent une activation transcriptionnelle de RE α plus importante que celle de RE β et ces effets sont inhibés par l'ICI. Les effets maximaux sont obtenus à des concentrations de 10 μ M pour les isoflavones, le coumestane, le stilbène et les entérolignanes, et de 1 μ M pour les flavanones.

C. Rôles des domaines AF-1 et AF-2 dans l'activation transcriptionnelle des RE α induite par les phyto-œstrogènes

Pour étudier l'implication des domaines AF-1 et AF-2 dans l'activation transcriptionnelle de RE α induite par les différents PE et mettre en évidence les différences possibles entre chaque sous famille de PE étudiée, trois constructions ont été utilisées : RE α 66, RE α Δ 79 (délétion de la boîte A1) et RE α 46, (délétion du domaine AF-1), avec le vecteur rapporteur ERE-TK-LUC. Cette étude a été réalisée dans les 3 lignées cellulaires. Les résultats de la lignée CHO sont regroupés dans le **tableau 12**, et ceux des lignées HeLa et HepG2 dans les **figures 37** (G, D et E), **38** (ED et EL), **39** (C et R) et **40** (Nar et 8-PN).

Tableau 12. Effets des PE sur l'activation transcriptionnelle des différentes formes de RE α dans les CHO

Les résultats représentent l'activation transcriptionnelle des RE obtenue après les différents traitements par rapport au contrôle, normalisé à 1

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 3 à 10 expériences de transfections indépendantes réalisées chacune en triplicata

CHO	REα66	RE$\alpha$$\Delta$79	REα46
E₂ (10⁻⁸ M)	4,3 \pm 1,4	5,8 \pm 0,8	4,6 \pm 1,6
G (10⁻⁵ M)	6,4 \pm 1,8	9,6 \pm 1,7	7,4 \pm 1,9
D (10⁻⁵ M)	9,0 \pm 2,0	10,2 \pm 1,9	8,6 \pm 2,1
E (10⁻⁵ M)	5,4 \pm 1,4	8,8 \pm 0,3	5,1 \pm 1,4
ED (10⁻⁵ M)	4,4 \pm 0,5	6,6 \pm 1,6	3,2 \pm 0,8
EL (10⁻⁵ M)	3,3 \pm 0,3	5,8 \pm 2,2	3,5 \pm 0,5
C (10⁻⁵ M)	8,3 \pm 3,5	9,1 \pm 1,5	4,7 \pm 0,6
R (10⁻⁵ M)	7,7 \pm 2,6	6,2 \pm 0,9	2,9 \pm 0,8

1. Les isoflavones

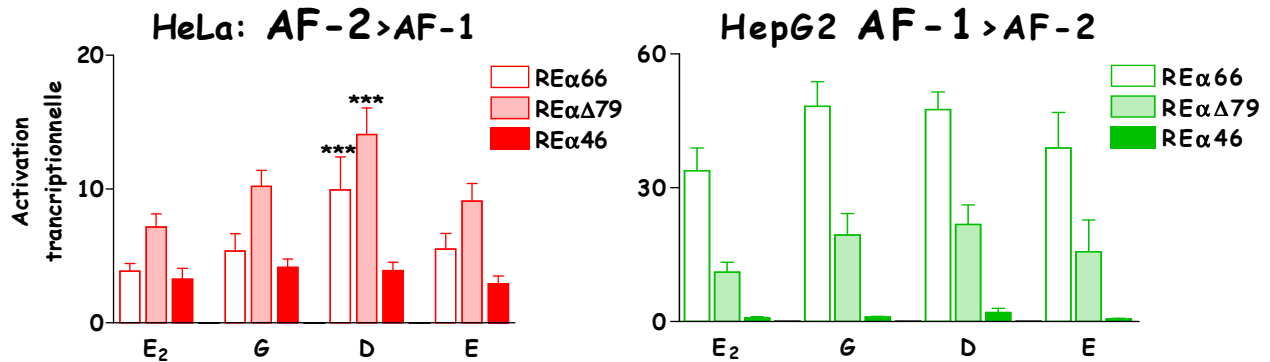


Figure 37. Effets des isoflavones sur l'activation transcriptionnelle des différentes formes de RE α dans les HeLa et les HepG2

Les graphes représentent l'activation transcriptionnelle des RE obtenue après les différents traitements par rapport à celle obtenue avec une solution contrôle, normalisée à 1

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 3 à 10 expériences de transfections indépendantes réalisées chacune en triplicata

*** ($p < 0,001$) pour la comparaison entre les PE (10^{-5} M) et l'E₂ (10^{-8} M) pour une même construction

Dans les HeLa, la G et l'E présentent le même profil d'activation que l'E₂ pour les trois constructions de RE α . La D induit une activation transcriptionnelle plus importante que l'E₂ pour le RE α 66 ($10,0 \pm 2,5$ et $3,9 \pm 0,6$ respectivement pour la D et l'E₂, $p < 0,001$) et pour le RE α Δ79 ($14,1 \pm 2,0$ et $7,2 \pm 1,0$ respectivement pour la D et l'E₂, $p < 0,001$), alors qu'elle induit une activation transcriptionnelle de RE α 46 équivalente à celle induite par l'E₂ ($3,9 \pm 0,6$ et $3,3 \pm 0,8$ respectivement). L'activation transcriptionnelle plus importante de RE α Δ79 par rapport aux autres formes par l'E₂, la G, la D et l'E signifie que la boîte A1 provoque une inhibition de l'activation transcriptionnelle induite par ces molécules.

Dans les HepG2, les trois molécules testées induisent une activation transcriptionnelle similaire à celle induite par l'E₂ pour les trois constructions de RE α . Pour toutes les molécules, l'absence de la boîte A1 induit une diminution significative de l'activation transcriptionnelle de RE α .

Dans les CHO, G, D et E ont le même profil d'activation transcriptionnelle des RE α que l'E₂ (tableau 13).

En résumé, la G et l'E ont un profil d'activation transcriptionnelle similaire à l'E₂ dans les trois contextes cellulaires. Ce sont donc des agonistes de RE α , avec le même mécanisme d'action que l'E₂ et ceci quel que soit le contexte cellulaire étudié. Au contraire, D présente un profil d'activation transcriptionnelle de RE α différent de celui de l'E₂ dans un contexte AF-2. Dans un contexte cellulaire AF-2 (« différencié »), l'implication du domaine AF-1 est privilégiée dans l'activation transcriptionnelle du RE α induite par la D. Ces résultats seront présentés dans l'article 2.

2. Les entérolignanes

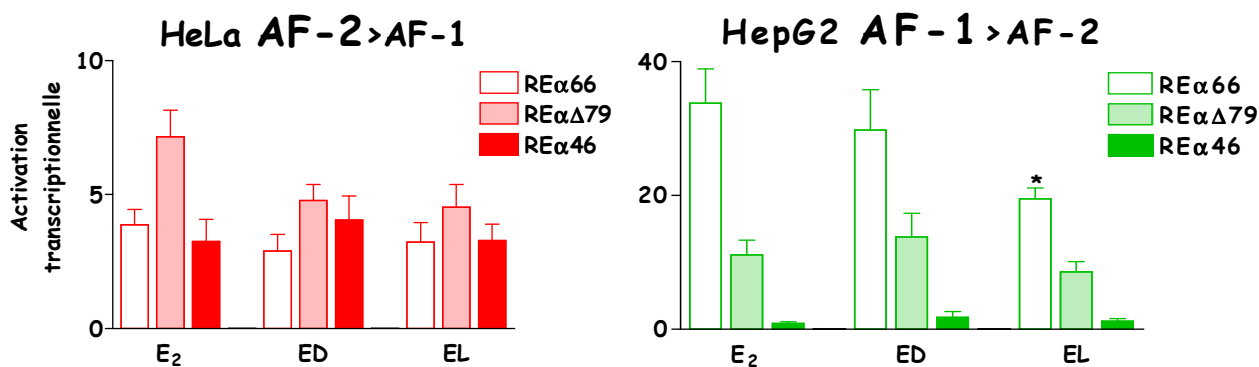


Figure 38. Effets des entérolignanes sur l'activation transcriptionnelle des différentes formes de RE α dans les HeLa et les HepG2

Les graphes représentent l'activation transcriptionnelle des RE obtenue après les différents traitements par rapport à celle obtenue avec une solution contrôle, normalisée à 1

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 3 à 10 expériences de transfections indépendantes réalisées chacune en triplicata

* ($p < 0,05$) pour la comparaison entre les PE (10^{-5} M) et l'E₂ (10^{-8} M) pour une même construction

Dans les HeLa, l'E₂, l'ED et l'EL activent de la même manière RE α 66, RE α Δ 79 et RE α 46. L'activation transcriptionnelle plus importante par l'E₂ de RE α Δ 79 que de RE α 66 et de RE α 46 n'est pas retrouvée avec l'ED et l'EL, ce qui montre, dans ce contexte cellulaire, que la boîte A1 ne joue pas un rôle important dans l'activation transcriptionnelle de RE induite par les entérolignanes.

Dans les HepG2, l'E₂ et l'ED ont induisent la même activation transcriptionnelle de REα66, mais pas l'EL, qui induit une activation transcriptionnelle moindre de REα66 (19,5 ± 1,6, p<0,05). Cette différence ne se retrouve pas avec le REαΔ79 et le REα46. La présence de la boîte A1 n'induit pas une activation transcriptionnelle de RE par l'EL aussi forte que celle induite par l'E₂ ou l'ED.

Dans les CHO, l'E₂, l'ED et l'EL ont le même profil d'activation transcriptionnelle pour les trois constructions de REα (**tableau 13**).

En résumé, pour les entérolignanes, dans les trois contextes cellulaires étudiés, l'ED et l'E₂ ont un même profil d'activation transcriptionnelle de REα. L'ED semble donc être un agoniste de l'E₂. Au contraire, l'EL induit une activation transcriptionnelle de REα plus faible que celle de l'E₂ (et donc de l'ED) dans un contexte AF-1. Cette différence ne se retrouve pas dans un contexte AF-2. Le domaine AF-1 est donc moins impliqué dans l'activation transcriptionnelle induite par l'EL que par l'ED et l'E₂. Ces résultats seront présentés dans l'article 1.

3. Le coumestrol et le resvératrol

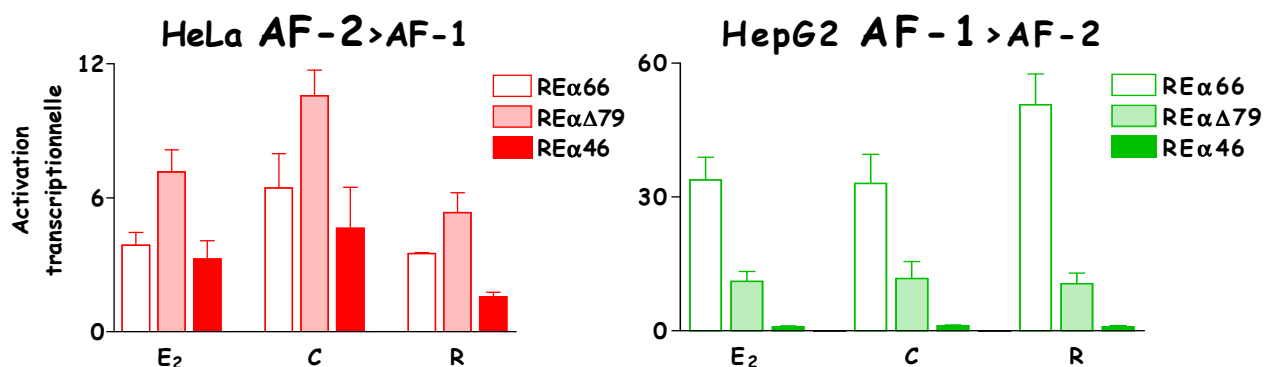


Figure 39. Effets du coumestrol et du resvératrol (10^{-5} M) sur l'activation transcriptionnelle des différentes formes de REα dans les HeLa et les HepG2

Les graphes représentent l'activation transcriptionnelle des RE obtenue après les différents traitements par rapport à celle obtenue avec une solution contrôle, normalisée à 1

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM de 3 à 10 expériences de transfections indépendantes réalisées chacune en triplicata

Dans les HeLa, les HepG2 et les CHO (**tableau 13**), C et R induisent une activation transcriptionnelle similaire à l'E₂, que ce soit pour le RE α 66, le RE α Δ 79 et le RE α 46.

En résumé, le coumestrol et le resvératrol ont le même profil d'activation transcriptionnelle de RE α que l'E₂ et ce quel que soit le contexte cellulaire. Ce sont donc des agonistes de RE α , faisant intervenir les mêmes domaines AF et vraisemblablement les mêmes mécanismes d'activation que l'E₂.

4. Les flavanones

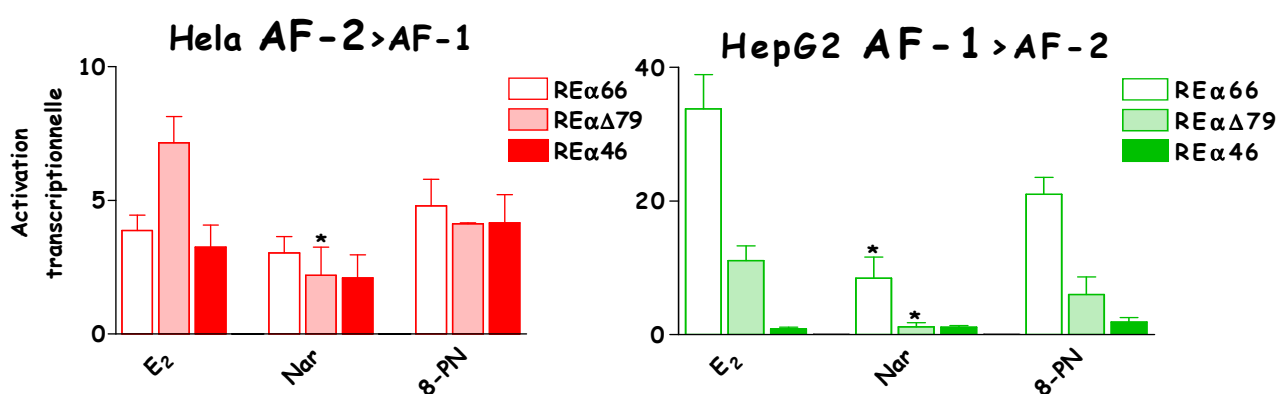


Figure 40. Effets des flavanones sur l'activation transcriptionnelle des différentes formes de RE α dans les HeLa et les HepG2

Les graphes représentent l'activation transcriptionnelle des RE obtenue après les différents traitements par rapport à celle obtenue avec une solution contrôle, normalisée à 1

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 3 à 10 expériences de transfections indépendantes réalisées chacune en triplicata

* ($p < 0,05$) pour la comparaison entre les PE (10^{-6} M) et l'E₂ (10^{-8} M) pour une même construction

Dans les HeLa, l'E₂ et la 8-PN induisent une activation transcriptionnelle similaire pour les trois constructions de RE α . En revanche, la Nar induit une activation transcriptionnelle de RE α Δ 79 plus faible que l'E₂ ($2,2 \pm 1,1$ et $7,2 \pm 1,0$ respectivement pour la Nar et l'E₂, $p < 0,05$), alors qu'elle est similaire pour RE α 66 et pour RE α 46. Contrairement à l'E₂, l'absence de la boîte A1 ne modifie pas l'activation transcriptionnelle de RE α induite par les flavanones dans ce contexte cellulaire.

De même, dans les HepG2, l'activation transcriptionnelle induite par l'E₂ et la 8-PN est similaire pour les trois constructions de RE α . En revanche, la Nar induit une activation transcriptionnelle plus faible de RE α 66 ($8,5 \pm 3,1$, $p < 0,05$) et n'induit pas l'activation transcriptionnelle de RE α Δ 79 ($1,2 \pm 0,6$, $p < 0,05$). L'absence de la boîte A1 inhibe l'activation transcriptionnelle de RE α induite par la Nar dans ce contexte cellulaire.

En résumé, pour les flavanones, la 8-PN et l'E₂ ont un profil d'activation transcriptionnelle de RE α similaire, ce qui suggère que la 8-PN est un agoniste de l'E₂. La Nar a un profil d'activation transcriptionnelle différent du ligand endogène. En effet, cette activation transcriptionnelle est plus faible que celle de l'E₂ et ne nécessite pas les mêmes domaines et boîtes d'activation. Ces résultats seront présentés dans la quatrième partie de ce manuscrit.

D. Conclusion

Cette étude de criblage a permis de mieux définir les capacités d'activation transcriptionnelle du RE α par différents PE issus de l'alimentation et ce dans différents contextes cellulaires.

Ce travail préliminaire a tout d'abord permis de déterminer les concentrations actives des PE de 1 et 10 μ M. Dans ces conditions expérimentales, il apparaît que les PE testés induisent plus fortement le RE α que le RE β .

De plus, ce travail de criblage nous a permis de réaliser une sélection des PE qui semblent les plus pertinents avant de poursuivre l'étude plus approfondie des effets de ces molécules et de leurs mécanismes d'action.

En effet, différents mécanismes d'activation transcriptionnelle de RE α par les PE ont été mis en évidence, notamment en ce qui concerne le rôle et l'implication des deux domaines de transactivation AF-1 et AF-2. Pour chaque sous famille de PE, une molécule montre un profil d'activation transcriptionnelle différent de celui de l'E₂ : la D pour les isoflavones, l'EL pour les entérolignanes et la Nar pour les flavanones. Par ailleurs, quel que soit le contexte cellulaire, C et R présentent des mécanismes d'activation transcriptionnelle de RE α similaire à l'E₂. De ce fait, les études avec ces composés ont été abandonnées. La suite de ce travail s'est donc focalisée sur la D, l'EL et la Nar.

II. LES ENTEROLIGNANES, ARTICLE 1

A. Contexte de l'étude

Les PE se lient aux RE et agissent soit comme des agonistes, soit comme des antagonistes des œstrogènes. Cependant, les mécanismes par lesquels ils peuvent interférer dans les voies de signalisation de l'E₂ sont encore mal connus.

Le RE α et le RE β possèdent deux fonctions, AF-1 et AF-2, contribuant à leur activité transactivatrice, en agissant de manière indépendante ou en synergie selon le modèle cellulaire et le gène cible concerné. L'activation transcriptionnelle des RE sur des séquences cibles est modifiée par de nombreux facteurs tels que le ligand auquel le récepteur est complexé ou encore le modèle cellulaire étudié.

L'E₂ est impliqué dans l'initiation et la promotion du cancer du sein, première cause de mortalité par tumeur maligne chez la femme. Le taux de cancer du sein diffère de façon importante entre les diverses populations du monde, les pays occidentaux industrialisés étant plus touchés que les pays asiatiques. Le style de vie, en particulier les habitudes alimentaires, semble donc jouer un rôle essentiel dans la prévalence des cancers du sein.

Ce premier travail s'intéresse à une classe particulière de PE, les entérolignanes. L'effet de deux entérolignanes, l'ED et l'EL, a été étudié sur l'activation du RE, dans une lignée humaine de cancer du sein, les cellules MCF-7. Plus précisément, nous avons étudié leur capacité à induire une activation transcriptionnelle de RE α et RE β , l'implication des domaines de transactivation AF et des boîtes d'activation dans cette activation, leurs effets sur la régulation de la transcription/traduction de gènes cibles de l'E₂ et sur la prolifération des cellules MCF-7 et enfin leur capacité à contrôler la migration cellulaire en modifiant l'activité des MMP-2 et MMP-9.

Le but de cette étude a été de mieux définir les propriétés pro- ou anti-œstrogéniques des entérolignanes, afin d'envisager ces molécules comme des SERM, candidats potentiels alternatifs au THS.

L'hypothèse de départ de cette étude est que l'EL et/ou l'ED possèderaient un mécanisme d'activation moléculaire des RE différent de celui de l'E₂.

L'ED et l'EL, de structure chimique proche, ont des propriétés d'activation de RE ainsi que des propriétés œstrogéniques différentes du ligand endogène, l'E₂, dans les cellules MCF-7.

L'ED et l'EL, administrés à une concentration de 10 µM, sont capables d'activer le REα, alors que seul l'ED est capable d'activer le REβ. L'activation transcriptionnelle de REα est plus forte que celle de REβ et ne requiert pas les mêmes mécanismes d'activation : l'ED agit préférentiellement sur le domaine AF-1 tandis que l'EL privilégie le domaine AF-2.

Contrairement à l'EL, l'ED régule l'expression du REα de la même façon que l'E₂, que ce soit au niveau de l'ARNm ou de la protéine. De plus, seul l'ED régule l'expression des ARNm de gènes œstrogéno-dépendants (PR et pS2) comme l'E₂.

Les deux molécules agissent différemment au niveau de la prolifération cellulaire : tandis que l'ED a un effet prolifératif équivalent à celui de l'E₂, l'EL n'induit pas de prolifération des cellules MCF-7.

Enfin, l'étude de l'activité des MMP montre que l'ED, mais pas l'EL, présente des effets œstrogéniques sur l'activité des MMP-9.

Tous ces résultats prouvent donc un effet œstrogénique de l'ED, alors que l'EL, même s'il induit faiblement l'activation transcriptionnelle de REα, n'a pas d'effet œstrogénique sur les différents paramètres étudiés.

Ce travail fait le lien entre le caractère agoniste de l'ED et sa capacité à induire une activation transcriptionnelle de REα par le domaine AF-1. Ce domaine AF-1 semble donc être lié avec le caractère agoniste pur d'une molécule.

Au contraire l'EL, mobilisant préférentiellement le domaine AF-2 pour induire une activation transcriptionnelle de REα, ne montre pas de propriétés pro-œstrogéniques.

Ces résultats sont rédigés sous forme de publication soumise au journal : « The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology » et acceptée le 31 Mars 2008.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb

Enterodiol and enterolactone, two major diet-derived polyphenol metabolites have different impact on ER α transcriptional activation in human breast cancer cells

Charlotte Carreau^a, Gilles Flouriot^b, Catherine Bennetau-Pelissero^a, Mylène Potier^{a,*}^a Université de Bordeaux, Unité Micronutriments Reproduction Santé ENITA de Bordeaux, 1 Cours du Général de Gaulle, CS 40201, 33175 Gradignan Cedex, France^b Equipe "Récepteur des œstrogènes et destinée cellulaire"-UMR CNRS 6026, 35042 Rennes Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2007

Received in revised form 22 February 2008

Accepted 28 March 2008

Keywords:

ER α

Transactivation

Enterolignans

Breast cancer

ABSTRACT

Lignans are plant compounds metabolized in the mammalian gut to produce the estrogenic enterolignans, enterodiol (ED) and enterolactone (EL). Because estrogens have been linked to breast cancer etiology, enterolignans could affect breast cancer risk, but to our knowledge, the mechanisms by which they exert their estrogenic and/or anti-estrogenic effects in humans are still unclear. To better understand how estrogenic compounds from the food, such as the enterolignans, might influence breast cancer progression and their mechanisms to interfere with human estrogen receptor (ER) signalling in hormone-dependant diseases, we examined and compared the ability of ED, EL and 17 β -estradiol (E2) to induce the transactivation of ER α and ER β , to modulate ER α target genes, to exert either growth stimulatory or anti-proliferative effects and finally to modulate MCF-7 cell migration by acting on matrix metalloproteases (MMP)-2 and -9, at concentrations that are achievable through a lignan-rich diet. This study indicates that enterolignans show distinct properties for transactivation of ER α and ER β . ED, as E2, induces ER α transcriptional activation through transactivation functions AF-1 and AF-2, while EL is less efficient in inducing AF-1, acting predominantly through AF-2. Furthermore, ED and EL modulate ER α mRNA and protein contents as well as MCF-7 cell proliferation and secreted MMP activities in a different way. Enterolignans are compounds of wide interest nowadays and our results help to unveil their mechanisms of action on ER, emphasizing the fact that the dietary load in lignans could be of importance in the balance between being risk or chemopreventive factors for breast cancer and women's health.

© 2008 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Breast cancer is the most common malignancy in women in North America, where every year about 200,000 new cases are diagnosed and 50,000 women die from the disease. Sex steroids play a dominant role in breast carcinogenesis by still largely unknown mechanisms. 17 β -Estradiol (E2) has been implicated in both the initiation and the promotion of breast cancer. However, the rate of breast cancer differs strikingly between various populations of the world, with the highest incidence in countries with a Western lifestyle [1]. Studies of migrant populations indicate that this

difference is largely attributable to lifestyle factors, such as a diet containing large amounts of phytoestrogens rather than genetics [1–3]. The main class of phytoestrogens in the Western diet is lignans, which are present in most plant food, with flaxseed being one of the richest sources [4]. Flaxseed contains the main precursor of enterolignan, secoisolariciresinol diglycoside, which is converted into the two major mammalian lignans enterodiol (ED) and enterolactone (EL) by the colonic bacteria ([5] and for review [6]).

Dietary phytoestrogens have been studied as potential compounds in breast cancer prevention and treatment. Several clinical studies (prospective cohort and case–control studies) have investigated the relationship between plant lignan intake and circulating or excreted levels of mammalian lignans and breast cancer risk in pre- or post-menopausal women (reviewed in [7]).

At present, it is not clear whether high intakes of plant lignans or high circulating levels of enterolignans offer significant protective effects against breast cancer. Moreover, cumulative exposure to estrogens may be a risk factor for breast cancer, and the mechanisms by which mammalian lignans may act on the disease remain today poorly understood [3,8,9].

Abbreviations: ED, enterodiol; EL, enterolactone; ER, estrogen receptor; MMP, matrix metalloproteases; V, vehicle; E2, 17 β -estradiol; Tam, tamoxifen; ICI, ICI 182,780; DMEM, Dubelcco's modified Eagle's medium; FCS, fetal calf serum; RT, reverse transcription; PCR, polymerase chain reaction; LBD, ligand binding domain; PR, progesterone receptor; pS2, trefoil factor 1, TFF1; AF, transactivation function; ECM, extracellular matrix.

* Corresponding author. Tel.: +33 5 57 35 59 95; fax: +33 5 57 35 07 39.

E-mail address: m-potier@enitab.fr (M. Potier).

49 Although human studies have been performed with lignan-rich
50 flaxseed diets, the purified enterolignans (ED and EL) have yet to be
51 studied alone or in combination with E2 with regard to their effects
52 on breast cancer.

53 Mammalian lignans have been hypothesized to modulate
54 hormone-related cancers because of their structural similarities
55 to estrogens. However, these compounds have biological activities
56 that may or may not be related to their interactions with estrogen
57 receptors (ER). Their anti-proliferative or anti-angiogenic proper-
58 ties have been referred to as being responsible for the anti-cancer
59 effects of lignans both *in vivo* and *in vitro* in several different cell
60 lines [8,10,11]. To explain their effects on breast cancer cell line
61 (MCF-7) proliferation [12-14], their ability to bind weakly to ER
62 and act as partial estrogen agonists or antagonists [15] have been
63 proposed. But, at present, the extent to which enterolignans exert
64 weak estrogenic and/or anti-estrogenic effects in humans is not
65 well understood and particularly their mechanisms of action on
66 the ER.

67 The effects of E2 and related compounds are mediated by two
68 members of the nuclear receptor superfamily, the ER α and β (NR
69 3A1 and NR 3A2, respectively) [16]. Upon ligand binding, they
70 undergo a conformational change allowing chromatin interaction
71 and the regulation of the transcription of target genes [17]. ER α has
72 a critical role in the control of the balance between cell proliferation
73 and differentiation, and its expression is therefore intimately asso-
74 ciated with the biology of breast cancers. Estrogens stimulate the
75 proliferation of many breast tumor cells, which has led to the use of
76 anti-estrogens such as tamoxifen (Tam) for endocrine therapy [18].
77 Therefore, estrogenic compounds from food, such as enterolignans,
78 might influence breast cancer progression.

79 To provide evidence for this hypothesis we have used the
80 estrogen-dependent human breast cancer cell line MCF-7 and for
81 the first time the ER-negative HeLa and HepG2 cell lines as model
82 systems to investigate the mechanisms of action of ED and EL. We
83 first described the ability of the enterolignans ED and EL (1) to
84 induce the transactivation of human ER α and ER β , (2) to modulate
85 human ER α mRNA and protein levels, as well as other ER α target
86 genes (3) to exert either growth stimulatory or anti-proliferative
87 effects and (4) to exert either stimulatory or inhibitory effects on
88 MCF-7 cell migration effectors such as matrix metalloproteases
89 (MMP)-2 and -9, at concentrations that are achievable with a
90 lignan-rich diet and/or lignan-based food supplements.

91 2. Materials and methods

92 2.1. Reagents

93 E2 and Tam were purchased from Sigma (France). ICI 182,780,
94 (ICI) was from Tocris (United Kingdom). ED and EL were obtained by
95 chemical synthesis by Dr. S. Shinkaruk at the Laboratoire de Chimie
96 Organique et Organométallique (Institut des Sciences Moléculaires
97 ISM, UMR 5255, CNRS, France).

98 2.2. Plasmids

99 pSG5, pSG human (h)ER α 66 (HEO), pSG ER α 46 and pCMV-
100 β galactosidase have been previously described [19]. Plasmids
101 pSG ER α Δ 79 and pSGER α Δ 79 S118A were produced from pSG
102 hER α 66 and pSG hER α 66 S118A (HE457), respectively [20]. Expres-
103 sion vector for human (h)ER β (pSG5 ER β) was provided by Pr. J.A.
104 Gustafsson's department (Dpt. Biosciences and Medical nutrition,
105 Karolinska Institute, Sweden). Two luciferase reporter plasmids
106 with different estrogen-sensitive promoters were employed in the
107 transfection experiments: an artificial promoter containing one ERE
108 upstream of the TK promoter ERE-TK-LUC [19,21], the promoter of
the human complement (hC3-LUC) [22].

2.3. Cell culture

109 All cell lines (HeLa, HepG2, CHO and MCF7) were routinely
110 maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
111 (Sigma, France), supplemented with 5% fetal calf serum (FCS,
112 Sigma, France), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml)
113 (Invitrogen, France) at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. For experi-
114 mental conditions, phenol red free medium DMEM/F12 (Invitrogen,
115 France) supplemented with 2.5% charcoal-stripped FCS was used
116 (experimental medium).
117

2.4. Cell proliferation

118 MCF-7 cells (25,000 per well) were seeded in a 24-well plate in
119 DMEM supplemented with 5% FCS. After 24 h, medium was changed
120 to experimental medium supplemented or not with FCS and with
121 the indicated treatment for 5 days. Cell number was determined at
122 day 1, 3 and 5 with a Coulter cell counter (Beckman Coulter, France).
123

2.5. Transient transfection experiments

124 Cell lines were transfected with FuGENE™ 6 as recommended
125 by the manufacturer (Roche Diagnostics, France). One day before
126 transfection, cells were plated in 96-well plates or 6-well plates
127 at a density previously determined as giving the best transfection
128 efficiency. One hour prior to transfection, the medium was
129 replaced with experimental medium. Transfection was carried out
130 with 50 ng of total DNA per well for the 96-well plates or with 1 μ g
131 of total DNA for the 6-well plates. Total DNA was composed of the
132 expression vector (10 ng for the 96-well plates or 200 ng for the
133 6-well plates), the reporter gene (20 or 400 ng, respectively) and
134 the pCMV- β galactosidase internal control (20 or 400 ng, respec-
135 tively). Following an overnight incubation with the transfection
136 mixture, the cells were treated with different concentrations of E2
137 and enterolignans (ED and EL, 10 nM to 1 μ M), 1 μ M Tam, 1 μ M
138 ICI or 0.1% ethanol (vehicle) or combination of these compounds
139 as indicated. After 36 h of transient transfection, cells were har-
140 vested and luciferase and β -galactosidase assays were performed
141 as previously described [22,23]. The reporter gene activity was
142 obtained after normalization of the luciferase activity with the β -
143 galactosidase activity.
144

2.6. Isolation of mRNA and RT-PCR

145 Total RNA was extracted from confluent cell layers using
146 the guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method (Tri-
147 Reagent®, Euromedex, France). RT was performed on 2 μ g of total
148 RNA. PCR amplifications of human ER α , ER β , progesterone receptor
149 (PR), pS2 (trefoil factor 1, TFF1), and β -actin as the housekeeping
150 gene, were performed as published [23,24]. The specificity of each
151 reaction was monitored in control reactions, where amplifications
152 were carried out on samples after omission of RT. Densitometry
153 analysis was performed using ImageJ 1.17 (National Institutes of
154 Health (NIH), USA), PCR data obtained were normalized to β -actin
155 signals.
156

2.7. Western blot

157 The expression of ER α and β -actin were examined by West-
158 ern blot as previously published [23]. Briefly, subconfluent cells
159 were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and lysed with
160 lysis buffer containing a mixture of proteases inhibitors. Following
161 quantification, 20 μ g of these whole cell extracts were denatured
162 in Laemmli Buffer at 95 °C for 5 min, resolved on a 10% SDS-PAGE
163 and electrotransferred onto nitrocellulose membranes (GE Health-
164 Care, Sweden). The membranes were blocked in Tris-buffered saline
165

(TBS) containing 0.05% Tween 20 and 5% non-fat milk powder, during 1 h at room temperature. Blots were then incubated with the polyclonal anti-ER α (HC-20, 1:1000, Tebu-bio, France) and the monoclonal anti- β -actin AC-15 (1:5000, Sigma, France) in TBS containing 0.05% Tween 20 and 5% non-fat milk powder for 18 h at 4 °C. After 3 washings with TBS, 0.05% Tween 20 at room temperature, blots were incubated with appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h. Membrane-bound secondary antibodies were detected using chemiluminescence solution followed by exposure to a Hyperfilm ECL film (GE HealthCare, Sweden). Densitometry analysis was performed using ImageJ 1.17 (NIH, USA), to determine relative amounts of protein.

2.8. Gelatin zymography

MCF-7 cells (25,000 per well) were seeded in 24-well plates in DMEM supplemented with 5% FCS. After 24 h, medium was changed to experimental medium with the indicated treatment for 24 and 72 h. At the time of medium collection, the cells were counted for the purpose of adjusting the volume of the medium to the cell number with a Coulter cell counter (Beckman Coulter, France). Supernatants were collected, centrifuged at 1500 \times g for 10 min and supernatants were concentrated 10 times by lyophilisation. MMP activity was assessed using 10% zymogram gels (Invitrogen, France) [23]. Briefly, the medium was diluted to normalize for cell number before the addition of 5 \times Laemmli buffer under nonreducing conditions. After electrophoresis, gels were washed for 1 h in 2.5% Triton X-100 and incubated 18 h in 50 mM Tris buffer allowing determination of total proteolytic MMP activities. Gels were stained with Coomassie Blue and air-dried. Densitometry analysis was performed using ImageJ 1.17 (NIH, USA), to determine relative MMP activity.

2.9. Statistical analysis

Shown are the means \pm S.E.M. of 3–5 independent experiments, each performed in triplicate (transfections) or duplicate. One-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison *post hoc* test or Student's *t*-test were performed for the statistical analysis between experimental conditions (GraphPad Prism[®], USA). Dose-dependant effects were assessed by linear regression (GraphPad Prism[®], USA). Statistical significance is indicated by 1, 2, and 3 symbols for $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

3. Results

3.1. Transcriptional activation of ERs by ED and EL in MCF-7

In MCF-7 cells, the mammalian lignan ED (10 nM to 10 μ M) induces ER α and ER β transactivation activities on the hC3-LUC reporter gene in a dose-dependant fashion as calculated by linear regression ($R^2 = 0.84$ and 0.99 , respectively). The lowest concentrations tested of ED (10 and 100 nM) do not induce a significant increase in transcriptional activity for both ER ($p > 0.05$ vs. vehicle-treated cells). For ER α , a significant increase in transcriptional activity is obtained with 1 and 10 μ M (5.9 ± 1.6 and 6.3 ± 1.6 fold increase compared to control, i.e. vehicle-treated cells, $p < 0.05$, respectively), while for ER β , only the highest concentration, 10 μ M, induces a significant increase (1.5 ± 0.2 fold increase compared to control, $p < 0.05$).

In a similar manner, 10 nM to 10 μ M of EL induces ER α transcriptional activity in a dose-dependant fashion ($R^2 = 0.95$) with a significant effect obtained for 1 and 10 μ M (3.3 ± 0.4 and 4.1 ± 0.5 fold increase compared to control, $p < 0.05$, respectively). There is no significant increase in ER α transcriptional activity with 10 and

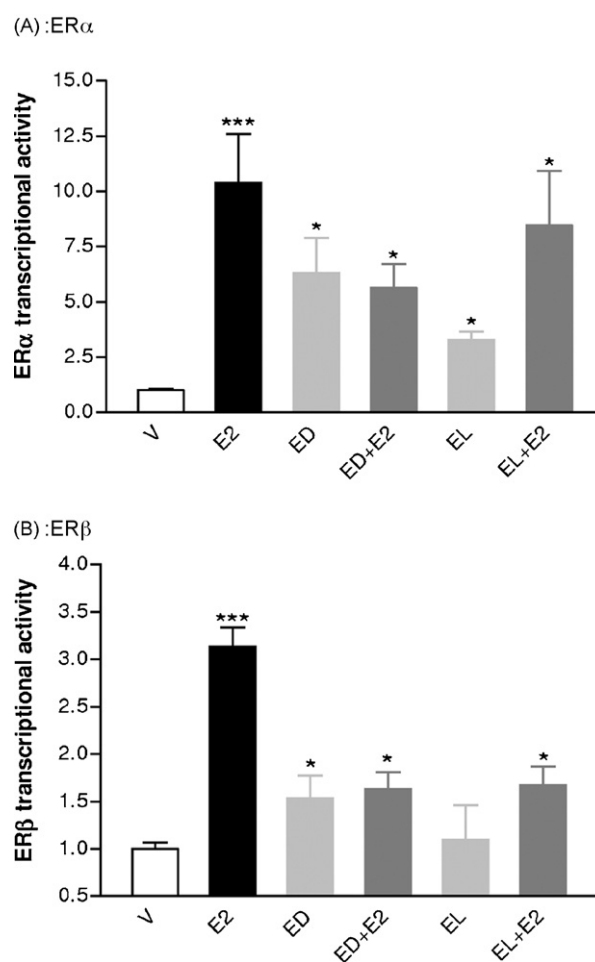


Fig. 1. Effects of enterolignans on ER transcriptional activity in MCF-7. Effects of V (EtOH, 0.1%), E2 (10 nM), ED and EL (10 μ M) or the combinations (E2 + ED and E2 + EL) on ER transcriptional activities. Cells were cotransfected with ER α (A) or ER β (B) and the hC3-LUC. Data are expressed as reporter fold induction compared to control (V-treated cells). Shown are means \pm S.E.M. of 3–5 independent experiments, each performed in triplicate wells. Comparisons between experimental conditions were performed by a one-way ANOVA followed by Dunnett's test. Statistical significance is indicated by *** and * ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively) compared to control.

100 nM of EL ($p > 0.05$ vs. vehicle-treated cells). EL (10 nM to 10 μ M) has no effect on ER β transcriptional activity.

Fig. 1 shows the effects of 10 nM E2 and of 10 μ M of ED or EL on ER α (Fig. 1A) and ER β (Fig. 1B) transcriptional activities compared to control, i.e. vehicle-treated cells. As shown in Fig. 1A, ED and EL induce a significant, but lower ER α transcriptional activation than E2 (61.0 and 31.5% of E2 response, respectively). E2, ED and EL effects are completely abolished by treatment with 1 μ M ICI (data not shown).

At similar concentrations, the ER β -induced transactivation activity by E2, ED and EL in MCF-7 cells is overall lower than the one of ER α (Fig. 1B). ED, but not EL, induces a significant, but lower ER β transcriptional activity than E2 (48.8% of E2 response). E2 and ED effects are completely abolished by ICI (data not shown).

We have also tested the effects of ED and EL in presence of E2 on ER transcriptional activities. Even though ED seems to inhibit E2-induced ER α transcriptional activation (54% of E2 response), this effect does not reach statistical significance ($p = 0.11$ vs. E2), therefore ED and EL have neither stimulatory nor inhibitory effects on the E2-induced ER α transcriptional activation (Fig. 1A). In contrast, as shown in Fig. 1B, both ED and EL inhibit the E2-induced ER β transcriptional activation (52 and 53% of E2 response respectively, $p < 0.001$).

3.2. Involvement of AF in transcriptional activation of ER α by ED and EL in MCF-7

ER α is a ligand-inducible transcription factor that belongs to the nuclear receptor family. The full-length ER α contains 2 major transactivation functions (AF), one located in the A/B domain (AF-1) and the other in the C-terminal part of the ligand binding domain (LBD) (AF-2, domain E) (Fig. 2A). Constitutively active when isolated, AF-1 has been subdivided into three regions: box 1 (amino acids 38–64), box 2 (amino acids 87–108) and box 3 (amino acids 108–129), which correspond to sequences surrounding the main phosphorylated serine residue at position 118 [20]. Box 1 is critical for recruitment of p160 co-activator, such as SRC-1 (steroid receptor co-activator protein 1) (Fig. 1A in [22]). It is well known that the respective contributions that AF-1 and AF-2 make towards the activity of the full-length ER α 66 is both promoter and cell specific, and more recently it has been shown to vary in a cell differentiation stage dependent manner [21]. Several data have emphasized the importance of the A/B domain (AF-1) in the cellular and physiological functions of ER α . Therefore, it is of interest to investigate the specific mechanisms involved in enterolignans induced ER α transcription. To provide evidence that micromolar concentrations of ED and EL transactivate ER α directly and to examine the role of the

different AF of the ER α , we used expression vectors of full-length ER α (ER α 66) or truncated ER α in the A/B domain (ER α Δ 79, ER α 46, Fig. 2A). ER α Δ 79 construct is deleted from the 79 first amino acids and therefore from box 1. ER α 46 is deleted from the A/B domains therefore from the entire AF-1 (box 1 and box 2/3). Thus, a similar activity of the three receptors is inherent to a strict AF-2 activity, whereas higher transcriptional activity of ER α 66 or ER α 66 and ER α Δ 79 defines a box 1 or box 2/3 activity, respectively.

Fig. 2B and C shows the effects of E2 (10 nM), ED and EL (10 μ M) on the transactivation activity of ER α wild-type and variant forms in MCF-7 cells. As shown in Fig. 2B, E2, ED and EL increase the full-length ER α 66 transcriptional activity (10.4 \pm 2.2, 6.3 \pm 1.6 and 3.3 \pm 0.4 fold increase, respectively). E2 and ED induce transcriptional activation of ER α Δ 79 (9.6 \pm 0.6 and 4.1 \pm 0.6 fold increase, respectively) to a similar extent to the full-length ER α 66. In contrast, EL induces a weaker transcriptional activation of ER α Δ 79 than ER α 66 (1.3 \pm 0.3 vs. 3.3 \pm 0.4, p < 0.01). ED and EL have no effect on E2-induced transcriptional activation of ER α Δ 79 and ICI completely blocks E2 and ED effects (data not shown). Most importantly, E2, ED and EL induced transcriptional activation is significantly weaker when cells are transfected with the truncated form ER α 46 (3.6 \pm 1.0, 2.5 \pm 0.5 and 2.0 \pm 0.4 fold increase, respectively). ED and EL have no effect on E2-induced transcriptional activation of ER α 46,

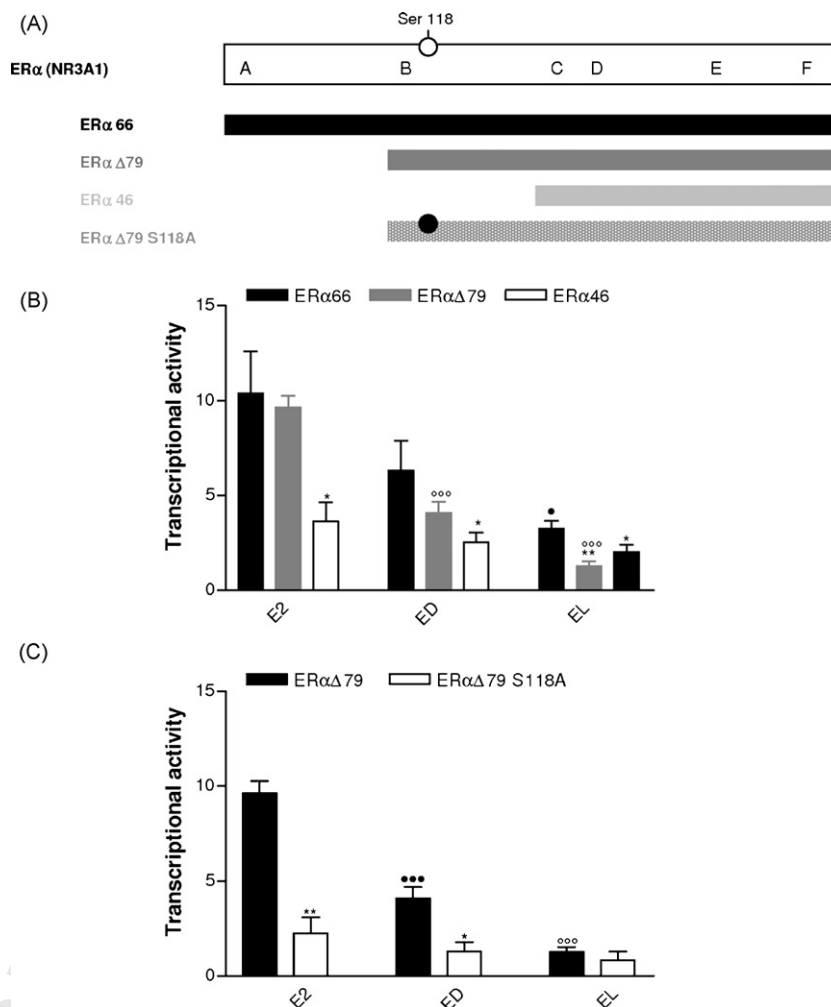


Fig. 2. Mechanisms of transcriptional activation of ER α by enterolignans in MCF-7. (A) Schematic organization of the ER constructs used in these experiments. (B and C) Effects of V (EtOH, 0.1%), E2 (10 nM), ED and EL (10 μ M) on the transcriptional activity of ER α constructs. Transcriptional activity was determined using hC3-LUC. Data are expressed as reporter fold induction compared to control (V-treated cells). Shown are means \pm S.E.M. of 3–5 independent experiments, each performed in triplicate wells. Comparisons between experimental conditions were performed by a one-way ANOVA followed by Dunnett's test and/or a student's t -test when applicable. Statistical significance is indicated * for comparison to ER α 66-transfected cells for a same compound, while other symbols (● or ○) were used for comparison to E2-treated cells for a same ER α construct. One, 2 or 3 symbols were used to express significance for p < 0.05, p < 0.01 and p < 0.001, respectively.

while 1 μ M ICI completely abolishes E2, ED and EL effects on both ER α forms (data not shown).

In MCF-7 cells, ED as for E2-induced ER α transcriptional activation is mainly mediated through AF1 (box 2/3) and to a lesser extent through AF-2. In contrast, EL-induced ER α transcriptional activation seems to be mediated strictly through the AF-2 domain. Therefore, E2, ED and EL do not have the same impact on ER α transcriptional activity, i.e. E2 and ED to a lesser extent, but not EL, induce the transactivation activity of AF-1 box 2/3. These results had led us to investigate more precisely the mechanisms of action of ED and EL in inducing ER α transcriptional activity.

3.3. Role of serine 118 in transcriptional activation of ER α by ED and EL in MCF-7

It is well known that ER α serine 118 (Ser 118) phosphorylation modulates box 2/3 activity of AF-1 function. To further investigate the mechanisms of action of mammalian lignans to induce ER α

transcriptional activity, cells were transfected with another construct ER α Δ 79S118A, deleted from the 79 first amino acids and with the Ser 118 replaced by an Ala. Results are shown in Fig. 2C. Replacement of Ser 118 inhibits the ER α Δ 79 induced transcriptional activity by E2 and ED (2.2 ± 0.8 , $p < 0.01$ and 1.3 ± 0.5 , $p < 0.05$, respectively) while the lack of effect of EL remains unchanged. Neither ED or EL in combination with E2, nor ICI alone or with E2, ED and EL, induced the transcriptional activation of ER α Δ 79S118A (data not shown). Therefore, ED and E2-induced ER α transcriptional activity through the box 2/3 AF-1 domain, involves the phosphorylation of the Ser 118.

3.4. Contribution of the AF domains in transcriptional activation of ER α by ED and EL

While in MCF-7 cells, ED and E2 act mainly through AF-1 to transactivate ER α , EL seems to act through the AF-2 domain. In order to check the preferential action of EL through the AF-2 domain to

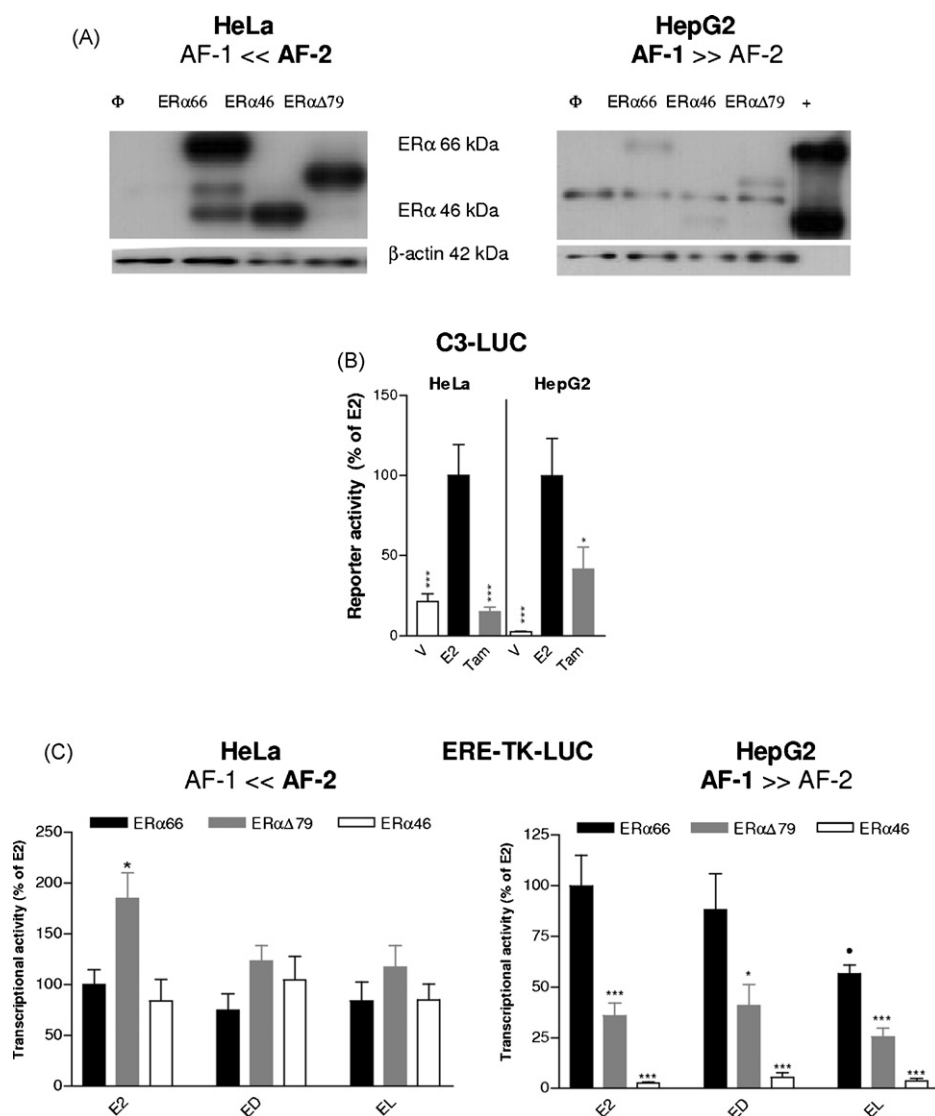


Fig. 3. Transcriptional activation of ER α by enterolignans in a defined cellular context (HepG2 AF-1 and HeLa AF-2 dominant). (A) Western blots controlling the correct expression of ER α constructs in HeLa and HepG2 cells transiently transfected with the corresponding expression vectors. (B) Use of the agonistic activity of Tam to confirm the cell permissiveness to either AF. HeLa and HepG2 cells were cotransfected with hC3-LUC and ER α 66. Cells were treated 36 h with V (0.1% EtOH), E2 (10 nM) or Tam (1 μ M). Results are expressed as percentage of E2-treated cells. All experiments were performed at least 5 times and shown are mean \pm S.E.M. (C) Transcriptional activity was determined using ERE-TK-LUC. Data are expressed as percentage of E2-treated cells. Shown are means \pm S.E.M. of 3-5 independent experiments, each performed in triplicate wells. Comparisons between experimental conditions were performed by a one-way ANOVA followed by Dunnett's test and/or a student's *t*-test when applicable. Statistical significance is indicated by * for comparison to ER α 66-transfected cells (black bars) within groups for a same compound, ● was used for comparison to E2-treated cells for ER α 66 construct. One or 3 symbols were used to express significance for $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively.

transactivate ER α , we studied the transcriptional activities induced by ED and EL in different cell lines known for their selective sensitivity to either ER α AF-1 or AF-2 domains. To assess estrogen responsive systems assessing permissiveness to either ER α AF, we transiently transfected the different ER α constructs into HepG2 (AF-1 dominant) and HeLa or CHO cells (AF-2 dominant). Correct expression of ER α 66, ER α Δ 79 and ER α 46 was checked by western blot analysis (Fig. 3A) as well as cellular context by using agonistic activity of Tam to check for permissiveness to AF-1 (Fig. 3B).

E2, ED and EL increase ER α 66 transcriptional activity in a similar fashion in HeLa and CHO cell lines. In contrast, in HepG2 cells (AF-1 dominant), ER α 66 induced transcriptional activity is 6–10 times higher than the other cell lines (data not shown). At similar concentrations, the ER β induced transcriptional activity by E2, ED and EL is overall lower than the one of ER α in all cell lines tested. ED, but not EL, induces a significant, but somehow lower ER β transcriptional activity than E2 in HeLa, HepG2 and CHO cell lines (data not shown).

Fig. 3C shows the effects of E2, ED and EL on the transcriptional activity of the ER α different constructs regarding the cellular context, i.e. AF-1 dominant (HepG2) or AF-2 dominant (HeLa) cells. In HeLa cells, ER α 66 and ER α 46 induced transcriptional activity by either E2 or enterolignans is similar. E2, not ED or EL, significantly increases the transcriptional activity of ER α Δ 79 compared to ER α 66 and ER α 46 in this cellular context (Fig. 3C). Similar responses are obtained for ED and EL at 1 μ M (data not shown). In this cellular context, ED and EL act in a similar fashion (and to the same extent as E2) to induce ER α transcriptional activity.

In contrast, in HepG2 cell line, the different constructs of ER α present different patterns of transcriptional activities. E2 and ED increase ER α 66 transcriptional activation in a similar fashion and this effect is significantly higher than EL-induced ER α 66 transcriptional activation. This difference between compounds is abolished when the box 1 containing the AF-1 helical core is deleted. All three compounds induce ER α Δ 79 and ER α 46 transcriptional activities in a similar fashion and to a significantly lower extent than ER α 66. ICI completely blocked E2, ED and EL induced transcriptional activities of ER α different constructs (data not shown). Taken together these results indicate that E2 and ED act in the same fashion, capable of inducing both transactivation functions AF-1 and AF-2, while EL is less efficient in inducing AF-1 function, acting predominantly through AF-2 to induce ER α transcriptional activation.

3.5. ED, but not EL, down-regulates ER α 66 mRNA and protein

E2 is known to down-regulate the levels of ER α in breast cancer cell lines through an increased turnover of the E2-activated ER α protein and a reduced transcription rate of its own gene [25]. This down-regulation represents an additional hallmark of the activation of ER α by an agonist. This prompted us to investigate whether ER α mRNA and protein levels are sensitive to enterolignans in MCF-7 cells. ER α mRNA levels were compared by RT-PCR and normalized on the mRNA levels of the housekeeping gene β -actin (Fig. 4A). A treatment of 24 h with ED, but not EL (10 μ M) down-regulates the levels of ER α mRNA in a similar extent to 10 nM of E2. Using the same treatment, we also observe a down-regulation of ER α 66 protein content with ED, but not EL, similar to the one induced by E2 (Fig. 4B). EL significantly increases ER α 46 protein content, while there was no change with E2 and ED (data not shown). Thus, structurally and functionally similar compounds may have overlapping and yet distinct effects on endogenous targets.

3.6. ED, but not EL, up regulates ER target genes

Having determined that ED, but not EL, modulates ER α mRNA and protein contents, we examined the induction of PR and pS2

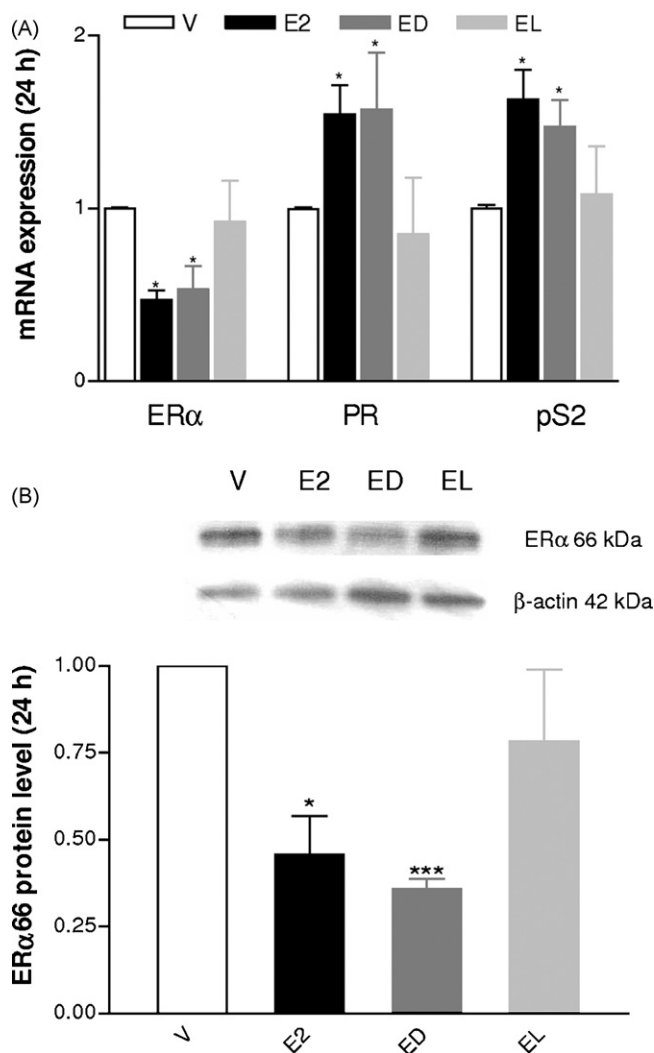


Fig. 4. Effects of enterolignans on ER-dependent target genes in MCF-7. (A) Effects of V (EtOH 0.1%), E2 (10 nM), ED and EL (10 μ M) on ER α , PR and pS2 mRNA levels. (B) Effects of V (EtOH 0.1%), E2 (10 nM), ED and EL (10 μ M) on ER α protein contents. Data are expressed as fold increase compared to control (V-treated cells). Shown are means \pm S.E.M. of at least 4 independent experiments. Comparisons between experimental conditions were performed by a one-way ANOVA followed by Dunnett's test. Statistical significance vs. control is indicated by * and *** for $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively.

mRNA, two well-known endogenous target genes, using RT-PCR (Fig. 4A). Similarly to E2, ED, but not EL, induces an up-regulation of PR and pS2 mRNA in MCF-7 cells after a 24 h treatment.

3.7. ED, but not EL, induces MCF-7 cell proliferation

Estrogens are decisive actors responsible for the proliferation and differentiation of normal mammary epithelial cells as well as the development and progression of breast cancer. Having established that ED and EL are ER activators we wanted to evaluate a more complex physiological response. We analyzed the effects of the enterolignans on the proliferation of estrogen-dependant MCF-7 cells, in the presence or absence of charcoal-stripped FCS (Fig. 5). Fig. 5A and C shows that both E2 and ED stimulate the proliferation of MCF-7 cells in the presence or absence of FCS, while EL does not significantly change cell numbers in the same experimental conditions. Neither ED, nor EL, has an inhibitory effect on E2-induced MCF-7 proliferation ($p > 0.05$ vs. E2 treatment, Fig. 5B and D), while 1 μ M ICI completely

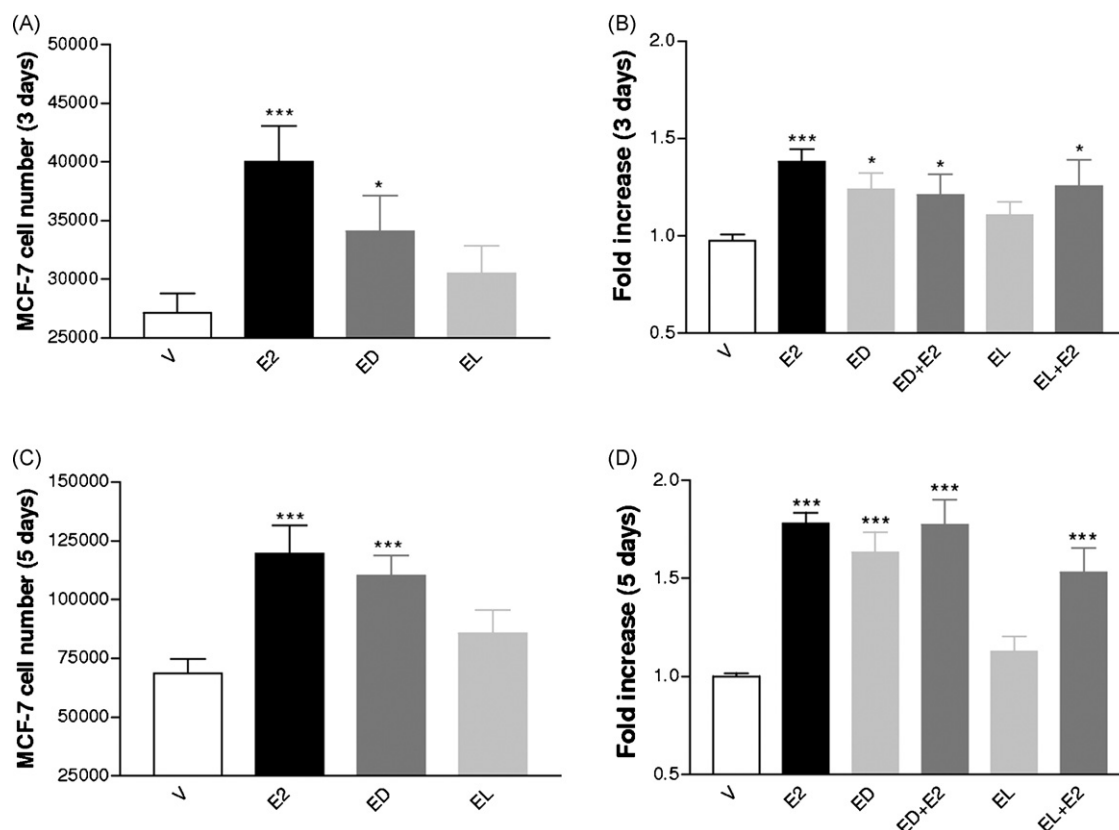


Fig. 5. Effects of enterolignans on proliferation of MCF-7. Effects of V (EtOH, 0.1%), E2 (10 nM), ED and EL (10 μM) or the combinations (E2 + ED and E2 + EL) on MCF-7 cell number in absence (A and B) or presence (C and D) of 2.5% charcoal-stripped FCS. Data are expressed as cell number (A and C) or as fold increase compared to control (V-treated cells, B and D). Shown are means ± S.E.M. of 5 independent experiments, each performed in duplicate wells. Comparisons between experimental conditions were performed by a one-way ANOVA followed by Dunnett's test. Statistical significance is indicated by * and *** ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively) compared to control (A–D). No statistical difference ($p > 0.05$) were obtained for comparisons between E2, ED + E2 and EL + E2 treatments (B and D).

402 blocked the E2 and ED-induced MCF-7 cell proliferation (data not
403 shown).

404 3.8. Enterolignans modulate MMP-2 and MMP-9 activities

405 MMP degrade extracellular matrix components enabling cell
406 tumor invasion and metastasis. The activity of MMP-2 and MMP-9
407 in MCF-7 conditioned media after 1 and 3 days of treatment was
408 analyzed using gelatin zymography (Fig. 6). We were not able to
409 detect any changes in MMP-2 and MMP-9 activity after 24 h of treat-
410 ment. After 3 days, the activity of secreted MMP-2 is decreased by
411 E2 while ED and EL alone have no effect. The effect of E2 is abo-
412 lished by ICI treatment (data not shown). Interestingly, E2 decreased
413 MMP-2 activity is reversed when cells are treated with ED or EL in
414 combination with E2 and therefore is similar to control conditions
415 (vehicle-treated cells) (Fig. 6A). More interestingly, while ED, EL and
416 ICI alone do not induce secreted MMP-2 activity, ED and EL in
417 combination with ICI induce an increase up to 1.9 ± 0.14 and 3 ± 0.43
418 fold respectively, in MMP-2 secreted activity (Fig. 6B).

419 Secreted MMP-9 activity is decreased to a similar extent by both
420 E2 and ED, while EL has no effect. Treatment of MCF-7 cells with E2
421 in combination with ED or EL did not induce significant changes in
422 secreted MMP-9 activity compared to the control (Fig. 6C). E2 and
423 ED induced decreases in MMP-9 activity is abolished by ICI, which is
424 able to increase MMP-9 activity when used alone. EL seems to block
425 the ICI induced increase in MMP-9 activity (Fig. 6D) even though
426 this effect did not reach statistical significance ($p = 0.09$).

427 Taken together these results indicate that ER activation in MCF-
428 7 cells may have a protective role by decreasing cell migration. This
429 is correlated with our result that in presence of ICI, which induces

ER degradation, there is an increase in MMP secreted activity and
430 therefore a loss of ER protection against cell migration. 431

432 4. Discussion

433 Our results provide mechanistic insights into the mode of action
434 of two very abundant dietary polyphenols, the enterolignans ED
435 and EL in MCF-7 cells. These observations suggest an explanation
436 for the confusing state of the literature on the potential role of
437 dietary lignans in breast cancer [7,9,26].

438 We have presented several lines of evidence that ED and EL,
439 while structurally and functionally similar compounds, have over-
440 lapping and yet distinct effects on endogenous targets in MCF-7
441 cells. At concentrations which can be achieved with a high con-
442 sumption of products rich in lignans (such as flaxseed or sesame
443 seed) and/or lignan-based pills in humans, we demonstrate, for the
444 first time, that ED, and EL to a lesser extent, potentially activate ER α
445 and ER β , that in the AF-1 domain, box 2/3 and to a lesser extent box
446 1 are necessary for ED, but not for EL, to induce ER α transcriptional
447 activity, that ED, but not EL, decreases ER α mRNA and protein con-
448 tents and regulates ER target genes such as PR and pS2 and finally
449 that ED, but not EL, increases MCF-7 cell proliferation and regulates
450 MMP activities.

451 In all these assays, ED qualitatively behaves like the physiologi-
452 cal estrogenic ligand E2. Quantitatively, similar effects are typically
453 achieved only at concentrations that are 2 or 3 orders of magnitude
454 higher, but can be reached with a lignan-rich diet. In populations
455 that consume a usual Western diet, mean plasma enterolignan
456 (ED + EL) concentrations are in the range of 10–270 nM, but with
457 wider ranges of EL concentrations (from non-detectable to over

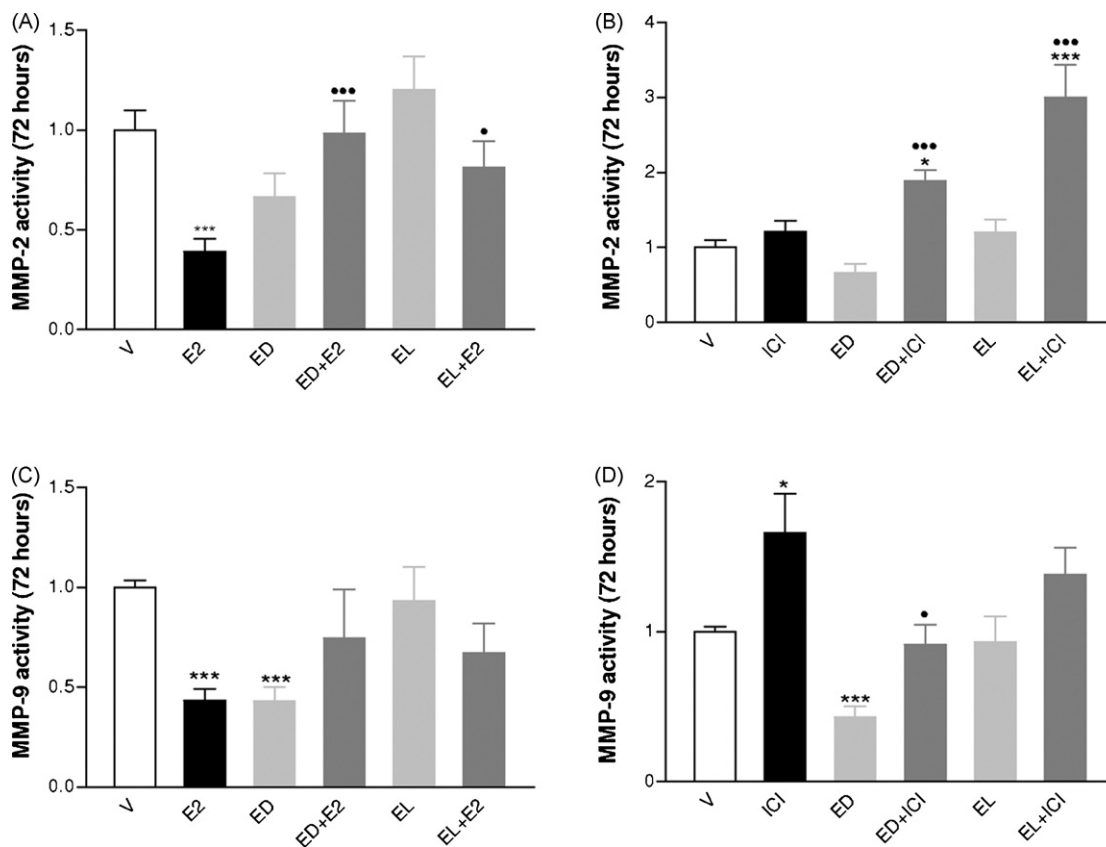


Fig. 6. Effects of enterolignans on MMP-2 and MMP-9 activities in MCF-7. Effects of V (EtOH, 0.1%), E2 (10 nM), ED and EL (10 μ M) or the combinations (E2 + ED and E2 + EL) on MMP-2 (A and B) and MMP-9 (C and D) activities secreted by MCF-7 after 72 h. Data are expressed as fold induction compared to control (V-treated cells). Shown are means \pm S.E.M. of 2–5 independent experiments, each performed in duplicate wells. Comparisons between experimental conditions were performed by a one-way ANOVA followed by Dunnett's test and/or a student's *t*-test when applicable. Statistical significance is indicated by * for comparison to control (open bars) and ● was used for comparison to either E2-treated cells (A) or ICI-treated cells (B and D). One and 3 symbols were used to express significance for $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively.

1 μ M). Generally, EL is the enterolignan with the highest concentrations in plasma, however this varies among groups studied in that ED concentrations higher than EL have also been reported [7,8,27,28]. Vegetarians and individuals consuming high quantity of products rich in lignans, such as flaxseed and sesame seed can reach micromolar concentrations of EL in their serum [3].

It has been previously reported that structurally distinct phytoestrogens, including enterolignans exert their estrogenic effects through direct binding and activation of the ER [15,29]. But even though ER α and ER β bind structurally diverse chemicals, the relative binding affinities for individual compounds do not predict their *in vivo* biology as ER agonists or antagonists. EL has a stronger affinity for binding to ER α and shows markedly low efficacy for activating ER and therefore is considered as a partial agonist/partial antagonist [15,30].

Our data, although qualitatively consistent with these reports, extend them in several important points. We demonstrate for the first time, that ED, and to a lesser extent EL, are ER agonists. In our transactivation assays, both ED and EL are ER α activators in MCF-7 cells, with ED having a stronger effect than EL. Regarding ER β , ED but not EL is as potent as E2 in transcriptionally activating ER β , which is in agreement with published data [15,30]. The estrogenic potency of compounds is a complicated phenomenon which results from a number of factors, such as the differential effects on the transactivation functionalities of the receptor, the particular co-activators recruited, the cell- and target promoter-contexts and the cell differentiation stage [31,32,21]. We report, in this study, a lower transcriptional activity of ER β compared to ER α in different cell lines (HeLa, HepG2 and CHO) as well as minor differences

between the two different constructs pERE-TK-LUC and pC3-LUC. Our results are consistent with those in part described in Ishikawa cells using similar reporter constructs [15].

This suggests that the estrogenic and/or anti-estrogenic activity of structurally diverse natural phytoestrogens is complex, which is consistent with published data that often give contradictory results for these compounds. Therefore, it was of particular interest to determine the precise mechanism of action of ED and EL as partial agonists. The use of ER α constructs expressed in ER-negative backgrounds has been a powerful technique for studying the function of various domains in the ER. For the first time, we showed that, unlike partial agonists, ED and EL activate AF-2 to a similar extent to E2, which is known to be associated with a characteristic repositioning of helix 12 in the LBD. This is consistent with the recent study of Penttinen et al. [30] showing that the LBD of the ER are sufficient for EL activity. Our results obtained from the experiments using the truncated types of ER α , RE α 46 and ER α Δ 79 revealed that ED is a full ER α agonist. In cell lines with a context permissive to AF-1 function (MCF7, HepG2), deletion of AF-1 interferes with E2 or ED-induced transcriptional activation of ER α . In contrast, this region is involved to a lesser extent in the transactivation of ER α by EL. This property could be due to a conformational change in the LBD different from that induced by E2 and which inhibits, at least partially, the activity of AF-1 without affecting AF-2 function. Therefore, these results reveal that this mechanism of action makes EL an interesting tool as an AF-2 agonist and enables a better understanding of ER activation through this domain.

Whereas both ED and EL acted as ER α agonists, but mainly through AF-1 and AF-2 respectively, they exhibited a contrastive

effect on the proliferation of MCF-7 cells. ED has an estrogenic effect to stimulate proliferation, while EL shows no estrogenic effect. This is consistent with the demonstration that full activity of the AF-1 domain is required for the estradiol-dependant proliferation of ER α positive breast cancer cell lines [33]. Most importantly, we show that ED is a full ER α agonist in more complex biological systems. At concentrations sufficient to elicit substantial ER transcriptional activities, it also stimulates the transcription of estrogen target genes (pS2 and PR). ED, but not EL, acts as E2, on ER α 66 protein expression, suggesting a similar mechanism of action, i.e. recruitment of co-activators and/or other proteins to the AF-2 of the bound ER, likely leading to the receptor's down-regulation [34].

In contrast to our results, previous *in vitro* studies showed that ED has either no effect or minimal growth modulating effects, on MCF-7 cells and conversely, EL has been reported to induce estrogenic effects by increasing MCF-7 cell proliferation and expression of pS2 gene [12–14,35]. In the presence of E2, EL acts anti-estrogenically by reducing MCF-7 cell proliferation [13]. Moreover, the EL induced reduction in MCF-7 cell proliferation has been linked to a reduction of local estrogen production [36]. However, these *in vitro* results, including ours, are not in agreement with those obtained *in vivo* showing that neither ED nor EL have growth-promoting effects on MCF-7 xenografts in the mammary glands of ovariectomized athymic nude mice [37]. Even the recent study of Penttinen et al. [30] showed evidence of only a modest uterotrophic effect of EL in mice. But, consistent with our study, different mechanisms of action on enzymes involved in estrogen production within the breast have been demonstrated for ED and EL. While ED is a stronger inhibitor of aromatase activity than EL, only EL, not ED, inhibits the activity of the 17 β hydroxysteroid dehydrogenase and reduces MCF-7 cell proliferation, in part by inhibiting local production of E2 in MCF-7 cells [36].

We also examined the effect of enterolignans on secreted MMP activities by MCF-7 cells. Invasion and metastasis are major causes of morbidity and mortality in breast cancer patients. They require the degradation of extracellular matrix (ECM) by neoplastic cells which involve a cascade of proteolytic enzymes. MMP are zinc-dependent ECM-degrading proteases playing an essential role in tumor angiogenesis, metastasis and growth factor release from the ECM, and several MMPs, including MMP-9 are directly involved in cancer invasion [38]. In clinically invasive breast cancers, augmented protein levels and activity of MMP-9 and MMP-2 were associated with shortened survival and unfavourable prognosis. Moreover, the expression of MMP-9 in MCF-7 cells is inhibited by anti-estrogens [39].

We show, for the first time, that ED, as E2, decreases MMP activity and therefore that ED has estrogenic effects, but only on MMP-9 in MCF-7 cells. Similar results were described for E2 and genistein, an extensively studied phytoestrogen [40,41]. Interestingly, while ED and EL are in combination with E2, they block the E2 effect. For MMP-2 activity, undoubtedly, ED and EL actions are not related to their estrogenic mechanisms since not inhibited by ICI, and lead to a loss of the ER mediated protection against cell migration. This is in accordance with the increased MMP-2/MMP-9 ratio in MCF-7 cells induced by Tam, the ER partial agonist/antagonist [41]. In contrast, MMP-9 decreased activity is inhibited by ICI, therefore mediated through an ER-dependant action. Our results obtained with ED, but not with EL, are complementary to those previously published regarding enterolignans in ER-negative breast cancer cell lines [42].

Our study emphasizes that it is of particular interest, because of their different mechanisms of action, to measure circulating levels of both metabolites of dietary lignans in future clinical studies. In conclusion, advocating lignan-rich food or even lignan-based food supplements without medical follow-up for women's health should be considered critically. Moreover, it also follows that the

diet of breast cancer patients should be matched carefully with their particular tumor types.

Acknowledgments

C.C. was a recipient fellow of a Région Aquitaine Grant (No. 20034380908). We are grateful to Dr. Svitlana Shinkaruk for providing 2,3-bis(3-hydroxybenzyl) butane-1,4-diol (enterodiol, ED) and 3,4-bis(3-hydroxybenzyl)dihydrofuran-2(3H)-one (enterolactone, EL) through chemical synthesis. We would like to thank the members of the Endocrinologie Moléculaire de la Reproduction lab (UMR CNRS 6026, Rennes, France) for providing plasmids pSG5, pSG human (h)ER α 66 (HEO), pSG ER α 46 and pSGER Δ 79 and the luciferase reporter plasmids ERE-TK-LUC and hC3-LUC. Many thanks to Pr. J.A. Gustafsson's department (Dpt. Biosciences and Medical Nutrition, Karolinska Institute, Sweden) for providing the expression vector for ER β (pSG5hER β). We are indebted to Russell Wallace for revision of the English text.

References

- [1] M.D. Althuis, J.M. Dozier, W.F. Anderson, S.S. Devesa, L.A. Brinton, Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973–1997, *Int. J. Epidemiol.* 34 (2005) 405–412.
- [2] R.G. Ziegler, R.N. Hoover, M.C. Pike, A. Hildesheim, A.M. Nomura, D.W. West, A.H. Wu-Williams, L.N. Kolonel, P.L. Horn-Ross, J.F. Rosenthal, M.B. Hyer, Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women, *J. Natl. Cancer Inst.* 85 (1993) 1819–1827.
- [3] H. Adlercreutz, Phytoestrogens and breast cancer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83 (2002) 113–118.
- [4] B. Raffaelli, A. Hoikkala, E. Leppala, K. Wahala, Enterolignans, *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 777 (2002) 29–43.
- [5] M. Axelson, J. Sjövall, B.E. Gustafsson, K.D. Setchell, Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants, *Nature* 298 (1982) 659–660.
- [6] J.W. Lampe, C. Atkinson, M.A. Hullar, Assessing exposure to lignans and their metabolites in humans, *J. AOAC Int.* 89 (2006) 1174–1181.
- [7] M. Verheus, C.H. van Gils, L. Keinan-Boker, P.B. Grace, S.A. Bingham, P.H. Peeters, Plasma phytoestrogens and subsequent breast cancer risk, *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 648–655.
- [8] L.U. Thompson, Experimental studies on lignans and cancer, *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 12 (1998) 691–705.
- [9] F. Boccardo, M. Puntoni, P. Guglielmini, A. Rubagotti, Enterolactone as a risk factor for breast cancer: a review of the published evidence, *Clin. Chim. Acta* 365 (2006) 58–67.
- [10] K.A. Power, L.U. Thompson, Ligand-induced regulation of ER α and ER β is indicative of human breast cancer cell proliferation, *Breast Cancer Res. Treat.* 81 (2003) 209–221.
- [11] J.M. Bergman, L.U. Thompson, C. Dabrosin, Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts *in vivo*, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 1061–1067.
- [12] W.V. Welshons, C.S. Murphy, R. Koch, G. Calaf, V.C. Jordan, Stimulation of breast cancer cells *in vitro* by the environmental estrogen enterolactone and the phytoestrogen equol, *Breast Cancer Res. Treat.* 10 (1987) 169–175.
- [13] Y. Mousavi, H. Adlercreutz, Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41 (1992) 615–619.
- [14] C. Wang, M.S. Kurzer, Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells, *Nutr. Cancer* 28 (1997) 236–247.
- [15] S.O. Mueller, S. Simon, K. Chae, M. Metzler, K.S. Korach, Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ER α) and ER β in human cells, *Toxicol. Sci.* 80 (2004) 14–25.
- [16] Nuclear receptor Committee, A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily, *Cell* 97 (1999) 161–163.
- [17] R. O'Lone, M.C. Frith, E.K. Karlsson, U. Hansen, Genomic targets of nuclear estrogen receptors, *Mol. Endocrinol.* 18 (2004) 1859–1875.
- [18] R.F. Swaby, C.G. Sharma, V.C. Jordan, SERMs for the treatment and prevention of breast cancer, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* (April) (2007), doi:10.1007/s11154-007-9034-4 (Epub ahead of print).
- [19] G. Flouriot, H. Brand, S. Denger, R. Metivier, M. Kos, G. Reid, V. Sonntag-Buck, F. Gannon, Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1, *EMBO J.* 19 (2000) 4688–4700.
- [20] S. Ali, D. Metzger, J.M. Bornert, P. Chambon, Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region, *EMBO J.* 12 (1993) 1153–1160.
- [21] Y. Merot, R. Metivier, G. Penot, D. Manu, C. Saligaut, F. Gannon, F. Pakdel, O. Kah, G. Flouriot, The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation

- functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 26184–26191.
- [22] R. Metivier, G. Penot, G. Flouriot, F. Pakdel, Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains, *Mol. Endocrinol.* 15 (2001) 1953–1970.
- [23] M. Potier, S.J. Elliot, I. Tack, O. Lenz, G.E. Striker, L.J. Striker, M. Karl, Expression and regulation of estrogen receptors in mesangial cells: influence on matrix metalloproteinase-9, *J. Am. Soc. Nephrol.* 12 (2001) 241–251.
- [24] A. Fritah, C. Saucier, J. Mester, G. Redeuilh, M. Sabbah, p21WAF1/CIP1 selectively controls the transcriptional activity of estrogen receptor alpha, *Mol. Cell Biol.* 25 (2005) 2419–2430.
- [25] G. Reid, M.R. Hubner, R. Metivier, H. Brand, S. Denger, D. Manu, J. Beaudouin, J. Ellenberg, F. Gannon, Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signalling, *Mol. Cell* 11 (2003) 695–707.
- [26] M.S. Touillaud, A.C. Thiebaut, A. Fournier, M. Niravong, M.C. Boutron-Ruault, F. Clavel-Chapelon, Dietary lignan intake and postmenopausal breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status, *J. Natl. Cancer Inst.* 99 (2007) 475–486.
- [27] J.W. Lampe, Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers, *J. Nutr.* 133 (Suppl. 3) (2003) 956S–964S.
- [28] P.H. Peeters, N. Slimani, Y.T. van der Schouw, P.B. Grace, C. Navarro, A. Tjonneland, A. Olsen, F. Clavel-Chapelon, M. Touillaud, M.C. Boutron-Ruault, M. Jenab, R. Kaaks, J. Linseisen, A. Trichopoulos, D. Trichopoulos, V. Dilis, H. Boeing, C. Weikert, K. Overvad, V. Pala, D. Palli, S. Panico, R. Tumino, P. Vineis, H.B. Bueno-de-Mesquita, C.H. van Gils, G. Skeie, P. Jakszyn, G. Hallmans, G. Berglund, T.J. Key, R. Travis, E. Riboli, S.A. Bingham, Variations in plasma phytoestrogen concentrations in European adults, *J. Nutr.* 137 (2007) 1294–1300.
- [29] G.G. Kuiper, J.G. Lemmen, B. Carlsson, J.C. Corton, S.H. Safe, P.T. van der Saag, B.B. van der, J.A. Gustafsson, Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta, *Endocrinology* 139 (1998) 4252–4263.
- [30] P. Penttinen, J. Jaehrling, A.E. Dandimopoulos, J. Inzunza, J.G. Lemmen, S.P. van der, K. Pettersson, G. Gauglitz, S. Makela, I. Pongratz, Diet-derived polyphenol metabolite enterolactone is a tissue-specific estrogen receptor activator, *Endocrinology* 148 (2007) 4875–4886.
- [31] M. Berry, D. Metzger, P. Chambon, Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen, *EMBO J.* 9 (1990) 2811–2818.
- [32] M.T. Tzukerman, A. Esty, D. Santiso-Mere, P. Danielian, M.G. Parker, R.B. Stein, J.W. Pike, D.P. McDonnell, Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions, *Mol. Endocrinol.* 8 (1994) 21–30.
- [33] T. Fujita, Y. Kobayashi, O. Wada, Y. Tateishi, L. Kitada, Y. Yamamoto, H. Takashima, A. Murayama, T. Yano, T. Baba, S. Kato, Y. Kawabe, J. Yanagisawa, Full activation of estrogen receptor alpha activation function-1 induces proliferation of breast cancer cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 26704–26714.
- [34] D.M. Lonard, C.L. Smith, Molecular perspectives on selective estrogen receptor modulators (SERMs): progress in understanding their tissue-specific agonist and antagonist actions, *Steroids* 67 (2002) 15–24.
- [35] N. Sathyamoorthy, T.T. Wang, J.M. Phang, Stimulation of pS2 expression by diet-derived compounds, *Cancer Res.* 54 (1994) 957–961.
- [36] J.D. Brooks, L.U. Thompson, Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 94 (2005) 461–467.
- [37] K.A. Power, N.M. Saarinen, J.M. Chen, L.U. Thompson, Mammalian lignans enterolactone and enterodiol, alone and in combination with the isoflavone genistein, do not promote the growth of MCF-7 xenografts in ovariectomized athymic nude mice, *Int. J. Cancer* 118 (2006) 1316–1320.
- [38] A. Lochter, M.D. Sternlicht, Z. Werb, M.J. Bissell, The significance of matrix metalloproteinases during early stages of tumour progression, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 857 (1998) 180–193.
- [39] S. Wolczynski, A. Surazynski, J. Swiatecka, J. Palka, Estrogenic and antiestrogenic effects of raloxifene on collagen metabolism in breast cancer MCF-7 cells, *Gynecol. Endocrinol.* 15 (2001) 225–233.
- [40] O.C. Kousidou, T.N. Mitropoulou, A.E. Roussidis, D. Kletsas, A.D. Theocharis, N.K. Karamanos, Genistein suppresses the invasive potential of human breast cancer cells through transcriptional regulation of metalloproteinases and their tissue inhibitors, *Int. J. Oncol.* 26 (2005) 1101–1109.
- [41] U.W. Nilsson, S. Garvin, C. Dabrosin, MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells, *Breast Cancer Res. Treat.* 102 (2007) 253–261.
- [42] J. Chen, L.U. Thompson, Lignans and tamoxifen, alone or in combination, reduce human breast cancer cell adhesion, invasion and migration in vitro, *Breast Cancer Res. Treat.* 80 (2003) 163–170.

III. LES ISOFLAVONES, ARTICLE 2

A. Contexte de l'étude

Cette étude s'intéresse aux isoflavones et à l'équol, qui font à l'heure actuelle l'objet de nombreuses études, puisque ces molécules, la génistéine et la daïdzéine en particulier, se retrouvent dans de nombreux compléments alimentaires. Cependant, leurs effets sur les cellules cancéreuses mammaires et leurs propriétés œstrogéniques restent toujours controversés.

En effet, les œstrogènes utilisés dans un THS augmenteraient les risques de cancer du sein, tandis qu'une forte consommation d'isoflavones dans les populations asiatiques a été associée à un faible risque de cancer du sein. Afin de mieux comprendre leur véritable impact sur le cancer du sein, les mécanismes moléculaires de ces composés sur l'activation transcriptionnelle des RE et leurs propriétés œstrogéniques ont été étudiés dans divers contextes cellulaires.

L'hypothèse initiale de ce travail était que les isoflavones et l'équol auraient des mécanismes d'action moléculaire et des propriétés œstrogéniques différentes du ligand endogène, l'E₂ en fonction des contextes cellulaires, ce qui expliquerait les résultats divergents obtenus dans la littérature.

En fait, notre étude met en évidence que les isoflavones et l'équol possèdent, quel que soit le contexte cellulaire, des propriétés d'activation transcriptionnelle du RE α similaires à l'E₂, avec une implication préférentielle d'AF-1. De plus, dans les MCF-7, nous démontrons des effets pro-œstrogéniques des isoflavones sur la régulation de gènes œstrogéno-dépendants et sur la prolifération cellulaire.

Ainsi, ce travail confirme les résultats obtenus avec les entérolignanes, à savoir que dans les MCF-7, il existe un lien entre la capacité d'une molécule à induire l'activation transcriptionnelle de RE α par le domaine AF-1 et ses propriétés pro-œstrogéniques. De façon plus intéressante, les divergences des résultats obtenus dans les études précédentes concernant les effets des isoflavones sur les cellules cancéreuses mammaires ne peuvent être imputées ni

à des différences de mode d'action de ces composés sur le RE α , ni aux différents contextes cellulaires utilisés comme modèles d'étude.

Enfin, nos résultats suggèrent fortement qu'une alimentation riche en isoflavones n'est pas recommandée dans l'optique de réduire les risques de cancer du sein et que ces molécules doivent être considérées avec prudence.

Ces résultats sont rédigés sous forme de publication soumise à « Molecular Nutrition and Food Research » depuis le 11 février 2008.

B. Respective contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor α induced transcriptional activity by isoflavones and equol: Consequence on breast cancer cell proliferation

Charlotte Carreau¹, Gilles Flouriot², Catherine Bennetau-Pelissero¹, Mylène Potier¹.

¹ Unité Micronutriments Reproduction Santé - ENITAB - 1 Cours du Général de Gaulle, CS 40201 - 33175 Gradignan cedex, France.

² Equipe "Récepteur des œstrogènes et destinée cellulaire"- UMR CNRS 6026 - 35042 Rennes cedex, France.

Corresponding author: Mylène Potier - Unité Micronutriments Reproduction Santé (UMRS) – ENITAB - 1, Crs du Général de Gaulle, CS 40201 - 33175 Gradignan Cedex France

Abbreviations used are: AF, transactivation function; D, daidzein; E, equol; E2, 17 β -estradiol; ER, estrogen receptor; FCS, fetal calf serum; G, genistein; ICI, ICI 182,780; LBD, ligand binding domain; V, vehicle.

Keywords: Breast cancer, Cellular background, Estrogen receptor, Phytoestrogens, Transactivation functions

Abstract

Estrogens used in hormone replacement therapy regimens may increase the risk of developing breast cancer. Paradoxically, high consumption of plant-derived phytoestrogens, particularly soybean isoflavones, is associated with a low incidence of breast cancer. To explore the molecular basis for these potentially different experimental/clinical outcomes, we investigated whether soybean isoflavones elicit distinct transcriptional actions from estrogens by performing transient transfections in different cell lines. Our results demonstrate that 17 β estradiol (E2), isoflavones and equol effectively trigger the transcriptional activation with both estrogen receptors (ER), ER α and ER β . ER α transcriptional activity is mediated through two transactivation domains AF-1 and AF-2, whose activity is tightly regulated in a cell-type and promoter specific manner. Isoflavones, genistein and daidzein, and equol, the main estrogenic metabolite of daidzein, are ER α agonists for transcriptional activation. The molecular mechanisms for ER α induced transcriptional activity by isoflavones and equol involve their capacity to act mainly through AF-1 regardless of the cell type. Therefore, our data indicate that estrogenic ligands, such as isoflavones and equol, exert their effects on ER α transactivation similarly to the endogenous ligand E2, and suggest that the risk of estrogen-related diseases might not be reduced by soy-rich food and/or isoflavone- or equol-based supplements.

Introduction

Estrogens were used in hormonal replacement therapy (HRT) to prevent menopausal symptoms such as hot flushes, urogenital atrophy but also osteoporosis in postmenopausal women. Unfortunately, HRT has not lived up to its potential to improve health in women. Estrogens have been associated with an increased incidence of breast and endometrial cancers, which has led to the use of antiestrogens and selective estrogen receptor modulators (SERM) such as tamoxifen and raloxifen that have a safer profile. However, since undesirable effects persist, numerous investigators continue to search for better SERM for HRT.

There is a growing interest in using natural dietary phytoestrogens, particularly those found in soy products, as a potential alternative to the estrogens in HRT. Interest in phytoestrogens has been fuelled by observational studies showing a marked difference in the incidence rates of breast cancer in women from western countries compared to those in non western countries [1]. Investigators have hypothesized that an Asian diet, which is typically high in soy content, may be one factor that explains the lower incidence of breast cancer in these countries

compared with other countries on a traditional diet that lacks soy as a common component [2].

The isoflavones genistein (G) and daidzein (D), which are abundant in soybeans, and available widely as herbal tablets, are especially popular among postmenopausal women who are taking phytoestrogens in an effort to alleviate menopausal symptoms without the risk of developing breast cancer. Despite their popularity and putative health benefits, it is clear that we need to know much more about the molecular mechanisms, safety and efficacy of isoflavones, as natural SERM, before they can be recommended to postmenopausal women as an alternative to estrogens for HRT.

Dietary isoflavones, such as G and D, and its main metabolite equol (E), are strikingly similar in chemical structure to steroidal and non-steroidal estrogens and are capable of binding weakly to estrogen receptors (ER) [3]. There are experimental evidences for and against the action of phytoestrogens as promoters or protectants of breast cancer (for review, [4]). Since many in vitro studies have used a similar cellular background (MCF-7) and experimental conditions, the discrepancies in the findings are puzzling.

The effects of 17β -estradiol (E2) and related compounds, such as phytoestrogens, are mediated by two members of the nuclear receptor superfamily, ER α and ER β , which are coded on separate genes. ER use two transactivation functions, located in their N-terminal (AF-1) and C-terminal (AF-2) domains. Once activated by ligand binding, these AF recruit co-regulators of gene transcription. Constitutively active when isolated, AF-1 has been subdivided into three regions, box 1 (amino acids 38-64), box 2 (amino acids 87-108) and box 3 (amino acids 108-129), which correspond to sequences surrounding the main phosphorylated serine residue at position 118 [5]. The transcriptional activity of the AF-2 region is dependant on ligand binding. The transcriptional activity of ER α can be promoted through functional cooperation between both AF-1 and AF-2 or through each AF acting independently [6]. Importantly, the respective activities of AF-1 and AF-2 are controlled in a cell-type and promoter-specific manner [7, 8]. Furthermore, it has been shown that the relative contribution that AF-1 and AF-2 exert on the transcriptional activity of ER α varies in a cell differentiation stage-dependant manner [9]. Consequently, during the epithelial-mesenchymal transition, the cell permissiveness shift from AF-1 to AF-2 can be predicted to cause ER α to regulate different gene patterns. More recently, the sensitivity of ER α transcriptional activity towards the cell differentiation stage has been shown to be controlled by the AF-1 box 1 sub-region [10].

Therefore, isoflavones and equol may produce clinical and/or experimental effects distinct from estrogens by differentially triggering ER α transcriptional activity. To test this hypothesis, we compared the effects of G, D and E on the transcriptional activity of ER α in different cellular backgrounds. Furthermore, the present study investigated the roles of the AF domains, and more particularly of the AF1 box 1 sub region, in the ability of isoflavones (G, D) and E in ER α transactivation. For these purposes, transient transfections of ER α constructs were performed in an ER positive mammary epithelial cell line (MCF-7) as well as in the ER-negative HeLa and HepG2 cell lines, which offer opposite AF permissiveness. The ability of G, D and E, alone or in combination with E2, to modulate ER α protein levels and to exert growth promoting effects in MCF-7 cells were also examined.

Materials and methods

Reagents and antibodies– 17 β -estradiol (E2) and the monoclonal anti- β -actin AC-15 were purchased from Sigma (France). Polyclonal anti-ER α (HC-20) was obtained from Tebu-bio (France) and ICI 182,780, (ICI) from Tocris (United Kingdom). The isoflavones genistein (G) and daidzein (D), and its metabolite equol (E), were obtained by chemical synthesis by Dr. S. Shinkaruk at the Laboratoire de Chimie Organique et Organométallique (Institut des Sciences Moléculaires ISM, UMR 5255, CNRS, France). Stock Solution of equol was a mixture (1:1) of racemic compounds (R-equol:S-equol).

Plasmids – Expression vectors pSG5, pSG human (h)ER α 66 (HEO), pSGER α 46 pSGER α Δ79, pSGER α Δ79 S118A and pCMV- β galactosidase as well as ERE-TK-LUC and hC3-LUC reporter genes were previously described [10]. Expression vector for human (h)ER β (pSG5ER β) was provided by Pr. J.A. Gustafsson's department (Dpt Biosciences and Medical nutrition, Karolinska Institute, Sweden).

Cell culture and proliferation - All cell lines (HeLa, HepG2 and MCF7) were routinely maintained in DMEM (Sigma, France), supplemented with 5% fetal calf serum (FCS, Sigma, France) and antibiotics (Invitrogen, France). For experimental conditions, phenol red free medium DMEM/F12 (Invitrogen, France) supplemented with 2.5% charcoal-stripped FCS was used (experimental medium). For cell proliferation, MCF-7 cells (25,000/well) were seeded in a 24-well plate in DMEM supplemented with 5% FCS. After 24 h, the medium was changed to an experimental medium either supplemented or not with FCS and with the

indicated treatment for up to 5 days. Cell number was determined after 3 and 5 days with a Coulter cell counter (Beckman Coulter, France).

Transient transfection experiments - Transfections were carried out with FuGENE™ 6 as recommended by the manufacturer (Roche Diagnostics, France) and as described previously [10] with 50 ng of total DNA consisting of the expression vector, the reporter gene and the pCMV- β galactosidase internal control (10, 20 and 20 ng, respectively). Following an overnight incubation with the transfection mixture, cells were treated either with different concentrations of E2, isoflavones (10 nM, 0.1 to 10 μ M, respectively), ICI (1 μ M) or vehicle (0.1% ethanol), or a combination of these compounds as indicated. Following 36 h of transient expression, cells were harvested and luciferase and β -galactosidase assays were performed as previously described [10]. The reporter gene activity was obtained after normalization of the luciferase activity with the β -galactosidase activity.

ER α mRNA and protein expression. Total RNA was extracted using Tri-Reagent® (Euromedex, France) after 24 h of treatment in an experimental medium. RT was performed on 2 μ g of total RNA. PCR amplifications of human ER α and β -actin as the housekeeping gene were performed as published [11]. Expressions of ER α and β -actin were examined by Western blot as previously published [11]. Densitometry analysis was performed using ImageJ 1.17 (National Institute of Health, USA), to determine relative amounts of amplicons and protein. Data obtained were normalized to β -actin signals.

Statistical analysis. Shown are the means \pm SEM of 3 to 10 independent experiments, each performed in triplicate (transfections) or duplicate. One-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison *post-hoc* test or Student's *t*-test were performed for the statistical analysis between experimental conditions (GraphPad Prism®, USA). Dose-dependant effects were assessed by linear regression (GraphPad Prism®, USA). Statistical significance is indicated by 1, 2, and 3 symbols for $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

Results and discussion

In MCF-7 cells, G, D and E (0.1 μM to 10 μM) induce ER α and ER β transactivation on the hC3-LUC reporter gene in a dose-dependant fashion as calculated by linear regression ($R^2 = 0.99; 0.97; 0.78$ for ER α and $0.97; 0.99; 0.87$ for ER β , respectively). For ER α , a significant increase in transcriptional activity is obtained with 1 and 10 μM of G, D and E ($12.8 \pm 3.6; 17.9 \pm 1.2, 4.8 \pm 1.0; 7.1 \pm 1.2$ and $11.7 \pm 3.4; 12.1 \pm 2.2$ fold increase compared to control, respectively). For ER β , 1 and 10 μM of G and D induce a significant increase ($2.9 \pm 0.4; 3.9 \pm 0.6$ and $2.1 \pm 0.4; 2.3 \pm 0.2$ fold increase compared to control) while only the highest concentration of E induces a significant effect (2.9 ± 0.6 fold increase compared to control). G, D and E (10 μM) induce a significant ER α and ER β transactivation similar to the one induced by 10 nM E2 (Figure 1). E2, G, D and E effects on both ER are completely abolished by treatment with 1 μM ICI (data not shown). The ER β -induced transactivation by E2 and isoflavones in MCF-7 cells is lower overall than that of ER α . For both ER, transactivation is slightly lower overall when using the estrogen sensitive reporter gene ERE-TK-LUC (data not shown). We observe that similar effects to E2 are typically achieved at concentrations that are 2 or 3 orders of magnitude higher, which can be reached physiologically with a phytoestrogen-rich diet. Serum concentrations of G, D or E are quite different between women from various geographic areas and/or specific diets [12]. For instance, isoflavones concentrations in plasma from 0.2 up to 10 μM have been reported [2, 13]. This is also in accordance with the fact that the relative binding affinity of phytoestrogens, measured on recombinant ER, is generally in the order of 1000-10,000 times less than that of E2 (except for G which has a much higher relative binding affinity in the order of 10-100 times less than E2) [3]. We observed a stronger transactivation (approximately 5 times) of ER α compared to ER β (Figure 1). This is in agreement with previously published data on HEK 293 cells and in Ishikawa cells using different (3ERE-TATA LUC) or similar reporter constructs [3, 14] but in contrast with those of Harris et al., which showed no difference between ER α and ER β in transfected MCF-7 cells [15]. However, this stronger activation seems to be corroborated by the study of Manas *et al.*, in 2004 showing essentially no difference in the structural determinations between the ER α -LBD and the ER β -LBD bound to G [16].

Previously published data has often given contradictory results for phytoestrogens, suggesting that the estrogenic and/or anti-estrogenic activity of these structurally diverse natural compounds is complex. Therefore, it was of particular interest to determine the precise

mechanisms of the action of G, D and E on ER α transcriptional activation. The use of ER α constructs expressed in ER-negative backgrounds has been a powerful technique for studying the function of various domains in the ER [7-10]. To examine the role of the different AF of the ER α -induced transactivation by G, D and E in different cellular backgrounds, we used expression vectors of full length ER α (ER α 66) or truncated ER α in the A/B domain (ER α Δ 79, ER α 46). ER α Δ 79 construct is deleted from the first 79 amino acids and therefore from the AF-1 box 1 sub-region. ER α 46 is deleted from the A/B domains and therefore from the entire AF-1 (box 1 and box 2/3 sub-regions). Thus, a similar activity of the three receptors is inherent in a strict AF-2 activity, whereas higher transcriptional activity of ER α 66 or ER α 66 and ER α Δ 79 defines a box 1 or box 2/3 activity, respectively. This was done by comparing the transcriptional efficiency of different ER α constructs on estrogen sensitive reporter genes in MCF-7 as well as in HeLa and HepG2 epithelial cell lines, which both have opposite AF permissiveness.

Similar expression of the different ER α variants in all cell lines was controlled by Western blots (data not shown). In MCF-7 cells, G, D and E (10 μ M) present the same transactivation profile of ER α constructs as E2 (10 nM) *i.e.* a higher transactivation of both ER α 66 and ER α Δ 79 than ER α 46 (Figure 2A). Furthermore, while the E2 and E effects are quantitatively similar on the three constructs, G-induced transactivation of ER α 66 and ER α Δ 79 is higher and D-induced transactivation of ER α Δ 79 is lower compared to the E2 effects. ICI (1 μ M) completely blocked the effects of E2 and of isoflavones and E (data not shown). These results indicate that, in MCF-7 cells, transactivation of ER α by isoflavones and E is mainly mediated through AF-1 and that deletion of AF-1 box 1 sub-region has no effect on ER α -induced transactivation.

It is well known that ER α serine 118 (Ser 118) phosphorylation modulates box 2/3 activity of AF-1 function [5]. To further investigate the mechanisms of the action of isoflavones and E to induce ER α transcriptional activity, cells were transfected with another construct, ER α Δ 79S118A, deleted from the first 79 amino acids and with the Ser 118 replaced by an Ala. The replacement of Ser 118 inhibits the ER α Δ 79 induced transcriptional activity by E2, G, D and E in MCF-7 cells (Figure 2B) as well as in HeLa and HepG2 cell lines (data not shown). Therefore, in MCF-7 cells, G, D, E and E2, induce ER α transcriptional activity mainly through the box 2/3 of the AF-1 domain, and involve the phosphorylation of the Ser 118.

In HepG2, a strict AF-1 permissive cell line, all compounds have the same transactivation profile for the three ER α constructs (Figure 2C). For the phytoestrogens tested, HepG2 cells are highly permissive to the transcriptional activity of ER α , which relies mainly on the box 1 of the AF-1 domain ($\approx 60\%$). Furthermore, G, D and E effects were not quantitatively different from those induced by E2.

In HeLa, the AF-2 permissive cell line, ER α is induced slightly compared to HepG2 (Figure 2D). This transactivation is mainly ensured by AF-2 (ER $\alpha_{66} \approx$ ER α_{46}). However, deletion of the box 1 and the A domain (ER $\alpha_{\Delta 79}$), previously identified as an internal structural repressor [6], enhances ER α activity therefore allowing a stronger transactivation through AF-1 box 2/3 (ER $\alpha_{\Delta 79}$ vs ER $\alpha_{66} \approx$ ER α_{46}). G and E present the same transactivation profile as E2, with a similar transactivation of ER α_{66} and ER α_{46} and a higher ER $\alpha_{\Delta 79}$ transactivation. The G, E and E2 effects are quantitatively similar. Interestingly, D transactivates equally both ER α_{66} and ER $\alpha_{\Delta 79}$ in a significantly higher manner than E2 while ER α_{46} -induced transactivation is similar. This suggests that D is more potent than E2 in an AF-2 cellular background in inducing transactivation through box 2/3 and/or in preventing structural repression by box 1.

It appears that the ability of phytoestrogens to act as ER agonists varies between cell types. Our results indicate that regardless the cellular background *i.e.* AF sensitivity, G, D, E and E2 induce a similar transcriptional activation of ER α . More particularly, ER α transcriptional activation by isoflavones and equol involve their capacity to act mainly through AF-1 regardless of the cellular background. Previous studies show that differences among SERM, including antiestrogens, xenoestrogens and phytoestrogens, can be observed in cells transfected with variant forms of ER α [7, 8, 17-19]. They conclude that the estrogenic potency of compounds is a complicated phenomenon which results from a number of factors, such as the differential effects on the transactivation functionalities of the receptor, the particular co-activators recruited, the cell- and target promoter-contexts and the cell differentiation stage [7-10].

These particular phytoestrogens have the same mechanisms of action than E2 on ER α in MCF-7. Having established that isoflavones and E are ER activators, we wanted to confirm these effects on more complex physiological responses, such as ER α expression and cell proliferation. E2 is known to down regulate the levels of ER α in breast cancer cell lines through an increased turnover of the E2-activated ER α protein and a reduced transcription

rate of its own gene [20]. This down-regulation represents an additional hallmark of the activation of ER α by an agonist. This prompted us to check whether ER α mRNA and protein levels are sensitive to isoflavones and E in MCF-7 cells. G, D and E (10 μ M, 24 h) down-regulate ER α mRNA levels in a similar extent to 10 nM of E2 (data not shown). Using the same treatment, we also observe a down-regulation of ER α 66 protein content with G, D and E similar to the one induced by E2 (Figure 3A). These results confirm previously published studies in MCF-7 cells [21, 22]. In contrast, only G significantly decreases ER α 46 protein content, while there was no change with E2, D and E. This effect could be explained by G having an ER-independent effect such as the inhibition of tyrosine kinase or the induction of c-fos [23]. The effects of G, D and E on ER α protein expression were unchanged in presence of E2 (data not shown).

Estrogens are decisive actors responsible for the proliferation and differentiation of normal mammary epithelial cells as well as the development and progression of breast cancer. We then analyzed the effects of these compounds on the proliferation of estrogen-dependant MCF-7 cells, in the presence or absence of charcoal-stripped FCS. Figures 3B and C show that isoflavones, E and E2 stimulate the proliferation of MCF-7 cells to a similar extent in the presence or absence of FCS. The effects of G, D and E on MCF-7 cell proliferation were similar at 1 μ M and unchanged in presence of E2 (data not shown). ICI (1 μ M) completely blocked the E2, the isoflavones and E-induced MCF-7 cell proliferation (data not shown). There seems now to be a general consensus view that in MCF-7 cells, G has biphasic effects on cell growth such that, at low concentrations, it acts as an estrogen agonist through the ER, whilst at higher concentration it inhibits cell growth through non-ER pathways [21]. However, our results are in accordance with those classically described for lower concentrations of phytoestrogens in MCF-7 cells [22, 24, 25] and are consistent with the demonstration that full activity of the AF-1 domain is required for the E2-dependant proliferation of ER α positive breast cancer cell lines [17].

Concluding remarks

Understanding how natural estrogens elicit clinical selective effects is a key to the development of safer estrogens for HRT. We have shown that isoflavones (G and D), E and estrogens (E2) have similar effects on ER α transcriptional activation, on ER α expression regulation and on MCF-7 cell proliferation. More precisely, the molecular mechanisms for ER α transcriptional activation by isoflavones and equol involve their capacity to act mainly through AF-1 and genistein, daidzein and equol have similar estrogenic properties to E2 on ER α expression and on MCF-7 cell proliferation. This study confirms that phytoestrogens are SERM with estrogenic activities.

The declining use of HRT may mean that more women are using phytoestrogens supplements as a natural alternative to HRT despite the fact that there is no good evidence that they reduce menopausal symptoms much beyond a placebo effect. These supplements are available as over the counter drugs and they vary widely in their phytoestrogen content [26]. In conclusion, advocating soy-rich food or even isoflavone-based pills for women without medical follow-up should be considered critically. Moreover, it also follows that the diet of breast cancer patients should be matched carefully with their particular tumor types.

Acknowledgments

Charlotte Carreau's thesis work is supported by a Région Aquitaine Grant (N° 20034380908). We are grateful to Dr. Svitlana Shinkaruk for providing genistein, daidzein and equol through chemical synthesis. We would like to thank the members of the "Récepteurs aux Estrogènes et Destinée cellulaire" lab (UMR CNRS 6026, Rennes, France) for providing plasmids pSG5, pSG human (h)ER α 66 (HEO), pSG ER α 46 and pSGER α Δ 79 and the luciferase reporter plasmids ERE-TK-LUC and hC3-LUC. Many thanks to Pr. J.A. Gustafsson's department (Dpt Biosciences and Medical Nutrition, Karolinska Institute, Sweden) for providing the expression vector for ER β (pSG5hER β). We are indebted to Russell Wallace for the revision of the English text.

References

- [1] Althuis, M. D., Dozier, J. M., Anderson, W. F., Devesa, S. S., Brinton, L. A., Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997, *Int.J.Epidemiol.* 2005, *34*, 405-412.
- [2] Setchell, K. D., Cassidy, A., Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health, *J.Nutr.* 1999, *129*, 758S-767S.
- [3] Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., *et al.*, Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta, *Endocrinology* 1998, *139*, 4252-4263.
- [4] Rice, S., Whitehead, S. A., Phytoestrogens, oestrogen synthesis and breast cancer, *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 2008, *108*, 186-95.
- [5] Ali, S., Metzger, D., Bornert, J. M., Chambon, P., Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region, *EMBO J.* 1993, *12*, 1153-1160.
- [6] Metivier, R., Penot, G., Flouriot, G., Pakdel, F., Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains, *Mol.Endocrinol.* 2001, *15*, 1953-1970.
- [7] Berry, M., Metzger, D., Chambon, P., Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen, *EMBO J.* 1990, *9*, 2811-2818.
- [8] Tzukerman, M. T., Esty, A., Santiso-Mere, D., Danielian, P., *et al.*, Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions, *Mol.Endocrinol.* 1994, *8*, 21-30.
- [9] Merot, Y., Metivier, R., Penot, G., Manu, D., *et al.*, The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell, *J.Biol.Chem.* 2004, *279*, 26184-26191.
- [10] Huet, G., Merot, Y., Le Dily, F., Kern, L., *et al.*, Loss of E-cadherin-mediated cell contacts reduces estrogen receptor alpha (ER alpha) transcriptional efficiency by affecting the respective contribution exerted by AF1 and AF2 transactivation functions, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2008, *365*, 304-309.

- [11] Potier, M., Elliot, S. J., Tack, I., Lenz, O., *et al.*, Expression and regulation of estrogen receptors in mesangial cells: influence on matrix metalloproteinase-9, *J.Am.Soc.Nephrol.* 2001, *12*, 241-251.
- [12] Lampe, J. W., Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers, *J.Nutr.* 2003, *133 Suppl 3*, 956S-964S.
- [13] Mathey, J., Lamothe, V., Coxam, V., Potier, M., *et al.*, Concentrations of isoflavones in plasma and urine of post-menopausal women chronically ingesting high quantities of soy isoflavones, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 2006, *41*, 957-965.
- [14] Mueller, S. O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M., Korach, K. S., Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells, *Toxicol.Sci.* 2004, *80*, 14-25.
- [15] Harris, D. M., Besselink, E., Henning, S. M., Go, V. L., Heber, D., Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha- or Beta-mediated responses in transfected breast cancer cells, *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*. 2005, *230*, 558-568.
- [16] Manas, E. S., Xu, Z. B., Unwalla, R. J., Somers, W. S., Understanding the selectivity of genistein for human estrogen receptor-beta using X-ray crystallography and computational methods, *Structure.* 2004, *12*, 2197-2207.
- [17] Fujita, T., Kobayashi, Y., Wada, O., Tateishi, Y., *et al.*, Full activation of estrogen receptor alpha activation function-1 induces proliferation of breast cancer cells, *J.Biol.Chem.* 2003, *278*, 26704-26714.
- [18] Yoon, K., Pallaroni, L., Stoner, M., Gaido, K., Safe, S., Differential activation of wild-type and variant forms of estrogen receptor alpha by synthetic and natural estrogenic compounds using a promoter containing three estrogen-responsive elements, *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 2001, *78*, 25-32.
- [19] Wu, F., Safe, S., Differential activation of wild-type estrogen receptor alpha and C-terminal deletion mutants by estrogens, antiestrogens and xenoestrogens in breast cancer cells, *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 2007, *103*, 1-9.
- [20] Reid, G., Hubner, M. R., Metivier, R., Brand, H., *et al.*, Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling, *Mol.Cell.* 2003, *11*, 695-707.
- [21] Maggiolini, M., Bonofiglio, D., Marsico, S., Panno, M. L., *et al.*, Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells, *Mol.Pharmacol.* 2001, *60*, 595-602.

- [22] Seo, H. S., DeNardo, D. G., Jacquot, Y., Laios, I., *et al.*, Stimulatory effect of genistein and apigenin on the growth of breast cancer cells correlates with their ability to activate ER alpha, *Breast Cancer Res.Treat.* 2006, 99, 121-134.
- [23] Maggiolini, M., Vivacqua, A., Fasanella, G., Recchia, A. G., *et al.*, The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells, *J.Biol.Chem.* 2004, 279, 27008-27016.
- [24] Matsumura, A., Ghosh, A., Pope, G. S., Darbre, P. D., Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells, *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 2005, 94, 431-443.
- [25] Schmidt, S., Michna, H., Diel, P., Combinatory effects of phytoestrogens and 17beta-estradiol on proliferation and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells, *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 2005, 94, 445-449.
- [26] Vergne, S., Bennetau-Pelissero, C., Lamothe, V., Chantre, P., *et al.*, Higher bioavailability of isoflavones after a single ingestion of a soya-based supplement than a soya-based food in young healthy males, *Br.J.Nutr.* 2008, 99, 333-344.

Figures and legends

FIGURE 1

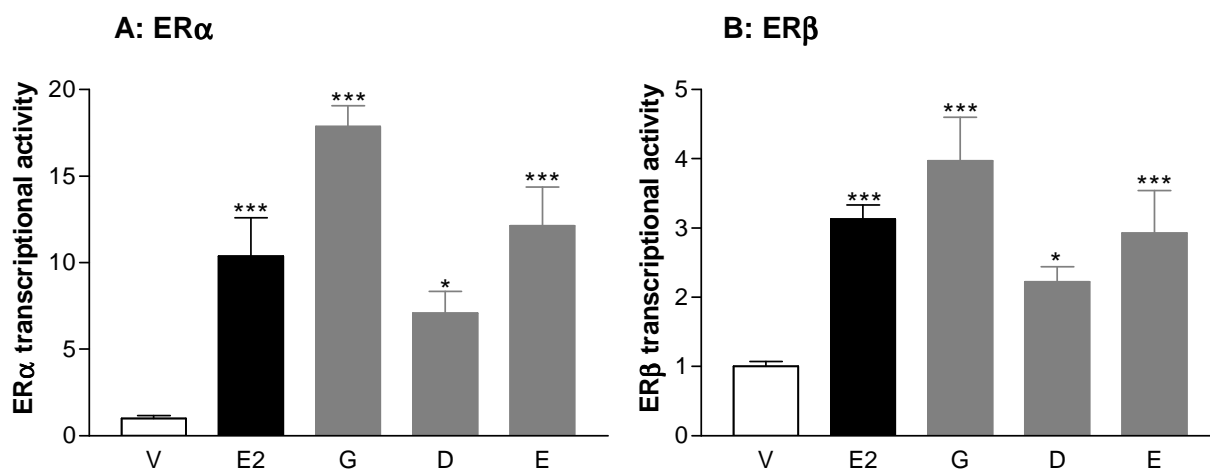


Figure 1: Transcriptional activation of ER by isoflavones and equol in MCF-7. The effects of V (EtOH, 0.1%), E2 (10 nM), G, D and E (10 μ M) on ER transcriptional activity. Cells were co-transfected with ER α (A) or ER β (B) and the hC3-LUC. Data are expressed as reporter fold induction compared to V-treated cells. Shown are means \pm SEM of 6-10 independent transfection experiments, each performed in triplicate wells. Comparisons between experimental conditions were performed by a one way ANOVA followed by Dunnett's test and/or a student's *t*-test when applicable. Statistical significance is indicated by * and *** for comparison to control (V-treated cells) for $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively.

FIGURE 2

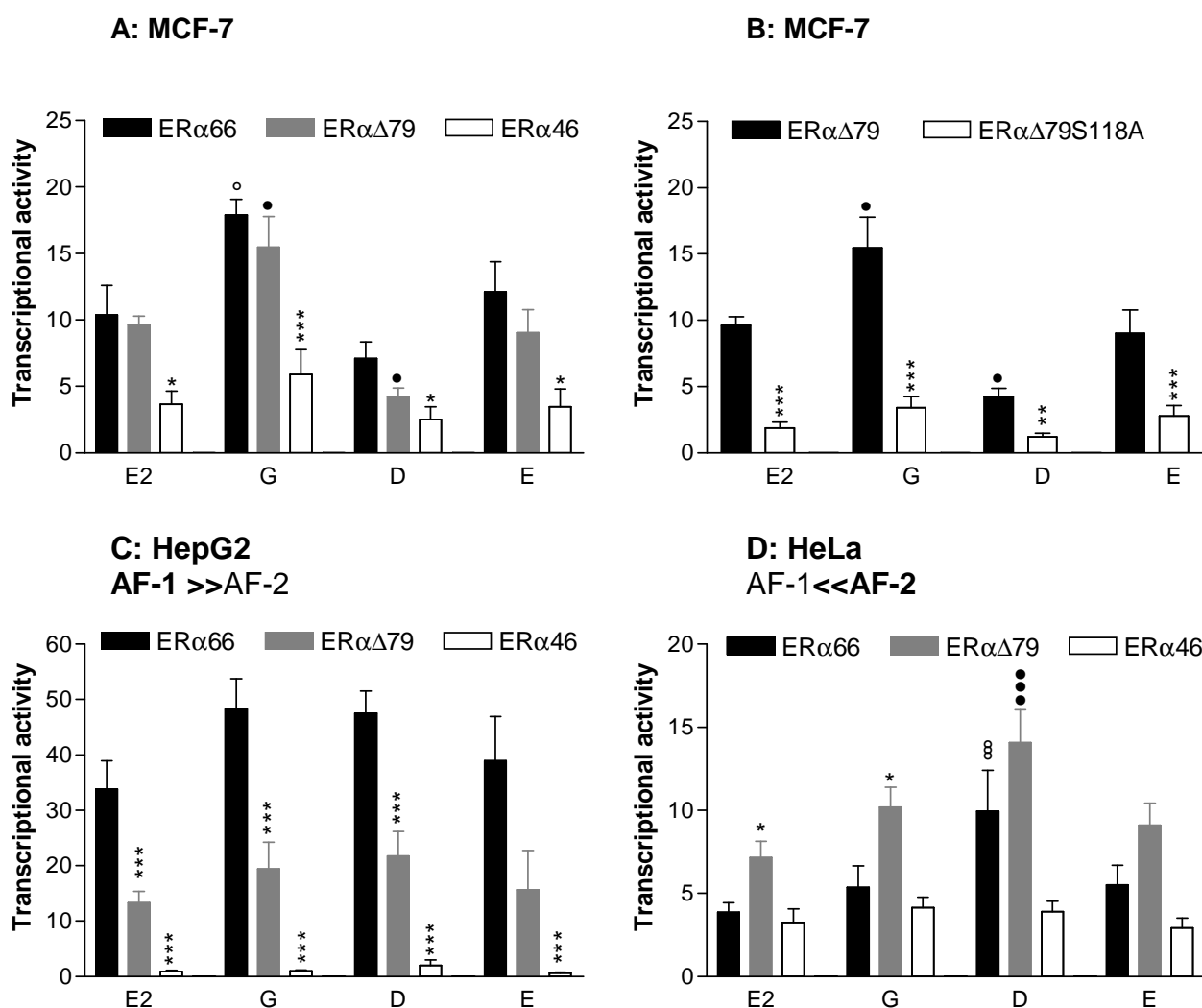


Figure 2: Transcriptional activation of ERα by isoflavones and equol in different cell lines.

Transcriptional activity of different ERα constructs was determined using hC3-LUC in MCF-7 cells (A, B) or ERE-TK-LUC in HepG2 (C) and HeLa cells (D). Data are expressed as reporter fold induction. Shown are means±SEM of 6-10 independent transfection experiments, each performed in triplicate wells. Comparisons between experimental conditions were performed by a one way ANOVA followed by Dunnett's test and/or a student's *t*-test when applicable. Statistical significance is indicated by * symbol for comparison to ERα66-transfected cells (black bars) within groups for a same compound, symbols ^o or [•] were used for comparison to E2-treated cells for a same ERα construct. One, 2 and 3 symbols were used to express significance for *p*<0.05, *p*<0.01 and *p*<0.001, respectively.

FIGURE 3

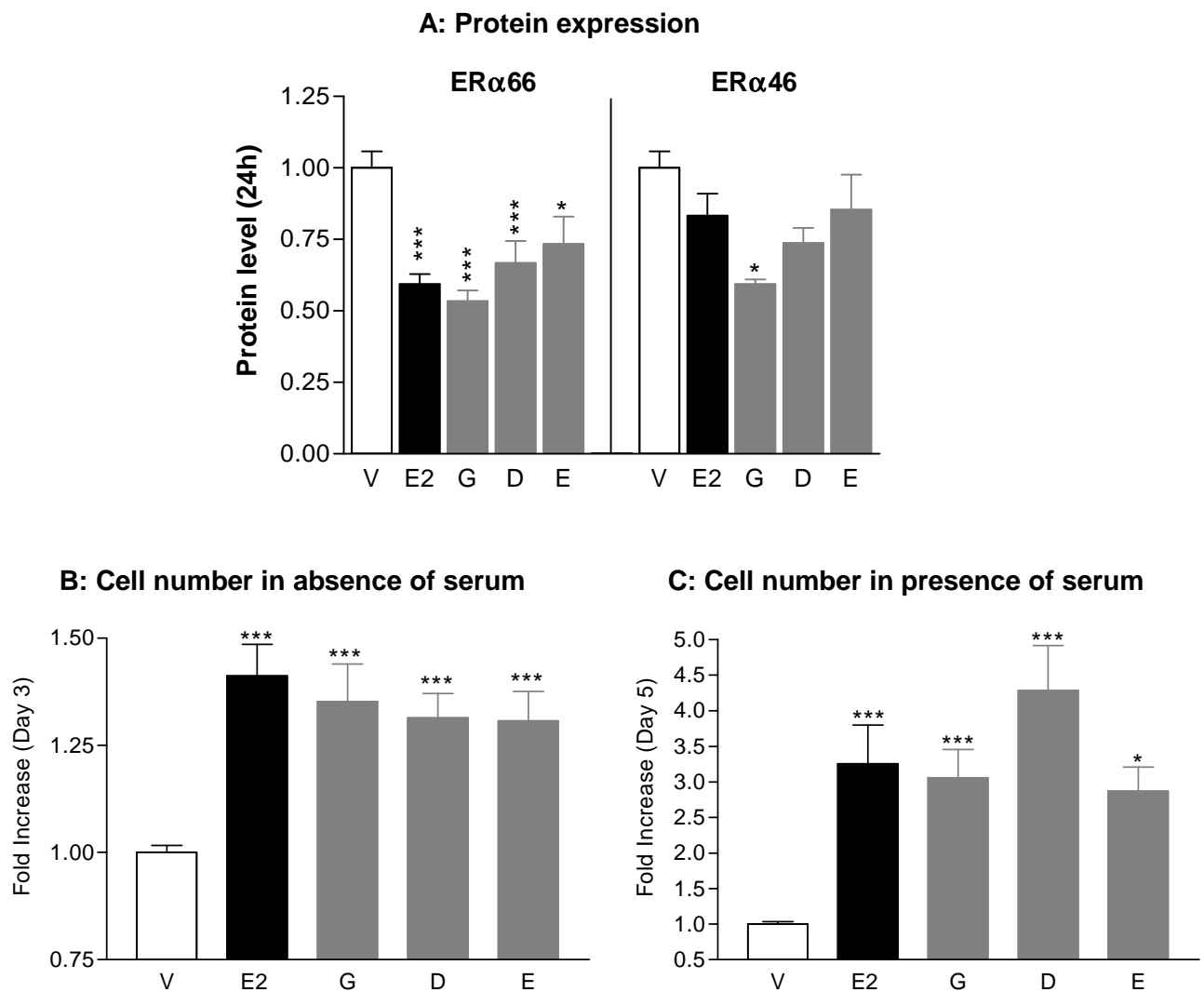


Figure 3: Effects of isoflavones and equol on ER α protein levels and cell proliferation in MCF-7. The effects of V (EtOH 0.1%), E2 (10 nM), G, D and E (10 μ M) on ER α protein levels (A) and on the number of MCF-7 cells in the absence (B, day 3) or the presence (C, day 5) of 2.5% charcoal-stripped FCS. Data are expressed as fold increase compared to control (V-treated cells). Shown are means \pm SEM of 4-5 independent experiments, each performed in duplicate wells. Comparisons between experimental conditions were performed by a one way ANOVA followed by Dunnett's test. Statistical significance versus control is indicated by * and *** for $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively.

IV. LES FLAVANONES, RESULTATS PRELIMINAIRES

A. Contexte de l'étude

La Nar et la 8-PN, deux PE de la famille des flavanones, sont présents essentiellement dans les agrumes et le houblon (**figure 41**). A ce jour, des compléments alimentaires à base d'extraits de houblon et/ou de 8-PN sont accessibles à tous afin de lutter contre les symptômes de la ménopause et leur mise sur le marché ne relève pas de norme drastique. Par ailleurs, ils présentent une alternative intéressante aux isoflavones de soja à double titre : le soja non génétiquement modifié devient de plus en plus difficile à trouver, ce qui peut constituer un frein pour les femmes qui se tourneraient vers les compléments alimentaires. De plus, les extraits peuvent être préparés de manière à contenir des acides amers de houblon dont les vertues calmantes sont connues depuis très longtemps et pourraient agir en complément des œstrogènes sur les troubles de la ménopause (Possemiers *et al.*, 2006).

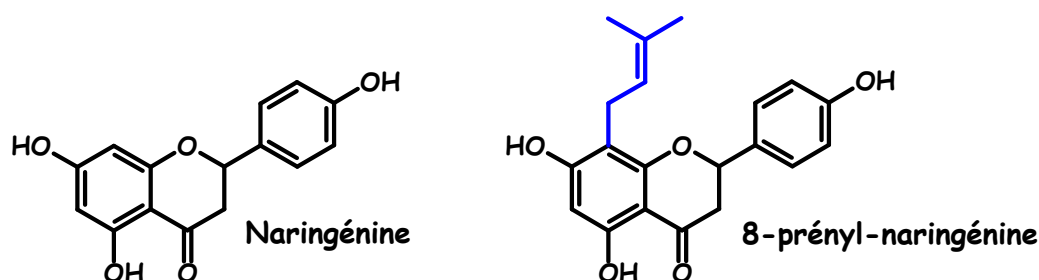


Figure 41. Structures chimiques de la Nar et de la 8-PN

Ces deux molécules diffèrent entre elles par la présence d'un groupement prényl en position 8. Ce groupement confère à la 8-PN une affinité élevée pour le LBD du RE α , et une activité œstrogénique importante *in vivo* et *in vitro* (Milligan *et al.*, 2002 ; Zierau *et al.*, 2005). Les effets de la Nar *in vitro* sont encore controversés (Schaefer *et al.*, 2003 ; Harris *et al.*, 2005). Les mécanismes d'action des flavanones au niveau des RE ne sont pas clairement élucidés.

L'hypothèse de départ est que la 8-PN, grâce à la présence du groupement prényl, posséderait un mécanisme moléculaire d'activation des RE distinct de celui de la Nar, ce qui

aurait pour conséquence une régulation de l'expression des RE différente entre ces deux composés.

Comme pour les études sur les entérolignanes et les isoflavones, nous avons testé les effets de la Nar et de la 8-PN sur l'activation transcriptionnelle des RE α et RE β . Puis nous avons mis en évidence l'implication des domaines de transactivation AF-1 et AF-2 dans cette activation. Par ailleurs, les effets pro- ou anti-œstrogéniques de la Nar et de la 8-PN ont été étudiés : sur la transcription d'un gène régulé par l'E₂, pS2, sur l'expression protéique des deux formes endogènes de RE α et sur la prolifération des MCF-7.

B. Effets de la Nar et la 8-PN sur l'activation transcriptionnelle des RE dans les MCF-7

Des transfections ont été réalisées dans les MCF-7 avec différentes constructions : RE α ou RE β et le vecteur rapporteur C3-LUC. Nous avons utilisé des concentrations de 1 μ M pour la Nar et la 8-PN. Ces résultats sont présentés dans la **figure 42**.

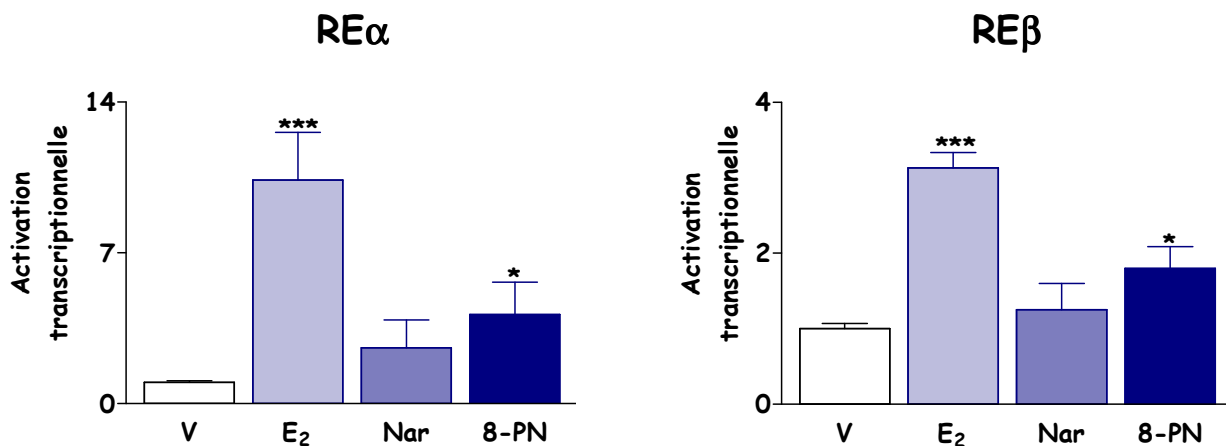


Figure 42. Effets de l'E₂, la Nar et la 8-PN sur l'activation transcriptionnelle de RE α et de RE β dans les MCF-7

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 3 expériences de transfections indépendantes réalisées chacune en triplicata.

* et *** (p<0,05 et p<0,001) pour la comparaison par rapport aux conditions contrôles.

La 8-PN induit l'activation transcriptionnelle de RE α , mais de façon moins importante que l'E₂, alors que la Nar n'a pas d'effet significatif ($10,4 \pm 2,2$, $4,1 \pm 1,5$ et $2,6 \pm 1,3$ respectivement pour l'E₂, la 8-PN et la Nar). De même, pour le RE β , l'E₂ et la 8-PN, mais pas la Nar, induisent une activation transcriptionnelle significative par rapport au contrôle ($3,1 \pm 0,2$, $1,8 \pm 0,3$ et $1,3 \pm 0,4$ respectivement pour l'E₂, la 8-PN et la Nar).

L'activation transcriptionnelle de RE α induite par la 8-PN est plus forte que celle de RE β (2,3 fois plus forte). De même, l'effet de la Nar est plus fort pour RE α que pour RE β .

C. Rôle des domaines de transactivation AF dans l'activation transcriptionnelle de RE

Afin de déterminer l'implication des domaines AF dans l'activation transcriptionnelle de RE induite par la Nar et la 8-PN, des transfections ont été réalisées dans les cellules MCF-7 avec les différentes constructions : RE α 66, RE α Δ 79 ou RE α 46 (**figure 43**).

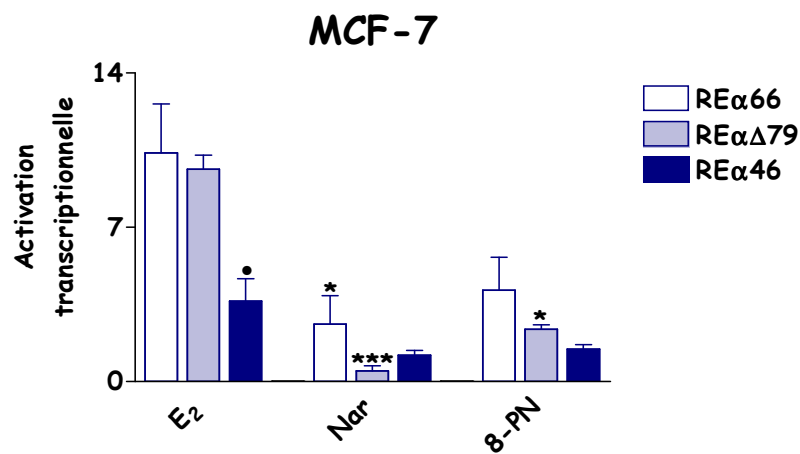


Figure 43. Effets de l'E₂, la Nar et la 8-PN sur l'activation transcriptionnelle des différentes constructions du RE α dans les MCF-7

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 3 expériences de transfections indépendantes réalisées chacune en triplicata.

- ($p < 0,05$) pour la comparaison entre les différentes constructions pour une même molécule.

- * et *** ($p < 0,05$ et $p < 0,001$) pour la comparaison entre les flavanones et l'E₂ pour une même construction

L'effet de l'E₂ est supérieur à celui de la Nar et de la 8-PN avec toutes les constructions étudiées. L'activation transcriptionnelle de RE α 66 induite par l'E₂, la Nar et la 8-PN est supérieure à celle de RE α 46 ($10,4 \pm 0,9$ et $3,7 \pm 1$ pour l'E₂, $p < 0,05$; $2,6 \pm 1,3$ et $1,2 \pm 0,2$ pour la Nar et $4,1 \pm 1,5$ et $1,5 \pm 0,2$ pour la 8-PN). Ces résultats montrent le rôle majeur du domaine AF-1 dans les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation transcriptionnelle de RE α par ces molécules dans les MCF-7. Le rôle des deux boîtes A1 et A2 du domaine AF-1 dans l'activation transcriptionnelle de RE α a donc été examiné plus en détails. Lorsque la boîte A1 est délétée, l'activation transcriptionnelle induite par l'E₂ reste inchangée ($10,4 \pm 2,2$ et $9,6 \pm 0,6$), celle induite par la 8-PN est légèrement diminuée ($4,1 \pm 1,5$ et $2,4 \pm 0,2$) et celle induite par la Nar est complètement inhibée ($2,6 \pm 1,3$ et $0,6 \pm 0,1$).

Dans les MCF-7, la Nar et la 8-PN n'activent pas la transcription du RE α selon les mêmes mécanismes moléculaires. La présence ou l'absence de la boîte A1 ne modifie pas l'activation de la transcription de RE α par l'E₂. En revanche, la boîte A1 est absolument nécessaire à la Nar pour induire une activation et participe faiblement aux effets de la 8-PN. De ce fait, l'activation transcriptionnelle de RE α induite par l'E₂ et par la 8-PN implique principalement le domaine AF-1 (boîtes A2/3) et de façon moindre le domaine AF-2. En revanche, l'activation transcriptionnelle de RE α induite par la Nar est beaucoup plus faible et fait intervenir la boîte A1 du domaine AF-1.

Ces résultats nous ont incités à étudier plus précisément les mécanismes d'activation de la Nar et de la 8-PN dans nos différents modèles cellulaires.

D. Rôles des domaines de transactivation AF dans l'activation transcriptionnelle des différentes formes de RE α

Pour déterminer le rôle précis des domaines de transactivation AF-1 et AF-2 dans l'activation transcriptionnelle de RE α induite par les flavanones, les lignées cellulaires HeLa et HepG2 ont été transfectées avec RE α 66 et le vecteur rapporteur ERE-TK-LUC (**figure 44**).

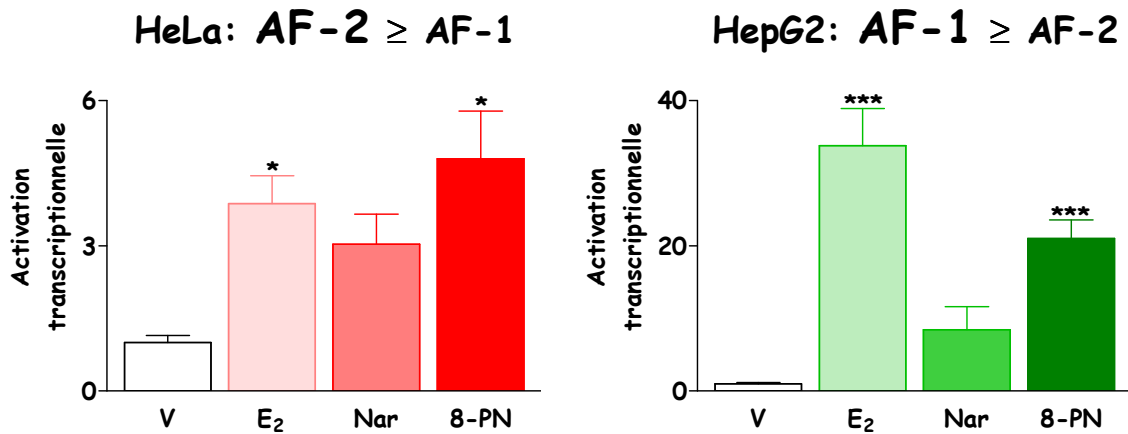


Figure 44. Effets de l'E₂, la Nar et la 8-PN sur l'activation transcriptionnelle du REα66 dans les HeLa et HepG2

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM de 3 expériences de transfections indépendantes réalisées chacune en triplicata.

* et *** (p<0,05 et p<0,001) pour la comparaison par rapport aux conditions contrôles.

Dans les HeLa, l'E₂ et la 8-PN induisent une activation transcriptionnelle de REα66 équivalente (respectivement 3,9 ± 0,6 et 4,8 ± 1,0 d'activation). La Nar induit une activation transcriptionnelle plus faible de REα66 (3,0 ± 0,6).

De même, dans les HepG2, l'E₂ et de la 8-PN induisent une activation transcriptionnelle de REα66 (respectivement 33,8 ± 5,1 et 21 ± 2,5 d'activation), mais de nouveau, la Nar, dans ce contexte cellulaire, induit une activation transcriptionnelle plus faible de REα66 (8,5 ± 3,1).

Quel que soit le contexte cellulaire AF-1 ou AF-2, l'activation transcriptionnelle de REα est plus importante avec la 8-PN qu'avec la Nar.

L'impact des différents domaines de transactivation AF et des boîtes composant le domaine AF-1 sur l'activation transcriptionnelle induite par la Nar et la 8-PN a été mesuré à l'aide de transfections transitoires dans les cellules HeLa et HepG2 (**figure 45**).

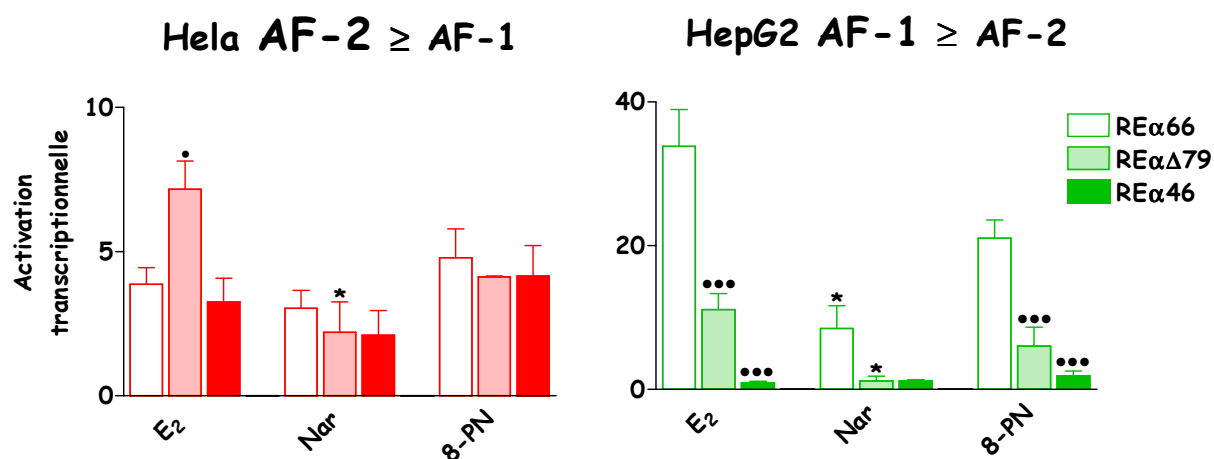


Figure 45. Effets de l'E₂, la Nar et la 8-PN sur l'activation transcriptionnelle des différentes constructions du REα dans les HeLa et HepG2

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM de 3 expériences de transfections indépendantes réalisées chacune en triplicata.

• et *** (p<0,05 et p<0,001) pour la comparaison entre les différentes constructions pour une même molécule.

* (p<0,05) pour la comparaison entre les flavanones et l'E₂ pour une même construction

Dans les HeLa, la Nar et la 8-PN induisent une activation transcriptionnelle similaire de REα66 ($3,0 \pm 0,6$ et $4,8 \pm 1,0$ respectivement pour la Nar et la 8-PN) et de REα46 ($2,1 \pm 0,9$ et $4,2 \pm 1,0$ respectivement pour la Nar et la 8-PN). Lorsque la boîte A1 du domaine AF-1 est déléetée avec la Nar et la 8-PN (respectivement $2,2 \pm 1,0$ et $4,1 \pm 0,1$). L'absence de la boîte A1 n'induit donc pas d'augmentation, comme avec l'E₂. Dans ce contexte cellulaire AF-2, même si la Nar induit une activation transcriptionnelle de REα plus faible que l'E₂ et la 8-PN, les trois profils d'activation sont similaires. L'absence de la boîte A1 ne modifie pas l'activation transcriptionnelle induite par les flavanones.

Dans les HepG2, l'activation transcriptionnelle de REα66 par l'E₂ et la 8-PN est similaire ($33,8 \pm 5,1$ et $21,0 \pm 2,5$), alors qu'elle est nettement plus faible avec la Nar ($8,5 \pm 3,1$, p<0,05). De la même façon, la Nar et la 8-PN, en absence du domaine AF-1, ne sont pas capables d'induire REα46 ($1,2 \pm 0,2$ pour la Nar et $1,9 \pm 0,7$ pour la 8-PN). Si seule la boîte A1 du domaine AF-1 est déléetée (REαΔ79), l'activation transcriptionnelle induite par la 8-PN est nettement diminuée par rapport à celle de REα66 ($6,0 \pm 2,6$ et $21,0 \pm 2,5$, p<0,001), alors que cette activation est complètement abolie avec la Nar ($1,2 \pm 0,6$ et $8,5 \pm 3,1$).

Dans un contexte cellulaire AF-1, la présence de la boîte A1 est absolument nécessaire pour l'activation transcriptionnelle de REα induite par la Nar, alors que pour la 8-PN, toutes

les boîtes du domaine AF-1 semblent intervenir. Le profil d'activation de la 8-PN est similaire à l'E₂, alors que celui de la Nar est différent. La Nar et la 8-PN induisent une activation transcriptionnelle de RE α par des mécanismes moléculaires différents.

Après l'étude des mécanismes d'action des flavanones sur l'activation transcriptionnelle du RE, leurs effets œstrogéno-dépendants ont été étudiés.

E. Effets œstrogéniques des flavanones dans les cellules MCF-7

1. Détection protéique de RE α

Pour déterminer les effets pro- ou anti-œstrogéniques des flavanones, nous avons mesuré le niveau d'expression protéique des RE α dans les MCF-7 (**figure 47**).

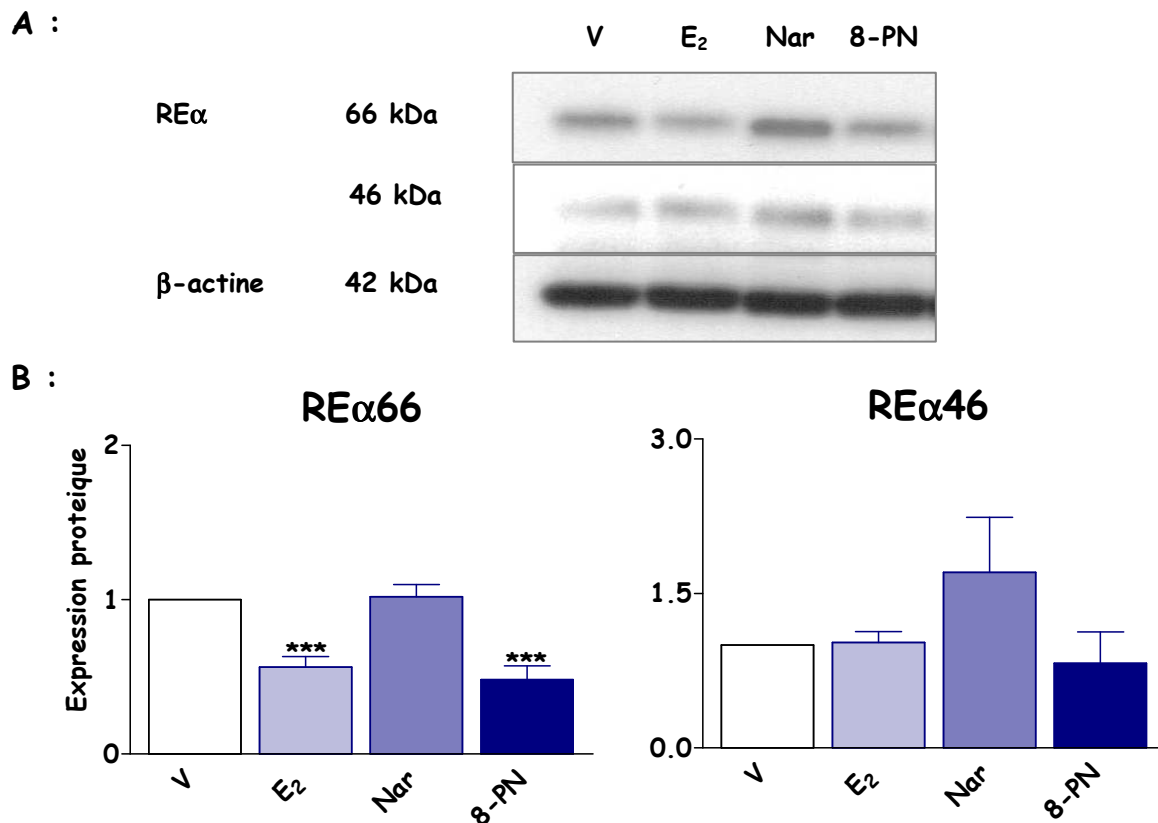


Figure 46. Effets de l'E₂, la Nar et la 8-PN sur l'expression de RE α 66 et RE α 46

A : Western Blot révélant la production de RE α 66, RE α 46 et la β -actine par les MCF-7 contrôles (V) ou traitées pendant 24 h.

B : Expression protéique après chaque traitement. Les résultats sont exprimés sous forme d'intensité relative par rapport aux conditions contrôles.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes.

*** ($p < 0,001$) pour la comparaison par rapport aux conditions contrôles

L'E₂ et la 8-PN diminuent RE α 66 ($0,6 \pm 0,1$ et $0,5 \pm 0,1$ respectivement, $p < 0,001$). Au contraire, la Nar n'a pas d'effet RE α 66 ($1,0 \pm 0,1$). L'expression de RE α 46 n'est pas modifiée ($1,0 \pm 0,1$, $1,7 \pm 0,5$ et $0,8 \pm 0,3$ respectivement pour l'E₂, la Nar et la 8-PN). Ces résultats montrent donc que, dans les MCF-7, la 8-PN a une action pro-œstrogénique sur l'expression protéique de RE α 66, ce qui n'est pas le cas de la Nar.

2. Régulation du gène codant pS2

L'effet de la Nar et de la 8-PN a été étudié sur la régulation de l'ARNm de pS2 par RT-PCR (figure 46).

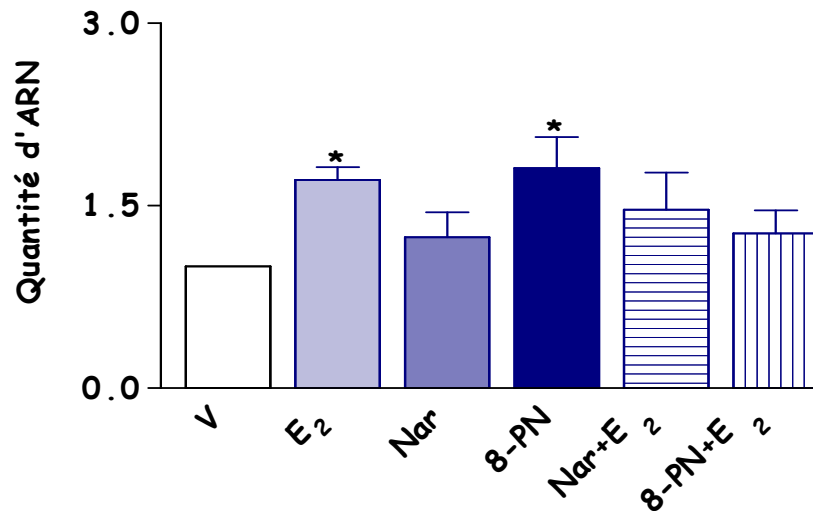


Figure 47. Effets de l'E₂, la Nar et la 8-PN sur l'expression de l'ARNm de pS2

Les résultats sont exprimés sous forme d'intensité relative après chaque traitement par rapport aux conditions contrôles, c'est-à-dire sans traitement.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 6 expériences de RT-PCR indépendantes. * ($p < 0,05$) pour la comparaison entre les différents traitements expérimentaux par rapport au contrôle

L'E₂ et la 8-PN augmentent l'expression d'ARNm de pS2 ($1,7 \pm 0,1$ et $1,8 \pm 0,3$ respectivement, $p < 0,05$), tandis que la Nar n'a pas d'effet ($1,2 \pm 0,2$). Les mélanges d'E₂ et de Nar ou d'E₂ et de 8-PN ne modifient pas l'expression d'ARNm. Dans les MCF-7, la 8-PN a une action pro-œstrogénique sur l'expression de l'ARNm d'un gène régulé par l'E₂, pS2, ce qui n'est pas le cas de la Nar.

3. Prolifération des MCF-7

La **figure 48** présente les effets de la Nar et de la 8-PN sur la prolifération des MCF-7.

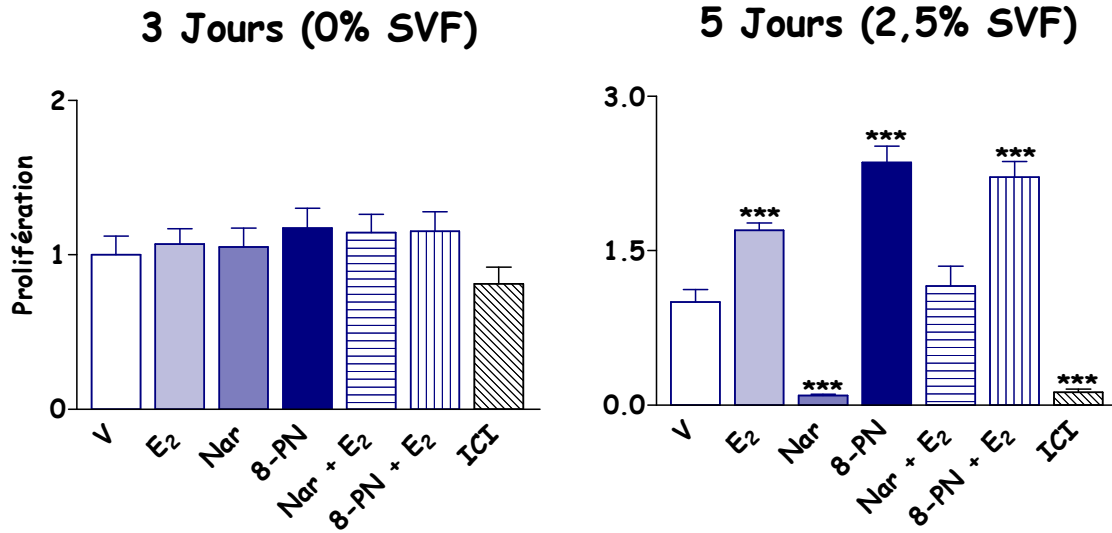


Figure 48. Effets de l'E₂, la Nar et la 8-PN sur la prolifération de MCF-7 après 3 (sans SVF) et 5 jours (avec SVF) de traitement

Chaque valeur représente le nombre de cellules \pm SEM, sur 3 expériences indépendantes faites en duplicata.

*** ($p < 0,001$) pour la comparaison par rapport aux conditions contrôles

Après 3 jours de traitement, il n'y a pas d'effet des flavanones ($1,0 \pm 0,1$ pour le contrôle, $1,1 \pm 0,1$ pour l'E₂, $1,1 \pm 0,1$ pour la Nar et $1,2 \pm 0,1$ pour la 8-PN).

Après 5 jours de traitement, la prolifération des MCF-7 augmente avec l'E₂ ($1,7 \pm 0,1$, $p < 0,001$) et la 8-PN ($2,4 \pm 0,2$, $p < 0,001$). Au contraire, la Nar ne montre pas d'effet sur la prolifération et induit une mort cellulaire, puisque le nombre de cellules est bien inférieur au contrôle ($0,1 \pm 0,01$, $p < 0,001$), équivalent au traitement avec l'ICI ($0,1 \pm 0,03$, $p < 0,001$). Cet effet de la Nar est inhibé par l'E₂ ($1,2 \pm 0,2$).

La 8-PN a donc une action pro-œstrogénique sur la prolifération des MCF-7, contrairement à la Nar, qui induit une mort cellulaire.

F. Conclusion

Ces résultats montrent que la 8-PN et plus faiblement la Nar, induisent l'activation transcriptionnelle des RE. La 8-PN a une activité œstrogénique supérieure à la Nar et supérieure sur RE α que sur RE β .

L'activation transcriptionnelle de RE α induite par la 8-PN passe essentiellement par le domaine AF-1 et ceci quel que soit le contexte cellulaire.

Dans un contexte AF-1, l'activation transcriptionnelle de RE α induite par la Nar est faible, mais pas dans un contexte AF-2, où elle est équivalente à l'E₂ et la 8-PN. Ces résultats indiquent le rôle important du domaine AF-2 dans l'activation transcriptionnelle induite par la Nar.

La 8-PN comme l'E₂, mais pas la Nar, augmente le taux d'ARNm de pS2, diminue l'expression de RE α 66 et augmente la prolifération des MCF-7.

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que la 8-PN des propriétés œstrogéniques comparables à l'E₂.

DISCUSSION

Les PE se lient aux RE et induisent des réponses pro- ou anti-œstrogéniques dans une lignée cancéreuse mammaire, les MCF-7. Plusieurs paramètres peuvent moduler cette réponse, en fonction des concentrations utilisées, du type de récepteur étudié ou encore de la conformation de RE induite par la molécule testée.

Un des premiers points que nous allons évoquer sont les concentrations utilisées au cours de ce travail, réalisé sur des cellules en culture. En effet, les concentrations de PE utilisées dans le travail préliminaire de criblage étaient de 0,1, 1 et 10 μM , tandis que les effets œstrogéniques des PE ont été évalués pour des concentrations d'1 μM pour les flavanones et de 10 μM pour les entérolignanes et les isoflavones.

Le choix de ces concentrations a été motivé par plusieurs raisons. Tout d'abord, les effets observés lors de cette étude préliminaire étaient significatifs à ces concentrations, qui de plus, correspondent aux concentrations circulantes retrouvées dans la littérature.

Pour les entérolignanes, une consommation dite « occidentale traditionnelle » entraîne des concentrations plasmatiques d'entérolignanes (ED et EL confondus) de l'ordre de 10 à 270 nM. Cependant, des concentrations plus élevées (de l'ordre du μM) peuvent être obtenues dans des populations ayant un régime particulièrement riche en lignanes (Lampe, 2003 ; Peeters *et al.*, 2007).

De nombreuses études sur la biodisponibilité des isoflavones ont été réalisées et les concentrations circulantes plasmatiques mesurées. L'ensemble de ces études montre que ces concentrations varient de 0,5 à 10 μM (Setchell *et al.*, 2001 ; Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003 ; Mathey *et al.*, 2006).

Enfin, deux études récentes sur la biodisponibilité des flavanones, réalisées chez l'Homme, ont mesuré des concentrations circulantes de Nar de l'ordre de 6-7 μM après ingestion de gélules (Erlund *et al.*, 2002 ; Kanaze *et al.*, 2007).

Nos résultats, obtenus *in vitro* sur les mécanismes d'action de ces composés pour des concentrations de 1 et 10 μM (légèrement supra-physiologiques), montrent des effets significatifs. Notons cependant que nos résultats obtenus à 1 μM sont équivalents, quoique légèrement plus faibles, que ceux obtenus à 10 μM .

Enfin, les concentrations plasmatiques ne sont pas forcément représentatives des concentrations intra-tissulaires. Par exemple, une étude récente a montré chez l'Homme des

concentrations de daïdzéine et d'équol plus élevées dans le fluide prostatique que dans le plasma (Hedlund *et al.*, 2005).

Les PE testés induisent une activation transcriptionnelle de RE α plus importante que de RE β . Ceci pourrait s'expliquer, en premier lieu, par une différence d'affinité, paramètre qui a déjà été largement étudié dans la littérature.

Les études sur l'affinité des PE pour les RE ont montré qu'ils avaient une plus forte affinité pour le RE β (Kuiper *et al.*, 1997 ; Morito *et al.*, 2002). Malgré la difficulté de comparer entre elles ces diverses études, car les valeurs pour une molécule donnée varient en fonction de la technique utilisée ou encore des conditions expérimentales, nous avons regroupé ces données obtenues sur l'affinité relative des PE pour les RE dans le **tableau 13**.

Tableau 13. RBA (Relative Binding Affinity) de divers PE pour RE α et RE β
L'affinité relative de l'E₂ pour les RE a arbitrairement été fixée à 100

	RE α	RE β	Rapport RBA α /RBA β	Technique de mesure d'affinité utilisée	Référence
Molécule	RBA (%)	RBA (%)			
G	5	36	0,14	compétition in vitro (RE solubilisé)	(Kuiper <i>et al.</i> , 1997)
	4	87	0,05	compétition in vitro (RE en phase solide)	(Kuiper <i>et al.</i> , 1998)
	0,7	13	0,05	compétition in vitro (RE solubilisé)	(Kuiper <i>et al.</i> , 1998)
	0,9	38	0,02	compétition in vitro (RE solubilisé)	(Mueller <i>et al.</i> , 2004)
	0,032	0,86	0,04	compétition sur cellules entières	(Escande <i>et al.</i> , 2006)
	6	79	0,1	compétition in vitro (RE solubilisé)	(Zhu <i>et al.</i> , 2006)
D	0,1	0,5	0,2	compétition in vitro (RE en phase solide)	(Kuiper <i>et al.</i> , 1998)
	0,2	1	0,2	compétition in vitro (RE solubilisé)	(Kuiper <i>et al.</i> , 1998)
	0,015	0,13	0,12	compétition sur cellules entières	(Escande <i>et al.</i> , 2006)
	0,1	2	0,05	compétition in vitro (RE solubilisé)	(Zhu <i>et al.</i> , 2006)
E	0,3	3,7	0,08	compétition in vitro (RE solubilisé)	(Mueller <i>et al.</i> , 2004)
EL	0,07	0,01	7	compétition in vitro (RE solubilisé)	(Mueller <i>et al.</i> , 2004)
C	94	185	0,51	compétition in vitro (RE solubilisé)	(Kuiper <i>et al.</i> , 1997)
	20	140	0,15	compétition in vitro (RE en phase solide)	(Kuiper <i>et al.</i> , 1998)
	34	100	0,34	compétition in vitro (RE solubilisé)	(Kuiper <i>et al.</i> , 1998)
	11,2	94	0,12	compétition in vitro (RE solubilisé)	(Mueller <i>et al.</i> , 2004)
	22	35	0,6	compétition in vitro (RE solubilisé)	(Zhu <i>et al.</i> , 2006)
R	0,06	0,02	3	compétition in vitro (RE solubilisé)	(Mueller <i>et al.</i> , 2004)
Nar	0,01	0,11	0,09	compétition in vitro (RE en phase solide)	(Kuiper <i>et al.</i> , 1998)

Le calcul du rapport du $RBA\alpha/RBA\beta$ permet de comparer l'affinité relative d'une molécule entre les deux RE. Ainsi, la génistéine, la daïdzéine, l'équol, le coumestrol et la naringénine ont une affinité beaucoup plus forte pour le $RE\beta$ que pour le $RE\alpha$. L'entérolactone et le resvératrol, au contraire, ont une affinité plus importante pour le $RE\alpha$.

Cependant, l'affinité ne reflète pas forcément leur capacité d'activation. Ainsi, nos résultats sont cohérents avec ceux de l'équipe de Barkhem, qui a trouvé que les PE étaient plus actifs *via* le $RE\alpha$ (Barkhem *et al.*, 1998). De même, la génistéine, la daïdzéine, le coumestrol ou encore la naringénine activent préférentiellement $RE\alpha$ même si les différences d'activation transcriptionnelle entre les deux sous-types de RE ne sont pas très grandes (Kuiper *et al.*, 1998). Mueller confirme l'absence de lien direct entre l'affinité des PE et leur capacité à induire une activation transcriptionnelle de RE (Mueller *et al.*, 2004).

Nos résultats montrant que l'EL et les isoflavones induisent une activation transcriptionnelle de $RE\alpha$ plus importante que de $RE\beta$ confirment les résultats déjà décrits dans la littérature (Kuiper *et al.*, 1998 ; Mueller *et al.*, 2004 ; Penttinen *et al.*, 2007). De même, l'activation transcriptionnelle préférentielle de $RE\alpha$ obtenue avec la 8-PN est en accord avec des études réalisées sur d'autres modèles (levures, lignées cellulaires d'ostéosarcome, cellules d'hépatome humain HuH7) (Milligan *et al.*, 2002 ; Schaefer *et al.*, 2003 ; Roelens *et al.*, 2006).

Ainsi, ces premiers résultats supposent que les PE peuvent avoir des mécanismes d'activation des RE différents entre eux et également différents des œstrogènes endogènes. Ces différences peuvent être dues au changement de conformation des RE induit, à l'affinité relative de chaque molécule pour les deux RE, ou encore à leur capacité à activer les RE suite au recrutement de divers cofacteurs agissant par les domaines AF-1/AF-2.

La diversité des effets des PE sur l'activation transcriptionnelle des RE peut s'expliquer par des différences structurales. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence la relation entre la structure du ligand et la réponse induite sur les RE. Selon la taille et la forme du ligand, la conformation du LBD sera différente, entraînant le recrutement de différents corégulateurs (Frasor *et al.*, 2004 ; Pike, 2006). Les deux domaines AF n'ont pas le même rôle et la même importance en fonction du ligand et donc de la conformation du

complexe RE-ligand. C'est le cas du tamoxifène et de l'E₂ qui entraînent des conformations différentes du RE : ainsi, le domaine AF-1 est important pour l'activité agoniste du Tam, alors que la synergie entre les deux domaines AF-1 et AF-2 est nécessaire pour l'activité induite par l'E₂. Il est aussi évident que l'E₂ et le tamoxifène ne mobilisent pas les mêmes régions du domaine AF-1 (Frasor *et al.*, 2004).

Ainsi, pour les entérolignanes, ces différences de structures peuvent expliquer les effets différents de l'entérodol et de l'entérolactone au niveau de l'activation transcriptionnelle de RE α . Dans un contexte AF-2, l'entérodol et l'entérolactone induisent une activation transcriptionnelle de RE α similaire à l'E₂, ce qui est associé à un positionnement caractéristique de l'hélice 12. Ce résultat est en accord avec une étude récente qui a montré que le LBD du RE était suffisant pour l'induction induite par l'entérolactone (Penttinen *et al.*, 2007). Cependant, dans un contexte AF-1, les deux molécules ne montrent plus la même induction de RE α , ce qui suggère qu'elles induisent une conformation spatiale de RE α différente et par conséquent le recrutement de corégulateurs différents.

Cette différence de conformation du complexe RE-ligand a déjà été étudiée dans le cas de la liaison de la génistéine au RE (**figure 49**).



Figure 49. Différence de conformation induite par l'E₂ et la génistéine (Heldring *et al.*, 2007)

A : conformation de RE après liaison à l'E₂

B : conformation de RE après liaison à la génistéine

Contrairement à la conformation induite par la liaison avec l'E₂, dans le cas de la liaison avec la génistéine, l'hélice 12 du LBD (en vert) du RE n'est pas stabilisée dans une « conformation agoniste », bloquant ainsi le recrutement de certains corégulateurs. La génistéine est donc considérée comme un agoniste partiel, puisque la conformation du RE qu'elle induit n'est pas strictement identique à celle de l'E₂ (Heldring *et al.*, 2007).

Pour les flavanones, la naringénine et la 8-prényl-naringénine ne diffèrent entre elles que par la présence d'un groupement prényl en position 8. Roelens suggère, d'une part, que l'absence de ce groupement entraîne une forte diminution de l'affinité de liaison aux RE (Roelens *et al.*, 2006). D'autre part, l'activation transcriptionnelle différente entre les deux molécules peut être expliquée par une conformation spatiale différente de RE α lors de la liaison du composé, ce qui entraînerait ainsi des interactions plus ou moins synergiques entre les domaines AF-1 et AF-2 et les différents corégulateurs.

D'une part, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine seraient nécessaires pour identifier précisément les corégulateurs recrutés par les différents PE testés. D'autre part, des études de cristallographie pour déterminer la structure du RE lié à un PE pourraient être envisagées.

Nos résultats ont mis en évidence le rôle des différents domaines AF dans l'activation transcriptionnelle de RE α induite par les PE.

L'implication des domaines AF-1 et AF-2 dans l'activation transcriptionnelle du RE α est fonction de l'état de différenciation de la cellule (Merot *et al.*, 2004). Ainsi, le domaine AF-1 est le principal domaine impliqué dans les cellules différenciées, comme notre modèle d'étude HepG2, alors que le domaine AF-2 est principalement actif dans les cellules dites dédifférenciées, comme les HeLa. Lors du processus de cancérisation, les cellules passent d'un état différencié à un état dédifférencié : il s'agit de la transition épithélio-mésenchymateuse. La cellule perd alors certaines propriétés et passe d'une sensibilité AF-1 à une sensibilité AF-2 (Huet *et al.*, 2008). Le rôle des domaines AF dans l'activation transcriptionnelle du RE α induite par les PE est un paramètre important à considérer dans l'optique de mieux comprendre l'impact de ces molécules dans le cancer du sein.

Cette étude a été réalisée à l'aide des différentes constructions de RE α , dans des contextes cellulaires définis.

L'implication privilégiée du domaine AF-1 dans le cas de l'entérodiol, des isoflavones et de la 8-prényl-naringénine, démontre un mécanisme d'action similaire à celui du ligand endogène, l'E₂, pour l'activation transcriptionnelle du RE. Par conséquent, ces molécules seraient classées comme des agonistes purs de l'E₂.

De façon plus intéressante, les résultats obtenus avec l'entérolactone et la naringénine semblent indiquer qu'ils seraient de bons candidats en tant qu'agonistes « AF-2 spécifiques » et par conséquent permettraient une meilleure compréhension du rôle du domaine AF-2 dans l'activation du RE α , non encore complètement élucidé à ce jour.

Deux hypothèses peuvent être envisagées : ces composés activent le RE par le domaine AF-2 ou induisent un changement de contexte cellulaire, qui forcerait le mécanisme d'activation du RE à passer par AF-2. Dans ce dernier cas, la cellule ayant un contexte AF-1, donc différenciée, basculerait vers un contexte AF-2, donc dédifférenciée. Des études sur des marqueurs spécifiques de différenciation cellulaire comme l'expression de la vimentine ou de l'E-cadherine seraient à envisager pour infirmer ou confirmer cette hypothèse.

Récemment, diverses études se sont intéressées au rôle des domaines AF-1 et AF-2 dans l'activation transcriptionnelle de RE α .

Ainsi, l'étude de l'activation transcriptionnelle de RE α et de constructions du RE α déléetées de AF-1 ou de AF-2, par la naringénine et le resvératrol, effectuée dans les lignées HepG2, MDA-MB-231 et une lignée osseuse U2, corrobore nos résultats. En effet, elle démontre, d'une part, que la naringénine et le resvératrol induisent faiblement le RE α , et d'autre part que cette induction est dépendante du contexte cellulaire. De plus, l'activation induite par la naringénine passe préférentiellement par AF-2 (Yoon *et al.*, 2001).

De même, le resvératrol posséderait des propriétés de superagonistes dans les MCF-7, alors qu'il s'avère n'être qu'un agoniste partiel dans une lignée de cancer de l'ovaire, les BG-1. Les propriétés agonistes d'un PE varient donc en fonction de la lignée cellulaire étudiée. Il apparaît aussi que le rôle respectif des domaines AF-1 et AF-2 dans l'activation transcriptionnelle de RE α induite par le resvératrol varie en fonction du ligand et du gène qui est ciblé, c'est-à-dire en fonction du promoteur (Gehm *et al.*, 2004).

Le domaine AF-2 n'est pas indispensable pour obtenir une activation transcriptionnelle du RE α avec certains PE dans les MCF-7, contrairement à l'E₂. De plus, il n'y aurait pas de lien entre l'activation transcriptionnelle du RE α et la capacité d'un composé

à induire une activité œstrogénique (comme la régulation protéique de RE α). Les activités œstrogéniques d'un composé ne peuvent donc pas être prédites par son affinité pour le RE ou par des études de transactivation transcriptionnelle de RE α (Wu et Safe, 2007).

Concernant l'étude des propriétés œstrogéniques des PE, nous avons choisi d'analyser l'expression de gènes œstrogéno-dépendants ainsi que la prolifération des MCF-7.

Les gènes cibles choisis pour cette étude (RE α , RP et pS2) sont des gènes de référence dans la régulation par l'E₂ de gènes œstrogéno-dépendants dans les MCF-7. En effet, le RE α lui-même est un des gènes cibles spécifiques dont la transcription est activée par l'E₂ et cette activation transcriptionnelle est concomitante avec une diminution du niveau d'expression protéique de RE α , induite par l'action du système ubiquitine/protéasome (Lonard et Smith, 2002). De même, le gène codant le RP est sous contrôle de l'E₂ et les RP sont également impliqués dans certains cancers du sein (Kastner *et al.*, 1990). Enfin, la régulation par l'E₂ du gène codant pS2 dans les MCF-7 a été mise en évidence dans les années 1980 (Jakowlew *et al.*, 1984). Même si la fonction protéique de pS2 est à l'heure actuelle méconnue, ce gène constitue une référence dans la régulation par l'E₂ de gènes œstrogéno-dépendants dans les MCF-7.

L'entérodiol, les isoflavones et la 8-prényl-naringénine, dont l'induction de l'activation transcriptionnelle de RE α passe préférentiellement par le domaine AF-1, régulent l'expression des gènes œstrogéno-dépendants comme l'E₂. Nos résultats confirment que ces molécules ont des propriétés pro-œstrogéniques et suggèrent que ce sont « agonistes purs » de RE α .

Peu d'études ont été réalisées sur l'analyse de la régulation de gènes œstrogéno-dépendants par les entérolignanes. L'absence d'effet de l'entérolactone sur l'expression de l'ARNm de pS2 ne confirme pas l'étude de Sathymoorthy réalisée en 1994, montrant que l'entérolactone induit faiblement la transcription de pS2, alors que l'entérodiol n'a pas d'effet sur la transcription de ce gène (Sathymoorthy *et al.*, 1994).

Nos résultats montrent également que l'entérodiol, les isoflavones et la 8-prényl-naringénine induisent la prolifération des MCF-7, ce qui confirme les propriétés pro-œstrogéniques de ces molécules. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la

littérature, montrant un effet prolifératif de la génistéine et de la daïdzéine à 10 μM (Schmidt *et al.*, 2005). Cependant, d'autres études montrent un effet prolifératif pour de faibles concentrations ($< 1 \mu\text{M}$) et un effet anti-prolifératif pour de fortes concentrations d'isoflavones ($> 1 \mu\text{M}$) (Matsumura *et al.*, 2005 ; Rice et Whitehead, 2007).

Dans notre étude, l'entérolactone n'a pas d'effet prolifératif sur les MCF-7, à l'inverse des travaux de Mousavi en 1992, qui montrent que l'entérolactone stimule la prolifération des MCF-7 pour des concentrations de 1 à 10 μM . Par ailleurs, comme nos résultats, cette étude montre que l'entérolactone inhibe cette prolifération en présence d'E₂ (Mousavi et Adlercreutz, 1992).

Nous obtenons un effet prolifératif de la 8-prényl-naringénine sur les MCF-7, ce qui n'est pas le cas d'une étude récente (Brunelli *et al.*, 2007). Il faut cependant souligner que les concentrations utilisées sont 10 à 100 fois plus fortes que les nôtres, ce qui pourrait expliquer cette différence.

De façon remarquable, nous avons montré que la naringénine, mais pas l'entérolactone, induit une mortalité cellulaire des MCF-7. Une étude récente a montré que la naringénine inhiberait la prolifération des cellules cancéreuses par une action œstrogéno-dépendante, en interférant avec la cascade de la cycline D1. De plus, elle induirait la voie p38/MAPK, favorisant ainsi l'apoptose de cellules cancéreuses par des actions œstrogéno-indépendantes (Totta *et al.*, 2004). Il serait donc intéressant de compléter nos données par l'étude de l'apoptose induite par la naringénine sur les MCF-7. Ces voies sont peut-être à privilégier dans des études complémentaires sur la naringénine pour l'envisager comme candidat alternatif au THS.

Afin de déterminer l'impact des PE sur la migration cellulaire, leurs effets sur l'activité des MMP-2 et MMP-9 ont été étudiés dans les MCF-7. Les MMP-2 et MMP-9 sont des collagénases de type IV impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse lors du processus de cancérisation. Elles permettent la migration cellulaire par dégradation de la matrice extracellulaire et sont impliquées dans la progression et l'invasion de cancers ainsi que dans le processus de métastase. Elles sont fortement exprimées dans les tumeurs avancées et une forte concentration circulante de MMP-9 a été retrouvée chez des patientes atteintes d'un cancer du sein (Zucker *et al.*, 1993). De récents résultats indiquent que l'E₂ inhibe l'activité des MMP dans les MCF-7 en culture (Nilsson *et al.*, 2007). L'étude de l'impact des

PE sur l'activité de ces MMP est donc une approche intéressante dans l'optique de déterminer leurs effets sur la migration de cellules cancéreuses mammaires.

Nous avons ainsi mesuré les effets de l'entérodiol et de l'entérolactone sur l'activité des MMP-2 et MMP-9. L'entérodiol, comme l'E₂, diminue l'activité de MMP-9, de façon RE-dépendante. Ces résultats sont en accord avec de récentes études décrivant des effets similaires pour l'E₂ et la génistéine (Kousidou *et al.*, 2005 ; Nilsson *et al.*, 2007).

Ainsi, l'ensemble de ces données indique une protection des entérolignanes contre la migration cellulaire induite par l'activité MMP-9 et donc contre l'invasion de cellules cancéreuses mammaires (Chen et Thompson, 2003). De façon intéressante, il y aurait également un effet RE-indépendant de l'entérodiol et de l'entérolactone pour augmenter l'activité de la MMP-2. Le blocage par l'ICI laisserait la possibilité à l'entérodiol d'agir par d'autres mécanismes non génomiques. Cette voie pourrait être poursuivie dans le cadre d'études complémentaires pour approfondir les effets non génomiques de l'entérolactone comme SERM.

Ainsi, dans les MCF-7, les molécules ayant des activités œstrogéniques induisent une activation transcriptionnelle de RE α préférentiellement par le domaine AF-1. A l'inverse, nous n'avons pas démontré d'effets pro-œstrogéniques pour des composés tels que l'entérolactone et la naringénine, qui agissent préférentiellement par le domaine AF-2.

Selon nos résultats, l'entérodiol, les isoflavones et la 8-prényl-naringénine ne paraissent pas être de bons candidats pour poursuivre des études complémentaires dans la recherche de nouveaux SERM. L'entérolactone et la naringénine montrent une activation faible de RE α , sans pour autant induire certains effets négatifs des œstrogènes, comme la prolifération des cellules cancéreuses, ou encore la transcription de gènes œstrogéno-dépendants impliqués dans les processus de cancérogenèse. Cela ouvre ainsi un champ d'investigation afin de vérifier et de poursuivre l'étude de leurs effets sur d'autres marqueurs et voies de signalisation œstrogéniques.

En effet, notre travail s'est intéressé particulièrement aux effets RE-dépendants des PE, or, il est maintenant établi que les œstrogènes exercent de très nombreuses actions physiologiques par de multiples voies de signalisation, notamment les interactions RE/protéines et les voies non génomiques.

Dans les interactions RE/protéines, les voies d'activation AP-1 ou Sp1 semblent être intéressantes à analyser pour étudier les effets de l'entérolactone et de la naringénine.

La voie AP-1 intervient dans de nombreuses régulations comme la prolifération, la différenciation ou encore la réponse immunitaire (Mechta-Grigoriou *et al.*, 2001). Dans les processus de prolifération, le complexe AP-1 est un facteur déterminant pour la formation de tumeurs et a des effets pro- ou anti-apoptotiques en fonction du complexe formé (Mechta-Grigoriou *et al.*, 2001). Les interactions entre les RE et les protéines AP-1 (c-fos et c-jun), requièrent les deux domaines AF-1 et AF-2 et en particulier le domaine AF-2, qui en liant des coactivateurs p160 (SRC-1 ou GRIP-1), stabilise le complexe protéique RE α /AP-1 et permet la régulation de la transcription de gènes cibles (Kushner *et al.*, 2000).

Le RE α est capable d'interagir directement avec c-jun de manière ligand-dépendante, activant ainsi deux voies selon si ce dernier est lié à son ligand endogène l'E₂ ou à un SERM comme le tamoxifène ou le raloxifène (Webb *et al.*, 1999 ; Teyssier *et al.*, 2001). Ainsi, selon le ligand du RE α , ou encore selon le contexte cellulaire, la voie AP-1 sera ou non activée. De plus, le RE α et le RE β induisent des réponses opposées sur cette voie. Lorsque l'E₂ est lié au RE α , il y aura activation de la transcription de gènes régulés par AP-1 et à l'inverse, lorsque l'E₂ est lié au RE β , cette transcription est inhibée. De plus, le tamoxifène, mais pas le raloxifène, active la voie AP-1 dans les HeLa mais pas dans les cellules cancéreuses du sein (Paech *et al.*, 1997). Des études supplémentaires seraient nécessaires pour vérifier que l'entérolactone et la naringénine pourraient interagir de la même façon dans certaines lignées, mais pas dans d'autres, en entraînant des recrutements différentiels de corégulateurs.

De même, des gènes contenant des séquences promoteurs riches en GC peuvent être régulés grâce à une interaction entre le RE et Sp1. Cette voie est activée par l'E₂ et les anti-œstrogènes dans les MCF-7 mais pas dans les HeLa. De plus, cette voie ne semble active que lors d'une interaction RE α /Sp1, ce qui confirme la nécessité de la région N-terminale, donc du domaine AF-1, dans l'activation de cette voie, même si le domaine AF-2 n'est pas inactif (Kim *et al.*, 2003). Ainsi, l'étude des effets de l'entérolactone et de la naringénine sur cette voie Sp1 vérifierait l'hypothèse que ces deux molécules activent le RE préférentiellement par le domaine AF-2. En effet, puisque cette voie nécessite l'activation du domaine AF-1, elle ne devrait pas être activée par l'entérolactone et la naringénine.

En parallèle, il existe d'autres voies de signalisation des œstrogènes dites non génomiques. Ces voies sont diverses, comme celle des MAPK, des PI₃K ou encore celle de l'interaction avec un récepteur membranaire, et peuvent être la cible des PE.

En effet, des études *in vitro* ont montré que les PE pouvaient engendrer des actions non génomiques très rapides (Belcher et Zsarnovszky, 2001). La génistéine est connue depuis de nombreuses années comme étant un inhibiteur des tyrosine-kinases (Akiyama *et al.*, 1987). De plus, la génistéine augmente la synthèse de NO dans des cellules primaires d'aorte humaine à des concentrations de 1-10 µM de façon RE-indépendante (Si et Liu, 2008). La daïdzéine, elle, induit une réorganisation rapide (minute) du cytosquelette d'actine des ostéoblastes, impliquée dans la migration cellulaire (de Wilde *et al.*, 2006). Cette action est due à la liaison de la daïdzéine à une protéine membranaire, qui entraîne une cascade de phosphorylations impliquant des PI₃K ou encore des MAPK. L'entérolactone et la naringénine pourraient induire des effets similaires.

Enfin, des études *in vivo* sur des souris sauvages ou mutées au niveau du domaine AF-1 du RE α , pourraient être envisagées. Ces études consisteraient, entre autres, à analyser les effets de l'entérolactone ou de la naringénine sur divers marqueurs et fonctions physiologiques des œstrogènes, notamment l'utérutrophie, l'ostéoporose ou encore le système cardio-vasculaire.

Pour conclure, ce travail a mis en évidence que deux PE, l'entérolactone et la naringénine, sont de faibles agonistes du RE, avec une préférence d'activation transcriptionnelle par le domaine AF-2 et n'induisant pas les effets œstrogéniques « néfastes ». Ce travail s'est intéressé à l'activation transcriptionnelle des RE par les PE, à l'élucidation de l'implication des domaines AF dans cette activation et aux effets œstrogéniques en résultant. Cependant, l'action des PE peut s'avérer aussi complexe que celle des œstrogènes et de nombreuses voies sont encore à explorer pour évaluer leur capacité à induire des réponses œstrogéniques et ainsi connaître leurs effets exacts dans notre organisme.

De nombreux compléments alimentaires sont à l'heure actuelle à base de PE, en particulier d'isoflavones. Ces compléments vantent, entre autres, les bienfaits de ces molécules sur les symptômes de la ménopause. Cependant, les diverses études réalisées sur les effets des isoflavones sur les symptômes de la ménopause ne mettent pas en évidence d'effets clairs. De plus, selon nos résultats, les isoflavones, mais également l'entérodiol et la 8-prényl-naringénine, montrent un effet pro-œstrogénique sur les MCF-7, lignée humaine de cancer du sein. Il semblerait donc important et nécessaire d'informer les utilisatrices de ce type de compléments alimentaires en vente libre, en particulier les plus vulnérables avec de forts risques de cancer du sein, sur les propriétés pro-œstrogéniques de ces composés.

Par ailleurs, des études complémentaires seraient nécessaires pour certifier que ces produits ne présentent aucun danger pour cette population à risque. Dans tous les cas, la connaissance de la prise de ces produits par les professionnels de santé semble fortement recommandée.

Nos résultats ne montrent pas d'effets pro-œstrogéniques de l'entérolactone et de la naringénine dans une lignée de cancer du sein. Ces composés semblent donc très intéressants, car ils seraient de bons candidats dans l'optique de l'utilisation de ces SERM dans le cadre d'une nutrition préventive. Cependant, de plus amples études seraient nécessaires, car nous n'avons pas testé leurs effets sur des aspects bénéfiques des œstrogènes, comme l'ostéoporose ou le système cardio-vasculaire.

En conclusion, la diversité des effets physiologiques des PE suggère que pour envisager leur utilisation en nutrition préventive, ou même en thérapeutique, une meilleure compréhension de leurs mécanismes cellulaires et moléculaires est nécessaire. Ainsi, cette approche permettrait de mieux caractériser leurs potentialités en tant que SERM.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adlercreutz, H. (2003). Phytoestrogens and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83, 113-18.
- AFSSA. and AFSSAPS. (2005). Sécurité et Bénéfice des phyto-oestrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations. France: 440.
- AFSSAPS (2006). Mise au point Le traitement hormonal de la ménopause (THM). Point d'étape. 20.
- AFSSAPS (2005). Traitement hormonal substitutif de la ménopause. Caractéristiques de l'utilisation en France. Effets sur la survenue de cancers du sein et d'évènements cardiovasculaires en France. Propositions d'études complémentaires. *Rapport AFSSAPS*, 68.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262(12), 5592-5.
- Albert, A., Altabre, C., Baro, F., Buendia, E., Cabero, A., Cancelo, M.J., Castelo-Branco, C., Chantre, P., Duran, M., Haya, J., Imbert, P., Julia, D., Lanchares, J.L., Llana, P., Manubens, M., Minano, A., Quereda, F., Ribes, C. and Vazquez, F. (2002). Efficacy and safety of a phytoestrogen preparation derived from *Glycine max* (L.) Merr in climacteric symptomatology: a multicentric, open, prospective and non-randomized trial. *Phytomedicine* 9(2), 85-92.
- Ali, S., Metzger, D., Bornert, J.M. and Chambon, P. (1993). Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *EMBO J.* 12(3), 1153-1160.
- Allred, C.D., Allred, K.F., Ju, Y.H., Virant, S.M. and Helferich, W.G. (2001). Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Res* 61(13), 5045-50.
- Althuis, M.D., Dozier, J.M., Anderson, W.F., Devesa, S.S. and Brinton, L.A. (2005). Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *Int.J.Epidemiol.* 34(2), 405-412.
- Amantea, D., Russo, R., Bagezza, G. and Corasaniti, M.T. (2005). From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol Res* 52(2), 119-32.
- Anderson, E. (2002). The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res* 4(5), 197-201.
- Antignac, J.P., Cariou, R., Le Bizec, B., Cravedi, J.P. and Andre, F. (2003). Identification of phytoestrogens in bovine milk using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17(12), 1256-64.
- Arnal, J.F., Gourdy, P., Elhage, R., Garmy-Susini, B., Delmas, E., Brouchet, L., Castano, C., Barreira, Y., Couloumiers, J.C., Prats, H., Prats, A.C. and Bayard, F. (2004). Estrogens and atherosclerosis. *Eur J Endocrinol* 150(2), 113-7.
- Ascenzi, P., Bocedi, A. and Marino, M. (2006). Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health. *Molecular Aspects of Medicine* 27 299-402.
- Axelsson, M., Sjøvall, J., Gustafsson, B.E. and Setchell, K.D. (1982). Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature*. 298(5875), 659-660.
- Azoulay, C. (2004). [Menopause in 2004: "hormone replacement therapy" is not what it used to be anymore]. *Rev Med Interne* 25(11), 806-15.
- Bang, O.Y., Hong, H.S., Kim, D.H., Kim, H., Boo, J.H., Huh, K. and Mook-Jung, I. (2004). Neuroprotective effect of genistein against beta amyloid-induced neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 16(1), 21-8.
- Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J. and Nilsson, S. (1998). Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol* 54(1), 105-12.

- Begum, A.N., Nicolle, C., Mila, I., Lapierre, C., Nagano, K., Fukushima, K., Heinonen, S.M., Adlercreutz, H., Remesy, C. and Scalbert, A. (2004). Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats. *J Nutr* 134(1), 120-7.
- Belcher, S.M. and Zsarnovszky, A. (2001). Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 299(2), 408-14.
- Bennetau-Pelissero, C., Arnal-Schnebelen, B., Lamothe, V., Sauvant, P., Sagne, J.L., Verbruggen, M.A., Mathey, J. and Lavialle, O. (2003). ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chemistry* 82(4), 645-658.
- Bennetts, H.W., Underwood, E.J. and Shier, F.L. (1946). A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western australia. *Aust Vet* 22, 2-12.
- Beral, V. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362(9382), 419-27.
- Bergman, J.M., Thompson, L.U. and Dabrosin, C. (2007). Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts in vivo. *Clin.Cancer Res.* 13(3), 1061-1067.
- Berry, M., Metzger, D. and Chambon, P. (1990). Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* 9(9), 2811-2818.
- Beyer, C. and Raab, H. (1998). Nongenomic effects of oestrogen: embryonic mouse midbrain neurones respond with a rapid release of calcium from intracellular stores. *Eur J Neurosci* 10(1), 255-62.
- Bhakta, D., Higgins, C.D., Sevak, L., Mangtani, P., Adlercreutz, H., McMichael, A.J. and dos Santos Silva, I. (2006). Phyto-oestrogen intake and plasma concentrations in South Asian and native British women resident in England. *Br J Nutr* 95(6), 1150-8.
- Bjornstrom, L., Kilic, E., Norman, M., Parker, M.G. and Sjoberg, M. (2001). Cross-talk between Stat5b and estrogen receptor-alpha and -beta in mammary epithelial cells. *J Mol Endocrinol* 27(1), 93-106.
- Bjornstrom, L. and Sjoberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 19(4), 833-42.
- Boccardo, F., Puntoni, M., Guglielmini, P. and Rubagotti, A. (2006). Enterolactone as a risk factor for breast cancer: a review of the published evidence. *Clin Chim Acta* 365(1-2), 58-67.
- Boudreau, N. and Myers, C. (2003). Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res.*(5), 140-6.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Brunelli, E., Minassi, A., Appendino, G. and Moro, L. (2007). 8-Prenylnaringenin, inhibits estrogen receptor-alpha mediated cell growth and induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 107(3-5), 140-8.
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A. and Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389(6652), 753-8.
- Burakov, D., Crofts, L.A., Chang, C.P. and Freedman, L.P. (2002). Reciprocal recruitment of DRIP/mediator and p160 coactivator complexes in vivo by estrogen receptor. *J Biol Chem* (277), 14359-62.
- Bush, N.J. (2007). Advances in hormonal therapy for breast cancer. *Semin Oncol Nurs* 23(1), 46-54.

- Butt, A.J., McNeil, C.M., Musgrove, E.A. and Sutherland, R.L. (2005). Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocr Relat Cancer* 12 Suppl 1, S47-59.
- Cancer, I.N.d. (2007). Comprendre le cancer du sein. Mise à jour. 116.
- Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B. and Bourguiba, S. (2003). Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 35.
- Cassidy, A., Albertazzi, P., Lise Nielsen, I., Hall, W., Williamson, G., Tetens, I., Atkins, S., Cross, H., Manios, Y., Wolk, A., Steiner, C. and Branca, F. (2006). Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in post-menopausal women. *Proc Nutr Soc* 65(1), 76-92.
- Cassidy, A., Bingham, S. and Setchell, K. (1995). Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soyabean products. *Br J Nutr* 74(4), 587-601.
- Castet, A., Boulahtouf, A., Versini, G., Bonnet, S., Augereau, P., Vignon, F., Khochbin, S. Jalaguier, S. and Cavailles, V. (2004). Multiple domains of the Receptor-Interacting Protein 140 contribute to transcription inhibition. *Nucleic Acids Res* (32) 1957-66.
- Cauley, J.A., Lucas, F.L., Kuller, L.H., Stone, K., Browner, W. and Cummings, S.R. (1999). Elevated serum estradiol and testosterone concentrations are associated with a high risk for breast cancer. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med* 130(4 Pt 1), 270-7.
- Cauley, J.A., Robbins, J., Chen, Z., Cummings, S.R., Jackson, R.D., LaCroix, A.Z., LeBoff, M., Lewis, C.E., McGowan, J., Neuner, J., Pettinger, M., Stefanick, M.L., Wactawski-Wende, J. and Watts, N.B. (2003). Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women's Health Initiative randomized trial. *Jama* 290(13), 1729-38.
- Chakraborty, T.R. and Gore, A.C. (2004). Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. *Exp Biol Med (Maywood)* 229(10), 977-87.
- Chambliss, K.L. and Shaul, P.W. (2002). Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev* 23(5), 665-86.
- Chen, J. and Thompson, L.U. (2003). Lignans and tamoxifen, alone or in combination, reduce human breast cancer cell adhesion, invasion and migration in vitro. *Breast Cancer Res.Treat.* 80(2), 163-170.
- Chen, W.Y., Hankinson, S.E., Schnitt, S.J., Rosner, B.A., Holmes, M.D. and Colditz, G.A. (2004). Association of hormone replacement therapy to estrogen and progesterone receptor status in invasive breast carcinoma. *Cancer* 101(7), 1490-500.
- Cheng, G., Imamov, O., Omoto, Y., Warner, M. and Gustafsson, J.A. (2002). What is the value of measuring MTA-1s in breast cancer? *Mol Interv* (2), 360-2, 338.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-9.
- Chung, M.I., Teng, C.M., Cheng, K.L., Ko, F.N. and Lin, C.N. (1992). An antiplatelet principle of *Veratrum formosanum*. *Planta Med* 58(3), 274-6.
- Clarkson, T.B. (2007). Estrogen effects on arteries vary with stage of reproductive life and extent of subclinical atherosclerosis progression. *Menopause* 14(3 Pt 1), 373-84.
- Committee, N.R.N. (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*. 97(2), 161-163.
- Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* 3(1), 93-6.

- Constantinou, A.I., Krygier, A.E. and Mehta, R.R. (1998). Genistein induces maturation of cultured human breast cancer cells and prevents tumor growth in nude mice. *Am J Clin Nutr* 68(6 Suppl), 1426S-1430S.
- Cornwell, T., Cohick, W. and Raskin, I. (2004). Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 65(8), 995-1016.
- Couse, J.F., Hewitt, S.C., Bunch, D.O., Sar, M., Walker, V.R., Davis, B.J. and Korach, K.S. (1999). Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 286(5448), 2328-31.
- Couse, J.F. and Korach, K.S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20(3), 358-417.
- Curtis Hewitt, S., Couse, J.F. and Korach, K.S. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor knockout mice: what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. *Breast Cancer Res* 2(5), 345-52.
- Cuzick, J., Powles, T., Veronesi, U., Forbes, J., Edwards, R., Ashley, S. and Boyle, P. (2003). Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet* 361(9354), 296-300.
- Dalais, F.S., Ebeling, P.R., Kotsopoulos, D., McGrath, B.P. and Teede, H.J. (2003). The effects of soy protein containing isoflavones on lipids and indices of bone resorption in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58(6), 704-9.
- Day, J.K., Besch-Williford, C., McMann, T.R., Hufford, M.G., Lubahn, D.B. and MacDonald, R.S. (2001). Dietary genistein increased DMBA-induced mammary adenocarcinoma in wild-type, but not ER alpha KO, mice. *Nutr Cancer* 39(2), 226-32.
- de Wilde, A., Heberden, C., Chaumaz, G., Bordat, C. and Lieberherr, M. (2006). Signaling networks from Gbeta1 subunit to transcription factors and actin remodeling via a membrane-located ERbeta-related protein in the rapid action of daidzein in osteoblasts. *J Cell Physiol* 209(3), 786-801.
- Deroo, B.J. and Korach, K.S. (2006). Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 116(3), 561-70.
- Detre, S., Riddler, S., Salter, J., A'Hern, R., Dowsett, M. and Johnston, S.R. (2003). Comparison of the selective estrogen receptor modulator arzoxifene (LY353381) with tamoxifen on tumor growth and biomarker expression in an MCF-7 human breast cancer xenograft model. *Cancer Res* 63(19), 6516-22.
- Doisneau-Sixou, S.F., Sergio, C.M., Carroll, J.S., Hui, R., Musgrove, E.A. and Sutherland, R.L. (2003). Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 10(2), 179-86.
- Duax, W.L. and Weeks, C.M. (1980). Estrogens in the environment. Molecular basis of estrogenicity / X ray crystallographic studies. J.A. McLachlan, Elsevier Inc: 11-31.
- Duffy, C., Perez, K. and Partridge, A. (2007). Implications of phytoestrogen intake for breast cancer. *CA Cancer J Clin* 57(5), 260-77.
- Duncan, A.M., Merz, B.E., Xu, X., Nagel, T.C., Phipps, W.R. and Kurzer, M.S. (1999). Soy isoflavones exert modest hormonal effects in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 84(1), 192-7.
- Duncan, A.M., Phipps, W.R. and Kurzer, M.S. (2003). Phyto-oestrogens. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17(2), 253-71.
- Dutertre, M. and Smith, C.L. (2000). Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action. *J Pharmacol Exp Ther* 295(2), 431-7.

- Edwards, D.P. (2005). Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 67, 335-76.
- Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M. and Gustafsson, J.A. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82(12), 4258-4265.
- Erlund, I., Silaste, M.L., Alfthan, G., Rantala, M., Kesaniemi, Y.A. and Aro, A. (2002). Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *Eur J Clin Nutr* 56(9), 891-8.
- Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J.P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J.C., Cavailles, V. and Balaguer, P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem Pharmacol* 71(10), 1459-69.
- Faulds, M.H., Pettersson, K., Gustafsson, J.A. and Haldosen, L.A. (2001). Cross-talk between ERs and signal transducer and activator of transcription 5 is E2 dependent and involves two functionally separate mechanisms. *Mol Endocrinol* 15(11), 1929-40.
- Faus, H. and Haendler, B. (2006). Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother* 60(9), 520-8.
- Fernandes, I., Bastien, Y., Wai, T., Nygard, K., Lin, R., Cormier, O., Lee, H.S., Eng, F., Bertos, N.R., Pelletier, N., Mader, S., Han, V.K., Yang, X.J. and White, J.H. (2003). Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell* (11) 139-50.
- File, S.E., Jarrett, N., Fluck, E., Duffy, R., Casey, K. and Wiseman, H. (2001). Eating soya improves human memory. *Psychopharmacology (Berl)* 157(4), 430-6.
- Fisher, B., Costantino, J.P., Wickerham, D.L., Redmond, C.K., Kavanah, M., Cronin, W.M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L. and Wolmark, N. (1998). Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 90(18), 1371-88.
- Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V. and Gannon, F. (2000). Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J.* 19(17), 4688-4700.
- Flouriot, G., Griffin, C., Kenealy, M., Sonntag-Buck, V. and Gannon, F. (1998). Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor-alpha gene are generated by alternative splicing and promoter usage. *Mol Endocrinol* 12(12), 1939-54.
- Fournier, A., Berrino, F., Riboli, E., Avenel, V. and Clavel-Chapelon, F. (2005). Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. *Int J Cancer* 114(3), 448-54.
- Fournier, L.R., Ryan Borchers, T.A., Robison, L.M., Wiediger, M., Park, J.S., Chew, B.P., McGuire, M.K., Sclar, D.A., Skaer, T.L. and Berman, K.A. (2007). The effects of soy milk and isoflavone supplements on cognitive performance in healthy, postmenopausal women. *J Nutr Health Aging* 11(2), 155-64.
- Frasor, J., Stossi, F., Danes, J.M., Komm, B., Lyttle, C.R. and Katzenellenbogen, B.S. (2004). Selective estrogen receptor modulators: discrimination of agonistic versus antagonistic activities by gene expression profiling in breast cancer cells. *Cancer Res* 64(4), 1522-33.

- Fujita, T., Kobayashi, Y., Wada, O., Tateishi, Y., Kitada, L., Yamamoto, Y., Takashima, H., Murayama, A., Yano, T., Baba, T., Kato, S., Kawabe, Y. and Yanagisawa, J. (2003). Full activation of estrogen receptor alpha activation function-1 induces proliferation of breast cancer cells. *J.Biol.Chem.* 278(29), 26704-26714.
- Gaddy, V.T., Barrett, J.T., Delk, J.N., Kallab, A.M., Porter, A.G. and Schoenlein, P.V. (2004). Mifepristone induces growth arrest, caspase activation, and apoptosis of estrogen receptor-expressing, antiestrogen-resistant breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 10(15), 5215-25.
- Gallo, D., Ferlini, C., Fabrizi, M., Prislei, S. and Scambia, G. (2006). Lack of stimulatory activity of a phytoestrogen-containing soy extract on the growth of breast cancer tumors in mice. *Carcinogenesis* 27(7), 1404-9.
- Gehin, M. Mark, M., Dennefeld, C., Dierich, A., Gronemeyer, H. and Chambon, P. (2002). The function of TIF2/GRIP1 in mouse reproduction is distinct from those of SRC-1 and p/CIP. *Mol Cell Biol* (22) 5923-37.
- Gehm, B.D., Levenson, A.S., Liu, H., Lee, E.J., Amundsen, B.M., Cushman, M., Jordan, V.C. and Jameson, J.L. (2004). Estrogenic effects of resveratrol in breast cancer cells expressing mutant and wild-type estrogen receptors: role of AF-1 and AF-2. *J Steroid Biochem Mol Biol* 88(3), 223-34.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M. and Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58(4), 685-704.
- Goldberg, J.I. and Borgen, P.I. (2006). Breast cancer susceptibility testing: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther* 6(8), 1205-14.
- Goldstein, S.R., Siddhanti, S., Ciaccia, A.V. and Plouffe, L., Jr. (2000). A pharmacological review of selective oestrogen receptor modulators. *Hum Reprod Update* 6(3), 212-24.
- Gontier-Latonnelle, K., Cravedi, J.P., Laurentie, M., Perdu, E., Lamothe, V., Le Menn, F. and Bennetau-Pelissero, C. (2007). Disposition of genistein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Gen Comp Endocrinol* 150(2), 298-308.
- Gottlicher, M., Heck, S. and Herrlich, P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med* 76(7), 480-9.
- Grady, D., Yaffe, K., Kristof, M., Lin, F., Richards, C. and Barrett-Connor, E. (2002). Effect of postmenopausal hormone therapy on cognitive function: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. *Am J Med* 113(7), 543-8.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P. and Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320(6058), 134-139.
- Grigoriadis, S. and Kennedy, S.H. (2002). Role of estrogen in the treatment of depression. *Am J Ther* 9(6), 503-9.
- Grodstein, F., Stampfer, M.J., Falkeborn, M., Naessen, T. and Persson, I. (1999). Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease and hip fracture in a cohort of Swedish women. *Epidemiology* 10(5), 476-80.
- Gruber, C.J., Gruber, D.M., Gruber, I.M., Wieser, F. and Huber, J.C. (2004). Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol Metab* 15(2), 73-8.
- Gustafsson, J.A. (1999). Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 163(3), 379-83.
- Hall, J.M., Couse, J.F. and Korach, K.S. (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276(40), 36869-72.

- Hall, J.M. and McDonnell, D.P. (1999). The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140(12), 5566-78.
- Hall, P., Ploner, A., Bjohle, J., Huang, F., Lin, C.Y., Liu, E.T., Miller, L.D., Nordgren, H., Pawitan, Y., Shaw, P., Skoog, L., Smeds, J., Wedren, S., Ohd, J. and Bergh, J. (2006). Hormone-replacement therapy influences gene expression profiles and is associated with breast-cancer prognosis: a cohort study. *BMC Med* 4, 16.
- Harrington, W.R., Kim, S.H., Funk, C.C., Madak-Erdogan, Z., Schiff, R., Katzenellenbogen, J.A. and Katzenellenbogen, B.S. (2006). Estrogen dendrimer conjugates that preferentially activate extranuclear, nongenomic versus genomic pathways of estrogen action. *Mol Endocrinol* 20(3), 491-502.
- Harris, D.M., Besselink, E., Henning, S.M., Go, V.L. and Heber, D. (2005). Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha- or Beta-mediated responses in transfected breast cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 230(8), 558-68.
- Hedlund, T.E., Maroni, P.D., Ferucci, P.G., Dayton, R., Barnes, S., Jones, K., Moore, R., Ogden, L.G., Wahala, K., Sackett, H.M. and Gray, K.J. (2005). Long-term dietary habits affect soy isoflavone metabolism and accumulation in prostatic fluid in caucasian men. *J Nutr* 135(6), 1400-6.
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Strom, A., Treuter, E., Warner, M. and Gustafsson, J.A. (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87(3), 905-31.
- Herrington, D.M., Reboussin, D.M., Klein, K.P., Sharp, P.C., Shumaker, S.A., Snyder, T.E. and Geisinger, K.R. (2000). The estrogen replacement and atherosclerosis (ERA) study: study design and baseline characteristics of the cohort. *Control Clin Trials* 21(3), 257-85.
- Hewitt, S.C. and Korach, K.S. (2003). Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction* 125(2), 143-9.
- Hofbauer, L.C., Khosla, S., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Boyle, W.J. and Riggs, B.L. (2000). The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15(1), 2-12.
- Hoffmann, J., Bohlmann, R., Heinrich, N., Hofmeister, H., Kroll, J., Kunzer, H., Lichtner, R.B., Nishino, Y., Parczyk, K., Sauer, G., Gieschen, H., Ulbrich, H.F. and Schneider, M.R. (2004). Characterization of new estrogen receptor destabilizing compounds: effects on estrogen-sensitive and tamoxifen-resistant breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 96(3), 210-8.
- Horn-Ross, P.L., Lee, M., John, E.M. and Koo, J. (2000). Sources of phytoestrogen exposure among non-Asian women in California, USA. *Cancer Causes Control* 11(4), 299-302.
- Howell, A. (2006). Pure oestrogen antagonists for the treatment of advanced breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 13(3), 689-706.
- Howell, A., Robertson, J.F., Quaresma Albano, J., Aschermannova, A., Mauriac, L., Kleeberg, U.R., Vergote, I., Erikstein, B., Webster, A. and Morris, C. (2002). Fulvestrant, formerly ICI 182,780, is as effective as anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing after prior endocrine treatment. *J Clin Oncol* 20(16), 3396-403.
- Howes, J.B., Sullivan, D., Lai, N., Nestel, P., Pomeroy, S., West, L., Eden, J.A. and Howes, L.G. (2000). The effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on the lipoprotein profiles of post menopausal women with mild to moderate hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 152(1), 143-7.

- Hsieh, C.Y., Santell, R.C., Haslam, S.Z. and Helferich, W.G. (1998). Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 58(17), 3833-8.
- Hubert, J., Berger, M. and Dayde, J. (2005). Use of a simplified HPLC-UV analysis for soyasaponin B determination: study of saponin and isoflavone variability in soybean cultivars and soy-based health food products. *J Agric Food Chem* 53(10), 3923-30.
- Huet, G., Merot, Y., Le Dily, F., Kern, L., Ferriere, F., Saligaut, C., Boujrad, N., Pakdel, F., Metivier, R. and Flouriot, G. (2008). Loss of E-cadherin-mediated cell contacts reduces estrogen receptor alpha (ER alpha) transcriptional efficiency by affecting the respective contribution exerted by AF1 and AF2 transactivation functions. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 365(2), 304-309.
- Hulley, S., Furberg, C., Barrett-Connor, E., Cauley, J., Grady, D., Haskell, W., Knopp, R., Lowery, M., Satterfield, S., Schrott, H., Vittinghoff, E. and Hunninghake, D. (2002). Noncardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *Jama* 288(1), 58-66.
- Hulley, S., Grady, D., Bush, T., Furberg, C., Herrington, D., Riggs, B. and Vittinghoff, E. (1998). Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Jama* 280(7), 605-13.
- Jakes, R.W., Duffy, S.W., Ng, F.C., Gao, F., Ng, E.H., Seow, A., Lee, H.P. and Yu, M.C. (2002). Mammographic parenchymal patterns and self-reported soy intake in Singapore Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11(7), 608-13.
- Jakowlew, S.B., Breathnach, R., Jeltsch, J.M., Masiakowski, P. and Chambon, P. (1984). Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Res* 12(6), 2861-78.
- Jensen, E.V. and DeSombre, E.R. (1973). Estrogen-receptor interaction. *Science* 182(108), 126-34.
- Joel, P.B., Traish, A.M. and Lannigan, D.A. (1998). Estradiol-induced phosphorylation of serine 118 in the estrogen receptor is independent of p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273(21), 13317-23.
- Jordan, V.C. (2007). SERMs: meeting the promise of multifunctional medicines. *J Natl Cancer Inst* 99(5), 350-6.
- Kanaze, F.I., Bounartzi, M.I., Georgharakis, M. and Niopas, I. (2007). Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *Eur J Clin Nutr* 61(4), 472-7.
- Kanis, J.A., Johnell, O., Black, D.M., Downs, R.W., Jr., Sarkar, S., Fuerst, T., Seckst, R.J. and Pavo, I. (2003). Effect of raloxifene on the risk of new vertebral fracture in postmenopausal women with osteopenia or osteoporosis: a reanalysis of the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation trial. *Bone* 33(3), 293-300.
- Karr, S.C., Lampe, J.W., Hutchins, A.M. and Slavin, J.L. (1997). Urinary isoflavonoid excretion in humans is dose dependent at low to moderate levels of soy-protein consumption. *Am J Clin Nutr* 66(1), 46-51.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H. and Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO Journal* 9(5), 1603-1614.

- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D. and Chambon, P. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270(5241), 1491-4.
- Katzenellenbogen, B.S. and Katzenellenbogen, J.A. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2(5), 335-44.
- Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., Tatee, T., Robertson, D.W. & Lanvatter, S.W. (1980). The chemistry of estrogens and antiestrogens: relationships between structure, receptor binding and biological activity. *Estrogens in the environment*.
- Keen, J.C. and Davidson, N.E. (2003). The biology of breast carcinoma. *Cancer* 97(3 Suppl), 825-33.
- Keinan-Boker, L., van Der Schouw, Y.T., Grobbee, D.E. and Peeters, P.H. (2004). Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. *Am J Clin Nutr* 79(2), 282-8.
- Kiely, M., Faughnan, M., Wahala, K., Brants, H. and Mulligan, A. (2003). Phyto-oestrogen levels in foods: the design and construction of the VENUS database. *Br J Nutr* 89 Suppl 1, S19-23.
- Kim, H.J., Yi, J.Y., Sung, H.S., Moore, D.D., Jhun, B.H., Lee, Y.C. and Lee, J.W. (1999). Activating signal co-integrator 1, a novel transcription coactivator of nuclear receptors, and its cytosolic localization under conditions of serum deprivation. *Mol Cell Biol* (19) 6323-32.
- Kim, K., Thu, N., Saville, B. and Safe, S. (2003). Domains of estrogen receptor alpha (ERalpha) required for ERalpha/Sp1-mediated activation of GC-rich promoters by estrogens and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 17(5), 804-17.
- Kim, M.Y., Woo, E.M., Chong, Y.T., Homenko, D.R. and Kraus, W.L. (2006). Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Mol Endocrinol* 20(7), 1479-93.
- King, R.A., Mano, M.M. and Head, R.J. (1998). Assessment of isoflavonoid concentrations in Australian bovine milk samples. *J Dairy Res* 65(3), 479-89.
- Kleiner, D.E. and Stetler-Stevenson, W.G. (1994). Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Analytical Biochemistry* 218(2), 325-329.
- Klinge, C.M. (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65(5), 227-51.
- Kousidou, O.C., Mitropoulou, T.N., Roussidis, A.E., Kletsas, D., Theocharis, A.D. and Karamanos, N.K. (2005). Genistein suppresses the invasive potential of human breast cancer cells through transcriptional regulation of metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Int J Oncol* 26(4), 1101-9.
- Kousteni, S., Bellido, T., Plotkin, L.I., O'Brien, C.A., Bodenner, D.L., Han, L., Han, K., DiGregorio, G.B., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., Roberson, P.K., Weinstein, R.S., Jilka, R.L. and Manolagas, S.C. (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104(5), 719-30.
- Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A. and Smithies, O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26), 15677-82.
- Kretz, O., Fester, L., Wehrenberg, U., Zhou, L., Brauckmann, S., Zhao, S., Prange-Kiel, J., Naumann, T., Jarry, H., Frotscher, M. and Rune, G.M. (2004). Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci* 24(26), 5913-21.

- Kritz-Silverstein, D., Von Muhlen, D., Barrett-Connor, E. and Bressel, M.A. (2003). Isoflavones and cognitive function in older women: the SOy and Postmenopausal Health In Aging (SOPHIA) Study. *Menopause* 10(3), 196-202.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. and Gustafsson, J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138(3), 863-70.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93(12), 5925-5930.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B. and Gustafsson, J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139(10), 4252-63.
- Kurtev, V., Margueron, R., Kroboth, K., Ogris, E., Cavailles, V. and Seiser, C. (2004). Transcriptional regulation by the repressor of estrogen receptor activity via recruitment of histone deacetylases. *J Biol Chem* (279) 24834-43.
- Kurzer, M.S. (2003). Phytoestrogen supplement use by women. *J Nutr* 133(6), 1983S-1986S.
- Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L., Scanlan, T.S., Shiau, A.K., Uht, R.M. and Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74(5), 311-7.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lampe, J.W. (2003). Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *J Nutr* 133 Suppl 3, 956S-964S.
- Lampe, J.W., Gustafson, D.R., Hutchins, A.M., Martini, M.C., Li, S., Wahala, K., Grandits, G.A., Potter, J.D. and Slavin, J.L. (1999). Urinary isoflavonoid and lignan excretion on a Western diet: relation to soy, vegetable, and fruit intake. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8(8), 699-707.
- Landmesser, U., Hornig, B. and Drexler, H. (2004). Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 109(21 Suppl 1), II27-33.
- Lanz, R.B., Chua, S.S., Barron, N., Soder, B.M., DeMayo, F. and O'Malley, B.W. (2003). Steroid receptor RNA activator stimulates proliferation as well as apoptosis in vivo. *Mol Cell Biol* (23) 7163-76.
- Le Bars, J. and Le Bars, P. (1987). Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. *Bull Assoc Anc El Inst Pasteur* 4ème trimestre 3-15.
- Le Goff, P., Montano, M.M., Schodin, D.J. and Katzenellenbogen, B.S. (1994). Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol Chem* 269(6), 4458-66.
- Leung, P.C. and Armstrong, D.T. (1980). Interactions of steroids and gonadotropins in the control of steroidogenesis in the ovarian follicle. *Annu Rev Physiol* 42, 71-82.
- Leung, Y.K., Mak, P., Hassan, S. and Ho, S.M. (2006). Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(35), 13162-7.
- Levin, E.R. (2005). Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 19(8), 1951-9.
- Leygue, E., Gol-Winkler, R., Gompel, A., Louis-Sylvestre, C., Soquet, L., Staub, S., Kuttann, F. and Mauvais-Jarvis, P. (1995). Estradiol stimulates c-myc proto-oncogene expression in normal human breast epithelial cells in culture. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52(4), 299-305.

- Liggins, J., Bluck, L.J., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W.A. and Bingham, S.A. (2000a). Daidzein and genistein content of fruits and nuts. *J Nutr Biochem* 11(6), 326-31.
- Liggins, J., Bluck, L.J., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W.A. and Bingham, S.A. (2000b). Daidzein and genistein contents of vegetables. *Br J Nutr* 84(5), 717-25.
- Liu, D., Homan, L.L. and Dillon, J.S. (2004). Genistein acutely stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cells by a cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent mechanism. *Endocrinology* 145(12), 5532-9.
- Lonard, D.M. and Smith, C.L. (2002). Molecular perspectives on selective estrogen receptor modulators (SERMs): progress in understanding their tissue-specific agonist and antagonist actions. *Steroids* 67(1), 15-24.
- Losel, R. and Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(1), 46-56.
- Lund, T.D. and Lephart, E.D. (2001). Dietary soy phytoestrogens produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze. *Brain Res* 913(2), 180-4.
- Maggiolini, M., Bonofiglio, D., Marsico, S., Panno, M.L., Cenni, B., Picard, D. and Ando, S. (2001). Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol.Pharmacol.* 60(3), 595-602.
- Maggiolini, M., Vivacqua, A., Fasanella, G., Recchia, A.G., Sisci, D., Pezzi, V., Montanaro, D., Musti, A.M., Picard, D. and Ando, S. (2004). The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J.Biol.Chem.* 279(26), 27008-27016.
- Manas, E.S., Xu, Z.B., Unwalla, R.J. and Somers, W.S. (2004). Understanding the selectivity of genistein for human estrogen receptor-beta using X-ray crystallography and computational methods. *Structure.* 12(12), 2197-2207.
- Manolagas, S.C., Kousteni, S. and Jilka, R.L. (2002). Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 57, 385-409.
- Marino, M., Acconcia, F., Bresciani, F., Weisz, A. and Trentalance, A. (2002). Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17beta-estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D(1) gene transcription in HepG2 cells. *Mol Biol Cell* 13(10), 3720-9.
- Marsaud, V., Gougelet, A., Maillard, S. and Renoir, J.M. (2003). Various phosphorylation pathways, depending on agonist and antagonist binding to endogenous estrogen receptor alpha (ERalpha), differentially affect ERalpha extractability, proteasome-mediated stability, and transcriptional activity in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 17(10), 2013-27.
- Martino, S., Costantino, J., McNabb, M., Mershon, J., Bryant, K., Powles, T. and Secret, R.J. (2004). The role of selective estrogen receptor modulators in the prevention of breast cancer: comparison of the clinical trials. *Oncologist* 9(2), 116-25.
- Mathey, J., Lamothe, V., Coxam, V., Potier, M., Sauvart, P. and Pelissero, C.B. (2006). Concentrations of isoflavones in plasma and urine of post-menopausal women chronically ingesting high quantities of soy isoflavones. *J Pharm Biomed Anal* 41(3), 957-65.
- Matsumura, A., Ghosh, A., Pope, G.S. and Darbre, P.D. (2005). Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94(5), 431-43.
- Matsuzaki, S., Fukaya, T., Suzuki, T., Murakami, T., Sasano, H. and Yajima, A. (1999). Oestrogen receptor alpha and beta mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 5(6), 559-64.

- Mawson, A., Lai, A., Carroll, J.S., Sergio, C.M., Mitchell, C.J. and Sarcevic, B. (2005). Estrogen and insulin/IGF-1 cooperatively stimulate cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of c-Myc and cyclin D1. *Mol Cell Endocrinol* 229(1-2), 161-73.
- McKenna, N.J., Lanz, R.B. and O'Malley, B.W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20(3), 321-44.
- Mechta-Grigoriou, F., Gerald, D. and Yaniv, M. (2001). The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. *Oncogene* 20(19), 2378-89.
- Mei, J., Yeung, S.S. and Kung, A.W. (2001). High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 86(11), 5217-21.
- Merot, Y., Metivier, R., Penot, G., Manu, D., Saligaut, C., Gannon, F., Pakdel, F., Kah, O. and Flouriot, G. (2004). The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell. *J.Biol.Chem.* 279(25), 26184-26191.
- Messina, M., Nagata, C. and Wu, A.H. (2006). Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. *Nutr Cancer* 55(1), 1-12.
- Messina, M.J. and Loprinzi, C.L. (2001). Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature. *J Nutr* 131(11 Suppl), 3095S-108S.
- Metivier, R., Penot, G., Flouriot, G. and Pakdel, F. (2001). Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. *Mol.Endocrinol.* 15(11), 1953-1970.
- Milder, I.E., Feskens, E.J., Arts, I.C., Bueno de Mesquita, H.B., Hollman, P.C. and Kromhout, D. (2005). Intake of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinoresinol in Dutch men and women. *J Nutr* 135(5), 1202-7.
- Milligan, S., Kalita, J., Pocock, V., Heyerick, A., De Cooman, L., Rong, H. and De Keukeleire, D. (2002). Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin. *Reproduction* 123(2), 235-42.
- Mo, R., Rao, S.M. and Zhu, Y.J. (2006). Identification of the MLL2 complex as a coactivator for estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* (281) 15714-20.
- Moore, J.T., McKee, D.D., Slentz-Kesler, K., Moore, L.B., Jones, S.A., Horne, E.L., Su, J.L., Kliewer, S.A., Lehmann, J.M. and Willson, T.M. (1998). Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 247(1), 75-8.
- Morabito, N., Crisafulli, A., Vergara, C., Gaudio, A., Lasco, A., Frisina, N., D'Anna, R., Corrado, F., Pizzoleo, M.A., Cincotta, M., Altavilla, D., Ientile, R. and Squadrito, F. (2002). Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res* 17(10), 1904-12.
- Moras, D. and Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 10(3), 384-91.
- Morito, K., Aomori, T., Hirose, T., Kinjo, J., Hasegawa, J., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatsu, M. and Masamune, Y. (2002). Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II). *Biol Pharm Bull* 25(1), 48-52.
- Mosselman, S., Polman, J. and Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 392(1), 49-53.

- Mousavi, Y. and Adlercreutz, H. (1992). Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41(3-8), 615-9.
- Mueller, S.O. and Korach, K.S. (2001). Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice. *Curr Opin Pharmacol* 1(6), 613-9.
- Mueller, S.O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M. and Korach, K.S. (2004). Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicol Sci* 80(1), 14-25.
- Murphy, L.C., Weitsman, G.E., Skliris, G.P., Teh, E.M., Li, L., Peng, B., Davie, J.R., Ung, K., Niu, Y.L., Troup, S., Tomes, L. and Watson, P.H. (2006). Potential role of estrogen receptor alpha (ERalpha) phosphorylated at Serine118 in human breast cancer in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102(1-5), 139-46.
- Newbold, R.R., Padilla-Banks, E. and Jefferson, W.N. (2006). Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology* 147(6 Suppl), S11-7.
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K. and van Leeuwen, P.A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74(4), 418-25.
- Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M. and Gustafsson, J.A. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81(4), 1535-65.
- Nilsson, U.W., Garvin, S. and Dabrosin, C. (2007). MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 102(3), 253-61.
- Norris, J.D., Fan, D., Sherk, A. and McDonnell, D.P. (2002). A negative coregulator for the human ER. *Mol Endocrinol* (16) 459-68.
- Oldenburg, R.A., Meijers-Heijboer, H., Cornelisse, C.J. and Devilee, P. (2007). Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? *Crit Rev Oncol Hematol* 63(2), 125-49.
- Olsson, H. (2000). Tumour biology of a breast cancer at least partly reflects the biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of initiation - a hypothesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74(5), 345-50.
- Osborne, C.K., Coronado-Heinsohn, E.B., Hilsenbeck, S.G., McCue, B.L., Wakeling, A.E., McClelland, R.A., Manning, D.L. and Nicholson, R.I. (1995). Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 87(10), 746-50.
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P.J. and Scanlan, T.S. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277(5331), 1508-10.
- Pappas, T.C., Gametchu, B. and Watson, C.S. (1995). Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *Faseb J* 9(5), 404-10.
- Pearce, S.T. and Jordan, V.C. (2004). The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 50(1), 3-22.
- Peeters, P.H., Slimani, N., van der Schouw, Y.T., Grace, P.B., Navarro, C., Tjonneland, A., Olsen, A., Clavel-Chapelon, F., Touillaud, M., Boutron-Ruault, M.C., Jenab, M., Kaaks, R., Linseisen, J., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Dilis, V., Boeing, H., Weikert, C., Overvad, K., Pala, V., Palli *et al.* (2007). Variations in plasma phytoestrogen concentrations in European adults. *J.Nutr.* 137(5), 1294-1300.

- Penot, G., Le Peron, C., Merot, Y., Grimaud-Fanouillere, E., Ferriere, F., Boujrad, N., Kah, O., Saligaut, C., Ducouret, B., Metivier, R. and Flouriot, G. (2005). The human estrogen receptor-alpha isoform hERalpha46 antagonizes the proliferative influence of hERalpha66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology* 146(12), 5474-5484.
- Penttinen, P., Jaehrling, J., Damdimopoulos, A.E., Inzunza, J., Lemmen, J.G., van der, S.P., Pettersson, K., Gauglitz, G., Makela, S. and Pongratz, I. (2007). Diet-derived polyphenol metabolite enterolactone is a tissue-specific estrogen receptor activator. *Endocrinology* .
- Pietras, R.J. and Szego, C.M. (1977). Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265(5589), 69-72.
- Pike, A.C. (2006). Lessons learnt from structural studies of the oestrogen receptor. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20(1), 1-14.
- Piller, R., Chang-Claude, J. and Linseisen, J. (2006). Plasma enterolactone and genistein and the risk of premenopausal breast cancer. *Eur J Cancer Prev* 15(3), 225-32.
- Polyak, K. (2001). On the birth of breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 1552(1), 1-13.
- Possemiers, S., Bolca, S., Grootaert, C., Heyerick, A., Decroos, K., Dhooge, W., De Keukeleire, D., Rabot, S., Verstraete, W. and Van de Wiele, T. (2006). The prenylflavonoid isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) is activated into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine. *J Nutr* 136(7), 1862-7.
- Potier, M., Elliot, S.J., Tack, I., Lenz, O., Striker, G.E., Striker, L.J. and Karl, M. (2001). Expression and regulation of estrogen receptors in mesangial cells: influence on matrix metalloproteinase-9. *J.Am.Soc.Nephrol.* 12(2), 241-251.
- Power, K.A., Saarinen, N.M., Chen, J.M. and Thompson, L.U. (2006). Mammalian lignans enterolactone and enterodiol, alone and in combination with the isoflavone genistein, do not promote the growth of MCF-7 xenografts in ovariectomized athymic nude mice. *Int J Cancer* 118(5), 1316-20.
- Pratt, W.B. and Toft, D.O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* 228(2), 111-33.
- Punyadeera, C., Verboost, P. and Groothuis, P. (2003). Oestrogen and progestin responses in human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84(4), 393-410.
- Ramsey, T.L., Risinger, K.E., Jernigan, S.C., Mattingly, K.A. and Klinge, C.M. (2004). Estrogen receptor beta isoforms exhibit differences in ligand-activated transcriptional activity in an estrogen response element sequence-dependent manner. *Endocrinology* 145(1), 149-60.
- Rapp, S.R., Espeland, M.A., Shumaker, S.A., Henderson, V.W., Brunner, R.L., Manson, J.E., Gass, M.L., Stefanick, M.L., Lane, D.S., Hays, J., Johnson, K.C., Coker, L.H., Dailey, M. and Bowen, D. (2003). Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *Jama* 289(20), 2663-72.
- Rassi, C.M., Lieberherr, M., Chaumaz, G., Pointillart, A. and Cournot, G. (2002). Down-regulation of osteoclast differentiation by daidzein via caspase 3. *J Bone Miner Res* 17(4), 630-8.
- Razandi, M., Pedram, A., Greene, G.L. and Levin, E.R. (1999). Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 13(2), 307-19.
- Redeuilh, G., Moncharmont, B., Secco, C. and Baulieu, E.E. (1987). Subunit composition of the molybdate-stabilized "8-9 S" nontransformed estradiol receptor purified from calf uterus. *J Biol Chem* 262(15), 6969-75.

- Reid, G., Hubner, M.R., Metivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J. and Gannon, F. (2003). Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ER α on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol.Cell.* 11(3), 695-707.
- Reifenstein, E.C. and Albright, F. (1947). The Metabolic Effects of Steroid Hormones in Osteoporosis. *J Clin Invest* 26(1), 24-56.
- Renaud, S. and Ruf, J.C. (1994). The French paradox: vegetables or wine. *Circulation* 90(6), 3118-9.
- Renoir, J.M., Buchou, T. and Baulieu, E.E. (1986). Involvement of a non-hormone-binding 90-kilodalton protein in the nontransformed 8S form of the rabbit uterus progesterone receptor. *Biochemistry* 25(21), 6405-13.
- Rice, S. and Whitehead, S.A. (2007). Phytoestrogens oestrogen synthesis and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.*
- Richter, K. and Buchner, J. (2001). Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol* 188(3), 281-90.
- Roelens, F., Heldring, N., Dhooge, W., Bengtsson, M., Comhaire, F., Gustafsson, J.A., Treuter, E. and De Keukeleire, D. (2006). Subtle side-chain modifications of the hop phytoestrogen 8-prenylnaringenin result in distinct agonist/antagonist activity profiles for estrogen receptors alpha and beta. *J Med Chem* 49(25), 7357-65.
- Ross, J.A. and Kasum, C.M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 22, 19-34.
- Rowland, I., Faughnan, M., Hoey, L., Wahala, K., Williamson, G. and Cassidy, A. (2003). Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br J Nutr* 89 Suppl 1, S45-58.
- Rudland, P.S., Fernig, D.G. and Smith, J.A. (1995). Growth factors and their receptors in neoplastic mammary glands. *Biomed Pharmacother* 49(9), 389-99.
- Russo, I.H. and Russo, J. (1998). Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3(1), 49-61.
- Russo, J., Moral, R., Balogh, G.A., Mailo, D. and Russo, I.H. (2005). The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 7(3), 131-42.
- Russo, J. and Russo, I.H. (2004). Development of the human breast. *Maturitas* 49(1), 2-15.
- Saarinen, N.M., Warri, A., Airio, M., Smeds, A. and Makela, S. (2007). Role of dietary lignans in the reduction of breast cancer risk. *Mol.Nutr.Food Res.* .
- Sabbah, M., Courilleau, D., Mester, J. and Redeuilh, G. (1999). Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20), 11217-22.
- Sacks, F.M. and Walsh, B.W. (1994). Sex hormones and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 5(3), 236-40.
- Safe, S. (2001). Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm* 62, 231-52.
- Saitoh, S., Sato, T., Harada, H. and Takita, T. (2001). Transfer of soy isoflavone into the egg yolk of chickens. *Biosci Biotechnol Biochem* 65(10), 2220-5.
- Sathyamoorthy, N., Wang, T.T. and Phang, J.M. (1994). Stimulation of pS2 expression by diet-derived compounds. *Cancer Res* 54(4), 957-61.
- SCEES (2006). Panorama des industries agroalimentaires. *MAP Edt* 26p.

- Schaefer, O., Humpel, M., Fritzemeier, K.H., Bohlmann, R. and Schleuning, W.D. (2003). 8-Prenyl naringenin is a potent ERalpha selective phytoestrogen present in hops and beer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84(2-3), 359-60.
- Schafer, J.M., Lee, E.S., Dardes, R.C., Bentrem, D., O'Regan, R.M., De Los Reyes, A. and Jordan, V.C. (2001). Analysis of cross-resistance of the selective estrogen receptor modulators arzoxifene (LY353381) and LY117018 in tamoxifen-stimulated breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 7(8), 2505-12.
- Schmidt, S., Michna, H. and Diel, P. (2005). Combinatory effects of phytoestrogens and 17beta-estradiol on proliferation and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94(5), 445-9.
- Schrager, S. and Potter, B.E. (2004). Diethylstilbestrol exposure. *Am Fam Physician* 69(10), 2395-400.
- Schreihofner, D.A. (2005). Transcriptional regulation by phytoestrogens in neuronal cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 231(1-2), 13-22.
- Sentis, S., Le Romancer, M., Bianchin, C., Rostan, M.C. and Corbo, L. (2005). Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 19(11), 2671-84.
- Seo, H.S., DeNardo, D.G., Jacquot, Y., Laios, I., Vidal, D.S., Zambrana, C.R., Leclercq, G. and Brown, P.H. (2006). Stimulatory effect of genistein and apigenin on the growth of breast cancer cells correlates with their ability to activate ER alpha. *Breast Cancer Res.Treat.* 99(2), 121-134.
- Setchell, K.D. (1985). Naturally occurring non steroidal estrogens of dietary origin. *Elsevier Science*, 69-85.
- Setchell, K.D., Brown, N.M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B.E., Brashear, W.T., Kirschner, A.S., Cassidy, A. and Heubi, J.E. (2001). Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* 131(4 Suppl), 1362S-75S.
- Setchell, K.D., Brown, N.M., Desai, P.B., Zimmer-Nechimias, L., Wolfe, B., Jakate, A.S., Creutzinger, V. and Heubi, J.E. (2003). Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *J Nutr* 133(4), 1027-35.
- Setchell, K.D., Brown, N.M. and Lydeking-Olsen, E. (2002). The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* 132(12), 3577-84.
- Setchell, K.D. and Cassidy, A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129(3), 758S-767S.
- Setchell, K.D., Clerici, C., Lephart, E.D., Cole, S.J., Heenan, C., Castellani, D., Wolfe, B.E., Nechemias-Zimmer, L., Brown, N.M., Lund, T.D., Handa, R.J. and Heubi, J.E. (2005). S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am J Clin Nutr* 81(5), 1072-9.
- Setchell, K.D., Lawson, A.M., Borriello, S.P., Harkness, R., Gordon, H., Morgan, D.M., Kirk, D.N., Adlercreatz, H., Anderson, L.C. and Axelson, M. (1981). Lignan formation in man--microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *Lancet* 2(8236), 4-7.
- Shelnutt, S.R., Cimino, C.O., Wiggins, P.A., Ronis, M.J. and Badger, T.M. (2002). Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *Am J Clin Nutr* 76(3), 588-94.

- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A. and Greene, G.L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95(7), 927-37.
- Shulman, R.G., Hyder, F. and Rothman, D.L. (2002). Biophysical basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Q Rev Biophys* 35(3), 287-325.
- Si, H. and Liu, D. (2008). Genistein, a soy phytoestrogen, upregulates the expression of human endothelial nitric oxide synthase and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 138(2), 297-304.
- Silberberg, M. (2005). Etude de l'absorption et du métabolisme des polyphénols : Interactions entre micronutriments, influence de l'état physiopathologique. *thèse*.
- Simoncini, T., Genazzani, A.R. and Liao, J.K. (2002). Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. *Circulation* 105(11), 1368-73.
- Simpson, E.R. (2003). Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86(3-5), 225-30.
- Smith, E.P., Boyd, J., Frank, G.R., Takahashi, H., Cohen, R.M., Specker, B., Williams, T.C., Lubahn, D.B. and Korach, K.S. (1994). Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 331(16), 1056-61.
- Smith, C.L., Onate, S.A., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1996). CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* (93), 8884-8.
- Smith, C.L. and O'Malley, B.W. (2004). Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* (25), 45-71.
- Spencer, J.L., Waters, E.M., Romeo, R.D., Wood, G.E., Milner, T.A. and McEwen, B.S. (2007). Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front Neuroendocrinol*.
- Sporn, M.B. (2004). Arzoxifene: a promising new selective estrogen receptor modulator for clinical chemoprevention of breast cancer. *Clin Cancer Res* 10(16), 5313-5.
- Steger, G.G., Bartsch, R., Wenzel, C., Pluschnig, U., Hussian, D., Sevela, U., Locker, G.J., Gnant, M.F., Jakesz, R. and Zielinski, C.C. (2005). Fulvestrant ('Faslodex') in pre-treated patients with advanced breast cancer: a single-centre experience. *Eur J Cancer* 41(17), 2655-61.
- Stein, B. and Yang, M.X. (1995). Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol Cell Biol* 15(9), 4971-9.
- Stenoien, D.L., Patel, K., Mancini, M.G., Dutertre, M., Smith, C.L., O'Malley, B.W. and Mancini, M.A. (2001). FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. *Nat Cell Biol* 3(1), 15-23.
- Syed, F. and Khosla, S. (2005). Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biochem Biophys Res Commun* 328(3), 688-96.
- Tan-Chiu, E., Wang, J., Costantino, J.P., Paik, S., Butch, C., Wickerham, D.L., Fisher, B. and Wolmark, N. (2003). Effects of tamoxifen on benign breast disease in women at high risk for breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95(4), 302-7.
- Tewari, M., Pradhan, S., Singh, U. and Shukla, H.S. (2007). Estrogen and progesterone receptor status in breast cancer: effect of oral contraceptive pills and hormone replacement therapy. *Breast* 16(5), 540-5.
- Teyssier, C., Belguise, K., Galtier, F. and Chalbos, D. (2001). Characterization of the physical interaction between estrogen receptor alpha and JUN proteins. *J Biol Chem* 276(39), 36361-9.

- Tcherepanova, I., Puigserver, P., Norris, J.D., Spiegelman, B.M. and McDonnell, D.P. (2000). Modulation of estrogen receptor-alpha transcriptional activity by the coactivator PGC-1. *J Biol Chem* (275), 16302-8.
- Thibault, C. and Levasseur, M.C. (2001). La reproduction chez les mammifères et l'homme. *INRA Ellipse Eds*, 936.
- This, P. and Guyot, B. (2004). [Raloxifene and breast: from the SERMs concept to its place in clinical practice]. *Gynecol Obstet Fertil* 32(1), 75-84.
- Thompson, L.U., Boucher, B.A., Liu, Z., Cotterchio, M. and Kreiger, N. (2006). Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestrol. *Nutr Cancer* 54(2), 184-201.
- Totta, P., Acconcia, F., Leone, S., Cardillo, I. and Marino, M. (2004). Mechanisms of naringenin-induced apoptotic cascade in cancer cells: involvement of estrogen receptor alpha and beta signalling. *IUBMB Life* 56(8), 491-9.
- Touillaud, M.S., Thiebaut, A.C., Fournier, A., Niravong, M., Boutron-Ruault, M.C. and Clavel-Chapelon, F. (2007). Dietary lignan intake and postmenopausal breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status. *J Natl Cancer Inst* 99(6), 475-86.
- Tzukerman, M.T., Esty, A., Santiso-Mere, D., Danielian, P., Parker, M.G., Stein, R.B., Pike, J.W. and McDonnell, D.P. (1994). Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol.Endocrinol.* 8(1), 21-30.
- Vadlamudi, R.K., Wang, R.A., Mazumdar, A., Kim, Y., Shin, J., Sahin, A. and Kumar, R. (2001). Molecular cloning and characterization of PELP1, a novel human coregulator of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* (276), 38272-9.
- Van Hinsbergh V.W.M., Engelse M.A. and Quax P.H.A.(2006). Pericellular protease in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*(26), 716-728.
- Vanharanta, M., Voutilainen, S., Rissanen, T.H., Adlercreutz, H. and Salonen, J.T. (2003). Risk of cardiovascular disease-related and all-cause death according to serum concentrations of enterolactone: Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Arch Intern Med* 163(9), 1099-104.
- Vergne, S., Bennetau-Pelissero, C., Lamothe, V., Chantre, P., Potier, M., Asselineau, J., Perez, P., Durand, M., Moore, N. and Sauvant, P. (2008a). Higher bioavailability of isoflavones after a single ingestion of a soya-based supplement than a soya-based food in young healthy males. *Br J Nutr* 99(2), 333-44.
- Vergne, S., Chaumaz, G., Potier, M., Rosier-Sala, C., Bennetau-Pelissero, C., Lieberherr, M. and Sauvant, P. (2008b). Equol increases alkaline phosphatase activity of the human osteosarcoma cell line MG63 via estrogen receptors. *en préparation*.
- Veronesi, U., Maisonneuve, P., Rotmensz, N., Costa, A., Sacchini, V., Travaglini, R., D'Aiuto, G., Lovison, F., Gucciardo, G., Muraca, M.G., Pizzichetta, M.A., Conforti, S., Decensi, A., Robertson, C. and Boyle, P. (2003). Italian randomized trial among women with hysterectomy: tamoxifen and hormone-dependent breast cancer in high-risk women. *J Natl Cancer Inst* 95(2), 160-5.
- Walsh, B.W., Kuller, L.H., Wild, R.A., Paul, S., Farmer, M., Lawrence, J.B., Shah, A.S. and Anderson, P.W. (1998). Effects of raloxifene on serum lipids and coagulation factors in healthy postmenopausal women. *Jama* 279(18), 1445-51.
- Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J.M., Jeltsch, J.M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M. and et al. (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(23), 7889-93.

- Wang, C., Fu, M., Angeletti, R.H., Siconolfi-Baez, L., Reutens, A.T., Albanese, C., Lisanti, M.P., Katzenellenbogen, B.S., Kato, S., Hopp, T., Fuqua, S.A., Lopez, G.N., Kushner, P.J. and Pestell, R.G. (2001). Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem* 276(21), 18375-83.
- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y. and Deuel, T.F. (2006). A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(24), 9063-8.
- Weatherman, R.V. and Scanlan, T.S. (2001). Unique protein determinants of the subtype-selective ligand responses of the estrogen receptors (ER α and ER β) at AP-1 sites. *J Biol Chem* 276(6), 3827-32.
- Webb, P., Nguyen, P., Valentine, C., Lopez, G.N., Kwok, G.R., McInerney, E., Katzenellenbogen, B.S., Enmark, E., Gustafsson, J.A., Nilsson, S. and Kushner, P.J. (1999). The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol* 13(10), 1672-85.
- Wessler, S., Otto, C., Wilck, N., Stangl, V. and Fritzemeier, K.H. (2006). Identification of estrogen receptor ligands leading to activation of non-genomic signaling pathways while exhibiting only weak transcriptional activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 98(1), 25-35.
- Wijayaratne, A.L. and McDonnell, D.P. (2001). The human estrogen receptor- α is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J Biol Chem* 276(38), 35684-92.
- Writing Group for the Women's Health Initiative, I. and Rossouw J.E. (2002). Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA* 288, 321-333.
- Wu, F. and Safe, S. (2007). Differential activation of wild-type estrogen receptor alpha and C-terminal deletion mutants by estrogens, antiestrogens and xenoestrogens in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103(1), 1-9.
- Xie, L.H., Akao, T., Hamasaki, K., Deyama, T. and Hattori, M. (2003). Biotransformation of pinoresinol diglucoside to mammalian lignans by human intestinal microflora, and isolation of *Enterococcus faecalis* strain PDG-1 responsible for the transformation of (+)-pinoresinol to (+)-lariciresinol. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 51(5), 508-15.
- Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F.J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1998). Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science* (279), 1922-5.
- Xu, J., Liao, L., Ning, G., Yoshida-Komiya, H., Deng, C. and O'Malley, B.W. (2000). The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* (97), 6379-84.
- Yaffe, K., Vittinghoff, E., Ensrud, K.E., Johnson, K.C., Diem, S., Hanes, V. and Grady, D. (2006). Effects of ultra-low-dose transdermal estradiol on cognition and health-related quality of life. *Arch Neurol* 63(7), 945-50.
- Yager, J.D. and Davidson, N.E. (2006). Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *New Eng. Jour. Med.*(354), 270-82.
- Yoon, K., Pallaroni, L., Stoner, M., Gaido, K. and Safe, S. (2001). Differential activation of wild-type and variant forms of estrogen receptor alpha by synthetic and natural estrogenic compounds using a promoter containing three estrogen-responsive elements. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78(1), 25-32.

- Yudt, M.R., Vorobjeikina, D., Zhong, L., Skafar, D.F., Sasson, S., Gasiewicz, T.A. and Notides, A.C. (1999). Function of estrogen receptor tyrosine 537 in hormone binding, DNA binding, and transactivation. *Biochemistry* 38(43), 14146-56.
- Yue, W., Santen, R.J., Wang, J.P., Li, Y., Verderame, M.F., Bocchinfuso, W.P., Korach, K.S., Devanesan, P., Todorovic, R., Rogan, E.G. and Cavalieri, E.L. (2003). Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86(3-5), 477-86.
- Zallone, A. (2006). Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 173-9.
- Zhang, F.L. and Casey, P.J. (1996). Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* 65, 241-69.
- Zhang, H., Thomsen, J.S., Johansson, L., Gustafsson, J.A. and Treuter, E. (2000). DAX-1 functions as an LXXLL-containing corepressor for activated estrogen receptors. *J Biol Chem* (275) 39855-9.
- Zhang, Y., Hendrich, S. and Murphy, P.A. (2003). Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women. *J Nutr* 133(2), 399-404.
- Zhao, L., Chen, Q. and Diaz Brinton, R. (2002). Neuroprotective and neurotrophic efficacy of phytoestrogens in cultured hippocampal neurons. *Exp Biol Med (Maywood)* 227(7), 509-19.
- Zhu, B.T., Han, G.Z., Shim, J.Y., Wen, Y. and Jiang, X.R. (2006). Quantitative structure-activity relationship of various endogenous estrogen metabolites for human estrogen receptor alpha and beta subtypes: Insights into the structural determinants favoring a differential subtype binding. *Endocrinology* 147(9), 4132-50.
- Zierau, O., Hamann, J., Tischer, S., Schwab, P., Metz, P., Vollmer, G., Gutzeit, H.O. and Scholz, S. (2005). Naringenin-type flavonoids show different estrogenic effects in mammalian and teleost test systems. *Biochem Biophys Res Commun* 326(4), 909-16.
- Zucker, S., Lysik, R.M., Zarrabi, M.H. and Moll, U. (1993). M(r) 92,000 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer. *Cancer Res* 53(1), 140-6.