



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



U.F.R Sciences et Techniques Biologiques

Ecole Doctorale Biologie, Santé, Environnement

FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES

SCD UHP NANCY 1
Bibliothèque des Sciences
Rue du Jardin Botanique - CS 20148
54601 VILLERS LES NANCY CEDEX

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

en Biologie Cellulaire

par **Nicolas ETIQUE**

Mécanisme d'action de l'éthanol sur la prolifération et la migration des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 : implication de la voie de signalisation des œstrogènes

Soutenance publique prévue le 8 novembre 2006 devant la commission d'examen

Membres du jury :

Rapporteurs : **M. Guy LECLERCQ**

Professeur, Université Libre de Bruxelles, Belgique

Mme Dany CHALBOS

Directrice de Recherche INSERM, Montpellier

Examineurs : **M. Stéphane FLAMENT**

Professeur, U.H.P., Nancy I (Directeur de thèse)

M. Jean louis MERLIN

Professeur, U.H.P., Nancy I (Président du jury)

Mme Martine DUTERQUE-COQUILLAUD Chargée de Recherche, CNRS, Lille

Mme Isabelle GRILLIER-VUISOZ

Maître de Conférences, U.H.P., Nancy I

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Comité 54 de la Ligue contre le cancer pour le soutien financier apporté à ces travaux ainsi que pour l'allocation de recherche qu'il m'a octroyée pendant 3 années.

J'exprime tous mes remerciements aux membres du jury, Mme Dany Chalbos, Directrice de Recherche INSERM, Mr Guy Leclercq, Professeur au laboratoire J-C Heuson de cancérologie mammaire de Bruxelles, Mr Jean-Louis Merlin, Professeur à l'Université Henri Poincaré de Nancy et Mme Martine Duterque-Coquillaud, Chargée de Recherche CNRS, pour avoir accepté de participer à ma soutenance de thèse et de juger mon travail.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur Stéphane Flament, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire mais surtout pour sa disponibilité, nos discussions scientifiques et techniques ainsi que pour ses conseils au cours de la rédaction de ce manuscrit. Plus qu'un simple directeur de thèse, c'est une personne aux qualités humaines exceptionnelles qui a toujours porté intérêt à mes préoccupations personnelles et professionnelles et qui m'a toujours soutenu dans les moments difficiles.

Je remercie également, Madame le Docteur Isabelle Grillier-Vuissoz, pour le co-encadrement de cette thèse, ses conseils scientifiques, techniques et professionnels, mais aussi pour sa sympathie et sa bonne humeur.

Je n'aurais garde d'oublier les personnes qui ont contribué, au cours de discussions informelles mais approfondies, à l'avancée de mes travaux, notamment les Docteurs Sabine Mazerbourg, Hélène Dumond, Dominique Chardard, Amand Chesnel et Hervé Schohn.

Merci également à Sylvie Laine pour sa sympathie, ses nombreux services rendus et notamment sa contribution dans le référencement des données bibliographiques de ce manuscrit.

Ma gratitude va également aux membres du laboratoire dont j'ai apprécié la présence attentive tout au long de mon travail, notamment Gilles Jacquemin, Armelle Ropars, Jean-Pol Frippiat, Martine Callier, Alain Iuretig et Jean Charles Olry. Mais aussi Chia-I, Julie, Natacha et Sandra, mes collègues "thésards", pour les bons moments partagés au cours de ces quatre années mais aussi pour leur aide et leurs conseils.

Ces remerciements seraient incomplets si je n'évoquais pas aussi Kévin, Céline, Philippe, Chroune, Miki, Axelle, Jérôme et spécialement Magali, Alex, Sibel et Guigui pour

nos repas arrosés de bons vins, nos soirées foot et nos parties interminables de barbu, belote et tarot. Cette thèse m'aura permis de tisser avec vous de véritables liens d'amitié qui je l'espère nous permettront de nous revoir dans les années futures.

Merci aussi à vous Sylvain, Vanessa, Yann, Virginie, Arnauld, Julie et Tony. Sans vous en rendre compte, c'est aussi grâce à votre amitié, nos soirées "ciné" et nos sorties Ch'timi arrosées de Gordon que j'ai pu mener à bien ce travail.

Enfin, merci à toi Julien et à vous, Papa et Maman, ce manuscrit c'est aussi un peu le vôtre. Sans votre soutien, votre amour et votre confiance depuis tant d'années, je n'aurais jamais atteint cet objectif.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
ABREVIATIONS	5
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	8
1. LE CANCER DU SEIN	8
1.1. Incidence	8
1.2. Facteurs de risques	8
1.2.1. Facteurs génétiques	8
1.2.2. Facteurs environnementaux	9
1.2.3. Facteurs hormonaux	11
1.2.3.1. Hormones endogènes	11
1.2.3.2. Hormones exogènes	11
1.2.4. Facteurs pronostiques et survie	12
1.3. Le sein : anatomie, carcinogenèse et développement tumoral	13
1.3.1. Le sein normal : architecture et développement	13
1.3.1.1. Architecture	13
1.3.1.2. Développement	14
1.3.2. Mécanismes de déclenchement tumoral	15
1.3.3. Développement tumoral, invasion et métastases	17
1.3.3.1. Croissance de la tumeur	18
1.3.3.2. Angiogenèse	19
1.3.3.3. Invasion tumorale et métastases	19
1.3.4. Anatomie pathologique des cancers du sein	20
1.3.4.1. Classification clinique	21
1.3.4.2. Classification histologique	21
1.4. Stratégies thérapeutiques	22
1.4.1. Chirurgie	22
1.4.2. Radiothérapie	23
1.4.3. Chimiothérapie	23
1.4.4. Hormonothérapie	24
1.4.4.1. Hormonothérapie soustractive	25
1.4.4.2. Hormonothérapie additive	25
1.4.4.3. Hormonothérapie inhibitrice	26

1.4.4.4. Hormonothérapie compétitive.....	27
1.4.4.5. Nouvelles stratégies thérapeutiques.....	28
2. ŒSTROGÈNES, AROMATASE ET CANCER MAMMAIRE.....	28
2.1. Les œstrogènes.....	28
2.2. Le complexe enzymatique aromatase.....	29
2.2.1. Structure et fonction.....	29
2.2.2. Localisation cellulaire et tissulaire.....	30
2.2.3. Structure génomique et expression tissu-spécifique de l'aromatase.....	31
2.2.4. Expression et régulation dans les tumeurs mammaires.....	31
2.2.4.1. L'élément régulateur S1.....	32
2.2.4.2. Régulation par l'AMPc.....	33
2.2.4.2. Régulation par Snail et Slug.....	34
2.2.5. Rôle et conséquences de l'expression d'aromatase dans la tumeurs.....	34
2.3. Les récepteurs aux œstrogènes.....	35
2.3.1. Le gène codant l'ER α	36
2.3.1.1. Structure génomique.....	36
2.3.1.2. Les différents variants et isoformes d'ARNm.....	37
2.3.1.3. Expression et régulation dans les tumeurs mammaires.....	37
2.3.2. Structure du récepteur alpha aux œstrogènes.....	39
2.3.3. Mécanisme d'action de l'ER α	41
2.3.3.1. Voie d'activation de la transcription dite "classique".....	41
2.3.3.2. Voie d'activation de la transcription ERE indépendante.....	44
2.3.3.3. Voie d'activation de la transcription dite "non génomique".....	45
2.3.3.4. Voie d'activation de la transcription ligand indépendante.....	46
2.3.4. Gènes cibles de l'ER α et conséquences de son expression dans la tumeur.....	49
3. ALCOOLS ET CANCERS MAMMAIRES.....	52
3.1. L'éthanol.....	52
3.1.1. Propriétés physico-chimiques.....	52
3.1.2. Métabolisme général.....	52
3.1.2.1. Alcool déshydrogénase.....	53
3.1.2.2. Cytochrome P450 2E1.....	54
3.1.2.3. Voie de la catalase et voie radicalaire.....	54
3.1.2.4. Aldéhyde déshydrogénase.....	54
3.1.3. Pharmacocinétique de l'éthanol.....	55
3.2. Données épidémiologiques.....	56
3.2.1. L'alcool et les femmes.....	56
3.2.2. L'alcool et risque de cancer mammaire.....	56

3.3. Mécanismes d'action de l'éthanol dans la cancérogenèse mammaire.....	57
3.3.1. Métabolisme de l'éthanol, stress oxydatif et mutagenèse.....	58
3.3.2. Métabolisme des monocarbones et méthylation.....	59
3.3.2. Métabolisme et réponse aux œstrogènes.....	60
4. OBJECTIFS DE LA THESE.....	63
 CHAPITRE 2 : RESULTATS.....	65
1. ETHANOL, PROLIFERATION CELLULAIRE ET AROMATASE.....	65
1.1. Etude des effets de l'éthanol sur la prolifération, l'expression de l'aromatase et de l'ER α dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7.....	65
1.1.1. Introduction.....	65
1.1.2. Principaux résultats.....	66
1.1.3. Conclusion.....	66
1.2. Etude des effets d'autres alcools sur la prolifération, l'expression de l'aromatase et de l'ER α dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7.....	68
1.2.1. Introduction.....	68
1.2.2. Principaux résultats.....	68
1.2.3. Conclusion.....	69
2. ETHANOL ET POTENTIEL METASTATIQUE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES.....	70
2.1. Introduction.....	70
2.2. Principaux résultats.....	71
2.3. Conclusion.....	71
3. ETHANOL ET VOIE DE SIGNALISATION DES ŒSTROGÈNES.....	73
3.1. Introduction.....	73
3.2. Principaux résultats.....	74
3.3. Conclusion.....	75
4. EFFETS DE L'ETHANOL ET CYCLOOXYGENASE-2.....	77
4.1. Introduction.....	77
4.2. Matériel et méthodes.....	78
4.2.1. Matériel.....	78
4.2.2. Culture cellulaire et traitement.....	78
4.2.3. RT-PCR semi-quantitative.....	79
4.2.4. Dosage des prostaglandines PGE2.....	79
4.3. Résultats.....	79
4.4. Discussion et conclusion.....	81
5. SYNTHÈSE.....	82

CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	84
1. PERTINENCE BIOLOGIQUE DES DOSES D'ETHANOL ET DE LA DUREE DES TRAITEMENTS	84
2. EFFET DE L'ETHANOL SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES	86
2.1. Rôle de l'ER α	87
2.2. Rôle de l'aromatase	89
2.1. L'AMPc : un facteur clef ?	90
3. EFFET DE L'ETHANOL SUR LA MIGRATION DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES	92
3.1. Sécrétion de la métalloprotéase-9	92
3.2. Sécrétion de la métalloprotéase-2	93
4. PERSPECTIVES	95
4.1. Poursuite des études <i>in vitro</i> sur les cellules MCF-7	95
4.2. Implication des voies de signalisation activées par l'éthanol dans la prolifération et la migration	96
4.3. Utilisation d'autres lignées cellulaires et étude <i>in vivo</i> des effets de l'alcool	96
4.4. Analyse de tumeurs de patientes alcooliques	97
4.5. Le récepteur A _{2a} à l'adénosine : une nouvelle cible thérapeutique	98
4. CONCLUSION GENERALE	99
CHAPITRE 4 : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	100

LISTE DES ABREVIATIONS

5-FU : 5-FluoroUracile

A_{2a}AR : *A_{2a} Adénosine Receptor* (Récepteur A_{2a} à l'adénosine)

ADH : Alcool Déshydrogénase

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

AJCC : American Joint Committee on Cancer (Comité canadien sur la stadification du cancer)

ALDH : ALdéhyde DésHydrogénase

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

AOX : Aldéhyde OXydase

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ATCC : *American Type Culture Collection*

CARM-1 : *Coactivator - asociated arginine methyltransferase 1* (Arginine méthyltransférase associée aux coactivateurs)

CBP : *CREB Binding Protein* (Protéine de liaison à CREB)

COUP-TF : *Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor* (facteur de transcription du promoteur de l'ovalbumine de poulet)

COX : Cyclooxygénase

CRE : *cAMP Responsive Element* (Elément de réponse à l'AMPc)

CREB : *cAMP Responsive Element Binding protein* (Proteine de liaison aux Elément de réponse à l'AMPc)

DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

E₁ : Oestrone

E₂ : 17β-œstradiol

E₃ : oestriol

EGF : *Epidermal Growth Factor* (Facteur de croissance épidermique)

ER : *Estrogen Receptor* (Récepteur aux oestrogènes)

ERα : *Estrogen Receptor alpha* (Récepteur alpha aux oestrogènes)

ERβ : *Estrogen Receptor beta* (Récepteur beta aux oestrogènes)

ERBF-1 : *Estrogen Receptor promoter B associated Factor-1* (Facteur associé au promoteur B du récepteur aux oestrogènes)

ERE : *Estrogen Response Element* (élément de réponse aux oestrogènes)

FGF : *Fibroblast Growth Factor* (Facteur de croissance fibroblastique)

FSH : *Follicle-Stimulating Hormone* (Hormone folliculostimulante)

GAS : *Gamma interferon Activation Site* (Séquence Activée par l'interferon- γ)

GnRH : *Gonadotropin-Releasing Hormone* (Facteur de libération des gonadotrophines)

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography* (Chromatographie liquide haute performance)

Hsp : Heat Shock Protein (Protéine de choc thermique)

IGF : *Insulin-like Growth Factor* (Le facteur de croissance ressemblant à l'insuline)

IL : InterLeukine

Kb : Kilobases

LBD : *Ligand Binding Domain* (Domaine de liaison au ligand)

LH-RH : *Luteinizing Hormone-Releasing-Hormone* (facteur de libération de l'hormone lutéinisante)

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase (Protéine kinase activée par des mitogènes)

MEOS : Microsomal Ethanol Oxidizing System (Système microsomal d'oxydation de l'éthanol)

MMP : *Matrix Metalloprotéases* (métalloprotéinase de la matrice)

MTT : MethylThiazol Tetrazolium

MTX : MéthoTréXate

NF- κ B : Nuclear Factor Kappa B (Facteur nucléaire Kappa B)

NID : *Nuclear receptor Interaction Domain* (Domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires)

P450arom : aromatasé cytochrome P450

pb : Paire de bases

PBS : *Phosphate Buffer Saline* (Tampon phosphate salin)

pCAF : *p300/CBP associated factor* (Facteur associé au complexe p300/CBP)

PCB : PolyChloro Biphényles

PGE2 : Prostaglandine E₂

PI3K/Akt : PhosphoInositol-3-Kinase/Akt

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate

PR : *Progesterone Receptor* (Récepteur à la Progestérone)

pRb : protéine du Rétinoblastome

RAR : *Retinoic acid receptor* (Récepteur à l'acide rétinoïque)
 RT-PCR : *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*
 SERD : *Selective ER Downregulator* (Régulateur négatif du récepteur aux oestrogènes)
 SERM : *Selective ER Modulator* (Modulateur sélectif du récepteur aux oestrogènes)
 SF-1 : *Steroidogenic Factor 1* (Facteur stéroïdogène 1)
 SHBG : *Sex-Hormone-Binding Globulin* (Globuline de liaison des hormones sexuelles)
 siRNA : *Small interfering RNA* (Petit ARN interférant)
 Sp-1 : *GC-box Binding Protein* (Protéine de liaison aux boîtes GC)
 SRC : *Steroid Receptor Coactivator* (Coactivateur des récepteurs stéroïdiens)
 SVF : Sérum de Veau Foetal
 TGF : *Transforming Growth Factor* (Facteur de croissance transformant)
 TIMP-1 : *Tissue Inhibitor of MetalloProteinases 1* (inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases 1)
 TNF : *Tumor Necrosis Factor* (Facteur de nécrose tumoral)
 TNM : *Tumor Node Metastases* (Tumeur ganglions métastases)
 UICC : Union Internationale Contre le Cancer
 VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor* (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)
 XOR : *Xanthine OxydoRéductase*

Chapitre 1 :

INTRODUCTION

1. LE CANCER DU SEIN

1.1. Incidence

Le cancer du sein est le plus fréquent des cancers dans les pays occidentaux et constitue le premier cancer féminin dans le monde avec environ 1 million de cas par an (Dumitrescu *et al.*, 2005). En France, il représente 35,7 % de tous les cancers féminins et l'on observe en moyenne 42 000 nouveaux cas chaque année. Une femme sur 10 développera un cancer du sein au cours de sa vie. Cette pathologie est rare avant 30 ans, 95 % des cas surviennent après 40 ans dont près de la moitié sont diagnostiqués entre 50 et 69 ans.

Le cancer du sein est aussi la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Durant l'année 2000, sur les 57 734 femmes qui sont décédées d'un cancer, environ 20 % l'ont été à la suite d'un cancer du sein. Par ailleurs, son incidence s'accroît régulièrement, + 60 % en 20 ans, ce qui fait de cette pathologie un problème de santé publique majeur (Trétarre *et al.*, 2004).

1.2. Facteurs de risques

Il n'existerait pas de facteur unique responsable de l'apparition d'un cancer du sein. En réalité, plusieurs facteurs de risque ont été mis en évidence. Cette notion de risque est relative. Elle signifie seulement que la probabilité de développer ce type de cancer est un peu plus élevée que la moyenne.

1.2.1. Facteurs génétiques

Si tous les cancers sont dus à un dérèglement à l'échelle des gènes, seuls 5 à 10 % des cas de cancer sont liés à des anomalies génétiques héréditaires. L'antécédent familial est le facteur de risque le plus reconnu par la communauté scientifique. La probabilité cumulative qu'une femme de 30 ans, ayant une mère ou une soeur atteinte d'un cancer du sein, développe cette pathologie avant l'âge de 70 ans est comprise entre 7 % et 18 %. Cependant, le risque cumulatif de développer un cancer du sein chez une femme ayant des antécédents familiaux dépasse rarement 30 % (Sakorafas *et al.*, 2002). L'hétérogénéité génétique du "cancer du sein

familial" est bien déterminée. Plusieurs gènes impliqués dans la carcinogenèse mammaire héréditaire ont été identifiés. On trouve principalement les gènes *BRCA1*, *BRCA2*, *p53*, *PTEN* et ataxia-telangiectasia (*AT*) (Dumitrescu *et al.*, 2005).

80 à 90 % des cancers du sein héréditaires peuvent être attribués aux gènes *BRCA1* et *BRCA2* (Dumitrescu *et al.*, 2005). *BRCA1* est localisé sur le chromosome 17q et code une protéine nucléaire jouant un rôle dans les interactions protéine-protéine et ADN-protéine. La protéine *BRCA1* est aussi impliquée dans le contrôle de la recombinaison mitotique, dans la ségrégation des chromosomes ainsi que dans la réparation de l'ADN. *BRCA2* est localisé sur le chromosome 13q et code une histone acétylase transférase impliquée dans la régulation de la transcription avec une fonction suppresseur de tumeur. Elle interagit avec Rad51 dans la réparation de l'ADN et interagit avec *BRCA1* dans les voies d'activation de la protéine p53. Les femmes portant des mutations de type délétion au niveau de *BRCA1* ou *BRCA2*, présentent un risque considérable de développer un cancer du sein (80%). Ce risque est en moyenne dix fois supérieur à celui de la population générale (Daly *et al.*, 2005).

p53, localisé sur le chromosome 17p13, est un des gènes les plus communément mutés dans les cancers humains (environ 50% des cancers). Les femmes affectées par une mutation de *p53* présentent un risque de développer un cancer du sein avant l'âge de 45 ans ce qui est 18 fois supérieur à la moyenne.

Enfin, les mutations des gènes *PTEN* et *AT*, observées chez les patientes atteintes respectivement du syndrome de Cowden et de l'ataxie télangiectasie, augmentent de 25 à 50 % le risque de cancérogenèse mammaire (Dumitrescu *et al.*, 2005).

1.2.2. Facteurs environnementaux

Les variations d'incidence observées entre différents pays ou zones géographiques amènent à parler de risques environnementaux.

Les radiations ionisantes constituent le facteur de risque environnemental le mieux décrit. Les animaux de laboratoire et les populations humaines ayant été exposés à de fortes doses de radiations ionisantes présentent un taux de cancer du sein relativement élevé (Ronckers *et al.*, 2004). C'est le cas notamment des survivantes japonaises aux bombes atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki (Tokunaga *et al.*, 1987). D'autres types de radiations, comme les radiations cosmiques ou solaires, sont également susceptibles de jouer un rôle dans la carcinogenèse mammaire.

Un certain nombre de produits chimiques environnementaux peuvent augmenter le risque de cancer du sein. C'est notamment le cas des organochlorés tel que le Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) ou les Polychloro biphényles (PCB) qui ont longtemps été utilisés comme pesticides. Les dioxines ou encore les solvants organiques utilisés dans l'industrie sont également incriminés (Coyle *et al.*, 2004).

Le régime alimentaire semble aussi avoir une importance dans l'apparition des cancers mammaires. Récemment encore, on observait que le taux de cancer mammaire était 4 à 5 fois plus élevé dans les pays occidentaux qu'au Japon, qui est pourtant aussi développé économiquement. La raison de cet écart tiendrait aux différences de régime alimentaire. Pour preuve, cette divergence est moins importante entre les Japonaises émigrées depuis une génération aux Etats-Unis et les femmes américaines. Les premières ayant souvent adopté les habitudes nutritionnelles des secondes. La surconsommation de protéines et graisses animales a longtemps été incriminée. Cependant, même si les données épidémiologiques sont nombreuses, elles ne permettent pas à ce jour de conclure réellement quant à leur influence sur la carcinogenèse mammaire (Hanf *et al.*, 2005). Par ailleurs, il est clairement démontré que les femmes obèses post-ménopausées présentent un risque supérieur de cancer mammaire (Carmichael *et al.*, 2004; Dumitrescu *et al.*, 2005). La consommation d'alcool augmente également ce risque (voir 3).

La nocivité du tabac joue un rôle déterminant dans l'apparition de nombreux cancers (du poumon, de la langue, du larynx...). Qu'en est-il pour le cancer du sein ? Dès 1996, une étude suisse mettait en évidence des résultats intéressants : une femme qui fume ou qui a fumé un paquet par jour augmente son risque de cancer du sein de 4,6 fois par rapport à une femme qui n'a jamais fumé. Une fumeuse passive, qui est en contact direct avec la fumée des autres mais ne fume pas, augmente quant à elle ce risque de 3,2 fois (Morabia *et al.*, 1996). Plus récemment, des scientifiques canadiens concluaient que le tabagisme actif ainsi que l'exposition indirecte à la fumée pendant une longue période doublait le risque de cancer du sein avant la ménopause. Ce risque est 30 à 60% plus élevé après la ménopause (Johnson *et al.*, 2000).

D'autres facteurs environnementaux sont actuellement à l'étude, tels que les champs électromagnétiques, certaines infections virales, le manque d'activité sportive ou encore les troubles du rythme circadien (Coyle *et al.*, 2004).

1.2.3. Facteurs Hormonaux

Les œstrogènes et progestatifs sont fortement impliqués dans le développement de la glande mammaire et de ce fait jouent un rôle important en tant que facteur de risque du cancer du sein. Les carcinomes mammaires hormono-dépendants s'observent chez approximativement 60% des patientes préménopausées et chez 75% des patientes ménopausées. On distingue les hormones endogènes (œstrogènes et progestérone), des hormones exogènes pouvant être apportées par les contraceptifs oraux, les traitements substitutifs hormonaux ou encore les xénoœstrogènes.

1.2.3.1. Hormones endogènes

Le risque semble dépendre essentiellement du temps d'exposition de l'épithélium mammaire à ces hormones. De nombreuses variables, incluant l'âge des premières règles, celui de la première grossesse et de la ménopause ainsi que le nombre de grossesses, sont à prendre en compte. Ainsi, une ménarche précoce (avant 12 ans) augmente de 10 à 30 % le risque de cancer mammaire. De même, une ménopause tardive élève le risque de 3 % pour chaque année dépassant l'âge moyen de la ménopause. Ces résultats s'expliquent par l'augmentation, chez ces individus, du nombre de cycles ovulatoires. A l'inverse, des grossesses précoces ou nombreuses et des lactations prolongées, diminuent le risque de cancer du sein (Dumitrescu *et al.*, 2005; Sakorafas *et al.*, 2002).

D'une manière générale, c'est la concentration et le type d'hormones présentes dans le sérum qui va influencer le risque de carcinogenèse mammaire. Ainsi, une augmentation du taux d'œstrone, d'œstradiol et/ou de testostérone est corrélée à une augmentation du risque de cancer du sein (Feigelson *et al.*, 1996; Key *et al.*, 2002). En revanche la progestérone, n'augmenterait pas ce risque et pourrait avoir un effet préventif (Campagnoli *et al.*, 2005).

1.2.3.2. Hormones exogènes

Au cours des trois dernières décennies, des sources externes d'hormones stéroïdes, favorisant la prolifération cellulaire et de ce fait le risque de cancer du sein hormono-dépendant, ont été largement utilisées. Les traitements hormonaux substitutifs et la contraception orale sont les deux sources d'hormones exogènes les plus étudiées.

Les contraceptifs oraux contiennent généralement un œstrogène et de fortes doses de progestérone. Les résultats, même s'ils sont pour la plupart controversés, montrent qu'ils n'augmentent que modestement le risque de cancer du sein. Ce risque varie selon l'âge d'ingestion des premiers contraceptifs et devient nul environ 10 ans après l'arrêt du traitement (Henderson *et al.*, 2000; Dumitrescu *et al.*, 2005).

En France, les traitements hormonaux substitutifs les plus couramment prescrits combinent des œstrogènes, généralement administrés sous forme de patchs ou de gels, à de la progestérone micronisée ou à des progestatifs de synthèse. Par ailleurs, les autorités sanitaires recommandent désormais un traitement hormonal substitutif de courte durée. L'examen des taux de cancer selon le type d'hormones suggère qu'avec l'œstrogène utilisé seul (traitement réservé aux femmes hystérectomisées), le sur-risque de développer un cancer du sein est minime voire inexistant. En revanche, lorsqu'il est associé à un progestatif de synthèse, le risque de cancer du sein est augmenté de 40 % et ce, indépendamment de la voie d'administration de l'œstrogène. La combinaison œstrogène et progestérone micronisée semble dépourvue d'effet cancérogène, tout du moins à court terme. (Fournier *et al.*, 2005).

Les xénoœstrogènes sont des substances chimiques, d'origine naturelle ou synthétique, capables de se lier aux récepteurs aux œstrogènes (ERs) et d'induire ou moduler une réponse relayée par ce récepteur. Ces xénoœstrogènes ou œstrogéno-mimétiques proviennent essentiellement de l'industrie, de l'agriculture et des rejets urbains. Les lignées de tumeurs mammaires MCF-7 et T47D, sensibles à l'œstradiol, se multiplient en présence de ces molécules (Soto *et al.*, 1995; Lascombes *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que ces molécules peuvent avoir un impact non négligeable sur l'incidence des cancers mammaires hormono-dépendants.

1.2.4. Facteurs pronostiques et survie

Un grand nombre de facteurs interviennent dans l'établissement d'un pronostic de survie. Le premier de ces facteurs est le sexe. En effet, bien que les hommes ne représentent que 1 % des cas de cancer du sein, le pronostic leur est plus défavorable (65 % de survie à 5 ans et 41 % à 10 ans contre respectivement 72 % et 53 % chez la femme pour les formes sans métastase).

L'âge joue un rôle très important : en absence de métastases, la survie à 5 et 10 ans est respectivement de 67 % et 52 % pour une patiente de moins de 35 ans, de 79 % et 63 % pour une patiente de 35 à 65 ans ; pour les femmes de plus de 75 ans la survie passe à 51 % et 25 %.

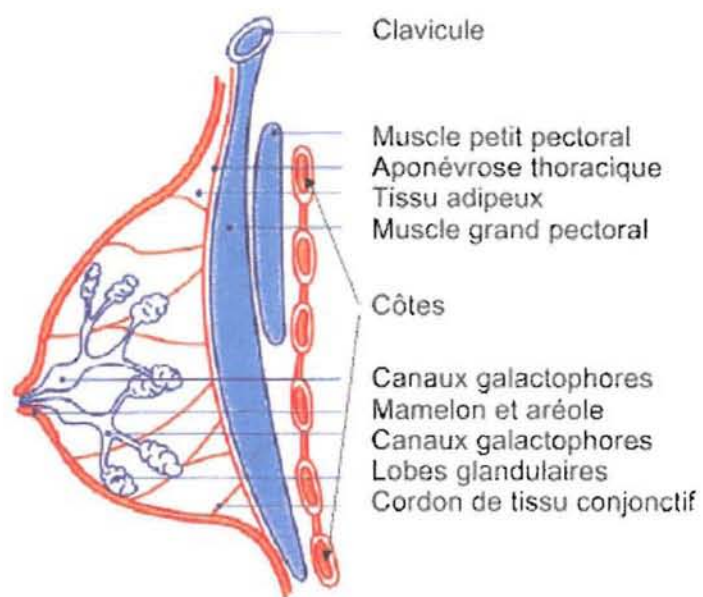


Figure 1 : Anatomie du sein

L'évolution de la maladie est d'autant plus sévère que la taille de la tumeur est volumineuse. Le taux de survie à 5 ans est de 99 % si la tumeur est de 1 cm ou moins, alors qu'il n'est plus que de 86 % pour une taille comprise entre 3 et 5 cm (Donegan *et al.*, 1997).

L'envahissement ganglionnaire axillaire est le meilleur indicateur de survie du cancer du sein. Le nombre de ganglions infectés et leur niveau d'envahissement suffisent à prédire le taux de survie au cancer du sein. En effet, le taux de survie à 5 ans est de 73 % pour des patientes ayant de 1 à 3 ganglions infectés, de 45,7 % pour 4 à 12 ganglions et de 28,4 % pour 13 ganglions ou plus. Les formes d'emblée métastatiques ont un très mauvais pronostic à 5 et 10 ans : respectivement 15 % et 5 % (Cianfrocca *et al.*, 2004).

Enfin, la présence des récepteurs hormonaux a aussi valeur de facteur pronostique. La survie à 5 ans pour un cancer du sein non métastatique est de 74 % en présence de récepteurs aux œstrogènes et de 66 % en leur absence. Pour les récepteurs à la progestérone, la survie à 5 ans est de 81 % en leur présence et de 73 % en leur absence. Ces facteurs sont plutôt favorables, parce que la présence de ces récepteurs est indicateur de la sensibilité des cellules tumorales à l'hormonothérapie d'une part, et car de nombreuses études montrent que les récepteurs aux œstrogènes diminuent les capacités invasives des cellules tumorales d'autre part (Platet *et al.*, 2004).

Le grade histologique est aussi un facteur pronostique important. Il est basé sur la différenciation glandulaire, le pléiomorphisme nucléaire et le nombre de mitoses par champ (Bundred *et al.*, 2001).

1.3. Le sein : anatomie, carcinogenèse et développement tumoral

1.3.1. Le sein normal : architecture et développement

1.3.1.1. Architecture

Le sein est une glande exocrine située sur la paroi antérieure du thorax (Figure 1). De forme conique ou hémisphérique, son extrémité se termine par un relief de forme cylindrique ou conique appelé mamelon. Celui-ci est entouré d'un disque cutané pigmenté de diamètre variable : l'aréole. Le revêtement cutané du sein est épais à la périphérie et devient mince au voisinage de la plaque aréolo-mamelonnaire. La solidarité de la peau avec la glande est d'autant plus intime que l'on se rapproche du mamelon.

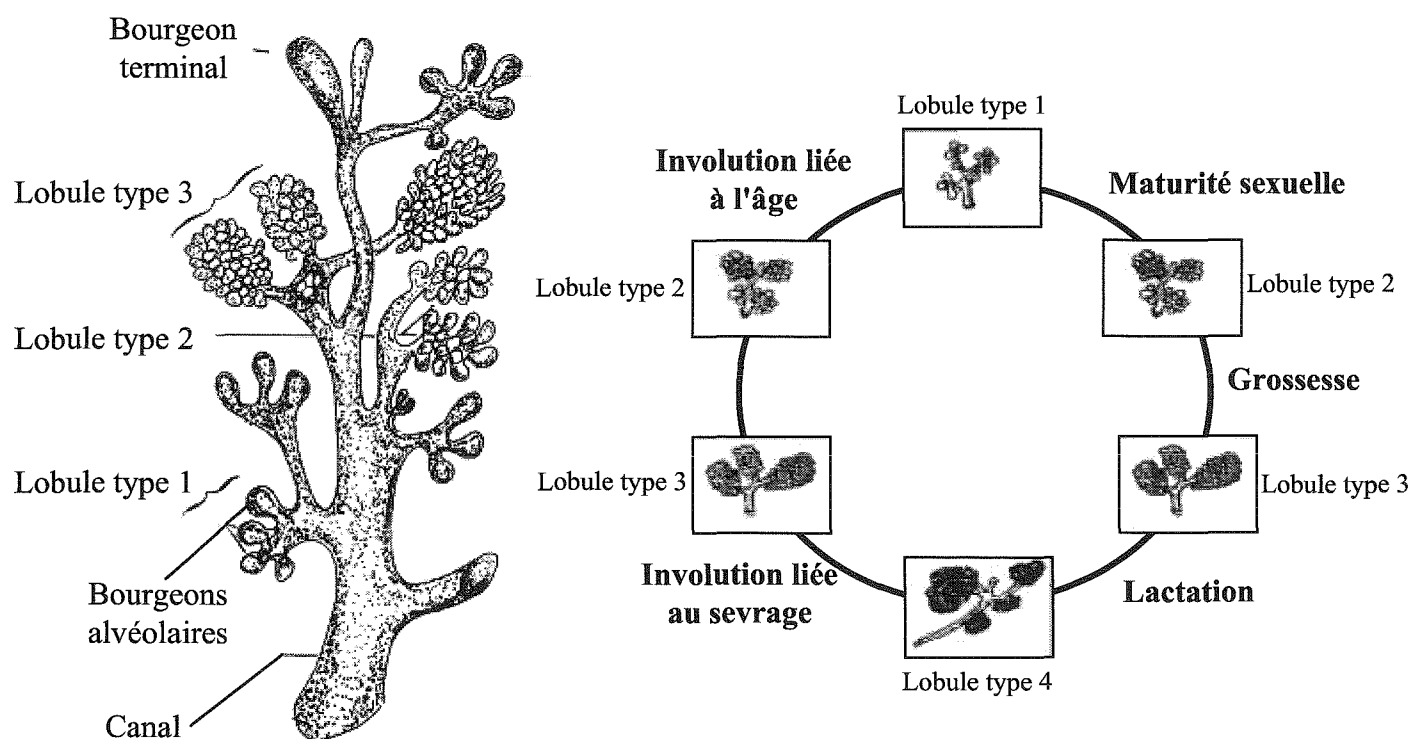


Figure 2 : Structure et développement des lobules mammaires

La glande mammaire est discoïde et de contour irrégulier. Elle est constituée de 2 compartiments cellulaires : le compartiment mésenchymateux, renfermant des vaisseaux sanguins et des nerfs, et le compartiment épithélial qui s'articule autour d'un réseau de canaux galactophores et de lobules. Ces deux compartiments sont séparés par une membrane basale composée de collagène de type IV, de laminine et de glycosaminoglycanes. Les acini sont groupés autour de canaux alvéolaires qui se réunissent pour former un canal lobulaire qui draine un lobule. Plusieurs canaux lobulaires se réunissent à leur tour pour former un canal galactophore. Chaque canal galactophore converge vers le mamelon.

1.3.1.2. Développement

Le sein se développe tout au long de la vie de la femme, du stade foetal à la ménopause, sous l'influence des hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone) et d'un certain nombre de facteurs de croissance.

Son développement commence au cours de la vie fœtale, dès la quatrième semaine, à partir de l'ectoderme. C'est lors du troisième trimestre de la grossesse que les œstrogènes et la progestérone produite par la mère, provoquent une canalisation de l'épithélium mammaire, une différenciation du parenchyme mammaire et la formation des canaux galactophores, ainsi que le développement du réseau lobulo-alvéolaire. Après la naissance et jusqu'à la puberté les modifications morphologiques et histologiques sont modestes.

Durant l'étape pubertaire, les modifications morphologiques sont importantes mais essentiellement dues à une augmentation du tissu graisseux. Avec la mise en place des cycles menstruels, la glande mammaire est soumise à une alternance d'exposition aux œstrogènes (1ère moitié du cycle) et de la progestérone (2ème moitié du cycle). Ces changements d'équilibres hormonaux sont incapables d'induire le véritable développement de la glande mammaire. Ce sont essentiellement les canaux qui vont se développer et se diviser pour former des bourgeons terminaux. Ces bourgeons terminaux sont à l'origine de nouvelles ramifications qui vont former des bourgeons alvéolaires, on parle alors de lobules de type 1 (Figure 2). Au cours de la maturation sexuelle, ces lobules évolueront en lobules de type 2 puis de type 3, et ce lentement jusqu'à l'âge de 35 ans. La différenciation totale de ces lobules ne pourra être atteinte si aucune gestation ne survient (Russo *et al.*, 2004) (Figure 2).

La gestation et la lactation entraînent des modifications importantes du sein. Les seins augmentent de volume, le mamelon devient saillant, l'aréole se pigmente comme le mamelon et prend un aspect grenu. Durant la grossesse, les ramifications terminales des canaux se

multiplient et de nombreuses alvéoles se développent (jusqu'à 80 alvéoles par lobule) sous l'influence notamment des hormones œstrogènes/progestérone et de facteurs de croissance tels que le TGF- α (Tumor Growth Factor- α) (Lamote *et al.*, 2004). Les cellules sécrétrices sont totalement différenciées et on parle alors de lobules de type 4. Après l'accouchement, durant 2 à 3 jours, la sécrétion mammaire est fluide et jaunâtre c'est le colostrum. Au 3^e jour, la sécrétion grasseuse augmente et le colostrum se transforme en lait humain. Ainsi la glande mammaire n'achève son développement qu'avec la première lactation.

A la ménopause, le déclin des fonctions ovariennes provoque une régression des structures de la glande mammaire : les canaux galactophores sont maintenus, mais les alvéoles restantes ainsi que les lobules continuent de régresser avec l'âge (Figure 2).

1.3.2. Mécanismes de déclenchement tumoral

Le cancer du sein, comme tous les cancers, résulte d'altérations génétiques et épigénétiques affectant des cellules normales. Par la suite, ces changements touchent non seulement les cellules malignes mais peuvent également atteindre les cellules qui interagissent avec la tumeur telles que les cellules immunitaires, vasculaires et stromales (Osborne *et al.*, 2004). La plupart des modifications génétiques sont acquises, et ne sont présentes que dans les cellules malignes, on parle alors de cancers du sein sporadiques. Dans seulement 10 % des cas, ces altérations génétiques sont héritées et prédisposent les individus à développer ce type de cancer. Dans tous les cas, ces événements permettent aux cellules d'acquérir un certain nombre de caractéristiques : autonomie vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire, insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance cellulaire, évaison du système de mort cellulaire programmée (apoptose), capacité à maintenir l'angiogénèse, potentiel de réplication illimité et capacité d'invasion tissulaire (potentiel métastatique) (Hanahan *et al.*, 2000).

De nombreux arguments supportent l'idée que les tumeurs mammaires dérivent de cellules "souches" épithéliales régénérantes. En effet, ces dernières présentent beaucoup des caractéristiques des cellules cancéreuses. De plus, l'accumulation de 4 à 6 altérations génétiques ou épigénétiques est nécessaire pour la tumorigénèse et de ce fait, les cancers ne peuvent résulter que de cellules qui sont maintenues pendant toute la durée de l'âge adulte. Enfin, les données épidémiologiques montrent qu'une gestation précoce diminue considérablement le risque de cancer du sein et ce, parce qu'elle entraîne une différenciation terminale des cellules épithéliales mammaires (Polyak *et al.*, 2001).

Oncogènes	Gènes suppresseur de tumeur
HER-2	p53
Ras	p27
PI3K	BRCA-1
Akt	BRCA-2
EIF-4E	CHK2
Cyclin D1	ATM
Cyclin E	PTEN
C-myc	Rb
C-fos	

Tableau 1 : Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans les cancers du sein (Osborne et al., 2004)

La première étape de la cancérisation est une phase d'initiation durant laquelle une cellule normale est irréversiblement altérée de telle sorte qu'elle ne peut terminer sa différenciation ou entrer en apoptose. Sa croissance reste cependant contrôlée par son environnement cellulaire notamment via les jonctions serrées. Dans un second temps, la division de ces cellules pré-malignes va être stimulée, c'est la phase de promotion. Les cellules filles sont immortelles. La présence de nombreux facteurs endogènes (hormones, facteurs de croissance, cytokines) et exogènes (composés promoteurs de tumeurs), le maintien de leur prolifération et l'absence d'apoptose, va favoriser leur accumulation. Par ailleurs elles acquièrent une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance et perdent leur capacité de communication intercellulaire. Après de multiples divisions, d'autres altérations génétiques et épigénétiques apparaissent. Celles-ci génèrent de nouveaux phénotypes, stables et totalement indépendants des facteurs externes grâce notamment à l'activation d'oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (anti-oncogènes) : c'est la phase de progression (Trosko *et al.*, 2005). Les oncogènes et les anti-oncogènes jouent un rôle prépondérant dans la carcinogenèse mammaire (Tableau 1). Les oncogènes sont des gènes qui, activés ou surexprimés, induisent des signaux de prolifération cellulaire. Les anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs, freinent la prolifération cellulaire. Lorsqu'ils sont inactivés par une mutation, par exemple, ils n'exercent plus leur rôle de régulation négative. Schématiquement, à l'état normal, il existe un équilibre entre l'expression des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Des mutations successives de ces gènes rompent cet équilibre, entraînant une prolifération excessive des cellules tumorales. Les mutations des oncogènes sont souvent des mutations qui rendent ces gènes hyperactifs. Il peut s'agir également de 2 gènes distants l'un de l'autre qui fusionnent pour former un nouveau gène qui n'existe pas à l'état normal. Plus d'une centaine d'oncogènes ont été identifiés. Certains sont connus pour causer des cancers mammaires lorsqu'ils sont surexprimés dans des modèles de souris transgéniques. L'oncogène *HER-2*, connu également sous le nom de *erbB-2*, est surexprimé dans 20 à 30 % des cancers du sein invasifs. Il code un récepteur membranaire dont l'activation peut se faire de manière autonome si le nombre de récepteurs présents dans la membrane cellulaire est suffisant. L'activation de ce récepteur entraîne la stimulation de nombreuses voies de signalisation dont celle des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et de la PI3K/Akt (Phosphoinositol-3-Kinase/Akt). Cela favorise la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, l'altération des contacts cellulaires, la résistance à l'apoptose et la migration cellulaire. L'oncogène *c-myc* est surexprimé dans 15 à 25% des tumeurs mammaires. Il s'agit d'un facteur de transcription qui

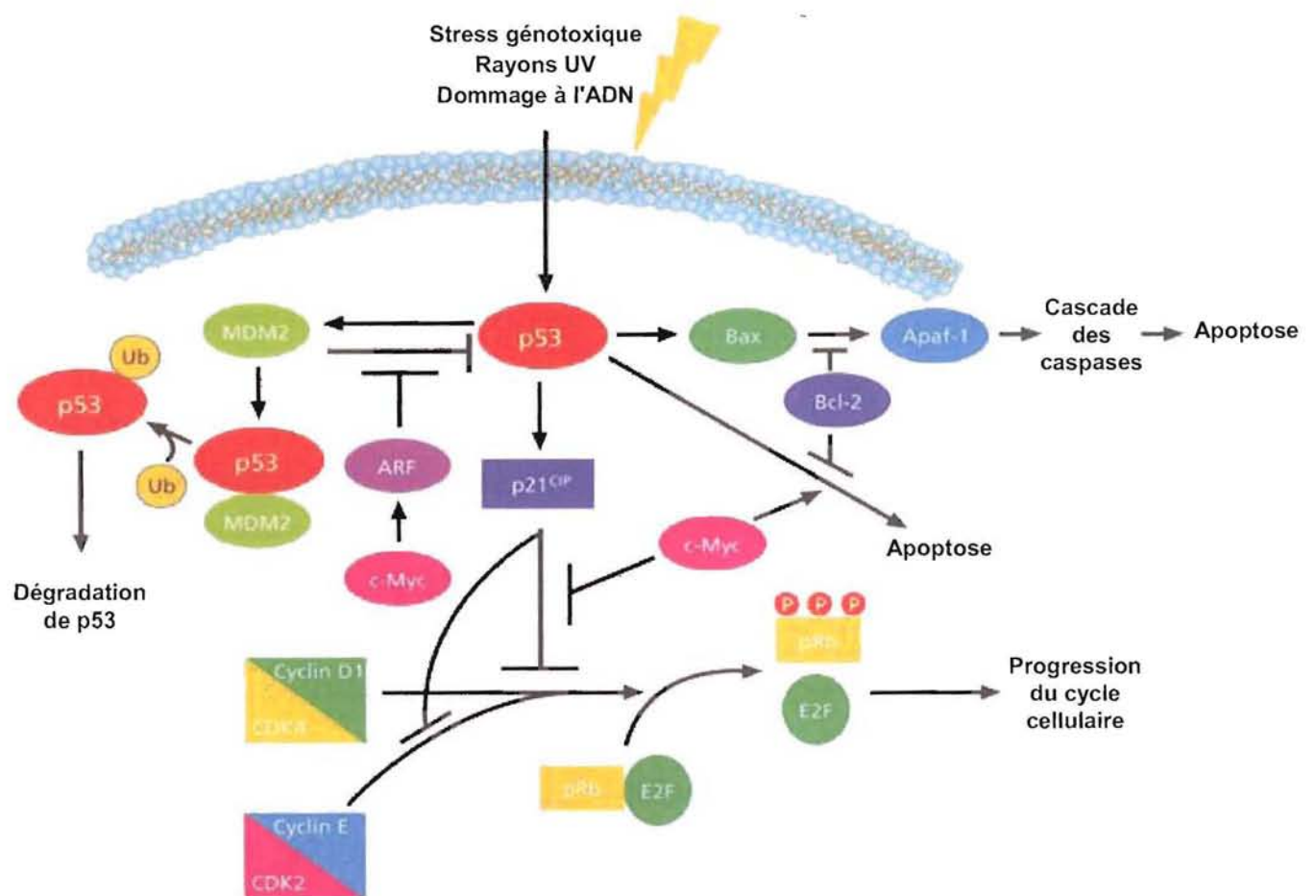


Figure 3 : Voie de signalisation de la protéine p53

forme un dimère avec la protéine Max et induit la prolifération cellulaire (Osborne *et al.*, 2004; Wazer *et al.*, 1999).

Deux anti-oncogènes majeurs interviennent dans la régulation du cycle cellulaire : la protéine du rétinoblastome (pRb) et le produit du gène p53. La protéine pRb peut, en fonction de son état de phosphorylation, bloquer le cycle cellulaire (hypophosphorylée) ou contrôler sa progression (hyperphosphorylée). Le stade hypophosphorylé est notamment maintenu par le TGF- β (Tumor Growth Factor- β), qui bloque en même temps l'expression de c-myc. Une mutation ou une perte de fonctionnalité du TGF- β ou de son récepteur provoque de manière concomitante la phosphorylation de pRb donc une avancée des cellules dans le cycle cellulaire, et l'expression de c-myc, favorisant la prolifération cellulaire. Le gène p53 code une phosphoprotéine de 53 KDa. Deux rôles particuliers sont dévolus à cette protéine : soit l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S, soit la mort cellulaire par un phénomène d'apoptose (Figure 3). La protéine p53 est un facteur de transcription, elle peut donc se lier à l'ADN et réguler la transcription de gènes cibles. Parmi ces gènes on retrouve le gène WAF1 / Cip1 (pour Wild Type p53-activated fragment et cdk2 inhibiting protein) dont la transcription est stimulée par p53. WAF1 / Cip1 code la protéine p21 qui se lie aux kinases cdk2, et inhibe leur activité. De cette manière p53 bloque le cycle cellulaire avant la synthèse de l'ADN et permet à la cellule de réparer d'éventuels dommages. Lors d'une agression cellulaire, la concentration et la demi-vie de p53 s'accroissent par une diminution de sa dégradation physiologique. On a ainsi montré expérimentalement qu'une simple lésion double brin suffisait à induire une augmentation du taux de p53. D'autres mécanismes sont capable d'augmenter le taux de p53 et notamment des mésappariements de bases ou encore des insertions délétions de bases. En présence de p53 mutée, l'ADN n'est plus réparé ce qui entraîne une instabilité génomique qui associée à l'accumulation de mutations peuvent entraîner une croissance cellulaire incontrôlée (Wazer *et al.*, 1999). Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont également des anti-oncogènes et sont avec *p53* à l'origine de la plupart des cancers du sein héréditaire. En effet, le gène *BRCA1* muté est retrouvé dans 40 à 45 % des cas de cancers du sein héréditaire, et une telle mutation n'est quasiment jamais observée dans les cas de cancers sporadiques.

1.3.3. Développement tumoral, invasion et métastases

Les cancers évoluent en deux phases: une phase locale, caractérisée par la croissance tumorale et l'invasion locale, et une phase générale se traduisant par une dissémination

tumorale à distance de la tumeur initiale. Cette phase de dissémination, spécifique du cancer, est responsable de sa gravité. Les étapes nécessaires à l'apparition de métastases sont : la croissance de la tumeur, l'angiogenèse et l'accès aux vaisseaux sanguins et lymphatiques, la réduction de l'adhésivité et de la cohésion des cellules tumorales, leur mobilité accrue et la production d'enzymes protéolytiques permettant le passage à travers la matrice extracellulaire et la paroi des vaisseaux (Heimann *et al.*, 2000).

1.3.3.1. Croissance de la tumeur

La croissance des tumeurs mammaires se fait essentiellement sous l'influence des hormones et des facteurs de croissance. En effet, de nombreuses études montrent que l'IGF-I (Insulin-like Growth Factor I), l'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGF α ou encore le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2) stimulent la prolifération des cellules cancéreuses mammaires (Stull *et al.*, 2004). Les hormones impliquées sont essentiellement les œstrogènes. Leur récepteur, le récepteur alpha aux œstrogènes (Estrogen Receptor alpha, ER α), est présent dans 50 à 80 % des tumeurs mammaires. De plus, de nombreuses études, *in vivo* et *in vitro*, ont montré que les estrogènes avaient une activité mitogène sur les cellules cancéreuses mammaires (Platet *et al.*, 2004). Les cellules présentes aux environs de la tumeur peuvent également jouer un rôle important dans son développement. Les cellules myoépithéliales en sont un premier exemple. Elles présentent à l'état normal des propriétés anti-prolifératives, anti-invasives et anti-angiogéniques médiées par l'expression d'inhibiteurs de protéases (serpines, TIMP-1) et d'inhibiteurs de l'angiogenèse (thrombospondine-1, récepteur soluble FGF β). Il est possible que la destruction de ces cellules ou des facteurs produits par celles-ci favorise la prolifération, le comportement invasif et l'angiogenèse des cellules cancéreuses mammaires. Les fibroblastes jouent également un rôle important dans la tumorigenèse mammaire. De nombreuses hormones, des facteurs de croissance et de différenciation sont sécrétés par ces cellules. De plus les fibroblastes contribuent à la formation de la matrice extracellulaire. Enfin, des études récentes suggèrent une implication des macrophages, des granulocytes éosinophiles et des cellules endothéliales dans la tumorigenèse (Polyak *et al.*, 2001).

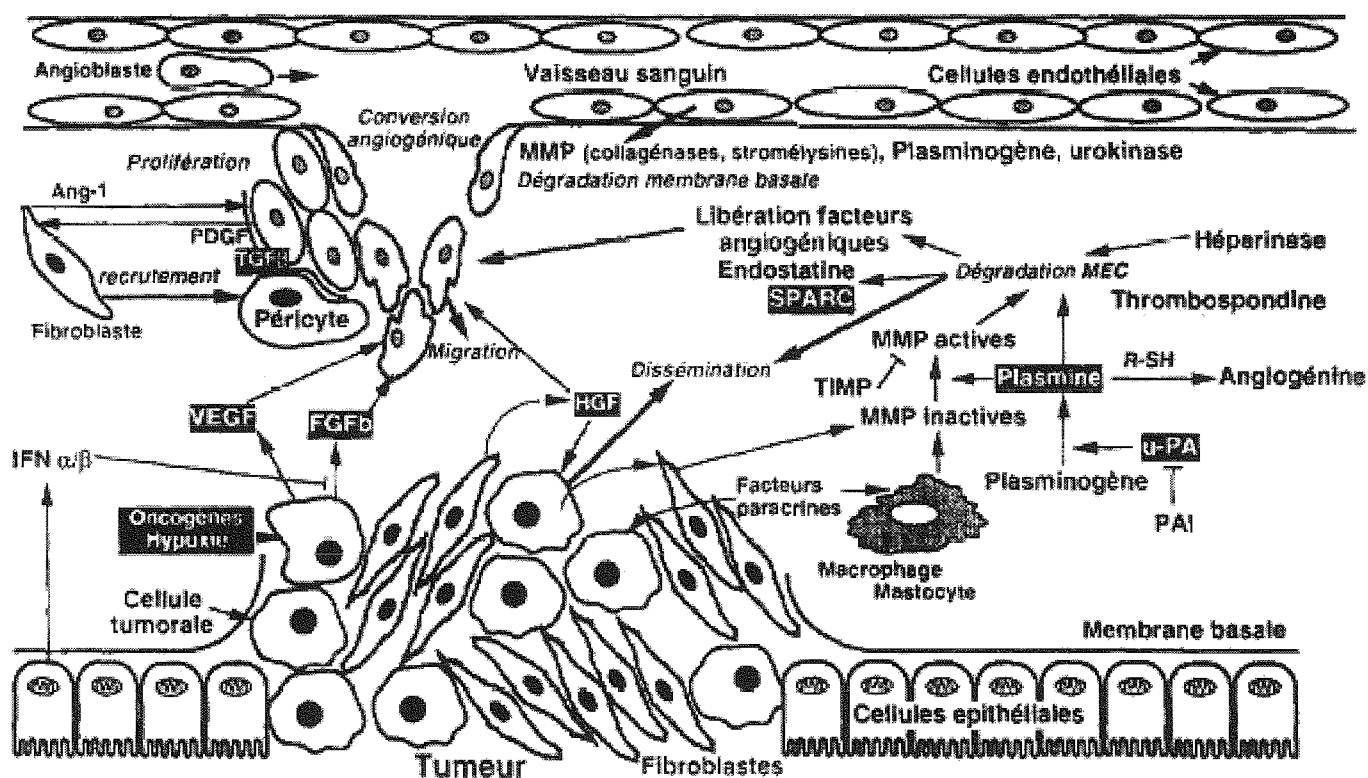


Figure 4 : Interactions entre cellules endothéliales, cellules tumorales et stromales pendant l'angiogénèse et l'invasion tumorale (André et al., 1998)

1.3.3.2. Angiogenèse

L'oxygène et les nutriments apportés par le réseau vasculaire sont cruciaux pour le fonctionnement et la survie cellulaire, obligeant virtuellement les cellules d'un tissu à se situer à moins de 100 μM d'un capillaire sanguin (Hanahan *et al.*, 2000). Aussi, lorsqu'une tumeur atteint 1 à 2 mm^3 sa croissance est dépendante de la formation de nouveaux vaisseaux (Miller *et al.*, 2002). Elle met donc en place un processus de vascularisation appelé angiogenèse (Figure 4). L'angiogenèse physiologique n'est pas sous le contrôle d'un facteur unique mais elle est régulée par un équilibre entre des facteurs pro-angiogéniques et des facteurs anti-angiogéniques. Le premier facteur pro-angiogénique identifié fut le "Fibroblast growth-factor" ou FGF. De nombreux agents ont depuis été identifiés. Ils constituent un ensemble très hétérogène de par leur nature, leur mécanisme d'activation et leur fonctionnement. Cet ensemble comprend des substances dont l'activité est essentiellement vasculaire comme l'angiogénine, l'angiotropine, le facteur de perméabilité vasculaire, des facteurs dont le rôle biologique est complexe ou mal élucidé (prostaglandines, héparine, $\text{TNF}\alpha$...) et surtout des facteurs de croissance ($\text{TGF}\alpha$, $\text{TGF}\beta$, EGF, βFGF , VEGF...) (Guinebretiere *et al.*, 2005). Parmi ces substances, le VEGF se distingue car son inhibition par des anticorps spécifiques est suivie d'un arrêt de la croissance tumorale (Kim *et al.*, 1993). De plus, il est surexprimé dans les cellules cancéreuses ainsi que dans les cellules entourant la tumeur (Boudreau *et al.*, 2003).

L'angiogenèse est mise en place par les cellules tumorales en hypoxie. Sous l'action de facteurs pro-angiogéniques issus de la tumeur, les cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux existants synthétisent des enzymes protéolytiques qui vont rompre la membrane basale endothéliale. Puis, les cellules endothéliales prolifèrent sous l'action du VEGF et synthétisent les éléments constitutifs de la membrane basale du nouveau vaisseau (collagènes, protéoglycanes, etc.), puis les molécules d'adhésion, les sélectines (E,P) et les intégrines (IC AM1, IC AM2, VC AM1). Ce nouveau réseau de vaisseaux permet à la tumeur de se développer et de mettre en place les processus d'invasion métastatique.

1.3.3.3. Invasion tumorale et métastases

Le processus métastatique commence par la réduction de l'adhérence et de la cohésion des cellules tumorales. L'adhérence des cellules tumorales est assurée par des déterminants moléculaires variés. La E-cadhérine est le prototype des molécules d'adhésion des épithéliums.

C'est une molécule transmembranaire qui, en présence de calcium, se lie à une structure identique présentée par la cellule voisine. Une perte d'expression des E-cadherines est observée dans plus de 85% des tumeurs invasives (Cowin *et al.*, 2005). Par ailleurs, des changements dans l'expression des intégrines, protéines permettant aux cellules de se lier aux différents substrats de la matrice extracellulaire, sont également observés. En effet, la migration oblige les cellules à s'adapter à de nouveaux environnements tissulaires et donc à de nouveaux composants de la matrice. En conséquence, la réussite de la colonisation de nouveaux sites (locaux ou distants) demande une adaptation des cellules cancéreuses. C'est en changeant de sous type d'intégrines (on en compte plus de 22), que la cellule tumorale va réussir cette adaptation. Les intégrines liant préférentiellement la matrice extracellulaire des épithélium "normaux" sont remplacées par les intégrines liant les composants du stroma dégradés par les protéases (Hanahan *et al.*, 2000).

La dégradation de la membrane basale, de la matrice extracellulaire ainsi que de toutes leurs protéines de structure est une caractéristique importante de l'invasion tumorale. Les cellules tumorales et environnantes sécrètent les enzymes nécessaires à cette dégradation. Parmi ces enzymes, on trouve les métalloprotéases (MMP). Il s'agit d'une famille d'endopeptidases zinc-dépendantes. Il en existe 19 qui peuvent être divisées en sous-groupes : les collagénases (MMP-1, 8 et 13), les gélatinases (MMP-2 et -9), les stromelysines (MMP-3, 7, 10 et 11) et les métalloprotéases membranaires. Le collagène de type IV composant majoritaire de la lame basale peut ainsi être dégradé par les gélatinases. De nombreuses études ont montré l'implication de ces enzymes dans les processus invasifs des cellules cancéreuses mammaires. D'ailleurs, dans les cancers du sein, un taux élevé de MMP-2 est souvent associé à un faible pronostic de survie (Duffy *et al.*, 2000).

Une fois le processus de migration enclenché, les sites métastatiques peuvent être nombreux. Néanmoins dans environ 30 % des cas les métastases sont retrouvées au niveau des os. Les poumons et le foie sont également des sites privilégiés puisqu'ils sont concernés dans respectivement 12% et 3% des cas.

1.3.4. Anatomie pathologique des cancers du sein

Deux classifications sont couramment utilisées : la classification clinique et la classification histologique.

T	Tumeur primitive
TX	Détermination de la tumeur primitive impossible
T0	Pas de signe de la tumeur primitive
Tis	Carcinome in situ
T1	Tumeur ≤ 2cm dans sa plus grande dimension T1a ≥ 0,5 cm T1b >0,5 cm et ≤ 1 cm T1c >1 cm et ≥ 2 cm
T2	Tumeur >2 cm et ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension
T3	Tumeur >5 cm dans sa plus grande taille
T4	Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau T4a extension à la paroi thoracique T4b oedème ou ulcération cutanée du sein T4c à la fois 4a et 4b T4d carcinome inflammatoire
N	Adénopathies régionales
NX	Appréciation impossible de l'atteinte ganglionnaire
N0	Absence de signes d'envahissement ganglionnaire régional
N1	Ganglions axillaires cliniquement suspects homolatéraux mobiles
N2	Ganglions axillaires homolatéraux fixés entre eux ou à d'autres structures
N3	Ganglions mammaires internes homolatéraux
M	Métastases à distance
MX	Détermination impossible de l'extension métastatique
M0	Absence de métastases à distance
M1	Présence de métastases à distance

Tableau 2 : Classification TNM de l'UICC

Stade	Statut de la tumeur	Statut des nodules	Statut des métastases
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade I	T1	N0	M0
Stade IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
Stade IIB	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stade IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1 et N2	M0
Stade IIIB	T4	Tout N	M0
	Tout T	N3	M0
Stade IV	Tout T	Tout N	M1

Tableau 3 : Classification de l'AJCC

1.3.4.1. Classification clinique

La classification TNM (Tumor Node Metastases, Tumeur ganglions métastases) de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) est la plus utilisée. Elle se base sur la taille de la tumeur (T), la présence de ganglions (N) et la présence de métastases (M) (Tableau 2). Une autre classification clinique, plutôt utilisée par les anglo-saxons est la classification de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Tableau 3).

1.3.4.2. Classification histologique

- **Les carcinomes non infiltrants**

- **Le carcinome intracanaire ou canalaire *in situ*.** Il se définit comme un carcinome se développant dans le canal, n'infiltrant pas le tissu conjonctif. Il représente environ 4 % des cancers et se caractérise par sa découverte fréquente sur des microcalcifications mammographiques et par sa multicentricité.
- **Le carcinome lobulaire *in situ*.** Il se définit comme un carcinome intéressant les canalicules intra-lobulaires comblés et distendus par une prolifération de cellules de petite taille sans envahissement du tissu conjonctif voisin. Il représente environ 2,5 % des cancers et se caractérise par son caractère multicentrique et sa tendance à la bilatéralisation.

- **Les carcinomes infiltrants**

- **Le carcinome canalaire infiltrant.** C'est la forme la plus fréquente : 70 % des cancers du sein. Il peut présenter trois types d'architectures : bien différencié avec des structures tubulaires prédominantes, moyennement différencié et indifférencié avec une absence de structures glandulaires.
- **Le carcinome lobulaire infiltrant.** Il représente 5 à 15 % des cancers. Il se caractérise par sa tendance à la bilatéralité et à la multicentricité.
- **Le carcinome mucineux.** Il s'agit d'un carcinome riche en mucus extracellulaire. Histologiquement, cette tumeur est constituée de nappes de

mucus ponctuées de petits îlots épithéliomateux avec ou sans différenciation glandulaire.

- **Le carcinome médullaire.** C'est un carcinome bien limité, constitué de nappes de cellules peu différenciées dans un stroma peu abondant, lymphoïde.

- **Les autres tumeurs malignes**

Les tumeurs malignes en dehors des carcinomes primitifs du sein sont rares. Elles représentent moins de 1% de toutes les tumeurs malignes du sein et constituent un groupe de lésions disparates comportant les sarcomes phyllodes, les sarcomes mésenchymateux ou sarcomes du stroma, les angiosarcomes, les lymphomes malins non hodgkiniens primitifs du sein.

1.4. Stratégies thérapeutiques

L'objectif du traitement du cancer du sein est d'enlever la tumeur et de supprimer toutes les cellules cancéreuses. Il existe différents types de traitements qui peuvent être réalisés seuls ou associés entre eux.

1.4.1. Chirurgie

La chirurgie est le traitement le plus anciennement utilisé pour soigner les cancers du sein. C'est un traitement standard ayant quatre objectifs :

- confirmer le diagnostic et préciser le stade d'évolution du cancer
- enlever la tumeur
- enlever et examiner certains ganglions
- conserver ou restaurer la taille et la forme du sein après l'ablation de la tumeur ou de la totalité du sein

Il existe 2 types de chirurgie : la chirurgie conservatrice (tumorectomie) et la mastectomie totale. La chirurgie conservatrice a pour but d'enlever la totalité de la tumeur sans enlever la totalité du sein. La tumeur est enlevée avec une marge de sécurité autour d'elle et l'opération est habituellement suivie d'une radiothérapie locale. Elle constitue aujourd'hui une intervention sûre, avec un risque de récurrence locale très faible (Doridot *et al.*, 2004). La

mastectomie totale consiste à enlever tout le sein, c'est-à-dire la glande mammaire, le mamelon et la peau en regard de la tumeur. Elle n'est réalisée que lorsque la tumorectomie n'est pas possible pour des raisons médicales (tumeur de taille plus importante) ou esthétiques. La reconstruction qui utilise des prothèses ou du tissu autologue peut se faire immédiatement (Houssami *et al.*, 2006).

1.4.2. Radiothérapie

Comme la chirurgie, la radiothérapie est un traitement local du cancer. Elle consiste à utiliser des rayons qui atteignent la tumeur et détruisent les cellules cancéreuses. Selon la zone à traiter, les rayons utilisés peuvent être différents (photons, rayons X ou électrons). Ces divers types de rayons peuvent être associés entre eux.

La radiothérapie peut être proposée dans deux situations : avant une chirurgie du sein (radiothérapie préopératoire) pour diminuer la taille de la tumeur et proposer à la patiente une chirurgie conservatrice si elle le souhaite, ou après une chirurgie du sein (radiothérapie postopératoire) pour diminuer le risque de rechute locale au niveau de la paroi du thorax, de la cicatrice ou du sein.

La radiothérapie post-opératoire est réalisée 3 à 4 semaines après l'intervention chirurgicale, après une bonne cicatrisation. Le traitement est en général de 5 à 6 semaines, avec une exposition totale de 9 à 10 grays par semaine à raison de 4 à 5 séances de 1,8 à 2,5 grays.

Après une chirurgie conservatrice, les rayons sont dirigés sur le sein. Après une mastectomie, les rayons sont dirigés sur la paroi du thorax et sur la cicatrice de la mastectomie. La radiothérapie peut s'effectuer également sur les ganglions situés au-dessus et au-dessous de la clavicule, sur les ganglions du sternum et sur les ganglions axillaires, s'il n'y a pas eu de curage (Brennan *et al.*, 2005).

1.4.3. Chimiothérapie

Il s'agit d'un traitement utilisé pour les formes métastatiques pour lesquelles la chimiosensibilité est largement démontrée, et en traitement adjuvant pour les formes non métastatiques. De nombreux médicaments existent et sont prescrits seuls ou en associations. Ils peuvent être classés en 4 familles selon leur mode d'action.

- La première famille est celle des antimétabolites. On y trouve des dérivés hémisynthétiques de la pervenche de Madagascar. Ils inhibent la polymérisation de la

tubuline, ce qui induit l'apoptose. La molécule la plus utilisée dans les protocoles thérapeutiques du cancer du sein est la vinorelbine. Les taxanes, dérivés de l'Iif, (paclitaxel ou docetaxel) sont aussi des antimétopiques. Ils bloquent les cellules en métaphase en inhibant la dépolymérisation de la tubuline. Les molécules utilisées sont le paclitaxel et le docetaxel.

- Les agents alkylants sont des molécules de synthèse qui après activation hépatique ou tissulaire, se lient de manière covalente à l'ADN et inhibent la progression de l'ADN polymérase. Dans le cas du cancer du sein, c'est le cyclophosphamide qui est utilisé.
- Les antimétabolites perturbent la synthèse de l'ADN en bloquant les enzymes nécessaires à la synthèse des nucléotides. Les plus utilisés dans le cancer du sein sont le 5-fluorouracile (5-FU) et le méthotrexate (MTX).
- Les inhibiteurs de la topoisomérase II inhibent la religation des 2 brins d'ADN après le relâchement des contraintes de torsion nécessaire au processus de réplication. Il s'agit de la famille des anthracyclines avec principalement l'adriamycine et l'épirubicine.

Les protocoles les plus souvent utilisés sont :

- CMF : il associe le cyclophosphamide, le méthotrexate et le 5-FU,
- AC : il associe l'adriamycine et le cyclophosphamide,
- FEC ou FAC : ils associent le 5-FU, le cyclophosphamide et l'adriamycine (FAC) ou l'épirubicine (FEC),
- AVCMF : il associe l'adriamycine, la vincristine, le cyclophosphamide, le méthotrexate et le 5-FU).

La durée optimale de la chimiothérapie est en général de quatre ou six cures. Le taux de réponse est relativement élevé puisqu'il est de 70 à 90% quelque soit l'agent choisi (Brain *et al.*, 1999).

1.4.4. Hormonothérapie

Il s'agit du plus ancien traitement médical efficace des cancers. En effet, c'est en 1896 que Beatson rapporte 2 cas de régression temporaire de cancer mammaire métastasés après ovariectomie. Dès lors, de nombreuses hormonothérapies ont été mises au point et utilisées dans le traitement des cancers du sein. Ce traitement peut permettre des survies très prolongées, y compris dans les cas de cancer du sein métastatique. Toutefois, il n'est efficace que dans les tumeurs hormono-dépendantes. Cette hormonosensibilité est déterminée par la

présence ou non de récepteurs aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR) dans les cellules cancéreuses. La limite permettant de déterminer si une tumeur est ER ou PR positive ou négative a été le sujet de nombreux débats. Actuellement, les résultats des méthodes permettant de quantifier ces récepteurs sont considérés comme positifs si la quantité de récepteurs est supérieure à 10 fmol par mg de protéines cytosoliques. Les patientes présentant des tumeurs ER+/PR+ seraient 80 % à répondre à l'hormonothérapie alors que le taux de réponse n'est que de 30 % pour les tumeurs ER+/PR- et de 45 % pour les tumeurs ER-/PR+ (Wittliff *et al.*, 1984). Il existe 4 types d'hormonothérapie : soustractive, additive, inhibitrice et compétitive.

1.4.4.1. Hormonothérapie soustractive

Elle consiste à supprimer rapidement par castration la source d'œstrogènes que constituent les ovaires. La méthode longtemps utilisée fut l'ovariectomie chirurgicale effectuée par coelioscopie ou laparotomie. Cette technique est actuellement remplacée par une ovariolyse radiothérapique, délivrant 12 à 16 Grays en quelques séances. La suppression ovarienne est obtenue dans les 6 à 10 semaines suivant la radiothérapie. Son intérêt est démontré en situation métastatique ou en traitement adjuvant chez les femmes non ménopausées présentant des tumeurs hormono-dépendantes.

1.4.4.2. Hormonothérapie additive

Les œstrogènes et les androgènes étaient paradoxalement utilisés parfois dans des cas dépassés de cancer du sein métastatique notamment dans le but de bloquer l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ils ne sont actuellement plus utilisés du fait de leurs effets secondaires.

Les principaux agents utilisés sont les progestatifs qui constituent une hormonothérapie de 2^{ème} ou de 3^{ème} intention dans les cancers métastatiques, après échec des anti-œstrogènes ou des inhibiteurs d'aromatases. Leur mode d'action n'est pas clairement défini, mais des études montrent qu'ils diminuent les taux d'ERs et d'œstrogènes circulants. L'efficacité des différents progestatifs est comparable. Deux types sont commercialisés : l'acétate de médroxy-progestérone et l'acétate de mégestrol.

Le taux de réponse est d'environ 30 % avec une rémission complète chez 5 % de ces patientes (Benghiat *et al.* 1986). Ces agents présentent cependant des effets secondaires non

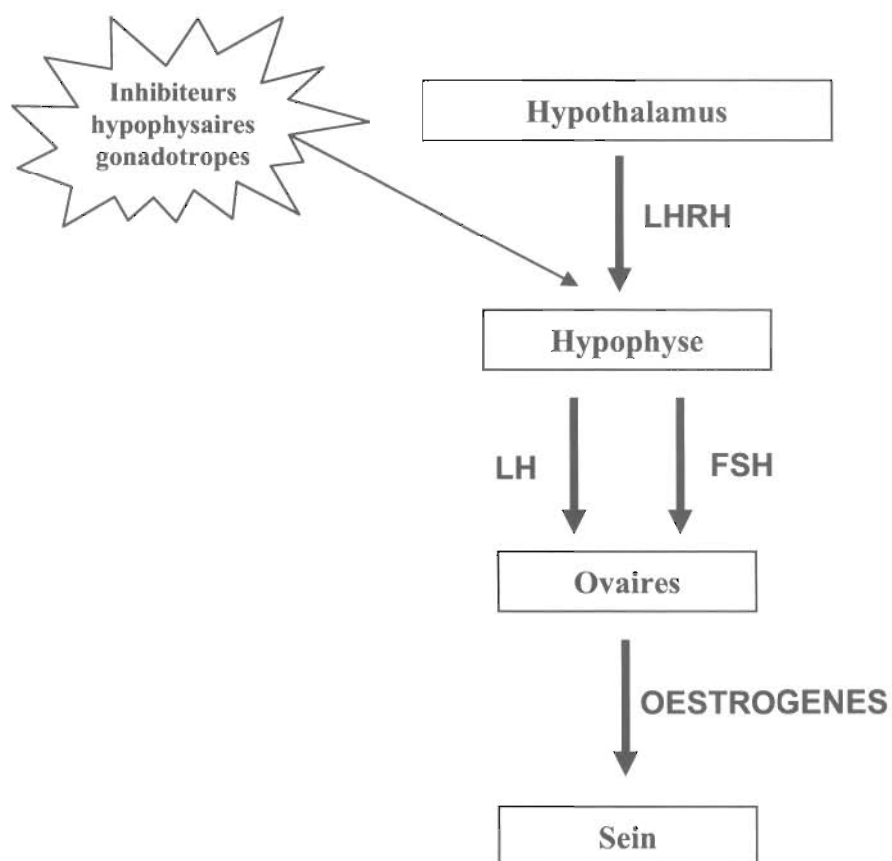


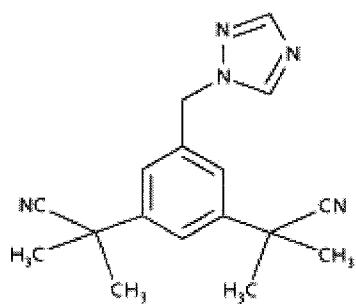
Figure 5 : Mécanisme de contrôle de la synthèse des oestrogènes par les ovaires chez la femme et action des inhibiteurs hypophysaires gonadotropes

négligeables dont une prise de poids importante, une hypertension et des risques thrombo-emboliques.

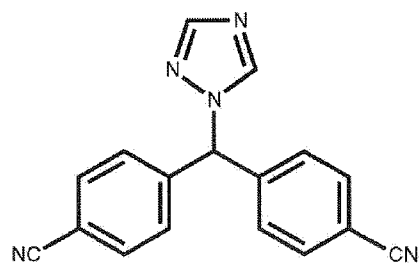
1.4.4.3. Hormonothérapie inhibitrice

On distingue tout d'abord les inhibiteurs hypophysaires gonadotropes. Il s'agit d'agonistes de la LH-RH (facteur de libération de l'hormone lutéinisante) obtenus par synthèse. Ces molécules de demi-vie longue stimulent l'hypophyse en permanence, supprimant le caractère pulsatile de la sécrétion physiologique de la LH-RH par l'hypothalamus. De ce fait, l'hypophyse ne sécrète plus de LH ni de FSH, entraînant une chute de la production d'œstrogènes et de progestérone par les ovaires (Figure 5). Les effets sont identiques à ceux obtenus par castration mais celle-ci est réversible 1 à 2 mois après l'arrêt du traitement (Kaufman *et al.*, 1989). Cependant, il existe initialement une augmentation transitoire des gonadotrophines et donc de la synthèse d'hormones sexuelles qui peuvent amener une aggravation brutale de la maladie. Au début, le traitement est donc souvent associé à un inhibiteur des récepteurs aux œstrogènes. De nombreux composés sont disponibles dont la gosereline ou encore la busereline. Des études cliniques montrent que chez les patientes ménopausées le taux de réponse n'est que de 8 à 10% (Saphner *et al.*, 1993). En revanche chez les patientes non-ménopausées, les essais de phase II ont montré, pour la gosereline, des taux de réponse d'environ 44% (Kaufman *et al.*, 1989).

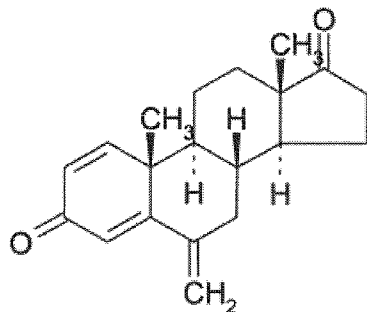
L'hormonothérapie inhibitrice fait également appel aux anti-aromatases. L'aromatase est l'enzyme qui catalyse la transformation des androgènes en œstrogènes (Voir 2.2). Les molécules à activité anti-aromatase agissent soit en prenant la place du précurseur, en l'occurrence les androgènes (inhibiteurs stéroïdiens ou de type I), soit en se liant à l'enzyme et inhibant ainsi toutes les activités enzymatiques liées à celle-ci (inhibiteurs non stéroïdiens ou de type II). Les inhibiteurs de première génération, aminoglutéthimide ou encore roglethimide, étaient non stéroïdiens. Parmi les inhibiteurs de deuxième génération, on trouve non seulement des inhibiteurs non stéroïdiens tel que le fadrozole mais également des inhibiteurs stéroïdiens tels que le formestane ou exemestane. Enfin, les molécules de troisième génération qui sont toutes non stéroïdiennes, à savoir le létrozole, l'anastrozole et le vorozole, sont très sélectives et leurs effets secondaires plus modérés. Les inhibiteurs actuellement utilisés sont l'anastrozole, le létrozole et l'exemestane plus connus sous les noms de Arimidex®, Femara® et Aromasin® (Figure 6). De récentes études montrent que ces inhibiteurs d'aromatase sont plus efficaces que le tamoxifène (Howell *et al.*, 2004; Yue *et al.*, 2005). Contrairement à ce



Anastrozole (Arimidex®)



Letrozole (Femara®)



Exemestane (Aromasin®)

Figure 6 : Structure chimique des inhibiteurs d'aromatase actuellement utilisés en hormonothérapie

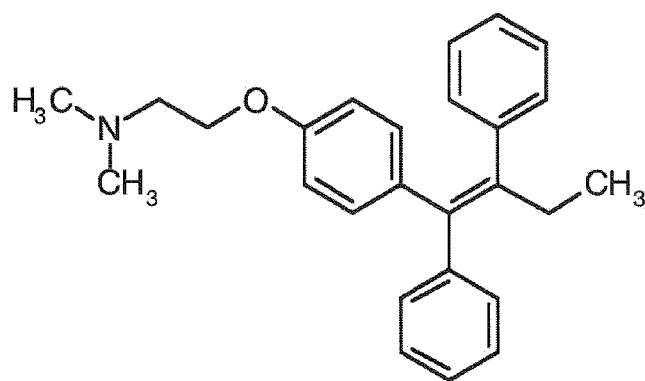


Figure 7 : Structure chimique du tamoxifène

dernier, ils n'augmentent pas le risque de cancer de l'endomètre ni de thromboses veineuses. En revanche, ils diminuent fortement la densité minérale osseuse et augmentant le risque de fractures. Actuellement, les inhibiteurs d'aromatase sont utilisés uniquement chez les femmes ménopausées, soit en première ligne de maladie métastatique, soit en situation adjuvante.

1.4.4.4. Hormonothérapie compétitive

Ce type d'hormonothérapie utilise les anti-œstrogènes. Ils bloquent l'action cellulaire des œstrogènes en se fixant à la place de l'œstradiol sur l'ER. Le chef de file est le tamoxifène qui fut mis sur le marché en 1970 et qui reste encore aujourd'hui le composé le plus utilisé dans le traitement des cancers du sein hormono-dépendants (Figure 7). En effet, le taux de réponse est en moyenne de 50 % chez les patientes possédant des tumeurs ER+. Outre une action cytostatique par blocage des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire, le tamoxifène possède également un effet cytotoxique propre. Les doses utilisées sont comprises entre 20 et 40 mg par jour et la durée optimale du traitement est généralement de 5 ans. Sa tolérance est bonne. Cependant, le tamoxifène peut augmenter le risque de cancer de l'endomètre. Dans une compilation de 7 études portant sur 4008 femmes traitées par tamoxifène et 4006 témoins, la fréquence du cancer de l'endomètre était de 0,5% dans le groupe traité et de 0,1% dans le groupe contrôle. Par ailleurs, le tamoxifène a aussi des effets secondaires bénéfiques puisqu'il diminue les risques de maladies cardiovasculaires et protège contre l'ostéoporose (Clemons *et al.*, 2002).

D'autres dérivés ont été synthétisés : le raloxifène, le torémifène ou encore le fulvestrant. Le raloxifène n'est pas utilisé en cancérologie mais plutôt dans la prévention de l'ostéoporose, même si son efficacité dans le traitement des cancers du sein non métastatiques est comparable à celle du tamoxifène (Jones *et al.*, 2004). Le torémifène est commercialisé avec comme indication le traitement de première intention du cancer du sein hormonosensible, situation dans laquelle il obtient des résultats comparables au tamoxifène (Lucchi-Angellier, 2001). Le fulvestrant ou ICI 182,780 est un anti-œstrogène stéroïdien sans effet agoniste qui se fixe sur l'ER, le bloque et induit sa dégradation ("pur antagoniste"). Son administration se fait par voie intra musculaire (1 injection mensuelle). Elle est indiquée dans les cancers hormono-dépendants avancés ou métastatiques et progressant sous traitement par des anti-œstrogènes traditionnels (Howell, 2005).

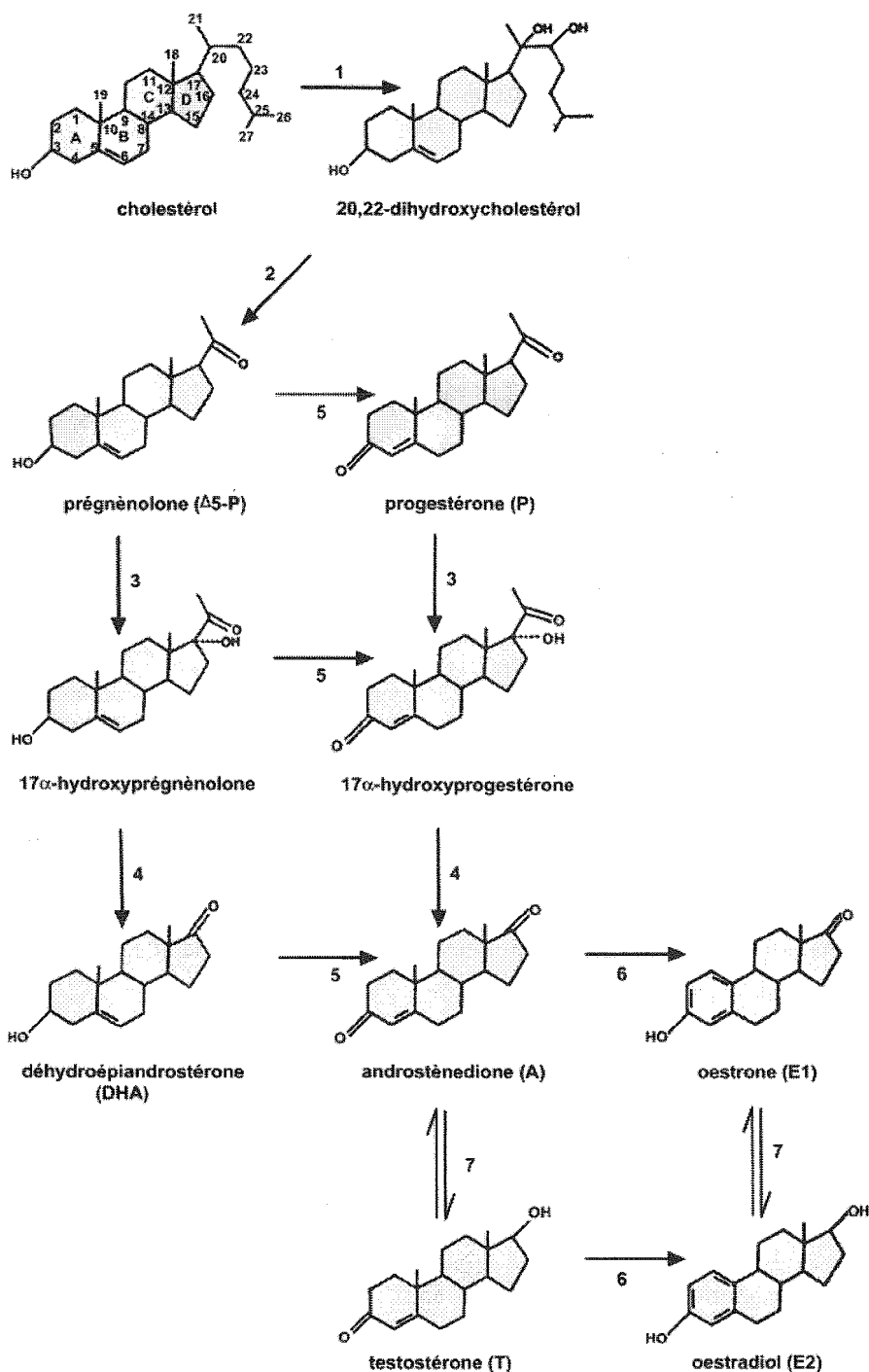


Figure 8 : Cascade enzymatique de la biosynthèse des oestrogènes à partir du cholestérol. 1,2 : cytochrome p450_{scc}; 3,4 : cytochrome p450_{17 α} ; 5 : 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD); 6 : cytochrome p450 aromatase; 7 : 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD).

1.4.4.5. Nouvelles stratégies thérapeutiques

Outre la mise au point de nouveaux agents anticancéreux pour la chimiothérapie ou d'anti-œstrogènes et d'inhibiteurs d'aromatase plus spécifiques et aux effets secondaires moins importants, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont à l'étude. Les premières concernent l'inactivation de la voie de signalisation de HER-2 (erbB-2) par un anticorps monoclonal anti-HER2 recombinant, connu sous le nom de trastuzumab ou Herceptine™. Ce dernier a subi ses premiers essais cliniques en association à la chimiothérapie. Les études montrent qu'il augmente significativement son efficacité et qu'il prolonge la rémission des patientes en phase métastatique (Slamon *et al.*, 2001).

Une autre stratégie vise à inactiver la cyclooxygénase-2 (COX-2), dont l'implication dans la progression et l'angiogenèse des tumeurs a été démontrée. Le celecoxib, un inhibiteur sélectif de cette enzyme, a notamment été utilisé en association avec la chimiothérapie entraînant peu d'effets cytotoxiques additionnels mais augmentant le taux de réponse de 20 % (Chow *et al.*, 2005).

Actuellement, les recherches se penchent vers des inhibiteurs des voies de signalisation des facteurs de croissance dont beaucoup interagissent avec l'ER et contrôlent le développement et la croissance des tumeurs (Nicholson *et al.*, 2005).

2. ŒSTROGENES, AROMATASE ET CANCER MAMMAIRE

2.1. Les œstrogènes

Les œstrogènes, comme toutes les hormones stéroïdes, sont des molécules liposolubles qui diffusent après leur synthèse à travers la membrane des cellules vers la circulation sanguine. Elles ne peuvent circuler dans le sang que liés à des protéines non spécifiques comme l'albumine ou à des protéines spécifiques comme la SHBG (sex hormone binding globulin). Dans les organes cibles, les œstrogènes peuvent traverser la membrane plasmique et nucléaire. Ils sont produits essentiellement par l'ovaire et le cortex surrénalien à partir du cholestérol qui subit l'action d'une cascade enzymatique complexe faisant intervenir des enzymes de la famille des cytochromes p450 (Figure 8). Trois œstrogènes sont produits naturellement chez les femmes.

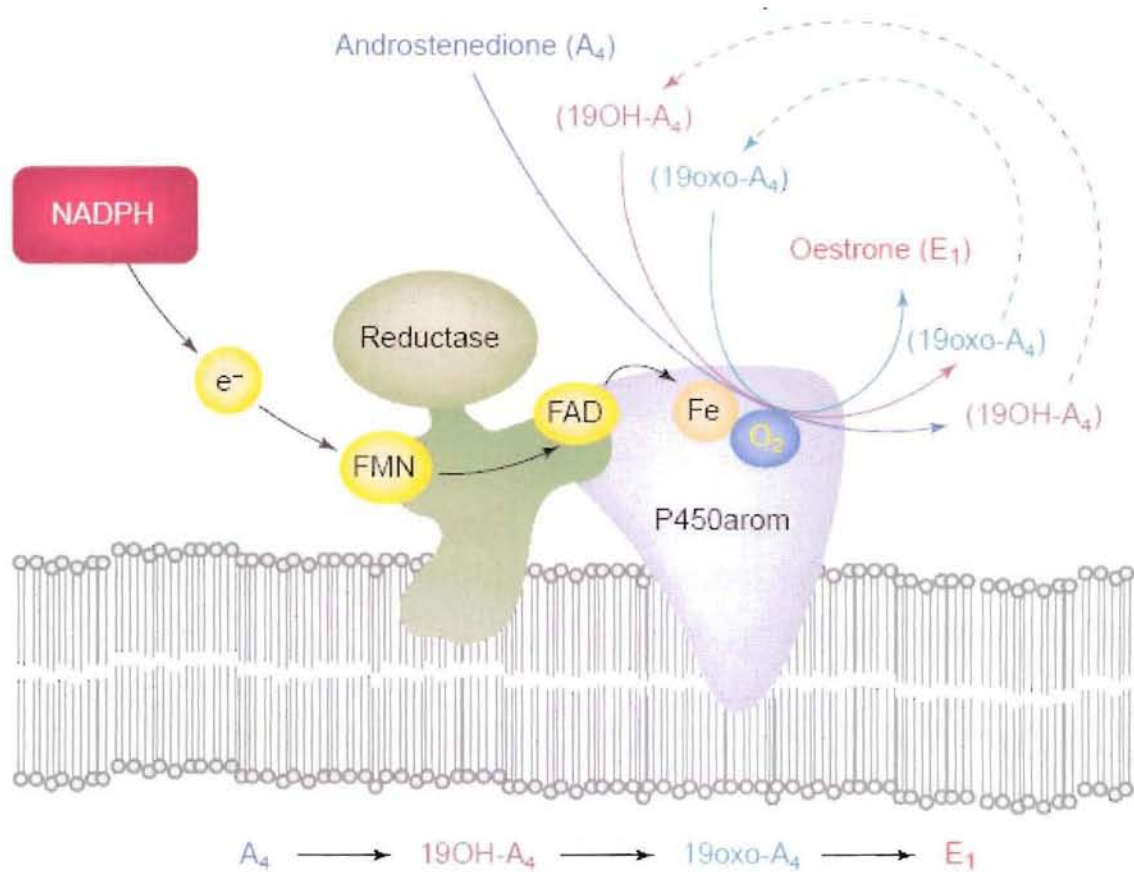


Figure 9 : Schéma de la membrane microsomale portant le complexe enzymatique aromatase. On retrouve la cytochrome P450 aromatase (P450arom) et son partenaire redox : la NADPH cytochrome P450 oxydoréductase (Réductase) (Conley et al., 2001).

Le 17β -œstradiol (œstradiol ou E_2) est produit au niveau des ovaires chez les femmes non-ménopausées. Il constitue l'œstrogène majoritaire et le plus actif car il possède la meilleure affinité pour les récepteurs aux œstrogènes. Sa concentration dans le sang varie de 40 à 400 pg/mL en fonction du cycle menstruel. Après la ménopause, le taux d'œstradiol circulant ne dépasse pas 20 pg/mL.

L'œstrone (E_1) moins actif que l'œstradiol est un de ses métabolites. Il peut également être produit directement par conversion de l'androstènedione dans le tissu adipeux. Chez les femmes ménopausées, l'ovaire cesse de produire de l'œstradiol mais l'hypophyse continue à fabriquer de l'androstènedione, précurseur de l'œstrone, et de ce fait le taux d'œstrone circulant reste inchangé.

Le troisième œstrogène est l'œstriol (E_3) qui est aussi un métabolite de l' E_2 . L'œstriol est le principal œstrogène produit par le placenta durant la gestation mais il est retrouvé en plus faible quantité que l'œstradiol et l'œstrone chez les femmes non gestantes (Ruggiero *et al.*, 2002).

2.2. Le complexe enzymatique aromatasase

2.2.1. Structure et fonction

L'aromatasase est l'enzyme qui synthétise les œstrogènes à partir des androgènes. Elle fait partie d'un complexe enzymatique formé de l'aromatasase cytochrome P450 (P450arom) couplée à une flavoprotéine ubiquitaire : la NADH-cytochrome P450 réductase. P450arom est membre de la superfamille des cytochromes P450 et appartient au sous groupe des stéroïdes hydrolases. Elle est constituée de 503 acides aminés. En accord avec son importance biologique, P450arom est très conservée chez les vertébrés (50 à 90% d'homologie entre la séquence peptidique de la P450arom d'un poisson et celle d'un mammifère).

La plupart des informations connues sur la fonction catalytique de la P450arom ont été déterminées à partir d'études sur l'enzyme humaine. Le processus catalytique correspondant à l'aromatisation des androgènes requiert le transfert séquentiel de trois paires d'électrons, la consommation de trois moles d'oxygène et de trois moles de NADPH réduit pour la synthèse d'une mole d'œstrogène (Figure 9). L'hème de la protéine est responsable de la liaison du substrat stéroïde C19 et catalyse une série de réactions menant à la formation du noyau A phénolique caractéristique des œstrogènes. La réaction implique deux hydroxylations consécutives sur le groupement méthyle du C19 du stéroïde (activité 19-hydroxylase),

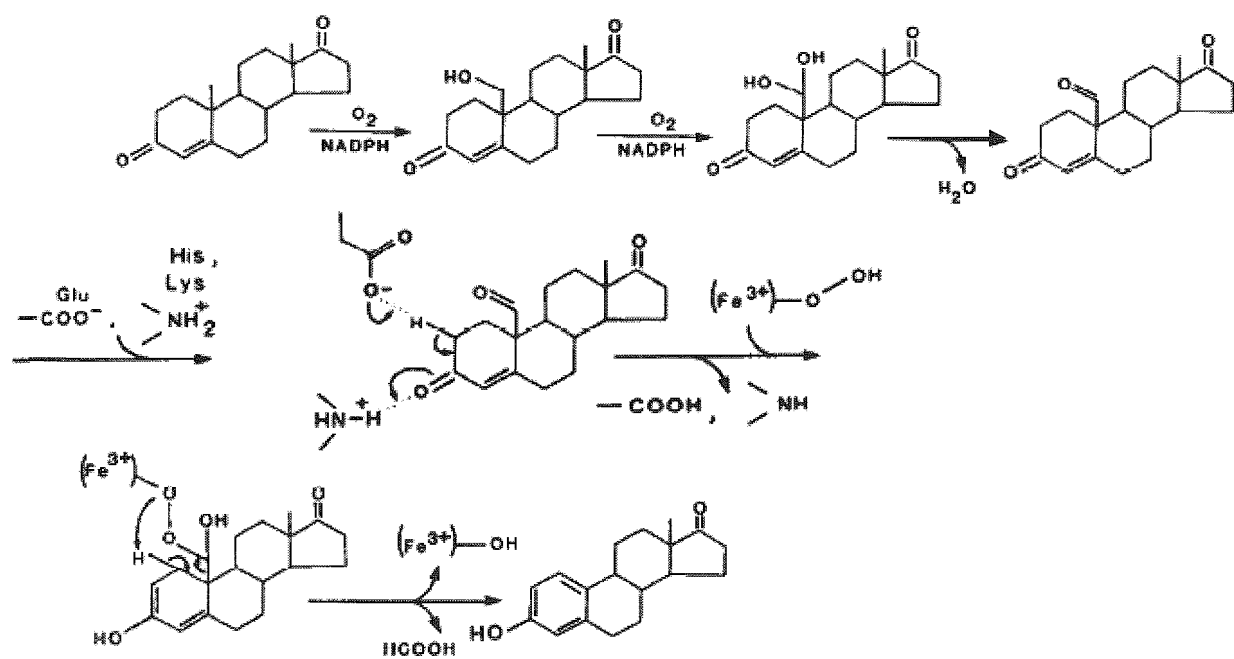


Figure 10 : Réaction d'aromatisation de l'androstènedione réalisée par le complexe enzymatique aromatasase. Seule la troisième réaction d'oxydation est détaillée (Simpson et al., 1994).

formant des intermédiaires 19-hydroxy et 19-oxo. Un troisième événement oxydatif a lieu et se termine par le clivage du groupement méthyle du C19, l'aromatisation du noyau A et la formation de l'œstrogène (Figure 10). L'androstènedione et la testostérone sont les 2 substrats les plus importants : ils présentent une grande affinité pour l'enzyme et sont majoritairement retrouvés chez la femme. La 16OH-androstènedione, provenant de l'hydroxylation hépatique du sulfate de déhydroépiandrostérone est un substrat additionnel utilisé dans la synthèse de l'œstriol placentaire durant la gestation. L'aromatisation n'est pas toujours complète. Des intermédiaires tels que la 19OH- et 19-oxo-androstènedione et testostérone sont parfois retrouvés dans certaines cellules et certains tissus. Par ailleurs, la P450arom montre d'autres activités catalytiques notamment une activité 2-hydroxylase.

L'affinité de l'androstènedione et de la testostérone est similaire et de l'ordre de 1 à 100 nM pour l'aromatasase placentaire humaine purifiée. Cette affinité de l'ordre du nanomolaire indique que l'aromatisation est possible à de très faibles concentrations d'androgène. Cette propriété facilite la synthèse d'œstrogène dans des tissus périphérique habituellement non stéroïdogène dans lesquels les androgènes ne sont pas synthétisés à de fortes concentrations (Conley *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 1994).

2.2.2. Localisation cellulaire et tissulaire

La plupart des cytochromes P450 aromatasase et réductase résident au niveau du réticulum endoplasmique.

Le complexe enzymatique aromatasase est retrouvé uniquement dans les gonades et le cerveau chez de nombreux vertébrés. Chez l'Homme, il est aussi retrouvé dans le syncytiotrophoblaste du placenta, le tissu adipeux, l'os, les fibroblastes de la peau, certaines portions du réseau vasculaire, le foie fœtal et d'autres tissus fœtaux (intestin, cerveau...) (Conley *et al.*, 2001).

Dans l'ovaire, l'aromatasase est retrouvée principalement au niveau des cellules de la granulosa et du *corpus luteum*. Dans les testicules, le complexe enzymatique est retrouvé dans les cellules de Sertoli essentiellement. Dans le cerveau, la biosynthèse d'œstrogènes et de ce fait la présence d'aromatasase est nécessaire pour un comportement sexuel normal et chez le rat, l'aromatasase a été retrouvée principalement dans la région médio-basale de l'hypothalamus. Au niveau des os, la P450arom est retrouvée majoritairement dans les ostéoblastes et les chondrocytes; sa présence permet une production locale d'œstrogènes probablement responsable du maintien de la minéralisation des os (Sasano *et al.*, 1997).

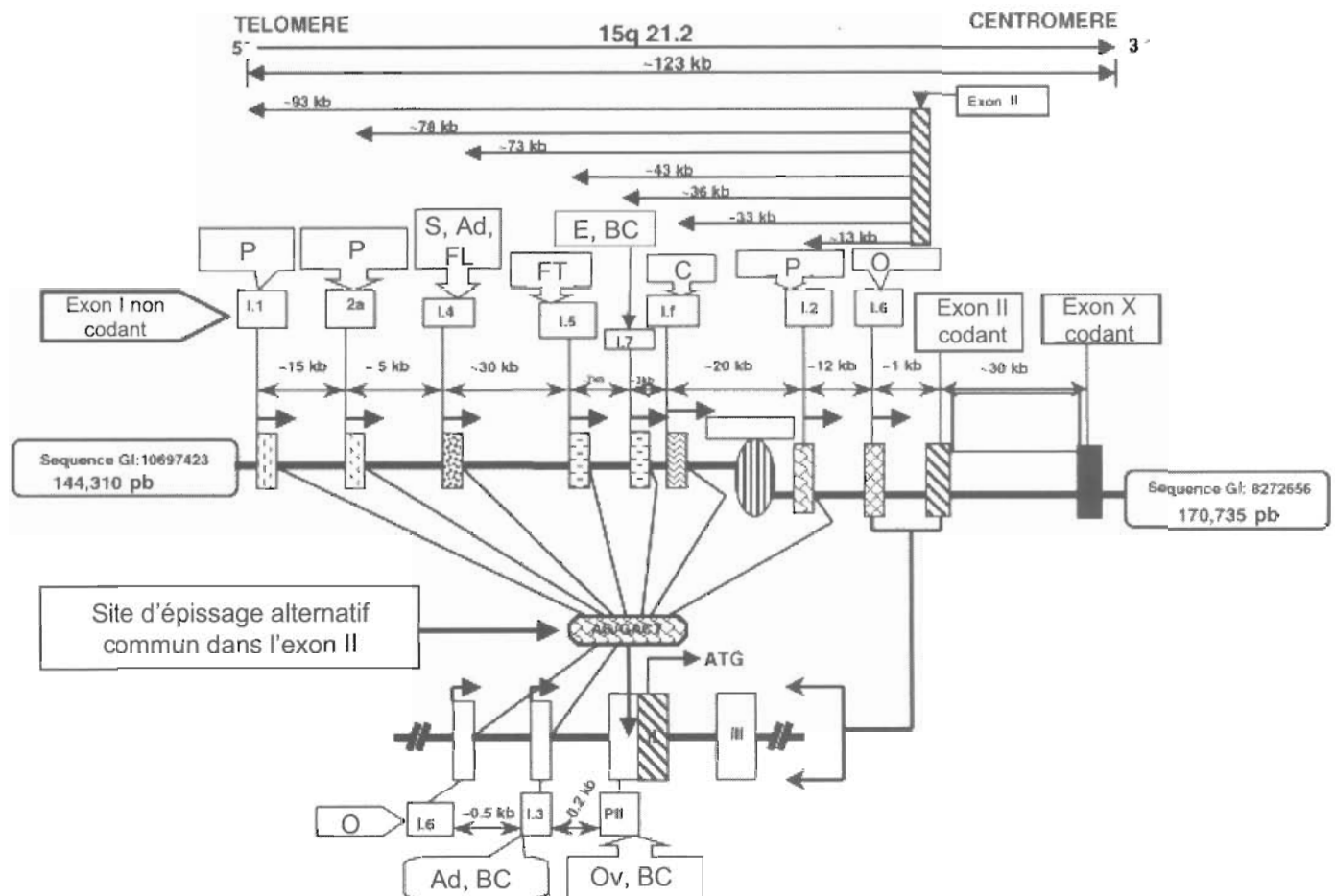


Figure 11 : Organisation génomique du gène de l'aromatase humaine (*CYP19*). La région 5' du gène contient de nombreuses séquences correspondant aux exons I non codants. Ces derniers contiennent différents promoteurs spécifiques du placenta (P), de la peau (S), du tissu adipeux (Ad), du foie fœtal (FL), des tissus fœtaux (FT), du cerveau (C), des os (O), de l'ovaire (Ov) et du tissu cancéreux mammaire (BC). Chaque tissu contient une 5'UTR unique générée par un épissage alternatif avec un site accepteur unique présent dans l'exon II (AG/GATC). La région codante est identique et ne s'étend que sur 30 kb de la séquence génomique tandis que les différentes régions promotrices et les exons I non codants s'étendent sur plus de 90 kb. (d'après Bulun et al., 2003)

Le tissu adipeux est un site majeur d'expression de l'aromatase. Néanmoins l'activité est maximale non pas dans les adipocytes mais dans les cellules stromales (cellules du tissu conjonctif) qui les bordent. Le stroma du sein étant majoritairement composé de tissu adipeux, on y retrouve le complexe enzymatique aromatase et particulièrement dans les fibroblastes du tissu adipeux (Bulun *et al.*, 1997). Dans les tumeurs mammaires, l'aromatase n'est pas uniquement exprimée dans le stroma mais également au niveau des cellules épithéliales. Néanmoins, le compartiment stromal reste le site majeur de conversion des androgènes en œstrogènes (Reed *et al.*, 2001).

2.2.3. Structure génomique et expression tissu-spécifique de l'aromatase

L'aromatase est codée par un gène unique : le gène *CYP19* localisé sur le chromosome 15q21.2. La taille du gène *CYP19* a été estimée à 123 kb. Il comporte 10 exons, dont 9 exons codants, numérotés de II à X, et 8 exons I différents non codants. En effet, l'expression de l'aromatase est tissu-spécifique et ceci grâce à la présence de plusieurs promoteurs et d'un mécanisme d'épissage alternatif. Ainsi, chacun des promoteurs est situé en amont d'un exon I, également tissu-spécifique, qui code un ARNm avec une extrémité 5' spécifique qui sera non traduite (Figure 11). La traduction est initiée au niveau d'un site commun d'épissage situé approximativement à 39 pb en amont de l'exon II. Les protéines exprimées dans les différents tissus sont donc identiques. Le promoteur le plus proche de l'exon II est le promoteur II qui est utilisé spécifiquement dans la gonade. Deux autres promoteurs, I.3 (spécifique du tissu adipeux) et I.6 (spécifique de l'os), sont situés dans une région de 1 kb en amont du codon d'initiation de la traduction. Le promoteur I.2, un promoteur minoritaire spécifique du placenta, est situé approximativement à 13 kb en amont de l'ATG. Enfin, les promoteurs spécifiques du cerveau (I.f), des cellules endothéliales (I.7), des tissus fœtaux (I.5), du tissu adipeux (I.4) et du placenta (2a minoritaire et I.1 majoritaire) sont localisés respectivement à 33, 36, 43, 73, 78 et 93 kb en amont du codon d'initiation de la traduction (Bulun *et al.*, 2003).

2.2.4. Expression et régulation dans les tumeurs mammaires

Le tissu adipeux du sein normal présente un niveau d'expression de l'aromatase assez bas. Cette expression est contrôlée essentiellement par le promoteur I.4 alors que les promoteurs I.3 et II sont très peu utilisés. La caractérisation de la région située en amont de l'exon I.4 a révélé l'absence de boîte TATA. En revanche, on y trouve un site de fixation pour

les facteurs de transcription SF-1 et Sp1, un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) et une séquence GAS (Séquence Activée par l'interferon- γ) qui peut lier les facteurs de transcription de la famille STAT (Harada *et al.*, 2001). L'activité aromatase dans le tissu adipeux du sein normal est donc dépendante essentiellement des glucocorticoïdes et d'un certain nombre de cytokines dont l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumoral alpha (Tumor Necrosis Factor alpha, TNF- α) (Reed *et al.*, 2001).

Dans les tumeurs mammaires, on observe une réduction des transcrits PI.4 et une augmentation des transcrits PII et PI.3 (Zhou *et al.*, 1996). Les promoteurs PII et PI.3 ont été caractérisés et se trouvent être approximativement à 200 pb l'un de l'autre. Plusieurs régions régulatrices ont été identifiées à proximité de ces 2 promoteurs.

2.2.4.1. L'élément régulateur S1

La région régulatrice S1 est située entre les promoteurs PII et PI.3. Les facteurs de transcription pouvant interagir avec cette région sont des récepteurs nucléaires. Selon le récepteur nucléaire fixé, l'élément agira comme un activateur ou un répresseur de la transcription. Ainsi, lorsque le récepteur ERR α s'y fixe, S1 agit comme un répresseur et lorsqu'il s'agit des récepteurs COUP-TF, EAR-2 et RAR γ , il agit comme un activateur. La régulation de l'expression de l'aromatase par S1 dépend donc du niveau d'expression de ces récepteurs nucléaires dans les cellules. Dans le tissu mammaire normal, EAR-2, COUP-TF1 et RAR γ sont fortement exprimés, ce qui explique que les transcrits provenant des promoteurs I.3 et II sont peu présents. A l'inverse, dans le tissu mammaire cancéreux, ERR α est exprimé alors que EAR-2, COUP-TF1 et RAR γ ne sont présents qu'en faible quantité (Yang *et al.*, 2002). De plus, il a été montré qu'il existe une corrélation inverse entre l'expression de COUP-TF1 et celle de l'aromatase dans les tumeurs mammaires (Yang *et al.*, 2002).

L'ER α peut également se fixer au niveau de S1 et supprimer l'activité du promoteur. Néanmoins les études révèlent que de fortes concentrations d'œstradiol (100 nM et plus) sont nécessaires pour observer une interaction entre ER α et S1. Généralement, dans les cellules, l'ER α peut être activé par des doses d'E $_2$ d'environ 0,1 à 1 nM ce qui suggère que la suppression de l'expression d'aromatase par l'ER α est un mécanisme de rétrocontrôle. Celui-ci permettrait la suppression de l'expression d'aromatase quand la concentration intracellulaire en œstrogène est proche ou supérieure à 100 nM (Chen *et al.*, 2002).

2.2.4.2. Régulation par l'AMPc

L'activité et le nombre de transcrits aromatasase sont supérieurs dans les cellules adipeuses exposées à la forskoline, un stimulateur de la production d'AMPc intracellulaire. Par ailleurs, ces transcrits sont spécifiques des promoteurs PI.3 et PII démontrant que ces deux promoteurs sont activés par l'AMPc. Le mécanisme d'activation transcriptionnel répondant à une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire fait intervenir des séquences d'ADN appelées éléments de réponse à l'AMPc (CRE) qui peuvent fixer des facteurs de transcription de la famille CREB/ATF. L'analyse de la séquence située en amont de PII n'a révélé aucune séquence CRE consensus. En revanche, une séquence "CRE-like" a été identifiée. Son activation nécessite la fixation d'un homodimère CREB ainsi que la fixation de la protéine Ad4BP/SF-1 sur une séquence située à proximité de l'élément S1 (Michael *et al.*, 1997). Au niveau du promoteur 1.3, un CRE qui diffère d'une base par rapport à la séquence consensus a également été identifiée. Cette séquence appelée CREaro présente une capacité activatrice supérieure à celle d'un CRE classique (Zhou *et al.*, 1999).

Ces observations ainsi que de nombreuses études révèlent que l'AMPc joue un rôle important dans la surexpression d'aromatasase et la biosynthèse d'œstrogènes observée dans les cellules cancéreuses mammaires. De nombreux facteurs peuvent être impliqués dans l'augmentation du taux d'AMPc dans les tissus mammaires cancéreux. Un des facteurs majeurs semble être la prostaglandine PGE2. Elle est synthétisée, à partir de l'acide arachidonique, par des enzymes appelées cyclooxygénases (COX). Deux isoformes ont été identifiées, COX-1 et COX-2. COX-1 est présent à niveau constant dans beaucoup de cellules et tissus, bien qu'elle semble avoir une activité et un niveau d'expression faible dans les tumeurs mammaires. En revanche COX-2 est présente dans les tissus cancéreux mammaires mais pas dans le tissu mammaire sain (Diaz-Cruz *et al.*, 2005). Les prostaglandines PGE2 produites par ces enzymes augmentent le taux d'AMPc intracellulaire dans les cellules cancéreuses mammaires (Zhao *et al.*, 1996). De plus, l'inactivation de COX-2 dans les cellules cancéreuses mammaires, à l'aide d'inhibiteurs sélectifs, induit une diminution de l'expression et de l'activité de l'aromatasase de manière dose dépendante (Diaz-Cruz *et al.*, 2005). Les œstrogènes sont également capables d'augmenter la production d'AMPc dans les cellules cancéreuses mammaires en stimulant l'adénylate cyclase (Aronica *et al.*, 1994). Cela suggère qu'il existe une boucle entre la production d'œstrogènes par l'aromatasase et la synthèse d'AMPc dans les tissus cancéreux mammaires.

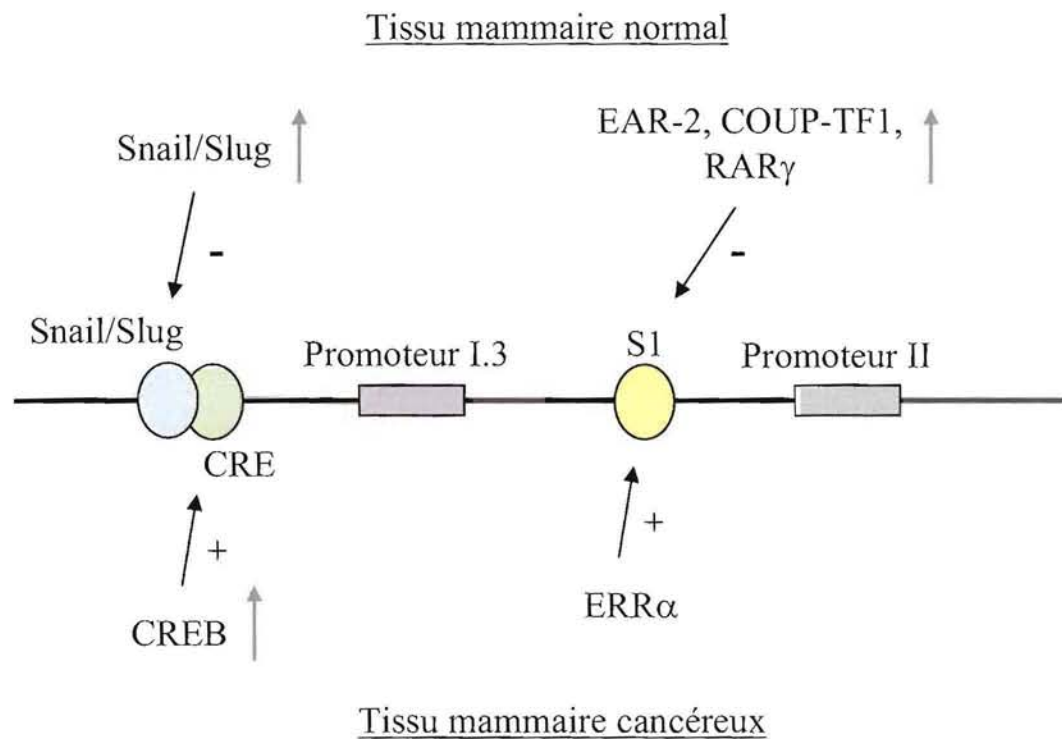


Figure 12 : Hypothèse actuelle concernant la régulation des promoteurs I.3 et II au niveau du tissu mammaire normal et cancéreux (d'après Chen et al., 2005).

2.2.4.3. Régulation par Snail et Slug

Plus récemment, une région régulatrice positionnée à proximité et en amont de CREaro a été mise en évidence. Les facteurs de transcription pouvant se lier à cette séquence sont les protéines Snail et Slug. Elles agissent comme des répresseurs du promoteur I.3. Dans les fibroblastes et les cellules épithéliales mammaires saines, l'expression de Snail est plus forte que dans les cellules cancéreuses mammaires (Okubo *et al.*, 2001). L'hypothèse actuelle est que dans le tissu mammaire normal, la fonction du promoteur PI.3 est réprimée car l'activation du CREaro est bloquée par la fixation des protéines Snail/Slug. Dans le tissu cancéreux, l'expression de Snail/Slug diminue, induisant une augmentation de l'expression de l'aromatase car la fixation de CREB et d'autres facteurs sur CREaro est alors possible (Figure 12).

2.2.5. Rôle et conséquences de l'expression d'aromatase dans la tumeur

La ménopause est caractérisée par une réduction marquée de la production d'œstrogènes au niveau de l'ovaire. Alors qu'avant la ménopause les taux journaliers de production d'œstradiol et d'œstrone sont respectivement de 400 et 180 µg, après la ménopause ils passent à 6 et 40 µg (Purohit *et al.*, 2002). Après la ménopause, la production d'œstrogènes a essentiellement lieu au niveau de sites extragonadiques. Ces sites incluent le tissu adipeux et notamment celui retrouvé au niveau du sein. Cette biosynthèse d'œstrogène au niveau de sites extragonadiques diffère de celle qui a lieu au niveau de l'ovaire. Tout d'abord, les œstrogènes synthétisés agissent préférentiellement au niveau local comme des facteurs paracrines ou même intracrines (Labrie *et al.*, 1997). La quantité d'œstrogènes synthétisés peut être faible mais la concentration locale au niveau du tissu est probablement forte et exerce localement une influence biologique non négligeable. Par ailleurs, dans les cancers du sein hormono-dépendants qui représentent environ 70% des cancers mammaires, les œstrogènes jouent un rôle crucial dans le développement et la croissance de la tumeur (voir 2.3.4).

Ainsi, des études montrent que par conversion des androgènes en œstrogènes, l'aromatase endogène de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (lignée cellulaire ER-positive) peut stimuler la synthèse d'ADN. Cette stimulation est par ailleurs abolie par l'administration d'inhibiteurs d'aromatase (Kitawaki *et al.*, 1992). D'autres études montrent que les androgènes dans ces mêmes cellules sont capables d'induire, via l'aromatase, une réponse habituellement

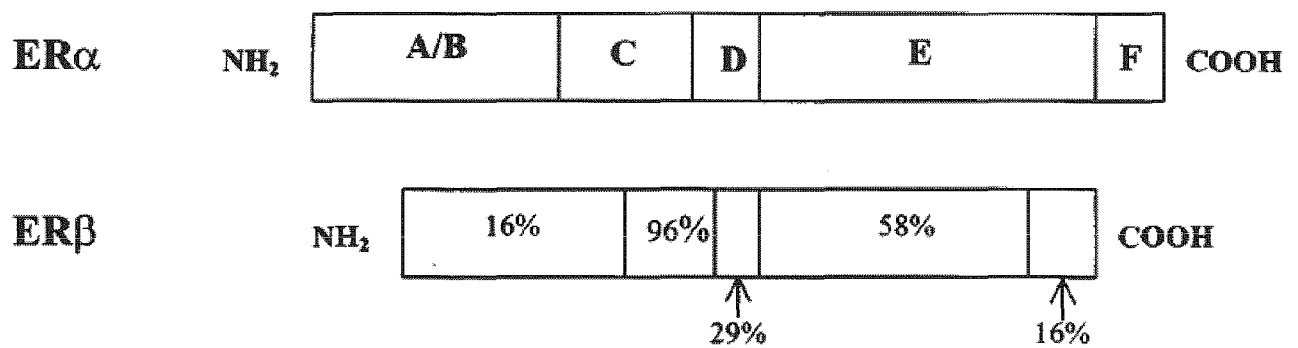


Figure 13 : Comparaison des protéines ERα et ERβ. Le pourcentage d'homologie entre les séquences d'acides aminés des différents domaines est montré. (d'après Girdler et al., 2000).

induite par les œstrogènes, à savoir la transcription de gènes régulés par l'ER α (Burak *et al.*, 1997).

D'un point de vue physiologique, la prolifération des cellules mammaires MCF-7 peut également être stimulée par aromatisation d'androgènes via l'aromatase endogène (Maggiolini *et al.*, 2001; Sonne-Hansen *et al.*, 2005). Ainsi, dans des souris nudes inoculées avec des cellules MCF-7 surexprimant l'aromatase, le développement d'une tumeur est plus rapide après injection d'androstènedione (Yue *et al.*, 1994). De plus, des études réalisées sur des souris transgéniques dans lesquelles l'aromatase est surexprimée au niveau du tissu mammaire indiquent que la production in situ d'œstrogènes joue un rôle plus important dans le développement tumoral que les œstrogènes circulants (Teckmal *et al.*, 1996).

L'aromatase a donc un rôle clef dans l'évolution de la tumeur car son expression au niveau des cellules stromales mais également des cellules cancéreuses stimule la croissance tumorale. Ces effets induits par stimulation autocrine et paracrine font de l'aromatase une cible thérapeutique de choix dans la lutte contre les cancers du sein hormono-dépendants.

2.3. Les récepteurs aux œstrogènes

Les récepteurs aux œstrogènes appartiennent à la grande famille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes et thyroïdiennes. Ils existent sous 2 isoformes : le récepteur alpha (ER α) et le récepteur bêta (ER β). Le premier a été découvert en 1967 alors que le second n'a été identifié qu'en 1996. Ils ne s'agit pas de variants issus d'un épissage différentiel : ils sont codés par des gènes différents (*ESR1* et *ESR2*) localisés sur des chromosomes différents. Ils présentent cependant une grande homologie puisque l'alignement des séquences montre une conservation de l'ordre de 96 % dans le domaine de fixation à l'ADN et de 58% dans le domaine de fixation du ligand (Figure 13). Les 2 récepteurs lient les œstrogènes avec une affinité similaire, mais ER β semble avoir une meilleure affinité pour les phytoœstrogènes (Herynk *et al.*, 2004). Dans les tissus, ER α et ER β sont exprimés de manière différentielle bien que le plus souvent ils soient coexprimés (Balfé *et al.*, 2004). Lorsqu'ils sont coexprimés dans les cellules, ils peuvent interagir entre eux et former des hétérodimères (Pace *et al.*, 1997).

Au niveau de la glande mammaire, les récepteurs aux œstrogènes sont connus pour être nécessaires au développement et à la maturation de la glande en stimulant la synthèse d'ADN et en induisant la formation de bourgeons. Seulement 7 à 10% des cellules épithéliales du sein

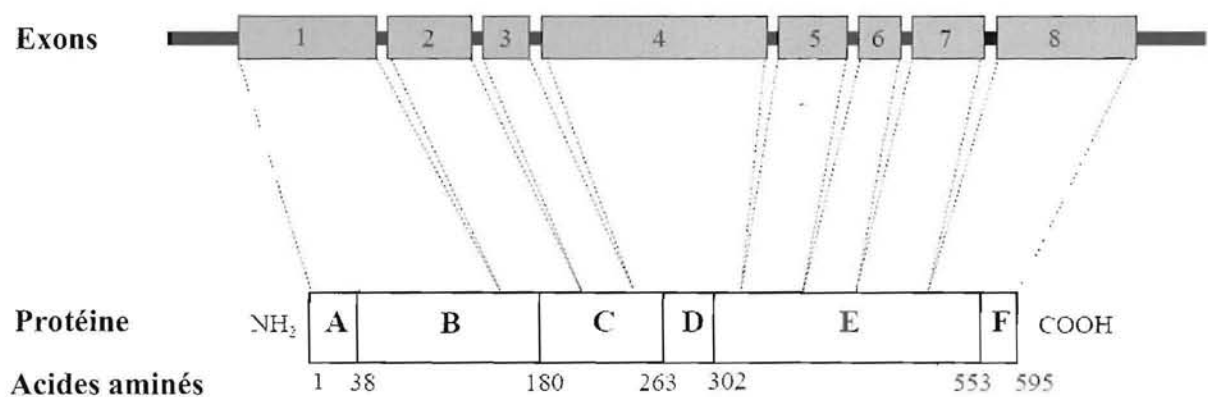


Figure 14 : Les exons codant pour les différents domaines fonctionnels et structuraux de l'ER α (d'après Girdler et al., 2000).

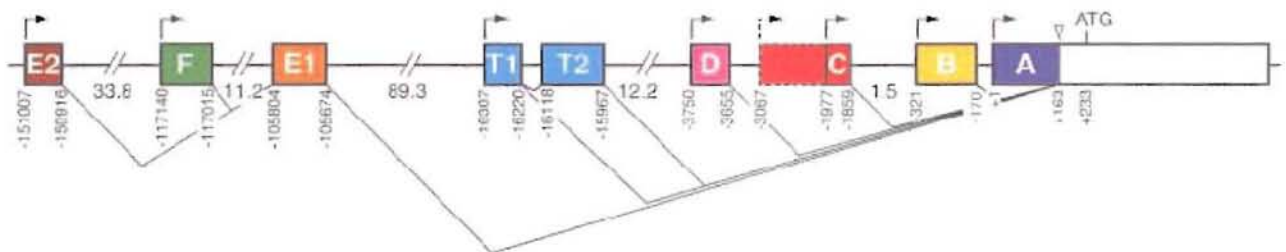


Figure 15 : Organisation génomique de la région promotrice du gène de l'ER α humain. Les rectangles colorés représentent les différents exons selon la nomenclature actuelle. Les nombres situés en dessous des exons indiquent leur distance par rapport au premier site de début de la transcription (+1). Les nombres situés entre les exons indiquent la taille des introns en kilo paires de bases. Le site commun accepteur d'épissage est indiqué par un triangle (d'après Kos et al., 2001).

normal expriment l'ER α et cette expression varie selon le cycle menstruel. A l'inverse, l'expression d'ER β est relativement élevée dans le tissu mammaire normal puisque 80 à 85 % des cellules l'expriment. De plus, ce niveau d'expression ne varie pas durant le cycle menstruel. Durant le processus de tumorigénèse, le ratio ER α /ER β change. En effet, dans les carcinomes canaux infiltrants de même que dans les cancers du sein invasifs, il a été démontré que 75% des cellules présentaient un fort taux d'ER α . Parallèlement, dans ces cellules une réduction de l'expression d'ER β est observée (Herynk *et al.*, 2004). Actuellement, le rôle d'ER β dans la progression des cancers mammaires est très controversé. En effet, des études suggèrent que l'expression d'ER β est un indicateur de pronostic favorable alors que d'autres suggèrent que l'expression d'ER β est associée à celle de facteurs connus comme ayant un impact plutôt défavorable. Il est cependant intéressant de noter que beaucoup des études indiquant que l'ER β est un indicateur de mauvais pronostic ne se sont intéressées qu'au taux d'ARN. En outre, certaines amorces utilisées peuvent amplifier des variants issus d'épissages alternatifs et fausser le taux réel. Les études évaluant le taux protéique d'ER β sont moins contradictoires et suggèrent que ER β est plutôt un indicateur de pronostic favorable (Murphy et Watson, 2002; Herynk *et al.*, 2004). Bien qu'actuellement, le rôle définitif d'ER β dans la carcinogénèse mammaire n'ait pas encore été élucidé, il peut être conclu que l'ER α apparaît comme le récepteur jouant le rôle le plus important dans le cancer du sein. Aussi, dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement à la forme alpha.

2.3.1. Le gène codant l'ER α

2.3.1.1. Structure génomique

Localisé sur le bras long du chromosome 6, le gène *ESR1* qui code l'ER α contient 8 exons qui représentent environ 140 kb (Figure 14). La comparaison de la séquence de l'ADNc de l'ER α humain avec celle du poulet, du rat ou encore de la souris montre un haut niveau de conservation entre ces espèces excepté pour l'extrémité 5'. Cependant, l'analyse d'autres membres de la famille des récepteurs nucléaires indique que la présence de multiples promoteurs est une caractéristique commune des récepteurs aux hormones stéroïdiennes. Ainsi, de nombreux exons situés en amont de l'exon 1 et correspondant à une région 5' non traduite de l'ARNm de l'ER α ont été identifiés (Figure 15). Ils sont au nombre de 8 et sont nommés A, B C, D E, F, T1 et T2 selon la dernière nomenclature. Il existe également sept

promoteurs différents situés en amont de chacun des exons (1 seul promoteur pour les exons T1 et T2). La traduction des différents variants d'ARNm est initiée au niveau d'un site commun d'épissage situé approximativement à 163 pb en amont de l'exon 1, et la traduction des différents variants engendre une protéine unique (Flouriot *et al.*, 1998; Kos *et al.*, 2001).

2.3.1.2. Les différents variants et isoformes d'ARNm

En plus des variants correspondant à l'utilisation différentielle des sept promoteurs, des variants issus d'épissage alternatif sont détectés dans de nombreux tissus normaux tel que le sein, l'endomètre ou encore l'hypophyse. De tels variants sont également trouvés dans de nombreuses variétés de tumeurs incluant les tumeurs mammaires, les carcinomes de l'endomètre et les méningiomes. Bien que beaucoup de ces variants aient été majoritairement détectés dans les tissus cancéreux, les études réalisées ont été incapables de démontrer une différence dans leur niveau d'expression par rapport aux tissus sains suggérant que ces variants pourraient aussi jouer un rôle dans le processus physiologique normal. Les variants les plus retrouvés sont ceux présentant une délétion des exons 2, 3, 4, 5, 6 ou 7. Leur traduction engendre pour la plupart des protéines tronquées. Les variants présentant une délétion de l'exon 7 sont ceux les plus fréquemment observés dans les tumeurs mammaires. Ils codent une protéine dépourvue du domaine AF-2 et d'une partie du domaine de fixation du ligand.

En plus des variants présentant une délétion d'un seul exon, des variants présentant des délétions multiples ou partielles ont également été identifiés et notamment dans les tissus cancéreux mammaires. Des duplications d'exons ou des insertions sont également possibles (Herynk *et al.*, 2004).

Une étude portant sur 109 tumeurs mammaires d'individus différents a montré que l'expression de l'ER α sauvage était plus forte que celle des variants dans la majorité des cas. Ces résultats démontrent que même si un nombre important de tumeurs expriment des variants de l'ER α , l'ER α sauvage est l'isoforme prédominante (Zhang *et al.*, 1996).

2.3.1.3. Expression et régulation dans les tumeurs mammaires

L'expression de l'ER α est significativement modifiée durant le développement du cancer du sein et de ce fait, les mécanismes qui régulent le taux d'ARNm de l'ER α ont été

bien étudiés. Les travaux ont commencé par l'étude des intérêts et fonctions des multiples promoteurs. L'hypothèse la plus évidente est une régulation tissu-spécifique voir cellule-spécifique des différents promoteurs. En effet, il a été montré que dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, les promoteurs A et C sont utilisés alors que dans les cellules ZR-75-1 seul le promoteur A est exploité. D'autres études montrent une plus grande utilisation du promoteur B dans le sein normal et le tissu utérin (Grandien *et al.*, 1995). Par ailleurs, une utilisation différentielle du promoteur C dans les cellules mammaires normales et cancéreuses a été démontrée (Kos *et al.*, 2001). Globalement, les promoteurs situés à 2 kb en amont du site d'épissage commun (promoteurs A, B et C) sont majoritairement utilisés dans les lignées cellulaires et tissus exprimant des taux élevés d'ER α , alors que les promoteurs les plus éloignés (E et F) sont utilisés dans les tissus où l'ER α est peu abondant tels que le foie ou les os (Henryk *et al.*, 2004). Néanmoins, certains promoteurs semblent être utilisés dans tous les tissus et même dans les tissus pour lesquels un promoteur spécifique a été décrit. Il est donc possible que les promoteurs, qui sont actifs dans tous les tissus, produisent un taux basal d'ARNm de l'ER α et que les promoteurs tissu spécifiques augmentent le taux d'expression de l'ER α en accord avec les besoins de la cellule (Kos *et al.*, 2001).

Les mécanismes responsables de la surexpression d'ER α observée dans les tumeurs mammaires sont complexes et font intervenir des activateurs et répresseurs qui ne sont pas tous clairement identifiés. Des études montrent que les promoteurs A et C (promoteur B dans l'ancienne nomenclature) sont fortement impliqués dans l'augmentation de la transcription de l'ER α dans les cellules cancéreuses mammaires (Hayashi *et al.*, 1997). La caractérisation du promoteur C a ainsi permis de mettre en évidence un élément activateur essentiel pour la transcription via ce promoteur. Le facteur pouvant se fixer à cet élément et activer la transcription est nommé ERBF-1 pour facteur associé au promoteur B des récepteurs aux œstrogènes. ERBF-1 est par ailleurs exclusivement exprimé dans les cellules exprimant des transcrits ER α issus du promoteur C, dont les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et T-47D (Tanimoto *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 2003). Une autre séquence activatrice a été identifiée approximativement à 3700 pb du site de début de la transcription. Elle semble essentielle à la surexpression d'ER α observée dans les cellules cancéreuses mammaires ER-positives. Cette séquence appelée ER-EH0 consiste en un site AP-1, liant les protéines c-fos et c-jun, et en une séquence adjacente liant d'autres facteurs encore inconnus (Tang *et al.*, 1997). Enfin, un facteur de transcription appelé AP-2 γ et membre de la famille des facteurs de transcription AP-2, est également impliqué dans la surexpression de l'ER α observée dans les

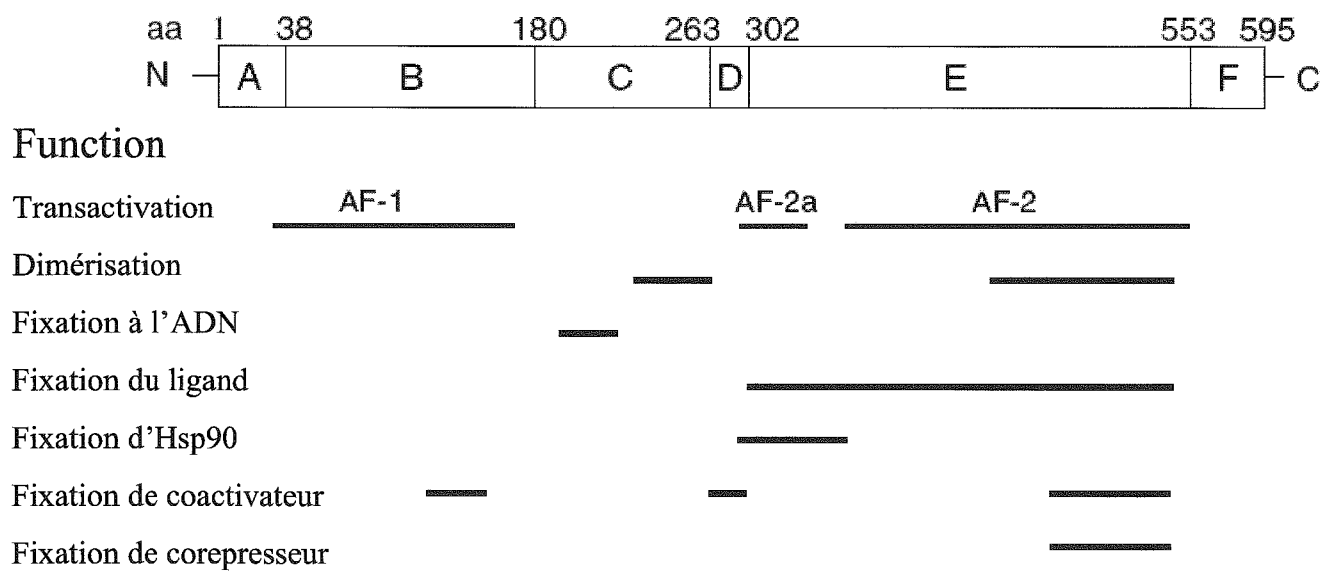


Figure 16 : Schéma de la structure de l'ER α et de ses domaines fonctionnels (d'après Sommer et al., 2001).

tumeurs mammaires. Les études montrent qu'il agit en induisant un changement dans la structure chromatinienne du promoteur (DeConinck *et al.*, 1995; Schuur *et al.*, 2001).

Le niveau d'expression de l'ER α dans les tumeurs mammaires est également régulé par des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN et la condensation de la chromatine des régions promotrices via notamment une hyperméthylation des îlots CpG du promoteur. En effet, une hyperméthylation du promoteur de l'ER α est associée à une diminution importante du taux d'ARNm dans les lignées cellulaires de cancer du sein ER-négatives. L'inhibition des ADN-méthyltransférases réactive l'expression de l'ER α dans ces cellules. Par ailleurs, l'augmentation de la méthylation des îlots CpG du promoteur de l'ER α a été rapportée comme plus importante dans les tumeurs humaines liées à des mutations de BRCA1 (Matthews *et al.*, 2003).

L'exposition aux œstrogènes joue aussi un rôle dans l'expression de l'ER α , mais peu de choses sont connues quant aux mécanismes moléculaires impliqués dans cette autorégulation (Castles *et al.*, 1997). La présence d'éléments de réponse aux œstrogènes (EREs) dans certaines régions promotrices du gène de l'ER pourrait expliquer ce résultat (Denger *et al.*, 2001). Les sites AP-1, présents notamment au niveau de la séquence ER-EH0, pourraient également contribuer à cette autorégulation. En effet, par interaction avec les protéines c-jun et c-fos, l'ER α pourrait activer sa propre transcription (Tang *et al.*, 1997). Enfin, le facteur de transcription AP-2 γ impliqué dans la surexpression de l'ER α est surexprimé en présence d'œstrogènes et ceci grâce à la présence d'un ERE consensus et d'un ERE dégénéré dans sa région promotrice (Orso *et al.*, 2004).

2.3.2. Structure du récepteur alpha aux œstrogènes

Le récepteur alpha aux œstrogènes est composé de 595 acides aminés et sa masse moléculaire est d'environ 65000 Daltons. L'utilisation de récepteurs chimères aux œstrogènes et aux glucocorticoïdes et de mutants a permis de diviser sa séquence en 6 domaines fonctionnels notés A à F (Figure 16).

Les domaines amino-terminaux A et B possèdent un domaine de transactivation appelé fonction d'activation 1 (AF-1) qui contient une fonction d'activation ligand-indépendante. Cette fonction d'activation AF-1 présente la plus grande variabilité parmi tous les récepteurs stéroïdiens. La région A/B contient également un domaine de corégulation qui peut lier des coactivateurs et corépresseurs et ainsi modifier l'activité transcriptionnelle.

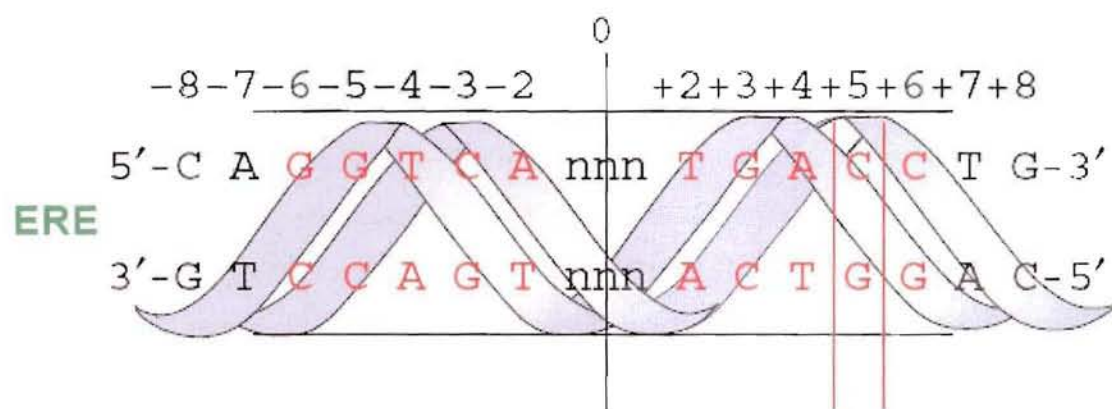


Figure 17 : Séquence consensus de l'élément de réponse aux oestrogènes (ERE) dérivant des gènes de la vitellogénine A1, A2, B1 et B2 de *Xenopus laevis*. Il s'agit d'une séquence palindromique en répétition inversée de 13 paires de bases présentant un espace de 3 paires de bases variables (en rouge)(d'après Gruder *et al.*, 2004).

Le domaine central C contient le domaine de fixation à l'ADN composé de deux motifs en doigts de Zinc. La région appelée "P-box" est responsable de la fixation spécifique du récepteur aux éléments de réponse aux œstrogènes (Estrogen Response Elements, EREs). Les ERE sont constitués d'une séquence palindromique en répétition inversée de 13 paires de bases contenant 3 paires de bases de nature variable (Gruber *et al.*, 2004) (Figure 17). La région "D-box" est impliquée dans la dimérisation du récepteur sur les EREs.

Le domaine D, appelé région charnière, contient une partie du domaine de transactivation AF-2a et une portion du signal de localisation nucléaire de l'ER α .

Les domaines carboxy-terminaux E et F contiennent le domaine de fixation au ligand (Ligand Binding Domain, LBD). Le LBD contient lui-même les domaines de transactivation AF-2 et AF-2a présentant une fonction d'activation ligand-dépendante. L'analyse de la structure cristallographique du LBD a révélé 12 hélices alpha dont 5 (hélices 3, 6, 8, 11 et 12) forment une poche hydrophobe permettant la fixation du ligand. La région E/F est aussi impliquée dans la dimérisation du récepteur, la fixation de protéines corégulatrices et de protéines chaperonnes telles que les protéines de choc thermique 70 (Heat Shock Protein 70, hsp70) et 90 (hsp90) (Sommer *et al.*, 2001; Herynk *et al.*, 2004).

L'ER α agissant comme un facteur de transcription, sa localisation dans les cellules est essentiellement nucléaire. Cependant, il a été démontré qu'il pouvait également fonctionner comme un récepteur couplé aux protéines G et être présent dans la membrane plasmique des cellules. La similitude entre l'ER α membranaire et l'ER α nucléaire a longtemps été controversée cependant, de nombreuses études confortent l'idée qu'il ne s'agit que d'un seul et même récepteur. En effet, des cellules endothéliales issues de souris knock-out pour l'ER α et l'ER β ne présentent ni de forme nucléaire ni de forme membranaire alors que les cellules sauvages expriment les deux isoformes d'ER dans les deux compartiments (Razandi *et al.*, 2004). De même, l'introduction d'oligomères antisens de l'ER α dans des cellules hypophysaires diminue la quantité du récepteur membranaire de manière significative (Norfleet *et al.*, 1999). Enfin, des anticorps dirigés contre de multiples épitopes de l'ER α nucléaire permettent de détecter la forme membranaire dans de nombreux types cellulaires (Pappas *et al.*, 1995; Norfleet *et al.*, 1999; Powell *et al.*, 2001). Bien qu'aucune séquence classique d'adressage membranaire n'ait été trouvée dans le gène *ESR1*, dans les cellules MCF-7, environ 5 % des récepteurs seraient transférés vers la membrane. Le transfert serait effectué grâce à la fixation de la cavéoline-1 au niveau de la sérine 522 de l'ER α . Celle-ci transporterait le récepteur jusqu'à la face cytoplasmique de la bicouche lipidique où il

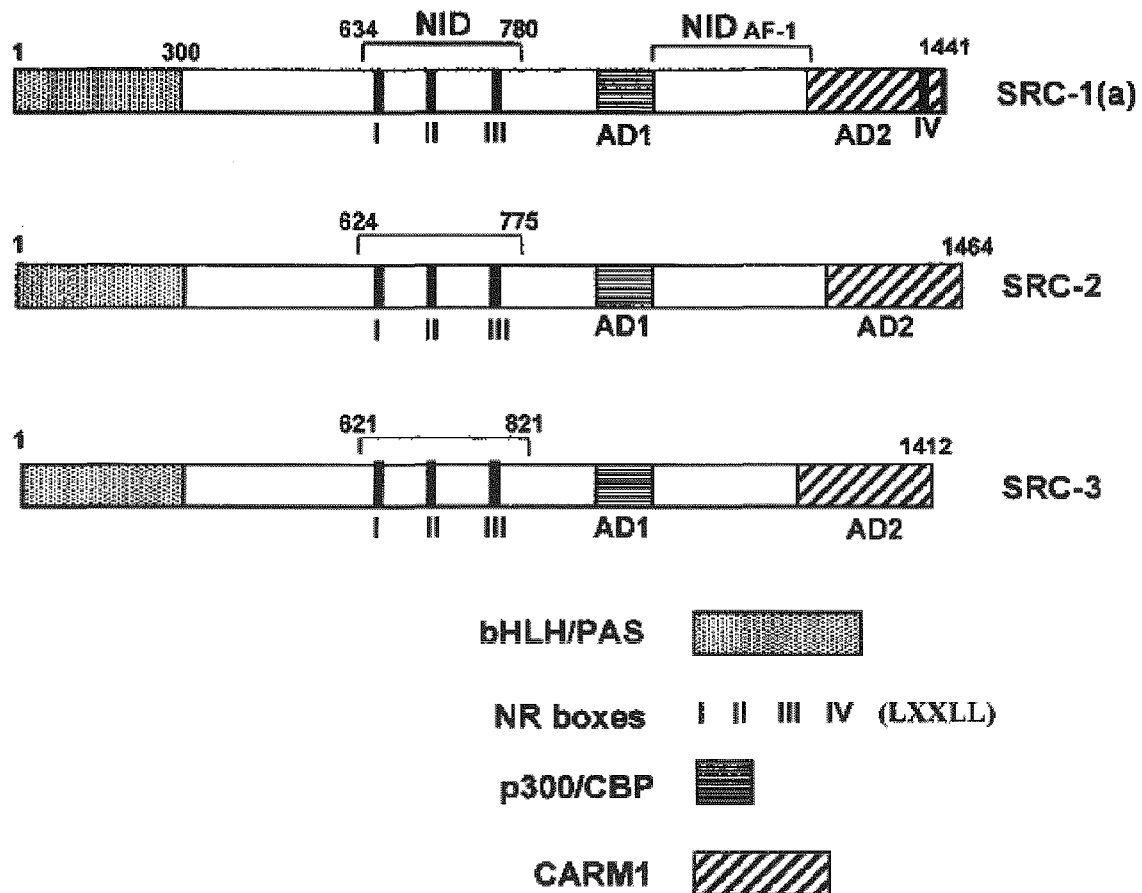


Figure 18 : les coactivateurs des récepteurs hormonaux nucléaires de la famille p160. Les trois classes de coactivateurs p160 sont appelées coactivateurs des récepteurs stéroïdiens (Steroid Receptor Coactivator (SRC) et comprennent : SRC-1 (SRC-1a, SRC-1e), SRC-2 et SRC-3. La région N-terminale contient un domaine hélice boucle hélice (bHLH) et un domaine de dimérisation (PAS). Au centre se trouve le domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires (NID) qui contient 3 motifs LXXLL appelés boîtes de liaison aux récepteurs nucléaires (NR boxes). On trouve également 2 domaines d'activation transcriptionnelle autonomes, AD1 et AD2, qui fixent respectivement les protéines CBP/p300 et CARM1. Enfin on trouve un second domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires (NID_{AF-1}) qui interagit avec le domaine d'activation AF-1 des récepteurs nucléaires.(d'après Edwards et al., 2000)

s'associerait avec les radeaux lipidiques cavéolins (Evinger *et al.*, 2005). Par ailleurs, c'est également sous forme de dimères que l'ER α semble être présent au niveau de la membrane (Razandi *et al.*, 2004).

2.3.3. Mécanisme d'action de l'ER α

2.3.3.1. Voie d'activation de la transcription dite "classique"

Dans les cellules, en absence de ligand, l'ER α est localisé dans le noyau au sein d'un hétérocomplexe, appelé "9S". Ce complexe est composé d'un dimère d'hsp 90, de la protéine p23, et d'une immunophiline comme la Cyp-40 ou la FKBP52. Les protéines hsp90 sont liées à l'ER α dans la partie N-terminale du domaine de fixation au ligand et interagissent avec une séquence située dans la partie N-terminale du domaine de fixation à l'ADN bloquant ainsi la capacité de régulation transcriptionnelle de l'ER α et le maintenant dans une conformation qui favorisent la fixation du ligand (Pratt *et al.*, 1997; Knoblauch *et al.*, 1999).

Les œstrogènes, agonistes de l'ER α , sont liés avec une grande affinité à la globuline de liaison des hormones sexuelles en circulation (sex hormone-binding globulin, SHBG) et diffusent librement au travers de la membrane plasmique et nucléaire. Ils se lient à l'ER α au niveau de la poche formée par 5 des hélices alpha du LBD, entraînant un changement conformationnel du récepteur et la dissociation du complexe multiprotéique. L'ER α peut alors se fixer sous forme de dimère au niveau de son élément de réponse (ERE) situé dans le promoteur de gènes dits cibles. La stimulation de la transcription de ces gènes par l'ER α ne pourra avoir lieu que par la capacité du récepteur à recruter une série de protéines désignées sous le nom de coactivateurs. Ainsi, le changement conformationnel induit par la fixation de l'agoniste permet le repositionnement de l'hélice α -12 du domaine de fixation au ligand ayant pour conséquence la fermeture de la cavité contenant le ligand et la création d'une cannelure hydrophobe sur le LBD (Singh *et al.*, 2005). Le domaine d'activation AF-2, qui apparaît comme très mobile, enjambe l'hélice 12 et se stabilise au dessus du ligand dans une position qui lui permet de compléter la surface de reconnaissance des coactivateurs (Savkur *et al.*, 2004).

Les premiers coactivateurs identifiés appartiennent à la famille des protéines p160. Cette famille de protéines aussi appelées coactivateurs des récepteurs stéroïdiens (Steroid Receptor Coactivator, SRCs), est composée de trois membres (Figure 18). SRC-1 a été le premier

coactivateur identifié comme pouvant interagir avec le domaine AF-2 des récepteurs stéroïdiens et favoriser leur activation transcriptionnelle. Le second membre, SRC-2 est aussi appelé GRIP1 ou TIF-2. Enfin, le troisième membre, SRC-3, qui a été découvert simultanément par plusieurs équipes porte également les noms de p/CIP, ACTR, RAC3, TRAM-1 et AIB1. Les trois membres présentent environ 50 à 55% d'identité de séquence. La région la plus conservée est la région N-terminale qui contient un domaine hélice boucle hélice et un domaine de dimérisation PAS. Chez tous les SRC, au centre, on trouve un site d'interaction avec les récepteurs nucléaires (Nuclear receptor Interaction Domain, NID). Ce site correspond à trois motifs conservés "LXXLL" (où L est une leucine et X n'importe quel acide aminé), qui reconnaissent spécifiquement le site AF-2 au niveau de l'emplacement hydrophobe du LBD. Un variant d'épissage de SRC-1, appelé SRC-1a, contient un quatrième motif LXXLL à l'extrémité C-terminale. Les SRCs présentent également 2 domaines d'activation de la transcription (AD-1 et AD-2). AD-1 est responsable de l'interaction des SRCs avec les coactivateurs généraux CBP (CREB Binding Protein), p300 et p/CAF, qui possèdent une activité histone acétylase transférase. AD-2 interagit avec la méthyltransférase CARM1. Un second NID, appelé NIDAF-1, qui interagit avec la fonction d'activation AF-1 de l'ER α , a été identifié entre les domaines AD-1 et AD-2. Par ailleurs, SRC-1 et SRC-3 possèdent une activité histone acétylase transférase propre (Edwards *et al.*, 2000). Les SRCs agissent donc comme des coactivateurs en remodelant la chromatine et en recrutant d'autres coactivateurs. Les résultats des études mécanistiques ont permis de clarifier, étape par étape, le processus d'activation de la transcription engendré par l'ER α . Le récepteur activé par la fixation du ligand recrute, au niveau de la chromatine, un complexe préexistant, formé de SRC associé à p300, pCAF (p300/CBP associated factor) et CARM1 (Coactivator - associated arginine methyltransferase 1). Cela a pour conséquence l'acétylation et la méthylation des histones au niveau de sites spécifiques. Ensuite, le complexe "remodeleur de chromatine" SWI/SNF est recruté par interaction directe ou indirecte avec CBP/p300 et ce complexe provoque des acétylations d'histones entraînant l'ouverture de la chromatine. Enfin, un complexe multiprotéique DRIP/TRAP est recruté soit par le complexe SRC/CBP/p300, soit directement par l'ER α . Ce complexe interagit directement avec la machinerie transcriptionnelle entraînant l'initiation de la transcription du gène (Shang *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2005). L'activation transcriptionnelle en présence d'un agoniste est donc principalement médiée par la fonction d'activation AF-2 de l'ER α . La fonction d'activation AF-1 contribue à l'activité d'AF-2 et agit en synergie pour augmenter l'activité transcriptionnelle de l'ER α . Peut

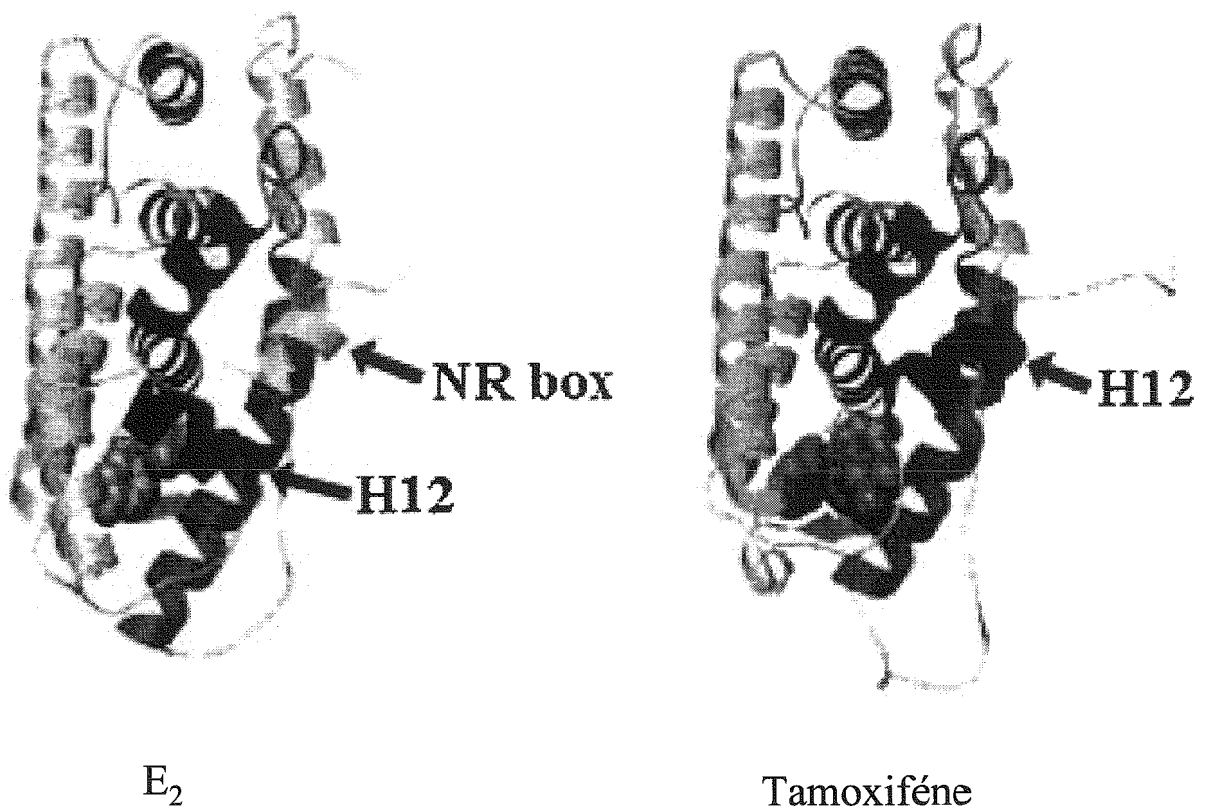


Figure 19 : Structure du site de reconnaissance des coactivateurs p160 du domaine AF-2. Lorsque le ligand est un agoniste, ici l'E₂, le complexe formé par le domaine de fixation au ligand et l'E₂ permet la liaison d'une séquence de 13 acides aminés correspondant à la boîte de liaison au récepteur nucléaire (NR box) du coactivateur SRC-2. Lorsque le récepteur lie un antioestrogène, ici le tamoxifène, l'hélice 12 tourne et se lie dans la partie où se fixe habituellement le coactivateur. L'hélice 12 (H12) qui contient le noyau AF-2 et la boîte de liaison aux récepteurs nucléaires (NR box) sont indiqués. (d'après Edwards et al., 2000)

d'informations sont disponibles quant à son mode d'action. De nombreux facteurs sont capables de se lier à AF-1 mais leur importance et la mécanistique d'action sont beaucoup moins bien connus que pour AF-2. Il est aussi intéressant de noter que la phosphorylation de certaines sérines, notamment la sérine 118, augmente son activité. De nombreuses kinases, incluant Erk1/2, Rsk1/2, Cdk2, Cdk7 et Akt, sont capables de phosphoryler une ou plusieurs sérines du domaine AF-1.

A l'inverse, la fixation d'un antagoniste sur l'ER α va induire une inhibition de la transcription qui va dépendre du composé, et surtout du changement conformationnel qu'il va induire. Certains antagonistes induisent un changement conformationnel dans la partie N-terminale de l'ER α empêchant la formation d'un AF-2 actif. Les études cristallographiques de LBD complexés avec des antiœstrogènes comme le tamoxifène ou le raloxifène montrent que le noyau formé par AF-2 et l'hélice α -12 est positionné différemment par rapport à celui observé lorsque le LBD est complexé avec un agoniste (Figure 19). En effet, l'hélice 12 tourne de près de 130° pour occuper la cannelure hydrophobe à la surface du LBD qui forme le site de fixation des coactivateurs (Shiau *et al.*, 1998). La surface hydrophobe sur l'hélice 12 qui mime le motif "LXXLL" contenu dans les coactivateurs forme une interaction intramoléculaire avec le domaine AF-2 empêchant ainsi la fixation des coactivateurs de type p160. Cependant, l'incapacité de l'ER α à recruter les coactivateurs de type p160 n'explique qu'en partie l'activité antagoniste de ces composés. En effet, de nombreuses études montrent que certains antagonistes de l'ER α favorisent également l'association du récepteur avec des corépresseurs appelés NCOR et SMRT. Ces corépresseurs présentent une activité histone déacétylase qui influe sur la structure de la chromatine, empêchant l'accès à l'ADN des facteurs généraux de la transcription (Edwards *et al.*, 2000). Ces antagonistes peuvent néanmoins, selon les cellules ou les tissus, avoir une activité antagoniste partielle d'où leur nom de modulateurs sélectifs de l'ER (Selective ER Modulators, SERMs). En effet, ces antagonistes bloquent le domaine AF-2 mais ils n'affectent pas le domaine AF-1 qui peut alors selon les cellules et les promoteurs, induire à lui seul la transcription du gène cible.

Certains antagonistes qualifiés de dérégulateurs sélectifs de l'ER (Selective ER Downregulators, SERDs) ou antagonistes purs tel que l'ICI 182,780 (Fulvestrant), induisent un changement conformationnel qui va empêcher la dimérisation de l'ER. Sa fixation à l'ADN est donc impossible quelques soient les tissus ou cellules (Singh *et al.*, 2005; Deroo *et al.*, 2006).

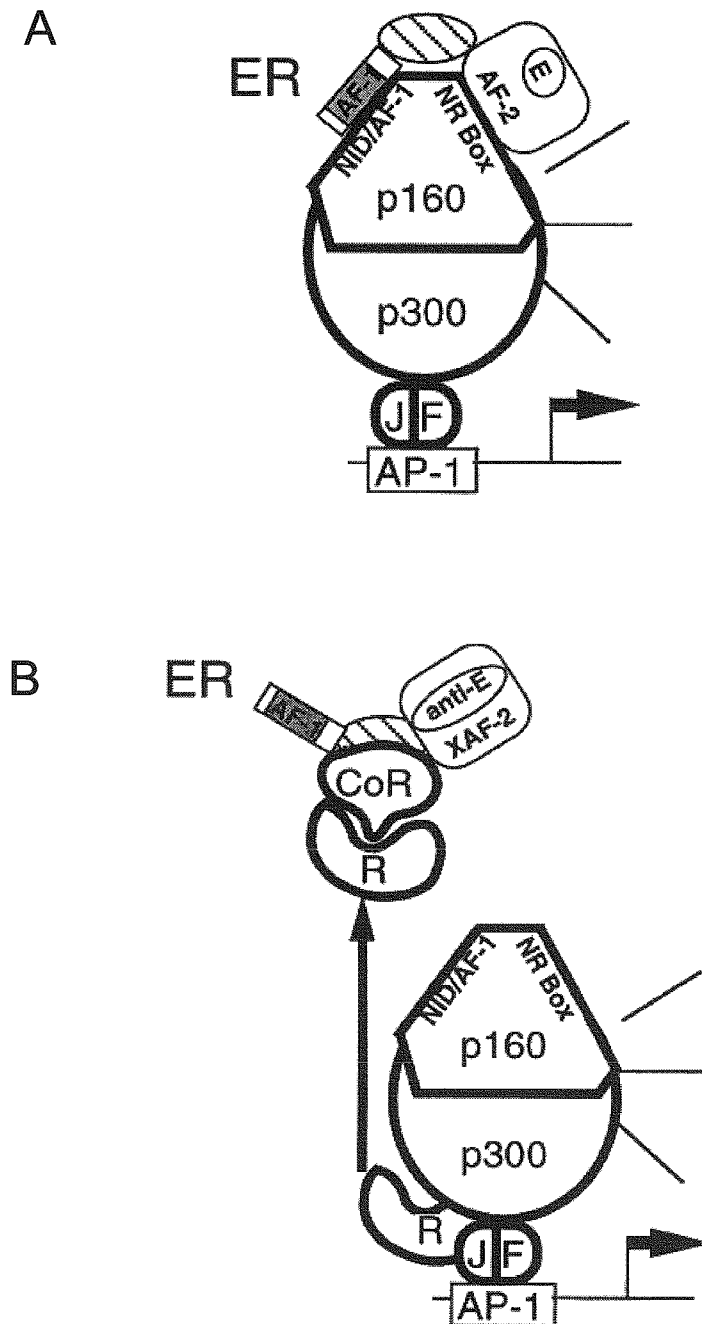


Figure 20 : Mécanismes d'action de l'ERα au niveau des sites AP-1. **A,** En présence d'un agoniste, l'ERα utilise ses deux fonctions d'activation (AF-1 et AF-2) pour reconnaître les séquences NIDAF-1 et NR box des p160s présentes sur le complexe jun/fos (J/F). Dans cette position, l'ERα peut alors activer la transcription. **B,** En présence d'un antagoniste, le domaine AF-2 est inactif et l'ERα se lie à un corépresseur des récepteurs nucléaires (CoR) et à des répresseurs non spécifiques (R) séquestrés au niveau du complexe AP-1. L'activité d'AP-1 est ainsi augmentée par l'ERα qui ne participe pas directement au complexe AP-1. (d'après Webb et al., 1999)

2.3.3.2. Voie d'activation de la transcription ERE indépendante

De nombreuses études ont montré que l'ER α pouvait réguler la transcription de gènes sans se fixer directement à l'ADN. Le récepteur dans la plupart des cas est lié, via des interactions protéine/protéine, avec des facteurs de transcription fixés à l'ADN. L'ER α peut ainsi réguler la transcription de nombreux gènes qui ne contiennent pas d'EREs. Ce mécanisme est d'ailleurs utilisé par d'autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires.

L'expression de nombreux gènes est activée via une interaction entre l'ER α et les protéines Jun et Fos au niveau de sites de fixation AP-1. La transcription de gènes dépendants d'AP-1 peut aussi être réprimée par l'ER α . C'est le cas notamment du gène de la choline acétylase transférase. L'étude du mécanisme d'action de l'ER α au niveau des sites AP-1, montre que la fixation des protéines Jun et Fos est nécessaire. Par ailleurs, l'E₂ mais également le tamoxifène et d'autres SERMs sont capables d'activer les gènes cibles d'AP-1. Ce résultat a permis de mettre en évidence deux mécanismes distincts qui dépendent du type de ligand. En présence d'E₂, les fonctions d'activation AF-1 et AF-2 de l'ER α , sont nécessaires à l'activation d'AP-1 suggérant que les coactivateurs de l'ER α interviennent dans cette interaction. Par ailleurs, l'hétérodimère Jun/Fos stimule la transcription de ses gènes cibles comme l'ER α : en recrutant le complexe CBP/p300 ainsi que des protéines coactivatrices de la famille des p160 (SRCs). Cependant, Jun/Fos entre d'abord en contact avec CBP/p300 puis permet la fixation des coactivateurs p160 alors que l'ER α lie les coactivateurs p160 avant le complexe CBP/p300. Il semble donc qu'en présence d'E₂, le complexe ER α /p160 vienne se fixer au complexe Jun/Fos/CBP/p300 présent au niveau du site AP-1 (Figure 20A). Une étude plus récente montre que l'ER α peut se lier directement à la protéine Jun et que cette interaction est nécessaire à la stabilité du complexe (Teyssier *et al.*, 2001). En présence de SERMs l'activation d'AP-1 a également lieu et cela même en l'absence des fonctions d'activation de l'ER α , suggérant l'utilisation d'un mécanisme différent. Contrairement à l'activation par l'E₂, l'ER α activé par les SERMs n'interagit pas directement avec le complexe AP-1. La fixation de SERMs au niveau du récepteur induit un changement conformationnel favorisant non pas le recrutement de coactivateurs, mais plutôt de corépresseurs comme NCOR, capable de lier d'autres répresseurs ayant une activité histone déacetylase. Ces répresseurs sont également responsables de la régulation de l'activité transcriptionnelle de Jun/Fos et leur capture par l'ER α , alors lié au SERMs, permettrait de déréprimer le complexe Jun/Fos. Son activité

transcriptionnelle serait alors augmentée (Figure 20B) (Webb *et al.*, 1999; Kushner *et al.*, 2000).

Des interactions entre l'ER α et le facteur de transcription Sp1 ont également été observées. Elles permettent de réguler l'expression de gènes contenant des séquences promotrices riches en GC. Comme pour AP-1, l'E₂ et le tamoxifène sont capables d'induire cette interaction. Par ailleurs, la partie C-terminale du domaine de fixation à l'ADN de Sp1 est nécessaire (Safe *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005).

D'autres interactions ont été décrites. Ainsi, L'ER α peut interagir avec deux autres facteurs de transcription : le facteur nucléaire κ B (Nuclear Factor κ B, NF- κ B) et C/EBP β . Via cette interaction, il peut notamment réprimer l'expression du gène de l'interleukine-6 (Stein *et al.*, 1995). Par ailleurs, il est suggéré que la répression de l'érythropoïèse par l'E₂ implique une interaction de l'ER α avec le facteur de transcription GATA-1 (Blobel *et al.*, 1995). Enfin, l'ER α peut réguler des gènes comme le gène de la β -caséine, qui contient un site de fixation du facteur de transcription STAT-5, mais les résultats concernant l'interaction entre l'ER α et ce facteur sont controversés (Faulds *et al.*, 2001).

2.3.3.3. Voie d'activation de la transcription dite "non génomique"

De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence une action non génomique des œstrogènes. Certains effets sont trop rapides pour être expliqués par l'activation de la synthèse d'ARN et de protéines. L'action non génomique est une propriété commune des hormones stéroïdes. Elle est fréquemment associée à l'activation de diverses cascades de protéines kinases. Ainsi, l'action non génomique de l'E₂ inclue la mobilisation du calcium intracellulaire, la stimulation de l'activité de l'adénylate cyclase et la production d'AMPc (Aronica *et al.*, 1994). Une des plus importantes voies de signalisation activée par l'action non génomique de l'ER α est celle des MAPKs qui a par ailleurs été intensivement étudiée dans de nombreux types cellulaires incluant les cellules cancéreuses mammaires (Migliaccio *et al.*, 1996). Dans ces mêmes cellules, l'E₂ est également capable d'activer la voie de signalisation de la phosphoinositol 3-kinase (Castoria *et al.*, 2001).

Les auteurs indiquent, pour la plupart, que l'action non génomique des œstrogènes est médiée par l'ER α présent dans la membrane plasmique des cellules. Le domaine de fixation au ligand semble suffisant pour entraîner cette action non génomique. Cependant, d'autres domaines fonctionnels du récepteur pourraient contribuer à l'importance de cette action par des

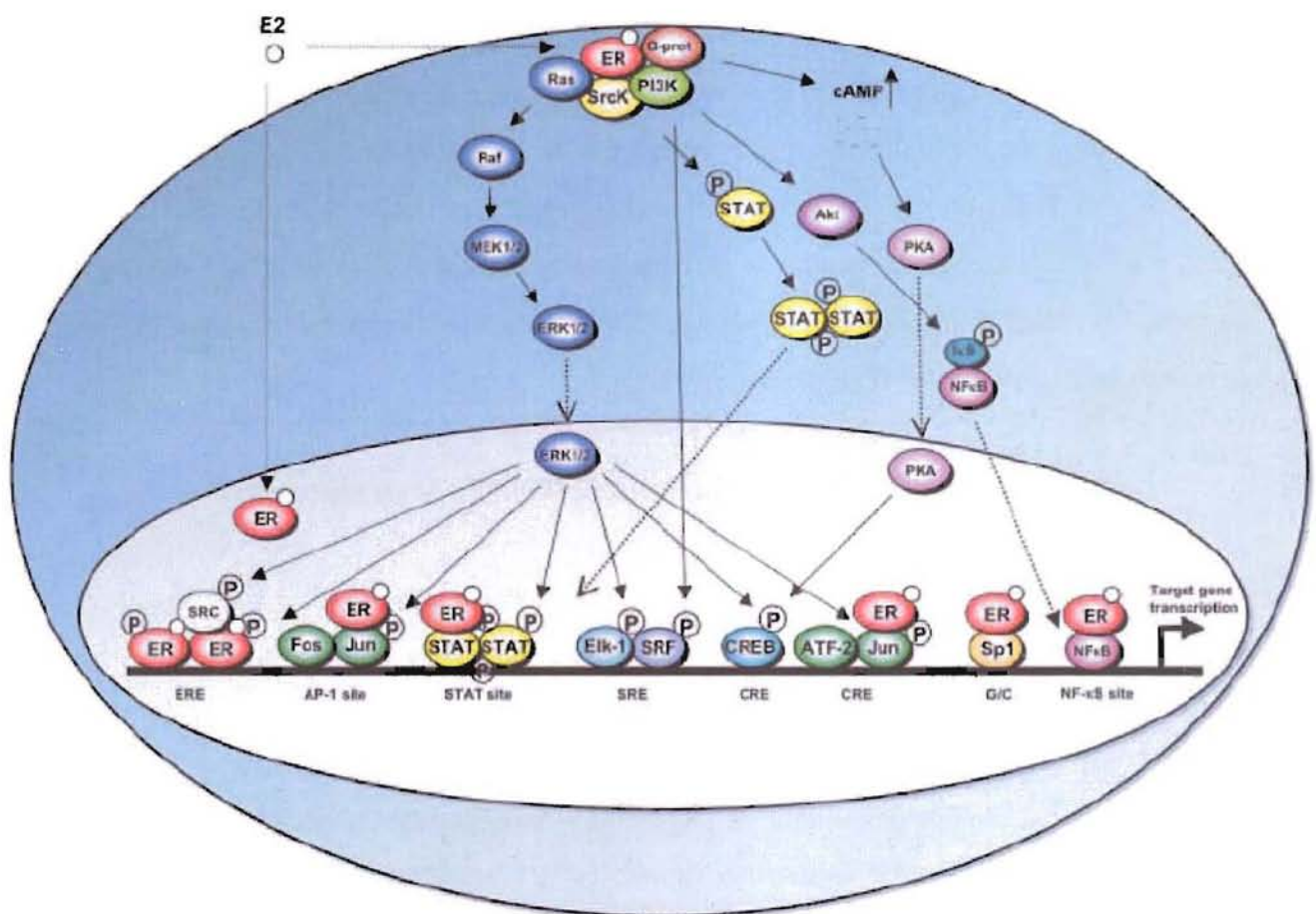


Figure 21 : Schéma résumant l'ensemble des éléments de réponse pouvant être activés par l'ER α . L'action de l'ER α sur la transcription des gènes contenant une ou plusieurs de ces séquences peut se faire soit par interaction directe du récepteur sur l'élément de réponse (ERE), soit par interaction protéine protéine avec d'autres facteurs de transcription (AP-1, STAT, CRE, Sp1, NF κ B), soit par l'activation de voie de signalisation cellulaire (SRE) via l'ER α membranaire. (d'après Björnström et al., 2005)

interactions de type protéine-protéine. Il est probable que l'interaction de l'ER α avec diverses molécules de structure et de signalisation augmente son activité. L'ER α au niveau de la membrane est en effet associé à une protéine de structure, la cavéoline-1, et à une variété de molécules de signalisation telles que les protéines G, les kinases Src et Ras, la sous-unité régulatrice p85 α de la PI3-kinase et la protéine Shc. En outre, la protéine de structure MNAR favorise également l'interaction de l'ER α , activé par l'E₂, avec la kinase Src, entraînant une augmentation de l'activité kinase de Src et l'activation de la voie de signalisation des MAPKs (Björnström et Sjöberg, 2005). L'ER α membranaire active également les récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase dans divers types cellulaires dont les cellules cancéreuses mammaires. En effet, l'ER α activé par l'E₂ interagit directement avec le récepteur à l'IGF-I, entraînant l'activation de ce récepteur et par conséquent de la voie de signalisation des MAPKs. L'ER α activé par l'E₂ interagit également directement avec ErbB2 et avec le récepteur à l'EGF via l'activation de protéines G, de la kinase Src et de métalloprotéases, ce qui favorise l'augmentation de l'activité des MAPKs et de la protéine kinase B (Akt) (Björnström et Sjöberg, 2005). Toutes ces études suggèrent que les mécanismes moléculaires expliquant l'action non génomique des œstrogènes sont spécifiques du type cellulaire. Les réponses variables observées pourraient dépendre de nombreuses conditions et, notamment, de la présence ou non de l'ensemble des signaux de transduction et de leurs cibles potentielles dans les cellules.

Les voies de transduction permettent de relier l'action non génomique des œstrogènes à la réponse génomique. En effet, le fonctionnement de nombreux facteurs de transcription est régulé par des phosphorylations médiées par des protéines kinases. Ces facteurs de transcription peuvent ainsi être la cible de l'action non génomique des œstrogènes. Ce type de signalisation non génomique/génomique est un mécanisme distinct par lequel l'ER α peut réguler la transcription de nombreux gènes contenant des éléments de réponse divers (Figure 21). Ce mécanisme fonctionne en plus de l'action génomique ERE-indépendante décrite précédemment qui implique une interaction protéine protéine directe entre l'ER α et les facteurs de transcription au niveau du noyau.

2.3.3.4. Voie d'activation de la transcription ligand-indépendante

L'ER α comme la plupart des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires est une phosphoprotéine. Par conséquent, la possibilité que la fonction de ces récepteurs soit

régulée par des phosphorylations, donc par des voies de transduction cellulaire, n'est pas étonnante. L'hypothèse d'une activation des récepteurs nucléaires en absence d'hormones par modulation des voies de transduction était contraire à l'idée, longtemps admise, que le ligand joue un rôle central et irremplaçable dans le fonctionnement de ces récepteurs. Pourtant, en 1990, l'activation ligand-indépendante d'un récepteur nucléaire, le récepteur à la progestérone de poulet, a été démontrée. Ce phénomène a été ensuite observé sur d'autres récepteurs dont l'ER α . Actuellement, la liste des agents ou signaux extracellulaires capables d'activer l'ER α en absence d'hormone est importante. Elle inclue : la dopamine, l'EGF, l'héréguline, la GnRH, le TGF α , l'insuline, l'IGF-1, l'AMPc, l'acide okadaïque et le vanadate (Bunone *et al.*, 1996). Ces molécules sont par ailleurs connues pour être responsables de l'activation de certaines voies de transduction cellulaire telles que la voie PI3K/Akt, la voie des MAPK, la voie AMPc/PKA ou encore la voie de la Protéine Kinase C (PKC). Ces voies correspondent à des cascades de réactions de phosphorylation dont la dernière étape consiste à activer un facteur de transcription par phosphorylation de certains de ses résidus. Les sites de phosphorylation de l'ER α sont nombreux. Néanmoins les études révèlent que dans la majorité des cas, seules les sérines sont phosphorylées (Le Goff *et al.*, 1994). Ces résidus sont situés majoritairement dans la partie N-terminale de l'ER α , notamment au niveau de la fonction d'activation AF-1 : Sérine 104, 106, 118, 154 et 167. On retrouve un résidu Sérine au niveau du domaine de dimérisation en position 236 et deux autres au niveau du domaine AF-2a en positions 294 et 305.

- **Activation ligand indépendante par la voie PI3K/Akt**

Les études concernant l'effet de l'EGF sur les cellules cancéreuses mammaires ont permis de montrer qu'il était capable de réguler l'expression mais également l'activité de l'ER α . Cet effet est interrompu par des inhibiteurs sélectifs de la voie PI3K/Akt (Stoica *et al.*, 2000). Une des cibles de la PI3K est la protéine Sérine/Thréonine kinase Akt également appelée protéine kinase B. Il a été montré que cette enzyme pouvait phosphoryler les sérines contenues dans le domaine AF-1 de l'ER α , à savoir les résidus S104, S106, S118 et S167 (Martin *et al.*, 2000). Le résidu S167 correspond d'ailleurs à un site consensus de phosphorylation d'Akt. Des études récentes montrent que ce site est essentiel pour l'activation ligand-indépendante de l'ER α par la voie PI3K puisque sa mutation empêche l'activation du récepteur par Akt (Campbell *et al.*, 2001).

- **Activation ligand-indépendante par la Protéine Kinase C**

La protéine Kinase C n'est pas une seule entité mais comprend 11 isoformes et a été identifiée comme activatrice de l'ER α . Ainsi, l'activation de la PKC par les esters de phorbol (TPA) entraîne la phosphorylation de la Sérine 118 située dans le domaine AF-1 de l'ER α . Des études réalisées avec l'ER α murin montrent que l'activité du récepteur est stimulée par la PKC γ , une protéine kinase dépendante du calcium, mais pas par la PKC α ou ϵ . Cette même étude montre que cet effet requiert la Sérine 122 de l'ER α murin qui est l'analogue de la Sérine 118 de l'ER α humain (Driggers *et al.*, 2002).

- **Activation ligand-indépendante par la voie des MAPK**

Il s'agit de la voie d'activation ligand-indépendante la mieux étudiée. Ce sont les études visant à étudier le lien entre l'EGF et l'activation ligand-indépendante de l'ER α qui ont permis de mettre en évidence l'intervention des MAPKs. En effet, des études réalisées en utilisant des dominants négatifs de Ras et des MAP kinase kinases montrent que ces protéines sont essentielles pour l'activation ligand-indépendante de l'ER α par l'EGF. Ces résultats sont en accord avec ceux montrant qu'une surexpression de Ras peut mimer les effets induits par l'EGF. Par ailleurs, l'activation ligand-indépendante de l'ER α par les MAPKs est inhibée lorsque le récepteur est amputé de sa fonction d'activation AF-1. Des analyses plus approfondies montrent qu'une mutation de la Sérine 118 en Alanine abolit cette activation. En revanche, sa substitution en acide glutamique, acide aminé qui mime un acide aminé phosphorylé, permet une activation de l'ER α médiée par l'EGF mais pas une activation constitutive du récepteur. Cela suggère que la phosphorylation de la Sérine 118 est nécessaire mais insuffisante pour induire à elle seule l'activation de l'ER α . La MAPkinase impliquée est la protéine Erk1/2 (Kato *et al.*, 1995; Bunone *et al.*, 1996).

- **Activation ligand-indépendante par la voie AMPc/PKA**

En 1991, Aronica et al montraient que des cellules utérines de ratte immatures traitées avec des agents augmentant le taux d'AMPc intracellulaire, tels que la toxine cholérique, l'isobutylméthylxanthine et le 8-Br-cAMP, présentaient un taux de récepteurs à la progestérone supérieur à celui des cellules témoins. Cette augmentation était par ailleurs

abolie par un co-traitement avec un antiœstrogène ou un inhibiteur de protéines kinases, suggérant que la régulation du taux de PR impliquait l'ER et une ou plusieurs voies de phosphorylation (Aronica *et al.*, 1991). Cette même équipe montra quelques années plus tard que ces mêmes agents augmentaient significativement le taux d'ER α phosphorylés dans ces cellules (Aronica *et al.*, 1993). L'activation ligand indépendante de l'ER α par l'AMPc a par la suite été clairement démontrée mais le mécanisme précis est encore mal connu. L'effet de l'AMPc sur l'ER α est en réalité médié par une protéine kinase activée par l'AMPc, la protéine kinase A (PKA). L'inhibition spécifique de cette kinase bloque l'activation de la transcription des gènes cibles de l'ER induite par l'AMPc (El-tanani *et al.*, 1997; Schreihöfer *et al.*, 2001). Cette kinase, contrairement aux MAPKs, semble agir sur le domaine AF-2 puisque la délétion de ce domaine abolit l'effet de l'AMPc, contrairement à la délétion du domaine AF-1 (El-tanani *et al.*, 1997). Ce résultat est en accord avec celui d'une équipe montrant que la mutation de la sérine 118, impliquée notamment dans l'activation ligand-indépendante de l'ER α par les MAPKs n'a aucun effet sur l'activation médiée par l'AMPc. Par ailleurs, la mise en évidence d'une sérine en position 305 dans le domaine AF-2a, au sein d'une séquence consensus reconnue par la PKA, renforce l'idée que cette kinase agit au niveau de ce domaine (Le Goff *et al.*, 1994). Il existe une autre sérine au sein d'une séquence consensus de la PKA en position 236 dans la région charnière. Néanmoins, sa phosphorylation par la PKA empêche la dimérisation de l'ER α et sa fixation à l'ADN suggérant que cette enzyme pourrait également réguler négativement l'activité de l'ER α (Chen *et al.* 1999). L'activation de l'ER α par la PKA est cellule spécifique et dépend de la structure du promoteur (Fujimoto *et al.*, 1994; Ince *et al.*, 1994). Ceci suggère que la phosphorylation de l'ER n'est pas suffisante pour expliquer son activation. D'autres facteurs contribueraient à cette activation. Ainsi, il a été montré que dans les cellules cancéreuses mammaires, l'AMPc via la PKA favorisait l'apparition de complexes cycline D1-ER α faisant de la cycline D1 un candidat potentiel (Lamb *et al.*, 2000). D'autres études montrent que la protéine CREB, un facteur de transcription activé par la PKA, est capable d'augmenter l'activité transcriptionnelle de l'ER α (Lazennec *et al.*, 2001).

2.3.4. Gènes cibles de l'ER α et conséquences de son expression dans la tumeur

Les gènes cibles de l'ER α sont, par définition, les gènes dont l'ER α régule significativement la transcription. Les différentes voies d'activation de l'ER α rendent complexe l'étude de ces gènes. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'ER α peut

réguler non seulement la transcription de gènes contenant dans leur région promotrice des EREs (voie classique), mais également la transcription de gènes régulés par d'autres facteurs de transcription, soit par interaction protéine/protéine dans le noyau (voie ERE-indépendante), soit par activation d'une voie de signalisation au niveau de la membrane plasmique (voie non génomique). La plupart des promoteurs des gènes humains sont souvent régulés par un nombre important de facteurs de transcription qui se fixent sur des sites de régulation distincts. De ce fait, il est possible qu'une convergence entre une action génomique et non génomique au niveau d'éléments de réponse multiples entraîne un contrôle bien précis de la transcription des gènes par l'ER α . L'étude de certains gènes semble confirmer cette hypothèse. Nous pouvons citer en exemple le gène de la cycline D1 décrit par de nombreuses études comme un gène cible de l'ER α . Le promoteur de ce gène est complexe, il contient des sites pour de nombreux facteurs de transcription mais aucun ERE. L'activation de ce gène par l'E₂ résulte d'une interaction de l'ER α avec le facteur de transcription Sp1 au niveau de séquences promotrices riches en GC et avec l'hétérodimère c-Jun/ATF-2 au niveau d'un CRE. Par ailleurs, il existe dans le promoteur du gène de la cycline D1 des sites de fixation pour STAT5 et NF-kB avec lesquels l'ER α pourrait interagir notamment par la voie génomique et non génomique. D'autres gènes décrits comme cibles de l'ER contiennent dans leur séquence promotrice des sites de fixation directs de l'ER (ERE) et des sites au niveau desquels l'ER ne s'associe pas directement. Un de ses gènes code le VEGF. Son promoteur contient non seulement un ERE légèrement différent du consensus, mais qui fixe spécifiquement l'ER α activé par l'E₂ mais aussi une séquence riche en GC qui fixe des complexes ER α /Sp1 (Björnström *et al.*, 2005). C'est le cas également du gène codant la protéine pS2 dont le promoteur contient un ERE consensus en aval d'un site AP-1 (Ribieras *et al.*, 1998). En outre, il existe un certain nombre de gènes contenant seulement un demi-site ERE situé à proximité d'un site de fixation Sp1. L'activation transcriptionnelle par l'E₂ est alors optimale lorsque les 2 sites sont utilisés. C'est le cas notamment des gènes codant récepteur à l'acide rétinoïque α (RAR α), le TGF α et le récepteur à la progestérone (O'loné *et al.*, 2004; Björnström *et al.*, 2005).

Ces dernières années, les techniques de "Microarray" ont facilité l'étude des gènes cibles de l'ER α . En effet, il est désormais possible d'étudier la transcription de milliers de gènes dans des cellules cancéreuses mammaires traitées à l'E₂. Sur plus de 12000 gènes étudiés, environ 400 sont régulés significativement par l'E₂. La majorité de ces gènes, soit environ 70 %, sont régulés négativement par l'ER α . L'analyse de l'expression de ces gènes au cours du temps

montre que certains gènes sont régulés très rapidement et sont donc probablement des gènes de réponse primaire. D'autres sont régulés plus tardivement et constituent probablement une réponse secondaire. Beaucoup de ces gènes sont associés à des voies de signalisation bien spécifiques et correspondent à des facteurs de régulation des récepteurs. Globalement, dans les cellules cancéreuses mammaires ER-positives, l'E₂ entraîne une activation transcriptionnelle des stimulateurs de la prolifération et une répression des régulateurs négatifs de la prolifération. Ces résultats expliquent la stimulation de la prolifération et la suppression de l'apoptose observée sur les cellules cancéreuses mammaires ER-positives traitées aux œstrogènes. Ainsi, l'E₂ augmente l'expression de gènes comme celui de la cycline D1, de la cycline A2, de cdc2, cdc20 et de Bub impliqués dans la progression du cycle cellulaire. L'E₂ stimule également la transcription de gènes comme RFC4 et CDC6, tous deux impliqués dans la synthèse d'ADN. Le gène de la survivine (BIRC5), qui code un inhibiteur de l'apoptose, est également surexprimé en présence d'E₂. A l'inverse, de nombreux facteurs impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire voient leur expression diminuée par l'ER. C'est le cas des gènes *BTG-1*, *BTG-2*, de la cycline G2 ainsi que des gènes codant des cytokines et des facteurs de croissance tels que les membres de la superfamille du TGFβ. L'E₂ entraîne également la diminution de l'expression de certains répresseurs transcriptionnels. On peut citer notamment le facteur de transcription JunB, membre de la famille des facteurs de transcription AP-1 et qui contrairement à c-fos, par association avec c-jun régule négativement la transcription de gènes contenant des sites AP-1. Enfin, l'ER stimule la transcription de gènes contribuant à l'amplification des processus induits par l'E₂. En effet, l'ER stimule la transcription des prostaglandines synthase (Cox-2) et de certains récepteurs des prostaglandines, notamment le récepteur EP3. Ainsi, les prostaglandines synthétisées par ces enzymes peuvent, via leurs récepteurs, stimuler l'activité aromatasase dans les cellules cancéreuses et augmenter la concentration locale en œstrogènes (Frasor *et al.*, 2003; O'loné *et al.*, 2004).

SCD UHP NANCY 1
Bibliothèque des Sciences
Rue du Jardin Botanique - CS 20148
54601 VILLERS LES NANCY CEDEX

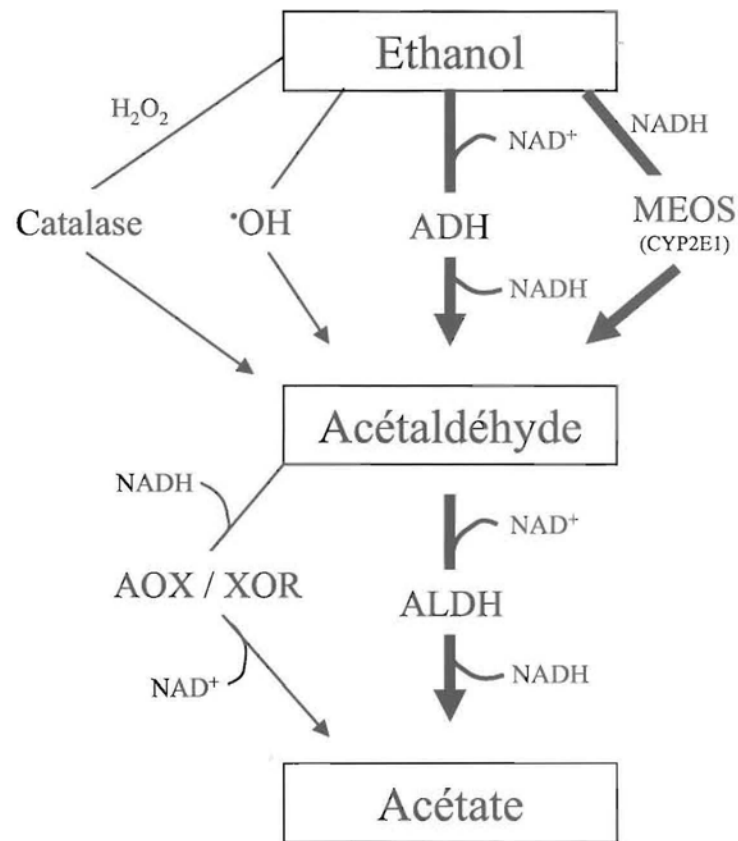


Figure 22 : Schéma résumant le métabolisme cellulaire de l'éthanol. ADH : Alcool déshydrogénase; ALDH : aldéhyde déshydrogénase; MEOS : voie microsomale; CYP cytochrome P450; AOX : aldéhyde oxydase; XOR : xanthine oxydo-réductase.

3. ALCOOLS ET CANCERS MAMMAIRES

3.1. L'éthanol

3.1.1. Propriétés physico-chimiques

L'éthanol appelé également alcool éthylique est un liquide mobile, incolore, volatil et hygroscopique. L'éthanol est miscible à l'eau, le mélange se faisant avec dégagement de chaleur et contraction. Il donne avec l'eau un azéotrope contenant 4,4 % d'eau, dont le point d'ébullition (78,2°C) n'est que très légèrement inférieur à celui de l'alcool pur. L'éthanol est également miscible à d'autres alcools, à l'oxyde de diéthyle et à la plupart des solvants organiques. En outre, c'est un bon solvant des graisses et de nombreuses matières plastiques. Sa masse molaire est de 46,04 g.mol⁻¹. Dans les conditions normales d'emploi, l'éthanol est un produit chimiquement stable. Il possède les propriétés générales des alcools primaires (réactions d'oxydation, de déshydrogénation, de déshydratation et d'estérification). Une oxydation brutale, par exemple lors d'une combustion, le transforme en dioxyde de carbone et eau. L'oxydation ménagée conduit principalement à l'aldéhyde et à l'acide acétique auxquels s'ajoutent selon les conditions, à divers composés tels que l'aldéhyde formique, le glyoxal et des acétals. L'oxydation en aldéhyde acétique est déjà réalisée par l'oxygène de l'air à température ordinaire, mais avec une extrême lenteur.

3.1.2. Métabolisme général

Le métabolisme de l'éthanol fait intervenir deux réactions d'oxydation, la première transformant l'alcool en acétaldéhyde, la seconde l'acétaldéhyde en acétate (Figure 22). L'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde se fait selon trois voies enzymatiques situées chacune dans un compartiment cellulaire différent : la voie de l'alcool déshydrogénase (ADH), la voie du système microsomal d'oxydation de l'éthanol (MEOS) qui fait intervenir le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), la voie de la catalase. Il existe aussi une voie radicalaire. L'acétaldéhyde est ensuite oxydé en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH).

3.1.2.1. Alcool déshydrogénase

L'alcool déshydrogénase est une enzyme cytosolique utilisant le NAD^+ comme cofacteur. C'est une protéine dimérique contenant deux atomes de Zinc par sous-unité. Elle appartient à une famille polygénique dans laquelle on peut identifier, chez l'homme, 7 gènes (ADH1 à ADH7) qui codent pour des sous-unités différentes. Les sous-unités sont associées deux par deux pour former des isoenzymes, réparties dans cinq classes (I à V) selon leurs propriétés électrophorétiques, enzymatiques et leurs similarités de séquence.

Les enzymes de classe I sont principalement présentes dans le foie et les glandes surrénales. On les trouve en plus faible quantité dans le rein, le poumon, le sein et d'autres tissus, exceptés le cerveau et le cœur (Edenberg, 2000). Elles ont une forte affinité pour l'éthanol et jouent, du fait de leur abondance, un rôle très important dans le métabolisme de l'alcool. Les enzymes de classe II ont été détectées dans le foie et le duodénum et contribuent à l'oxydation de l'alcool lorsque sa concentration est élevée. Les enzymes de classe III, relativement abondantes dans tous les tissus étudiés, y compris le cerveau et l'estomac, seraient les ancêtres de l'ADH. Elles pourraient contribuer du fait de leur affinité pour l'éthanol au "métabolisme de premier passage de l'éthanol". Par ailleurs, leur activité est plus faible chez les femmes que chez les hommes (Baraona *et al.* 2001). Les enzymes de classe IV sont présentes dans l'estomac et l'œsophage. Elles ont une faible affinité pour l'éthanol mais une vitesse de métabolisation élevée. Enfin l'ADH de classe V, découverte plus récemment, est encore mal caractérisée.

Il existe un polymorphisme génétique pour les gènes ADH2 et ADH3 qui codent les ADH de classe I. La fréquence des allèles codant les ADH de classe I diffère selon les ethnies. Ainsi, chez les caucasiens, les allèles prédominants sont différents de ceux des asiatiques ou des afro-américains (Bosron et Li, 1986).

L'ADH oxyde l'éthanol en acétaldéhyde selon un mécanisme ping-pong où le NAD^+ doit pénétrer dans son site de fixation avant que l'éthanol n'entre dans le domaine catalytique. Ainsi, la quantité d'ADH est peu limitante dans le métabolisme de l'éthanol. L'oxydation est en réalité contrôlée par la vitesse de réoxydation du NADH produit et par les quantités d'acétaldéhyde générées, ce dernier pouvant être inhibiteur.

3.1.2.2. Cytochrome P4502E1

La deuxième voie d'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde la mieux établie est la voie microsomale ou MEOS qui fait intervenir principalement le CYP2E1. Cette enzyme appartient à la superfamille des cytochromes P450 qui utilise le NADPH et l'oxygène comme cofacteurs. Elle est localisée principalement dans le réticulum endoplasmique. Des radicaux libres sont produits au cours du métabolisme de l'éthanol par cette enzyme, notamment des radicaux hydroxyles qui vont participer à l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde et à la formation de radicaux hydroxyéthyles impliqués dans la toxicité de l'éthanol. Le CYP2E1 possède également la capacité d'oxyder l'acétaldéhyde en acétate et son affinité pour l'acétaldéhyde est environ 1000 fois plus grande que pour l'éthanol (Bell-Parikh et Guengerich, 1999). On trouve cette enzyme principalement au niveau des hépatocytes et en quantité 10 à 100 fois plus faible dans les cellules de Küpfer et les tissus extrahépatiques. A la différence de l'ADH, cette voie est inductible par l'alcool et ceci dans tous les tissus. Il semble que le CYP2E1 soit responsable d'environ 10% du métabolisme de l'éthanol à l'état non induit. Son taux est multiplié par 5 à 10 chez les consommateurs excessifs d'alcool (Lieber, 1999).

3.1.2.3. Voie de la catalase et voie radicalaire

La voie de la catalase, localisée dans les péroxysomes, semble peu importante car la présence d'eau oxygénée nécessaire à la réaction est limitée dans l'organisme.

Une partie de l'éthanol peut également être oxydée par une voie radicalaire résultant de l'attaque de l'éthanol par des radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) générés au cours du métabolisme de l'éthanol. Cette voie n'a été décrite que récemment et son importance est encore mal connue.

3.1.2.4. Aldéhyde déshydrogénase

L'acétaldéhyde est oxydé en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase qui appartient à une superfamille d'enzymes codés par 16 gènes chez l'homme. Comme l'ADH, elle est NAD^+ dépendante. La réaction est thermodynamiquement irréversible dans les conditions physiologiques. Les deux isoenzymes les plus importantes dans le métabolisme de l'éthanol sont l'ALDH1 et l'ALDH2. L'ALDH1 est cytosolique et a une affinité pour l'acétaldéhyde plus faible que l'ALDH2 qui est mitochondriale.

Boisson	Degré	Grammes d'éthanol
1 litre de bière ou de cidre	5 %	40 g
1 demi de bière (250 ml)	7 %	13 g
1 litre de vin	10%	80 g
1 bouteille de vin de 75 cl	10%	60g
1 verre de vin	10 %	8 g
1 verre de vin	12 %	9,6 g
1 bouteille de vin de 75 cl	12%	72g
1 litre d'apéritif	20 %	160 g
1 verre de 50 ml de Porto	20 %	9 g
1 litre d'eau de vie	40 %	320 g
1 verre de 40 ml de whisky	44 %	13,2 g
1 coupe de champagne	10 %	8 g

Tableau 4 : Teneur moyenne, en g d'éthanol, de différentes boissons alcoolisées. La quantité est toujours indiquée en % Vol, qui équivaut aux degrés employés auparavant.

L'ALDH n'est pas limitante dans le métabolisme de l'éthanol. On considère que tout l'acétaldéhyde généré par l'ADH est métabolisé par l'ALDH. La situation change lorsque l'on est en présence d'individus ayant une ALDH2 déficiente.

3.1.3. Pharmacocinétique de l'éthanol

Le devenir de l'éthanol dans l'organisme est essentiel pour la compréhension de ses effets sur l'organisme. Plusieurs étapes sont importantes : l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion.

L'éthanol est absorbé par simple diffusion. Cette diffusion est lente au niveau gastrique et la majeure partie, environ 75 %, est absorbée au niveau de l'intestin grêle. Quand l'alcool est ingéré à jeun, la concentration maximale est atteinte rapidement, environ une demi-heure après l'ingestion (Jones et Jönsson, 1994). L'ingestion de nourriture prolonge le temps de séjour de l'éthanol dans l'estomac modifiant ainsi la cinétique d'absorption de l'éthanol. Une différence sexuelle pourrait exister à ce niveau puisqu'il semble que le même repas entraînerait un allongement du temps de séjour de l'éthanol dans l'estomac plus important chez les femmes que chez les hommes, principalement à cause d'une diminution plus importante des contractions antrales chez la femme (Knight *et al.*, 1997). Les alcools forts (d'une concentration supérieure à 20°) ralentissent également l'absorption.

La distribution de l'éthanol aux organes très vascularisés comme le cerveau, les poumons et le foie est très rapide. Les concentrations dans ces différents organes sont très rapidement équilibrées avec les concentrations sanguines (Jones *et al.*, 1990). L'éthanol est distribué dans l'eau libre sans liaison aux protéines plasmatiques, sa solubilité dans les graisses et les os est négligeable. Son volume de distribution (dose administrée ou absorbée divisée par la concentration plasmatique) est donc celui de l'eau libre, soit environ 41 L pour un homme de 70 kg. Le volume de distribution est en moyenne de 0,5 L/kg chez la femme et de 0,6 L/kg chez l'homme (Jones *et al.* 1992). La concentration sanguine en éthanol peut être calculée selon la formule de Widmark. En effet, cette formule, proposée en 1932 par Widmark et réévaluée en 1994, permet de calculer l'alcoolémie en g/L (Ct) à partir de la quantité d'alcool consommé en grammes (A) : $Ct = (A / (Vd \times p))$. Vd représente le volume de distribution en L/kg, p le poids du sujet en kg. Ainsi, une femme de 60 kg qui consomme 1 verre de vin, soit environ 8 g d'alcool (Tableau 4), aura après quelques minutes (du fait de la distribution rapide de l'éthanol) une alcoolémie d'environ 0,26 g/L de sang (Tableau 4)(Goulle, 2001).

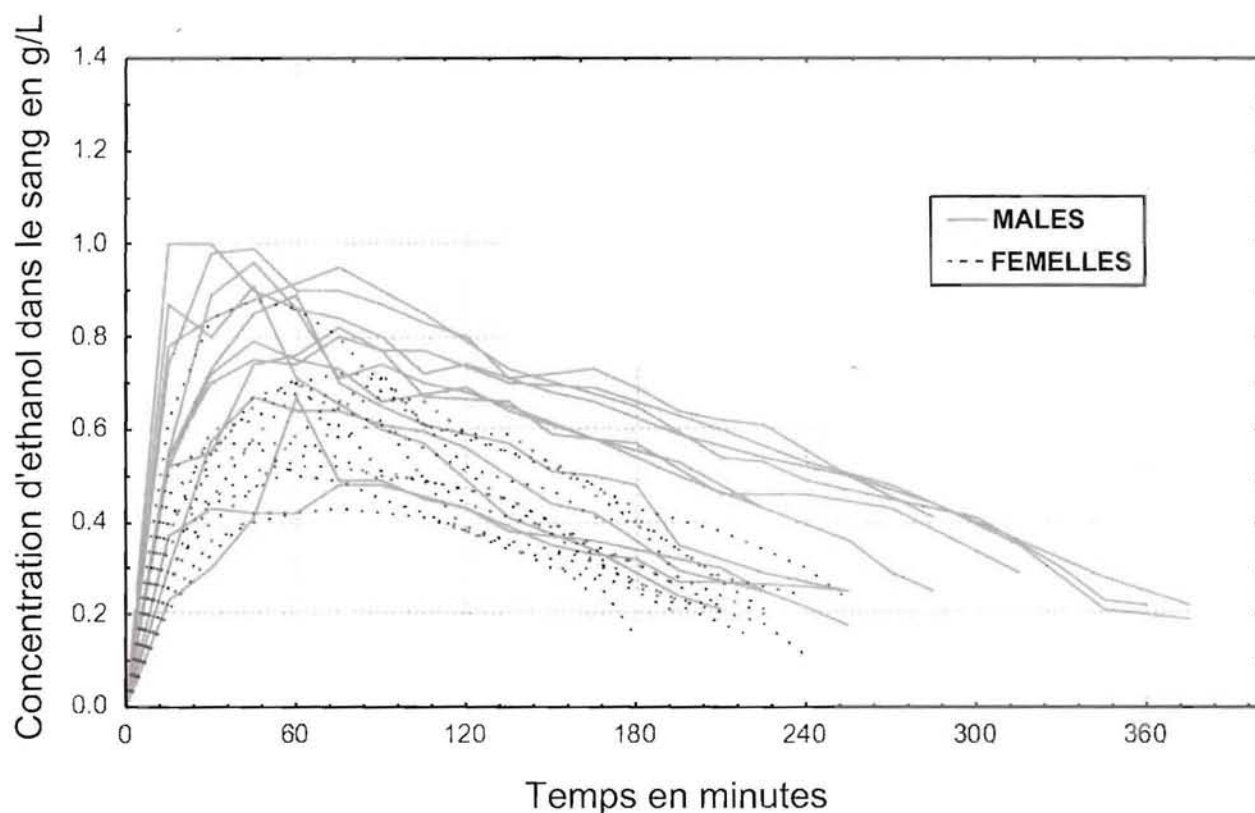


Figure 23 : pharmacocinétique de l'éthanol chez des individus de sexes différents ayant consommé 0,7 g d'alcool par kg de masse corporelle pour les hommes et 0,6 g pour les femmes (d'après Gubala et al., 2003).

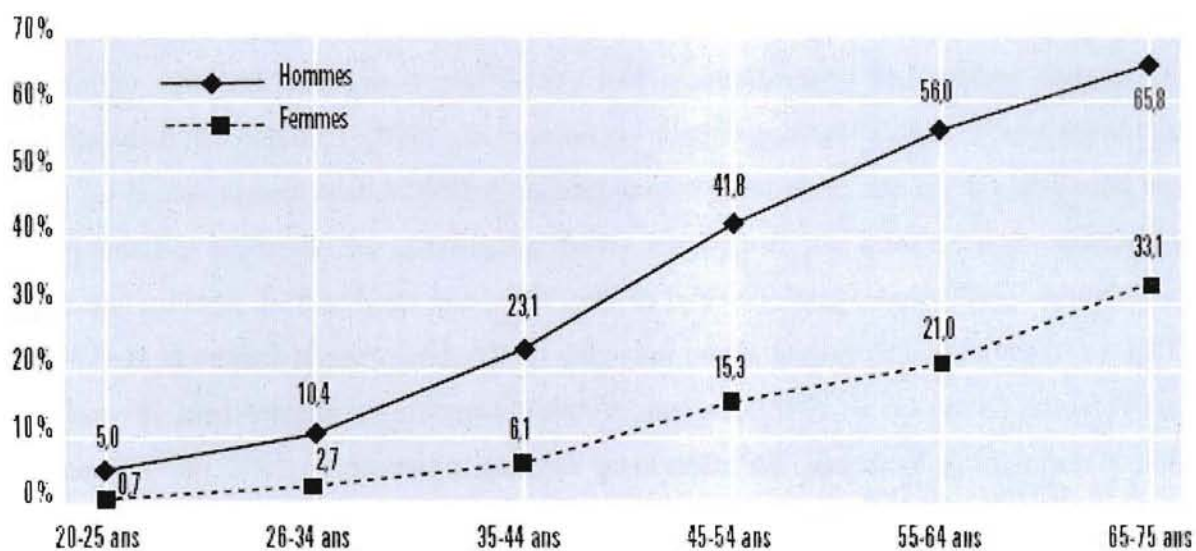


Figure 24 : Consommation quotidienne d'alcool chez les hommes et chez les femmes selon l'âge (en pourcentage parmi les personnes ayant déclaré avoir bu une boisson alcoolisée au cours des 12 mois précédant l'enquête) (Source : Comité Français d'Éducation pour la Santé).

L'élimination de l'éthanol se fait selon deux voies : l'oxydation enzymatique, c'est-à-dire le métabolisme, et l'excrétion sous forme inchangée par l'air expiré, les urines et la sueur. La vitesse d'élimination est, contrairement à celle de distribution, relativement faible (Figure 23). Widmark a estimé cette élimination à seulement 0,16 g/L/h (Jones, 1993).

3.2. Données épidémiologiques

3.2.1. L'alcool et les femmes

Selon l'observatoire français des drogues et toxicomanies, l'alcool est avec le tabac la substance psychoactive la plus consommée en France. On estime à 44,4 millions les expérimentateurs (12-75 ans) de l'alcool en France. Les usagers réguliers sont estimés à 13,1 millions. Même si la consommation d'alcool touche beaucoup plus les hommes que les femmes, un million cinq cent mille femmes seraient dépendantes de l'alcool. Si elles sont moins de 6% à consommer de l'alcool tous les jours avant 44 ans, elles sont 15,3 % entre 45 et 54 ans, 21 % entre 55 et 64 ans et 33,1 % entre 65 et 75 ans (Figure 24). Parmi les consommatrices régulières interrogées, le nombre moyen de verres consommés la veille était de 1,7. Cette moyenne atteint 2 verres chez les femmes âgées de 18 à 25 ans.

3.2.2. Alcool et risque de cancer mammaire

En France, le nombre de décès directement attribuables à l'alcool serait d'environ 7000 par an chez les femmes. Parmi ces 7000 décès, l'alcool est responsable d'un décès par cancer dans environ 1 cas sur 9. D'ailleurs, dans la population âgée de 45 à 64 ans, plus d'un décès par cancer sur 4 est attribuable à l'alcool.

Même si la majorité des cancers liés à l'alcool sont des cancers des voies aérodigestives, de nombreuses études épidémiologiques réalisées durant les 2 dernières décennies ont montré que la consommation d'alcool est associée à une augmentation du risque de cancer du sein chez les femmes qu'elles soient ménopausées ou non (Bowlin *et al.*, 1997). Parmi les femmes américaines, la proportion de cancers du sein attribuables à la consommation d'alcool est d'environ de 2,1% ce qui représente 14000 femmes chaque année. Dans les pays où la consommation d'alcool est plus forte, comme l'Italie, la proportion est de 10% (Dumitrescu *et al.*, 2005). En 2002, une analyse épidémiologique regroupant 53 études, soit 66426 femmes atteintes d'un cancer du sein et 126953 femmes non atteintes, a permis de

quantifier clairement le risque de cancer du sein engendré par la consommation d'alcool. La majorité des études avaient été réalisées dans des pays développés où la consommation d'alcool est plus forte (moyenne de 6 g d'alcool consommé par jour) par rapport aux pays en voie de développement (moyenne de 0,4g d'alcool consommé par jour). L'analyse révèle que l'alcool augmente significativement le risque de développer un cancer du sein d'environ 7,1 % pour 10 g d'alcool consommé de manière journalière (environ 1 verre de vin) (Hamajima *et al.*, 2002). Certaines populations présentent un risque supérieur et c'est le cas notamment des femmes japonaises qui avec une consommation d'alcool supérieure à 15 g par jour, voient le risque de développer un cancer du sein augmenter de 2 fois (Lin *et al.*, 2005). Ce risque accru semble être dû au polymorphisme génétique des enzymes du métabolisme de l'éthanol, des différences existant entre l'ADH2, l'ADH3 et l'ALDH2 des asiatiques et des caucasiens (Bosron et Li, 1986).

Outre l'appartenance ethnique, l'impact de nombreux autres facteurs a été testé sur le risque associé à la consommation d'alcool. Quels que soient la taille, le poids, l'éducation, l'âge de la ménopause, la consommation de tabac, l'utilisation de contraceptifs hormonaux, de traitements hormonaux substitutifs, les antécédents de cancer du sein familiaux, le risque de 7,1% pour 10 g d'alcool consommé quotidiennement ne varie pas ou très peu (Hamajima *et al.*, 2002). Il semble également que ni le type d'alcool consommé (bière, vin, liqueur) ni la période de la vie (âge) durant laquelle la consommation a lieu, n'affectent ce résultat (Terry *et al.*, 2006). En réalité, c'est surtout la quantité d'alcool ingéré de manière quotidienne qui détermine ce risque. Des chercheurs sont allés plus loin en essayant de déterminer le risque de mort par cancer du sein associé à la consommation d'alcool. Il augmente significativement mais modestement (moins de 7 %) à partir d'une consommation d'alcool de 10 à 20 g par jour (Jain *et al.*, 2000).

3.3. Mécanismes d'action de l'éthanol dans la cancérogenèse mammaire

Des études réalisées *in vivo* chez le rat montrent que la consommation d'alcool est capable d'induire la carcinogenèse mammaire (Singletary *et al.*, 1991). Les raisons pour lesquelles la consommation d'alcool favorise l'apparition du cancer du sein sont mal connues bien que de nombreuses hypothèses existent. L'alcool pourrait ainsi favoriser la carcinogenèse mammaire par mutagenèse liée à l'acétaldéhyde, par perturbation du métabolisme et de la réponse aux œstrogènes, via le métabolisme des vitamines et folates ou encore par des

dommages oxydatifs. En plus de la carcinogenèse, l'éthanol pourrait également jouer un rôle dans la tumorigenèse.

3.3.1. Métabolisme de l'éthanol, stress oxydatif et mutagenèse

L'éthanol peut être métabolisé au niveau du sein. Sa première oxydation par l'ADH conduit à la formation d'acétaldéhyde, composé très toxique. Bien qu'il soit considéré comme peu mutagène et carcinogène, il est capable de se fixer rapidement aux protéines et à l'ADN pour former des adduits protéiques et d'ADN (Dellarco *et al.*, 1988; Nakamura *et al.*, 2003). Il peut également entraîner des aneuploïdie, des aberrations chromosomiques, des micronoyaux chromosomiques et des pontages d'ADN. En plus de causer des dommages à l'ADN, l'acétaldéhyde peut également interférer avec la machinerie de réparation de l'ADN en inhibant notamment la O6-méthylguanine transférase, enzyme impliquée dans la réparation des adduits causés par les agents alcalins (Espina *et al.*, 1988). L'implication de l'acétaldéhyde dans la carcinogenèse mammaire est par ailleurs suggérée par l'étude du polymorphisme de l'ADH. En effet, l'allèle 1C*1 (ADH1C*1) code une ADH1 qui métabolise de manière rapide l'éthanol conduisant à l'augmentation du taux d'acétaldéhyde. Les femmes de génotype ADH1C*1 présentent un risque 1,8 fois plus important de développer un cancer du sein que celles présentant un autre génotype (Coutelle *et al.*, 2004). De plus, des études récentes réalisées chez le rat semblent confirmer l'implication de l'acétaldéhyde dans la carcinogenèse mammaires (Castro *et al.*, 2006). Cependant, la toxicité de l'acétaldéhyde ne suffit pas à elle seule pour expliquer le spectre d'altérations observées au niveau de l'ADN dans les cellules cancéreuses mammaires et en particulier, la présence de mutations de transition et de transversion, de cassures simple et double brins et d'ADN modifié par des radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$). D'autres métabolites doivent être impliqués.

Après la formation d'acétaldéhyde, le métabolisme se poursuit par conversion de celui-ci en acétate par l'ALDH. Deux autres enzymes peuvent également intervenir dans ce processus, il s'agit de la xanthine oxydoréductase (XOR) et de l'aldéhyde oxydase (AOX). Ces deux enzymes, contrairement à l'ALDH, peuvent générer des radicaux libres tels que les anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et les radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) ainsi que du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Dans le sein, il a été observé que seul les radicaux $\cdot\text{OH}$ pouvaient induire des adduits d'ADN de type $\cdot\text{OH}$, des délétions de bases et des cassures simple et double brins. Un des mécanismes proposés suggère qu'à partir de l'acétaldéhyde et du NADH produit par l'ADH, la XOR produit des radicaux libres oxygénés (Reactive Oxygen Species, ROS). Les ROS

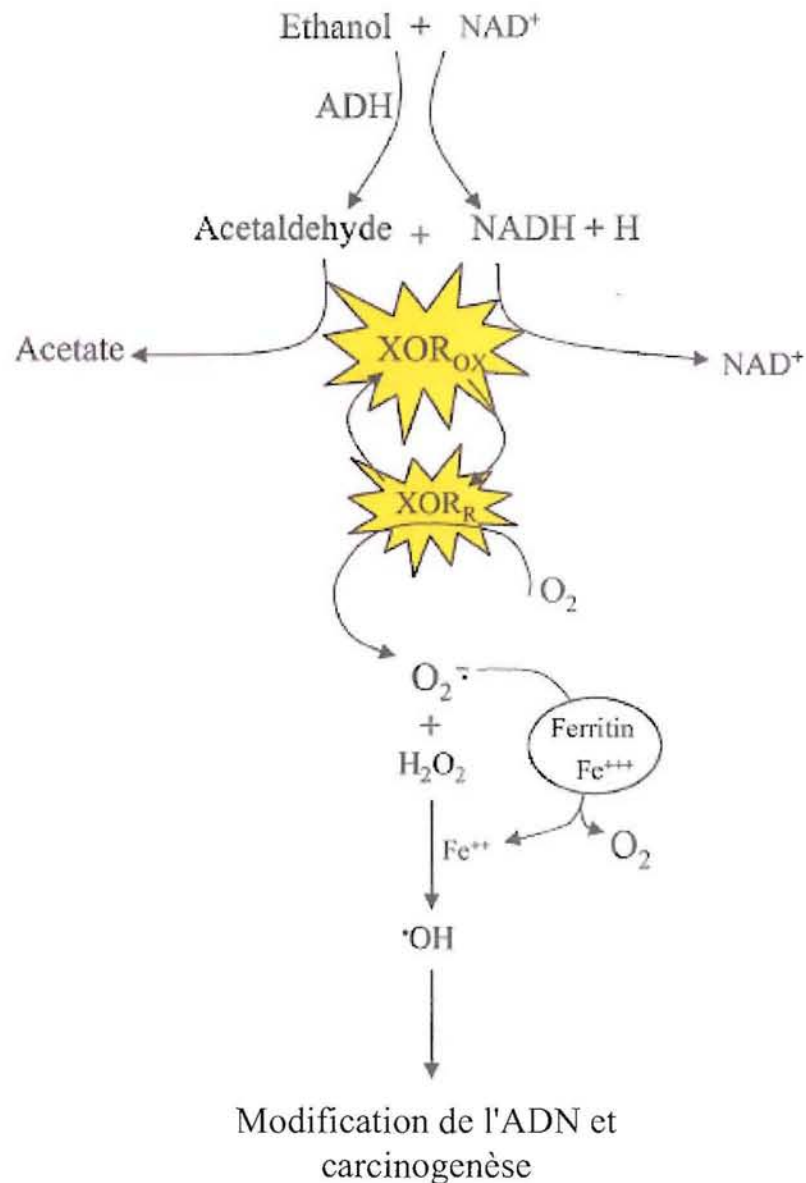


Figure 25 : Métabolisme de l'éthanol impliquant la Xanthine oxydoréductase (XOR) et entraînant la formation de radicaux libres. L'action de l'ADH sur l'éthanol, dans le sein, produit de l'acétaldéhyde et du NADH qui sont les substrats de la XOR. La réduction de la XOR par l'acétaldéhyde et le NADH entraîne la formation de radicaux libres oxygénés (ROS) et ce, dès que la XOR est oxydée par une molécule d'oxygène. L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot -}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui en résultent participent à la formation de radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$). Ces radicaux produisent des dommages à l'ADN et des mutations. (d'après Wright et al., 1999)

généérés peuvent induire des mutations carcinogènes et des dommages à l'ADN qui sont habituellement retrouvés dans les cancers mammaires (Figure 25) (Wright *et al.*, 1999). Ce mécanisme pourrait expliquer l'augmentation de la probabilité de développer des tumeurs avec des mutations dans *p53* observées chez les femmes préménopausées ayant augmentées leur consommation d'alcool (plus de 16 verres par mois) (Freudenheim *et al.*, 2004).

Il peut y avoir également une amplification de ce phénomène dans les cellules via la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, il s'agit de la plus importante source d'anion superoxyde dans la cellule. Des dommages dans l'ADN mitochondrial induit par l'éthanol peuvent augmenter le stress oxydatif par une formation incontrôlée de ROS. De plus, on observe une augmentation de certains biomarqueurs du stress oxydatif comme l'isoprostane, chez les femmes consommant environ 30 g d'alcool par jour, ainsi qu'une diminution de composés antioxydants comme la vitamine E (Hartman *et al.*, 2005).

3.3.2. Métabolisme des monocarbones et méthylation

Les radicaux monocarbonés, ou plus simplement les monocarbones, sont des fragments de molécules ne contenant qu'un seul atome de carbone. Provenant de précurseurs (certains acides aminés et leurs dérivés), ils sont transportés par le tétrahydrofolate, forme réduite de l'acide folique. Certaines études montrent qu'un régime alimentaire riche en folates ou qu'un certains taux de folates circulants réduit le risque de cancer du sein, particulièrement chez les femmes qui consomment de fortes doses d'alcool (Sellers *et al.*, 2001). La consommation d'alcool peut affecter le taux de folates dans les tissus. Lorsqu'une alimentation pauvre en folates est associée à une consommation d'alcool, cela entraîne un blocage de la délivrance des folates par les hépatocytes et une diminution de l'absorption intestinale des folates (Giovannucci *et al.*, 2004). De même une consommation modérée d'alcool peut diminuer le taux sanguin de vitamines B₁₂, vitamines également impliquées dans la synthèse des nucléotides et la méthylation de l'ADN (Laufer *et al.*, 2004). Les conséquences de ces diminutions sont nombreuses et résultent notamment en l'inhibition d'enzymes telles que les ADN méthyltransférases ou méthionine synthase. Il est à noter qu'une hypométhylation de l'ADN augmente le risque de carcinogenèse car cela entraîne des incorporations d'uracile durant la synthèse d'ADN, ou une déficience dans les systèmes de réparation de l'ADN favorisant les cassures des brins d'ADN.

Par ailleurs, il existe un polymorphisme génétique au sein des gènes du métabolisme des monocarbones qui peut être associé au risque de carcinogenèse mammaire. Le gène de la

méthionine synthase peut coder des variants qui présentent une activité enzymatique plus faible. Il existe une interaction entre cette enzyme et la consommation d'alcool : les individus qui expriment un variant particulier de la méthionine synthase et qui consomment moins d'un verre par jour ont un risque de cancer colorectal plus faible en comparaison à d'autres individus exprimant l'enzyme sauvage (Ma *et al.*, 1999). Il existe également une interaction entre cette enzyme et le cancer du sein puisque certains variants sont associés à une diminution du risque de carcinome mammaire.

3.3.3. Métabolisme et réponse aux œstrogènes

Une des raisons majeures de l'augmentation du risque de cancer mammaire liée à la consommation d'alcool semble être rattachée aux œstrogènes. En effet, il a été montré que l'ingestion d'un punch à base de vodka (0.7 g d'alcool/kg) augmente de 55 à 66 % le taux d'œstradiol circulant chez des femmes en phase folliculaire du cycle menstruel (Mendelson *et al.*, 1988). Une autre étude, réalisée sur trente femmes non-ménopausées ayant ingéré quotidiennement 30 g d'alcool pendant 3 mois, montre durant la phase préovulatoire, une augmentation significative du taux plasmatique d'œstradiol et d'œstrone et du taux urinaire d'œstradiol. Cette augmentation est également observée durant la phase lutéale (Reichman *et al.*, 1993). Après la ménopause, des variations de la concentration d'œstradiol sont également observées. En effet, une étude réalisée sur 164 femmes ménopausées montre que celles qui boivent en moyenne 4,8 verres d'alcool par semaine présentent une concentration sanguine en œstradiol supérieure à celle ne buvant pas d'alcool (162,6 contre 100,8 pmol/L) (Gavaler *et al.*, 1993). Cette augmentation du taux d'œstrogènes circulants n'est pas sans conséquences : des diminutions de la variabilité des cycles menstruels, des cycles longs moins fréquents, ainsi qu'une diminution des taux de FSH et LH sont observées (Cooper *et al.*, 1996). L'effet de l'éthanol sur le taux d'œstrogènes circulant ne semble pas se limiter aux femmes puisque des phénomènes de féminisation, d'hypogonadisme, mais aussi des anomalies vasculaires et des gynécomasties suggérant une hyperœstrogénisation sont observées chez les hommes alcooliques (Van Thiel *et al.*, 1981).

Les raisons de cette augmentation du taux d'œstrogènes peuvent être de 2 types : soit l'éthanol favorise l'induction de l'aromatase qui convertit les androgènes en œstrogènes, soit il déstabilise le métabolisme hépatique des œstrogènes entraînant ainsi leur accumulation dans la circulation sanguine. Concernant l'aromatisation, de nombreuses études ont été menées et donnent des résultats variables selon les tissus, les conditions et le substrat utilisé. L'activité

aromatase dans le foie de rats mâles exposés à 12g d'alcool par kg et par jour pendant 54 jours est significativement augmentée. De plus, le taux plasmatique d'œstradiol augmente de 60 % alors que le taux de testostérone diminue de 55%. En revanche, les taux d'œstrone et d'androstènedione restent inchangés. Des études de l'activité aromatase dans la zone préoptique de l'hypothalamus de rat mâle montrent également une augmentation de l'activité aromatase en réponse à l'éthanol. Chez l'Homme, des cellules de choriocarcinome cultivées *in vitro* en présence de 5 à 100 mM d'éthanol pendant 2, 4 et 6 jours, sécrètent une quantité d'œstradiol plus importante. Cette augmentation est par ailleurs dose- et temps-dépendant. Cependant, des microsomes de placenta humain incubés en présence d'androstènedione ne produisent pas des quantités significativement plus importantes d'œstrone. Dans les cellules de la granulosa, l'éthanol semble promouvoir l'aromatisation de l'androstènedione en œstradiol. Cependant des travaux réalisés sur ces mêmes cellules obtenues sur des femmes traitées avec des gonadotrophines chorioniques indiquent des résultats opposés (Ginsburg, 1999). Actuellement, ces résultats ne permettent pas de conclure clairement sur la capacité de l'éthanol à promouvoir l'aromatisation des androgènes.

Quoi qu'il en soit, le taux d'œstrogènes sanguins est significativement augmenté chez les femmes alcooliques et un fort taux d'hormones sexuelles chez les femmes ménopausées est associé à un risque accru de cancer mammaire. L'éthanol peut activer la voie métabolique des cytochromes P450 et promouvoir la carcinogenèse. Chez des rats, il a été montré qu'une ingestion chronique d'alcool pouvait moduler l'activation métabolique de pré-carcinogènes en leurs intermédiaires actifs, par redistribution des cytochromes P450 (Steele *et al.*, 1986). Or, les hormones naturels, œstrone et œstradiol, ont été reconnues carcinogènes chez les rongeurs mais également chez l'homme. En effet, des dommages à l'ADN peuvent être induits par les œstrogènes via la production de radicaux libres et d'adduits d'ADN. Par exemple, les 2- et 4-hydroxyœstradiol, métabolites des œstrogènes, peuvent être convertis en semiquinones qui peuvent entrer dans les réactions d'oxydo-réduction et générer des radicaux libres (Sarkar *et al.*, 2001).

Des études montrent que la densité mammographique de femmes âgées de 55 à 65 ans ou ménopausées prenant un traitement œstrogéno substitutif est augmentée lorsqu'il y a consommation d'alcool suggérant que l'effet des œstrogènes est supérieur en présence d'éthanol (Maskarinec *et al.*, 2006). La relation entre alcool, œstrogènes et cancer mammaire a été suggérée par plusieurs études épidémiologiques montrant que les tumeurs mammaires développées chez les patientes alcooliques sont principalement ER+/PR+. Par ailleurs, une relation inverse entre consommation d'alcool et développement de tumeurs ER- a été

rapportée (Singletary *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2005). Cette potentialisation de l'effet des œstrogènes peut s'expliquer par des études *in vitro* qui montrent une augmentation de l'expression de l'ER α mais également une augmentation de son activité transcriptionnelle. L'éthanol peut également diminuer l'expression de BRCA1 qui, en plus de sa fonction de suppresseur de tumeur, peut réguler l'activité de l'ER α (Fan *et al.*, 2000; Singletary *et al.*, 2001). La stimulation de l'activité transcriptionnelle de l'ER α peut être liée aux résultats obtenus *in vitro* sur la prolifération de lignées de cellules cancéreuses mammaires. En effet, de nombreuses études montrent que l'éthanol est capable de stimuler la synthèse d'ADN et la prolifération de ces cellules (Przylipiak *et al.*, 1996; Izevbogie *et al.*, 2002; Singletary *et al.*, 2001). Cependant, cette stimulation est spécifique des lignées hormono-dépendantes, c'est-à-dire des cellules ER positives, suggérant que l'action de l'éthanol passe par l'ER α (Singletary *et al.*, 2001).

L'alcool, en plus d'être à l'origine des cancers mammaires, pourrait jouer un rôle dans le développement et l'évolution des tumeurs. En effet, des études montrent que l'alcool diminue la période de latence généralement observée avant le développement de la tumeur. Par exemple, chez des rats élevés pour développer des tumeurs mammaires, ceux consommant régulièrement de l'éthanol développent en moyenne une tumeur après seulement 8 mois alors que chez ceux consommant de l'eau, cela apparaît après environ 14,2 mois (Schrauzer *et al.*, 1979). L'effet de l'éthanol sur la tumorigénèse a également été étudié *in vitro*. Certaines études montrent que l'éthanol favorise l'invasion et la migration des cellules tumorales en diminuant notamment l'expression de la E-cadhérine et des trois caténines majeures (α , β et γ). Selon les auteurs, cette action est liée à la diminution de l'expression de BRCA1 (Meng *et al.*, 2000). D'autres études montrent que l'expression des récepteurs erbB-2, erbB-3 et erbB-4 est augmentée par l'éthanol. Via ces récepteurs l'éthanol augmenterait le potentiel métastatique des cellules tumorales (Luo *et al.*, 2000). Puisque les œstrogènes jouent un rôle important dans le développement des tumeurs mammaires (Platet *et al.*, 2004), il est possible qu'ils interviennent dans la stimulation de la tumorigénèse induite par l'éthanol.

4. OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif général de mes travaux s'inscrit dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la tumorigenèse mammaire induite par l'éthanol. Je me suis plus particulièrement intéressé à la relation entre l'éthanol et les œstrogènes, relation suggérée par plusieurs études mais dont de nombreux aspects sont à élucider. La lignée de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 a servi de modèle d'étude puisqu'il s'agit d'une lignée hormono-dépendante et qu'environ 70 % des cancers du sein sont hormono-sensibles.

La première partie du travail a porté sur l'analyse des effets de l'éthanol sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'expression de deux acteurs de la signalisation œstrogénique : l'aromatase qui synthétise les œstrogènes et le récepteur alpha aux œstrogènes qui médie leur action. Enfin, les mêmes analyses ont été réalisées avec d'autres alcools à courte chaîne aliphatique, en l'occurrence le méthanol et le butanol. En effet, le méthanol est présent en faible quantité dans certaines boissons alcoolisées des pays en voie de développement et il peut, comme le butanol, être utilisé en tant que solvant dans certaines industries.

La deuxième partie du travail a porté sur l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la stimulation par l'éthanol de la migration et de l'invasion cellulaire. Nous nous sommes focalisés sur l'étude des métalloprotéinases -2 et -9, collagénases intervenant dans la dégradation de la matrice extracellulaire et facilitant l'invasion des cellules tumorales. Nous avons analysé la sécrétion de ces deux enzymes par zymographie et nous avons mesuré les taux de leurs d'ARN messagers par une technique de RT-PCR semi-quantitative. Nous avons également étudié l'implication du récepteur alpha aux œstrogènes dans l'action de l'éthanol sur la sécrétion de ces deux métalloprotéases.

Ces travaux ayant permis de mettre en évidence une implication du récepteur alpha aux œstrogènes dans différents effets induits par l'éthanol, le troisième volet de mon travail a consisté en une analyse approfondie de l'activation du récepteur alpha aux œstrogènes lors d'une exposition des cellules MCF-7 à l'éthanol. Cette étude nous a permis d'identifier une activation ligand-indépendante de l'ER α par l'éthanol, médiée par la voie AMPc/PKA et par un récepteur membranaire, le récepteur A_{2a} à l'adénosine.

Enfin une étude préliminaire sur l'implication de la cyclooxygénase-2 dans les effets de l'éthanol a été initiée. Cette enzyme joue un rôle important puisqu'elle produit des prostaglandines capables de stimuler l'activité de l'aromatase dans les cellules cancéreuses

mammaires. Actuellement, seuls les effets de l'éthanol sur l'expression de cette protéine et son activité ont pu être étudiés.

La majorité des résultats obtenus au cours de la thèse sont présentés sous forme d'articles parus ou soumis. Une première partie s'intitule "Ethanol, prolifération cellulaire et aromatase" et regroupe deux articles parus. Une deuxième partie s'intitule "Ethanol et potentiel métastatique des cellules cancéreuses mammaires" et s'appuie sur un article paru. Une troisième partie s'intitule "Ethanol et voie de signalisation des œstrogènes". Les résultats sont présentés sous forme d'un article soumis. Enfin la quatrième partie intitulée "Effets de l'éthanol et cyclooxygénase-2" présente des résultats préliminaires. Chaque article est précédé d'une introduction brève situant les principales données au moment des travaux. Enfin, tous les résultats obtenus sont discutés dans le dernier chapitre "Conclusions et perspectives".

Chapitre 2 :

RESULTATS

1. ETHANOL, PROLIFÉRATION CELLULAIRE ET AROMATASE

1.1. Etude des effets de l'éthanol sur la prolifération, l'expression de l'aromatase et de l'ER α dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7

Ethanol stimulates proliferation, ER α and aromatase expression in MCF-7 human breast cancer cells. Nicolas ETIQUE, Dominique CHARDARD, Amand CHESNEL, Jean louis MERLIN, Stéphane FLAMENT and Isabelle GRILLIER-VUISSOZ. International journal of molecular medicine. 2004, 13(1):149-155

1.1.1. Introduction

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'une consommation régulière d'alcool augmentait significativement la probabilité de développer un cancer mammaire aussi bien avant qu'après la ménopause (Bowlin *et al.*, 1997). Ce risque accru est fortement associé aux tumeurs ER-positives. A l'inverse, aucune corrélation n'a été observée chez les patientes présentant des tumeurs ER-négatives (Singletary *et al.*, 2001).

In vitro, il a été montré que l'éthanol pouvait stimuler la prolifération des cellules cancéreuses mammaires hormono-dépendantes (Przylipiak *et al.*, 1996 ; Singletary *et al.*, 2001). Dans ces mêmes cellules, l'exposition à l'alcool induit une augmentation du taux d'ER α (Récepteur α aux œstrogènes) et il peut également stimuler la voie de signalisation de l'ER (Fan *et al.*, 2000; Singletary *et al.*, 2001). Par ailleurs, une consommation chronique d'alcool augmente le taux d'œstrogènes chez les femmes pré-ménopausées et post-ménopausées (Reichman *et al.*, 1993 ; Ginsburg *et al.*, 1996). Le même phénomène est observé chez les hommes et peut alors conduire à des processus de féminisation, d'hypogonadisme ainsi qu'à des anomalies vasculaires et des gynécomasties suggérant une hyperœstrogénisation (Van Thiel *et al.*, 1981).

Pour notre part, nous pensons que l'aromatase, enzyme responsable de la synthèse des œstrogènes, pourrait jouer un rôle dans les effets induits par l'éthanol. En effet, son expression dans les cellules mammaires pourrait être stimulée par la consommation d'alcool augmentant ainsi la concentration locale en œstrogènes et favorisant la prolifération des cellules cancéreuses hormono-dépendantes. Si nous démontrons son implication, cela permettra

d'élucider certains phénomènes et contribuera à mieux comprendre le rôle joué par l'éthanol dans la tumorigenèse mammaire.

1.1.2. Principaux résultats

Dans un premier temps, nous avons évalué les effets de l'éthanol, à deux concentrations physiologiques (0,1 et 0,3 %), sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 après 4 et 6 jours de traitement. La prolifération est stimulée significativement de 11,5 % après 4 jours et de 28 % après 6 jours de traitement ($p < 0,05$). En revanche, en présence de 0,3 % d'éthanol seule une stimulation significative de 11 % après 4 jours de traitement était observée. Aucune différence n'est observée à 6 jours. Des analyses de prolifération ont également été réalisées dans des conditions de croissance indépendantes de l'ancrage. Après 15 jours de traitements, l'éthanol à 0,1 % augmente de 50 % la prolifération cellulaire. L'éthanol à 0,3% n'a aucun effet sur la croissance des cellules dans ces conditions.

L'analyse a été poursuivie par l'étude de l'expression de l'ER α dans des cellules MCF-7 traitées avec la dose optimale de 0,1% d'éthanol pendant 6 jours. L'étude du taux d'ARNm par la technique de RT-PCR semi-quantitative n'a pas révélé d'augmentation significative dans les cellules traitées. En revanche, l'analyse du taux protéique réalisée par Western Blot montre une stimulation d'environ 3,3 fois du taux d'ER α .

Enfin, nous avons étudié l'expression de l'aromatase après 6 jours de traitement en présence de 0,1% d'éthanol. Une augmentation significative du taux d'ARN messenger est observée dans les cellules traitées (2,4 fois). Pour l'étude du taux protéique, nous avons dû passer par une étape d'immunoprécipitation avant le western blot pour pouvoir détecter l'aromatase. L'intensité des bandes obtenues dans les cellules traitées à l'éthanol est significativement supérieure à celles obtenues dans les cellules témoins (10 fois).

1.1.3. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons confirmé l'effet stimulateur de l'éthanol sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires. Cet effet a également été observé dans des conditions de culture indépendantes de l'ancrage suggérant que l'éthanol joue un rôle important dans la progression tumorale. Par ailleurs, la prolifération des cellules s'accompagne d'une augmentation du taux protéique d'ER α . Puisqu'elle s'observe en l'absence

d'augmentation du taux d'ARNm de l'ER α , cela suggère plutôt une stabilisation du récepteur qu'une surexpression. Enfin, nous montrons pour la première fois une augmentation de l'expression de l'aromatase dans les cellules exposées à l'éthanol, confirmant l'implication de cette enzyme dans les effets induits par l'alcool.

Ethanol stimulates proliferation, ER α and aromatase expression in MCF-7 human breast cancer cells

NICOLAS ETIQUE¹, DOMINIQUE CHARDARD¹, AMAND CHESNEL¹, JEAN-LOUIS MERLIN²,
STEPHANE FLAMENT¹ and ISABELLE GRILLIER-VUISSOZ¹

¹EA 3442 Génétique, Signalisation, Différenciation, Faculté des Sciences, Université Henri Poincaré-Nancy I, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex; ²Centre Alexis Vautrin, Laboratoire de Recherche en Oncologie, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Received August 8, 2003; Accepted September 15, 2003

Abstract. It is well documented that alcohol is associated with an increased risk factor for breast carcinogenesis although the underlying mechanisms are not clearly understood. It has been reported that *in vitro*, the culture of estrogen receptor (ER) expressing breast cancer cells in ethanol containing medium was associated with an increase in the proliferation rate, in the ER α content as well as in ER transcriptional activity. Since these changes are not observed in ER negative breast cancer cells, and since alcohol intake has been associated to an increased level of circulating estrogens, we have postulated that aromatase expression could be increased following ethanol exposure. The results of our studies show a 1.3-fold increase in cell proliferation after 6 days of culture of MCF-7 cells in the presence of 0.1% ethanol. This enhanced proliferation is confirmed by the use of clonogenic assays which show a 1.5-fold increase in clonal growth in the presence of 0.1% ethanol. No statistically significant changes were observed in the presence of higher ethanol concentration (0.3%). After a 6-day exposure to 0.1% ethanol, RT-PCR analyses reveal a 1.7-fold increase in ER α mRNA that was not significant, whereas Western blot analyses show a significant 3.3-fold increase in ER α content. At the same stage, RT-PCR studies demonstrate a 2.4-fold increase in aromatase mRNA level which is confirmed at the protein level by Western blots performed after immuno-precipitation of the enzyme. Taken together, these results are in agreement with the involvement of ER signalling in ethanol-induced stimulation of breast cancer cell proliferation and could help to understand why alcohol consumption is associated with breast cancer risk.

Introduction

Breast cancer is the most prevalent type of cancer among women in the world (30% of all female cancers). One hundred and sixty thousand new breast cancers are diagnosed each year in Europe (1). About 70% of human breast cancers are related to sex hormone exposure and 60% of all patients have hormone-dependent breast cancer. These tumours express estrogen receptors (ER) and require estrogens for tumour growth (2-4). These hormones exert their proliferative effect through the binding to their nuclear receptors which are members of the steroid/thyroid nuclear receptors family, known to have a key role in cell proliferation and differentiation (5). The presence or the lack of ER expression is an important determinant for both prognosis and choice of treatment. A poor prognosis and resistance to endocrine therapy are associated with ER-negative disease (6). The proportion of patients with hormone sensitive tumours is higher among post-menopausal (70%) than in pre-menopausal patients (60%) (7,8). In the former population, breast tumours display a high level of estrogens despite the low plasma level. Previous studies have demonstrated that the expression of aromatase, the estrogen synthesis rate-limiting enzyme, is increased in breast tumours (9). Aromatase (CYP 19) is a cytochrome P₄₅₀, catalysing three consecutive reactions converting C19 androgens to aromatic C18 estrogenic steroids. It converts androstenedione and testosterone respectively to estrone and estradiol (10).

Epidemiological data have shown that chronic abuse of alcohol, even with a moderate dosage, increased significantly the incidence of breast cancer (11-14). This increased risk is associated with a higher frequency of ER-positive tumours. In contrast, no correlation or even an inverse correlation has been found for patients exhibiting ER-negative tumours. But so far, the molecular mechanism of alcohol-induced carcinogenesis is not yet understood.

It has been shown that ethanol could enhance cell proliferation and increase the ER α content of ER-positive breast cancer cells (15-17). Alcohol can also stimulate ER signalling in human breast cancer cell lines (18). It has been reported that alcohol consumption increased the level of estrogens and DHEAs both in pre-menopausal and post-

Correspondence to: Professor S. Flament, EA 3442, Faculté des Sciences, Université Henri Poincaré-Nancy I, Entrée 1B-9ème étage, Boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

E-mail: stephane.flament@persmail.uhp-nancy.fr

Key words: breast cancer, aromatase, estrogen receptor, ethanol, proliferation

menopausal women (19-21). Besides, it is well known that chronic alcoholic men display a higher estrogen plasmatic level leading to severed side effect including azoospermia (22,23). Hence, we proposed that aromatase expression could be increased in cases of alcohol intake, providing a source of estrogens which could stimulate the proliferation of malignant clones derived from breast epithelial cells. The aim of our study was to test this hypothesis and to better understand the role played by ethanol in breast cancer.

Materials and methods

Cell culture. MCF-7 human breast cancer cell line was kindly provided by Professor Didier Picard (University of Geneva, Switzerland). Cells were grown at 37°C under 5% CO₂ in phenol red-free DMEM, supplemented with 5% foetal calf serum, 2 mM L-glutamine and 100 nM E₂.

For soft agar assays, cells were plated in 24-well flat bottomed plates using a two-layer soft agar system with a total of 10³ cells/plate in a volume of 500 µl/well as previously described (24).

For cell proliferation assays, cells were seeded in 6-well plates at a density of 2x10⁴ cells/well in 2 ml of medium lacking ethanol. After 24 h of cell attachment, the medium was replaced and supplemented with ethanol at different concentrations (0.0, 0.1 or 0.3%). Cells in triplicate dishes per treatment group were exposed to ethanol for periods up to 6 days. Fresh ethanol-containing medium was added to cells daily. At the end of the treatment, cells were washed with PBS, trypsinized and counted with the CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega).

Semi-quantitative RT-PCR. The analysis of P₄₅₀-aromatase and ERα mRNA expression was performed by RT-PCR. At the end of the treatment, total RNA was extracted from cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Basel, Switzerland) as suggested by the manufacturer. cDNA was synthesized in a 20-µl volume containing 2 µg RNA, 1.5 µg random hexamer primer, 1X Invitrogen buffer, 2 mM MgCl₂, 7.5 mM DTT, 0.25 mM of each dNTP, 20 U RNase inhibitor, and 200 U of MMLV Reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The mixture was incubated for 60 min at 37°C and subsequently for 5 min at 94°C in order to stop the reaction.

The cDNAs obtained were further amplified by PCR. The sequences of primer were 5'-CTACATCATCTCGGTTC CGC-3' and 5'-CACCACGTTCTTGCACTTCATG-3' for ERα (25), 5'-CTGGAAGAATGTATGGACTT-3' and 5'-GATCATTTCAGCATGTTTT-3' for P₄₅₀-aromatase (26) and 5'-TACATGGGTGGGGTGTGAA-3' and 5'-AAGAGAGGCATCCTCACCCCT-3' for β-actin (27). PCR was carried out in a thermal cycler in a final volume of 30 µl containing 2 µl cDNA, 1X Invitrogen Taq buffer, 1.5 mM MgCl₂, 125 µM of each dNTP, 0.33 µM of each primer, and 1.5 U Taq polymerase (Invitrogen). Negative controls were always included. Amplification was carried out under the following conditions: 94°C for 5 min, 25-35 1-min cycles at 94°C, 1 min at 54°C, and 1 min at 72°C, followed by a 10-min extension step at 72°C. A total of 30 µl of the amplified PCR product was mixed with 6 µl of loading buffer and submitted to electrophoresis in a 2% agarose gel at 90 V for 60 min at

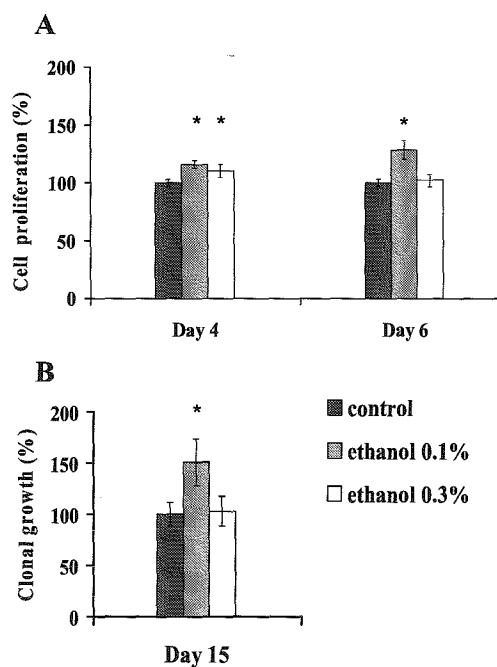


Figure 1. (A), Effect of ethanol concentration on proliferation of MCF-7 cells. At the indicated time of treatment, cell numbers were evaluated using the CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay. Results are given as mean ± standard error of 6 different counts. (B), Effect of ethanol concentration on clonal growth of MCF-7 cells. Results are given as mean ± standard error of 3 different experiments. *Significantly different from untreated control (Student's t-test, $p < 0.05$).

room temperature. The gel was stained with ethidium bromide, viewed and photographed on an UV-transilluminator (GelDoc 2000, Bio-Rad Laboratories). A software package (Quantity One v.4.3.1, Bio-Rad Laboratories) was used to analyse the PCR products.

Electrophoresis and Western blotting. MCF-7 cells were plated in 75 cm² flasks at 2x10⁵ cells/flask and exposed to ethanol. At the end of the treatment, they were washed twice with cold PBS and collected in extracting buffer containing 50 mM Tris, 10 mM DTT, pH 6.8, 2% SDS and 10% glycerol. After heating (100°C, 5 min), an aliquot was used for protein concentration determination using the RC-DC reagent (Bio-Rad Laboratories). For each sample, 50 µg of total proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Separated proteins were subjected to Western blot analysis as previously reported (28). ERα was detected using the monoclonal antibody F-10 (SC-8002, Santa Cruz) and for tubulin, a mouse monoclonal antibody against acetylated tubulin was used (clone 6-11B-1, Sigma). Aromatase was detected using a mouse monoclonal antibody to human cytochrome P₄₅₀-aromatase (clone H4, Serotec).

Immunoprecipitation. Immunoprecipitation experiments were carried out to study aromatase. At the end of each treatment, MCF-7 cells were lysed on ice in 500 µl of a buffer containing 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% SDS, 50 mM HEPES, 5 mM NaF, 2 mM EDTA, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml soybean trypsin inhibitor, 100 µM benzamidine, pH 7.4. Samples were

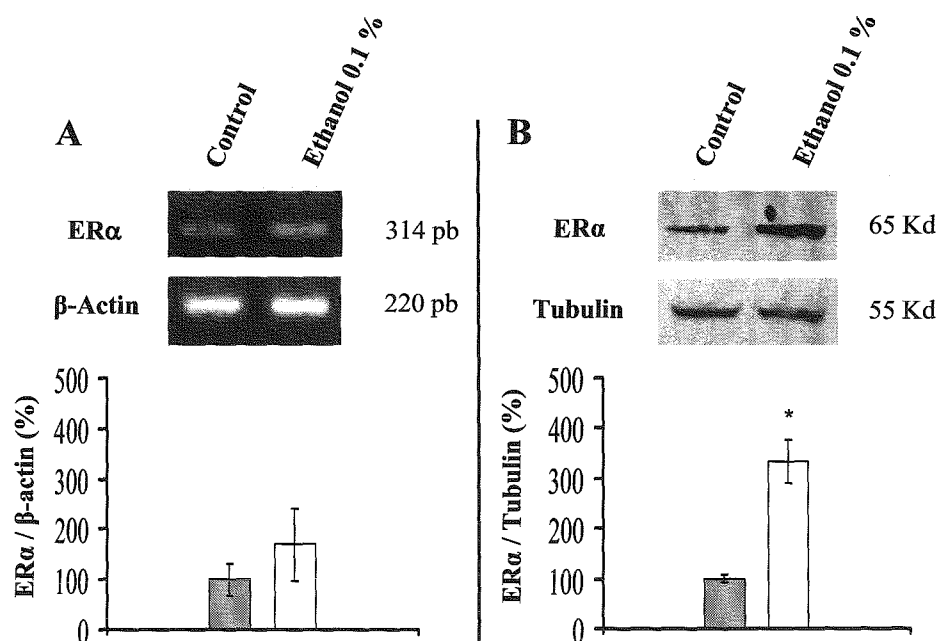


Figure 2. Expression of ER α in control versus ethanol-treated MCF-7 cells (0.1% for 6 days). (A), mRNA analysis. At the top of the figure is shown the result of a representative RT-PCR experiment. At the bottom is shown the result of the semi-quantitative analysis performed on 6 different experiments. The 314 bp amplified ER α product was quantified by densitometry and expressed relative to the control gene, β -actin. (B), Protein analysis. At the top is shown the result of a typical Western blot whereas at the bottom is shown the result of the semi-quantitative analysis performed on 3 different experiments. ER α was expressed relative to the control protein, tubulin. *Significantly different from control (Student's t-test, $p < 0.05$).

centrifuged (10,000 g, 10 min at 4°C) and the supernatants were removed and spun again for 10 min before total protein content determination using the RC-DC reagent (Bio-Rad Laboratories).

Each sample was diluted to a total protein concentration of 1 μ g/ml in TBST buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4). In order to preclear the samples, they were incubated with 20 μ l of a 50% slurry of protein A-sepharose beads (Sigma) in TBST and rocked for 10 min at 4°C. Samples were then spun (10,000 g, 10 min, 4°C). Supernatants were removed and 500 μ l of each sample was incubated rocking overnight with 5 μ l of rabbit anti-human placental P₄₅₀-aromatase serum (R-11-4, Hauptman Woodward Institute, Buffalo, USA). Immunocomplexes were precipitated with a 2-h incubation with 10 μ l of TBST-washed protein A-sepharose beads that were then spun at 4°C for 15 sec at 10,000 g. After washing in TBST, the pellet was resuspended in 50 μ l of Laemmli's sample buffer and submitted to electrophoresis and Western blotting as described above.

Statistical analysis. The results are expressed as mean $\pm$ standard error of several experiments as indicated in the text. Data were compared by means of a Student's t-test; significance level at $p < 0.05$.

Results

Ethanol enhances cell proliferation and clonal growth of MCF-7 cells. First, we evaluated the effects of ethanol on MCF-7 cell proliferation. Two sets of cells were incubated in the presence of 0.1 or 0.3% ethanol. Relative cell proliferation was measured after 4 and 6 days of treatment and compared to untreated control cells. When MCF-7 cells were grown in

the presence of 0.1% ethanol, a significant increase in cell proliferation (11.5%) was observed following 4 days of culture and it peaked at 28% after 6 days of treatment ($p < 0.05$) (Fig. 1A). In contrast, in the presence of 0.3% ethanol, after a transient significant increase (11%) at day 4, no significant change was observed at day 6.

Then, we measured the effects of ethanol on MCF-7 cell proliferation in conditions of anchorage-independent growth using soft agar clonogenic assays. Ethanol (0.1%) induced a 50% increase in MCF-7 clonal growth (Fig. 1B). In correlation with the results of cell proliferation analysis in liquid culture, no significant change was observed in the presence of 0.3% ethanol.

Increase in ER α and aromatase expression in the presence of ethanol. Then, we investigated the molecular mechanisms underlying this enhanced cell proliferation. It is well described that breast epithelial cell proliferation is mediated by the binding of estrogens to their nuclear receptor ER α (29-31). So, we tested if ethanol treatment could modify the level of ER α in our MCF-7 cell line.

MCF-7 cells were incubated in ethanol containing medium and after 6 days of treatment, the cells were harvested for mRNA and protein analysis. Semi-quantitative RT-PCR analyses of ER α mRNA content revealed a general upward trend (1.7-fold increase) which was not significant ($p > 0.05$) whereas Western blot studies showed a 3.3-fold increase in the ER α protein level as compared to controls ($p < 0.05$) (Fig. 2).

In order to determine whether ethanol treatment could stimulate aromatase expression, semi-quantitative RT-PCR studies were performed. We observed a 2.4-fold increase in aromatase mRNA level in MCF-7 cells that were grown during

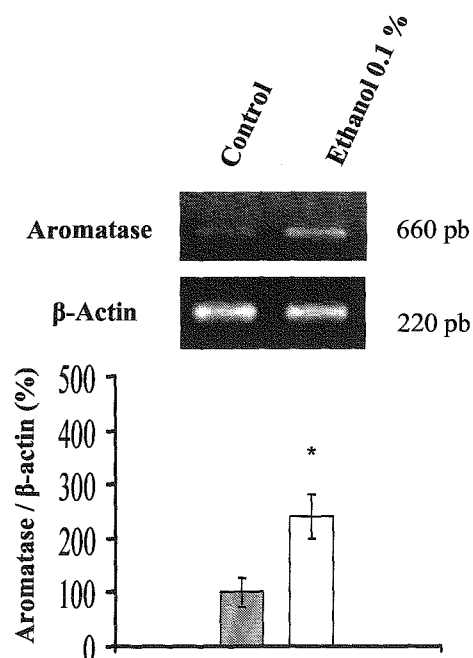


Figure 3. Expression of P₄₅₀-aromatase mRNA in control versus ethanol-treated MCF-7 cells (0.1% for 6 days). At the top of the figure is shown the result of a representative RT-PCR experiment. At the bottom is shown the result of the semi-quantitative analysis performed on 4 different experiments. The 660 bp amplified aromatase product was quantified by densitometry and expressed relative to the control gene, β-actin. *Significantly different from control (Student's t-test, $p < 0.05$).

6 days in the presence of 0.1% ethanol ($p < 0.05$) (Fig. 3). To confirm this result at the protein level, several Western blot analyses were performed. We always failed to detect aromatase in total homogenates of MCF-7 cells, even when 100 μg of total proteins had been loaded at the top of the polyacrylamide gel. Aromatase was detected only after immunoprecipitation. The result of a typical experiment is shown in Fig. 4. The intensity of the band revealed by the antibody at 55 kDa in the sample of ethanol-treated MCF-7 cells was higher than those in the control (Fig. 4A). As shown by the Coomassie blue staining of the gel after transfer, the two supernatants were identical regarding their total protein content (Fig. 4B).

Discussion

It is well documented that ethanol is associated to an increased risk factor for breast carcinogenesis although the underlying mechanisms are not clearly understood (11-14). It has been reported that *in vitro*, the culture of ER-positive breast cancer cells in ethanol containing medium was associated with an increase in the proliferation rate whereas no effect was obtained on ER-negative breast cancer cells (16). Interestingly, similar results were observed on hepatocytes which are very sensitive to sex steroid hormones. In male rats, chronic intake of ethanol increased 3-fold the number of ERα-positive hepatocytes and was associated with an elevation of hepatocyte proliferation ability (32,33). In human, active alcohol intake is required to maintain high level of ER-positive hepatocytes. Moreover, alcohol intake has been associated to an increased level of circulating estrogens (34). Hence, we have postulated

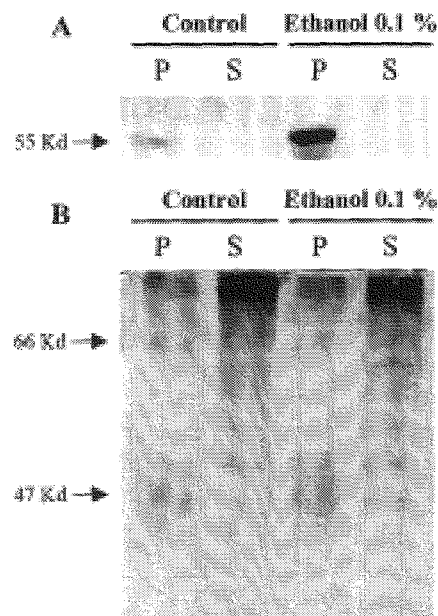


Figure 4. Expression of P₄₅₀-aromatase in control versus ethanol-treated MCF-7 cells (0.1% for 6 days). (A), Western blot showing aromatase in immunoprecipitates. A signal at 55 kDa is detected by the antibody only in pellets (P) but not in supernatants (S), suggesting that aromatase was totally immunoprecipitated. The intensity of this signal is higher in ethanol-treated cells. (B), Coomassie blue staining of the corresponding gel after the transfer. This staining shows that the total protein content is similar in ethanol-treated versus control cells.

that the stimulation of proliferation observed in ER-positive breast cancer cells following ethanol exposure could be the result of an elevation of local estrogen level through an effect on P₄₅₀-aromatase expression. The results of our studies confirm the stimulation of the proliferation rate and the increase in ERα content previously reported. Besides, they demonstrate for the first time an increase in aromatase mRNA level following ethanol treatment.

First, it was necessary to re-evaluate on our cell line the effect of ethanol on MCF-7 proliferation reported previously. When MCF-7 cells were grown in DMEM containing 5% FCS, the most significant increase in proliferation was observed after 6 days of treatment with 0.1% ethanol. A shorter exposure to ethanol (4 days) as well as treatment with a higher dose of ethanol (0.3%) appeared less efficient. In the previous studies, various results were obtained. An increase in [³H]-thymidine incorporation was measured after 5 h of exposure to ethanol in DMEM containing 10% FCS and the most efficient concentration was 0.01% (15). An increase in cell number was also reported after 7 days of exposure of MCF-7 to ethanol at concentrations between 10 and 100 mM (i.e. between 0.025 and 0.5%) in medium containing 5% FCS (16). The increase reached 54 and 87% in the presence of respectively 20 and 100 mM. However, the authors did not observe any change after 2 days of treatment. Lastly, an increase in [³H]-thymidine incorporation and in cell number was measured after 24 h of treatment with ethanol at concentrations ranging from 0.1 to 10% in serum-free medium (17). In that study, the highest effect (60% increase) was observed in the presence of 0.3% ethanol. In our study, the concentration of 0.3% of ethanol was not more efficient than 0.1% in stimulation of

cell proliferation, even in clonogenic assays. This is probably not the result of a toxic effect because using trypan blue, we did not observe a higher number of cell membrane permeabilization in cultures performed in the presence of 0.3% ethanol (data not shown). The lack of toxicity of this concentration was also reported previously using the MTT method (35). It should be noted that, for instance, women consuming daily 0.75 g alcohol per kg of body weight have blood ethanol concentrations of 20-24 mM i.e. approximately 0.1% (16). So, despite the differences in the most efficient dose and the time at which the proliferative effect is observed, our results are in agreement with those reported in other studies and confirm the proliferative effect of ethanol on ER-positive breast cancer cells.

Besides, using clonogenic assays, we observed that MCF-7 displayed a 1.5-fold increase in anchorage-independent growth after treatment with 0.1% ethanol. This result could be an important indicator for tumour progression and reinforce the fact that ethanol is also able to stimulate cell proliferation.

Second, we completed the studies on the effect of ethanol on ER α expression that were only performed by immunodetection of the protein. Our Western blotting analyses showed that the level of ER α was 3.3-fold higher in MCF-7 cells that were grown during 6 days in the presence of 0.1% ethanol. A 1.6-fold increase in ER α was previously reported to occur as early as at 24 h of incubation in medium containing 20 mM ethanol (18). Another study failed to detect any change at such an early time of treatment although significant changes were found later: a 2.1-fold level of ER α was measured after 7 days of culture in the presence of 20 mM ethanol (16).

Although the increase in ER α at the protein level was clearly observed and was statistically significant in our experiments, a 1.7-fold increase in the level of ER α mRNA was observed but it was not significant. So, it was difficult to conclude that there is a stimulation of the transcription following ethanol treatment. The subcellular trafficking process may influence receptor stabilisation and it is well known that the binding of estrogens induces ER phosphorylation, increases its nuclear translocation and consequently its stabilisation (36-39). This explanation could reinforce the idea that aromatase, the estrogen synthesis enzyme, could be modified in MCF-7 cells subjected to ethanol treatment.

Indeed, alcohol consumption has been associated to an increase in plasma estrogens level in post-menopausal women (34,40). A clinical study of post-menopausal women under estrogen replacement therapy showed that estrogens level peaked at 300% from the baseline value after alcohol absorption (0.7 g/kg) (41). Moreover, some direct or indirect indications of aromatase involvement in ethanol-induced increased level of estrogens have been described for various peripheral tissue (42). For instance, in male rat, an increase in hepatic aromatization has been observed after exposure to an alcohol enriched diet (36% calories) (33). In male rat pup, foetal exposure to ethanol displays a significant increase in aromatase activity (43). Here, we show evidence for the first time that P₄₅₀-aromatase is involved in ethanol signalling pathway in breast cancer cells, since a 6-day exposure to ethanol containing medium induced a 2.4-fold increase of the

mRNA level of this enzyme. Moreover, we found a 10.1-fold increase in the amount of the protein in ethanol-treated MCF-7 cells. This result was obtained using immunoprecipitation experiments. This suggests that the amount of aromatase is initially very low in MCF-7 cells and this is consistent with the fact that 35 cycles were required to detect the endogenous mRNA by RT-PCR.

The involvement of aromatase in breast cancer is well established. Aromatase overexpression in some breast carcinoma has been detected in epithelial tissue, in adipose tissue and in stromal cells (44-47). It is also known that transgenic mice overexpressing P₄₅₀-aromatase display several premalignant changes such as hyperplasia and dysplasia in the epithelial cells of the mammary gland (7). As a consequence, through the increase in aromatase expression in breast tumour, ethanol could play a key role in malignant breast cancer cell proliferation.

How could the ethanol-induced increase be explained in aromatase expression? It has been reported that I.3 and II are the two major promoters directing aromatase expression in breast cancer cells (9). Both of these promoters are sensitive to cAMP (48,49). Since ethanol treatment of MCF-7 cells has been shown to increase cAMP amount (16), this might be the reason for the enhanced expression of P₄₅₀-aromatase.

Furthermore, recent studies show that in rat, ethanol is metabolised by the breast microsomes into a mutagen (acetaldehyde) (50). If a similar process occurs in human breast normal cells, this mutagen could be the starting point of carcinogenesis. Indeed P53 is frequently mutated (51,52) in breast carcinoma suggesting an effective involvement of carcinogen but, so far, to our knowledge, no specific study has been carried on alcoholic women. In this model, ethanol would both induce a mutagenic process and increase the proliferation of breast cancer cells by boosting the ER signalling pathway.

In summary, this study supports data suggesting that ethanol is an increased risk factor for breast cancer, showing the impact of ethanol on estrogen signalling pathway and evidencing the involvement of P₄₅₀-aromatase. These data should be considered for women under estrogen replacement therapy for menopause or, more generally, for women with an increased risk of developing cancer. Moreover, the pharmacological tests used in order to evaluate anticancer drugs should take into account the present data when ethanol is used to solubilize drugs such as nuclear receptor ligands.

Acknowledgements

These studies were supported by grants of the 'Université Henri Poincaré (BQR)', of the 'Ligue Contre le Cancer, comités de la Meurthe et Moselle, de la Meuse et des Vosges' and of the 'Association pour la Recherche sur le Cancer'. Nicolas Etique is recipient of a grant of the 'Ligue Contre le Cancer, comité de la Meurthe et Moselle'. We would like to thank Martine Callier for technical assistance in molecular biology. We also acknowledge Professor Didier Picard (University of Geneva, Switzerland) for the generous gift of MCF-7 cells and for advising us on cell culture, Dr Anne Lykkesfeldt (Danish Cancer Society, Copenhagen, Denmark) for advising us on Western blot studies of ER α .

References

1. Europa.eu.int/comm/research/leaflets/health/fr/02.html.
2. Weichselbaum RR, Hellman S, Piro AJ, Nove JJ and Little JB: Proliferation kinetics of a human breast cancer line *in vitro* following treatment with 17beta-estradiol and 1-beta-D-arabino-furanosylcytosine. *Cancer Res* 38: 2339-2342, 1978.
3. Reddel RR and Sutherland RL: Tamoxifen stimulation of human breast cancer cell proliferation *in vitro*: a possible model for tamoxifen tumour flare. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20: 1419-1424, 1984.
4. Lykkesfeldt AE and Briand P: Indirect mechanism of oestradiol stimulation of cell proliferation of human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 53: 29-35, 1986.
5. Gronemeyer H and Laudet V: Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* 2: 1173-1308, 1995.
6. Zava DT and McGuire WL: Human breast cancer: androgen action mediated by estrogen receptor. *Science* 199: 787-788, 1978.
7. Kirma N, Gill K, Mandava U and Tekmal RR: Overexpression of aromatase leads to hyperplasia and changes in the expression of genes involved in apoptosis, cell cycle, growth, and tumor suppressor functions in the mammary glands of transgenic mice. *Cancer Res* 61: 1910-1918, 2001.
8. Lippman ME and Dickson RB: Mechanisms of growth control in normal and malignant breast epithelium. *Recent Prog Horm Res* 45: 383-440, 1989.
9. Chen S, Itoh T, Wu K, Zhou D and Yang C: Transcriptional regulation of aromatase expression in human breast tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83: 93-99, 2002.
10. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, *et al*: Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15: 342-355, 1994.
11. Hankinson SE, Willett WC, Manson JE, Hunter DJ, Colditz GA, Stampfer MJ, Longcope C and Speizer FE: Alcohol, height, and adiposity in relation to estrogen and prolactin levels in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 87: 1297-1302, 1995.
12. Aronson K: Alcohol: a recently identified risk factor for breast cancer. *Can Med Assoc J* 168: 1147-1148, 2003.
13. Longnecker MP: Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review. *Cancer Causes Control* 5: 73-82, 1994.
14. Wolff MS and Weston A: Breast cancer risk and environmental exposures. *Environ Health Perspect* 105 (Suppl 4): 891-896, 1997.
15. Przylipek A, Rabe T, Hafner J, Przylipek M and Runnebaum R: Influence of ethanol on *in vitro* growth of human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Arch Gynecol Obstet* 258: 137-140, 1996.
16. Singletary KW, Frey RS and Yan W: Effect of ethanol on proliferation and estrogen receptor-alpha expression in human breast cancer cells. *Cancer Lett* 165: 131-137, 2001.
17. Izevbogie EB, Ekunwe SI, Jordan J and Howard CB: Ethanol modulates the growth of human breast cancer cells *in vitro*. *Exp Biol Med* (Maywood) 227: 260-265, 2002.
18. Fan S, Meng Q, Gao B, Grossman J, Yadegari M, Goldberg ID and Rosen EM: Alcohol stimulates estrogen receptor signaling in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 60: 5635-5639, 2000.
19. Reichman ME, Judd JT, Longcope C, Schatzkin A, Clevidence BA, Nair PP, Campbell WS and Taylor PR: Effects of alcohol consumption on plasma and urinary hormone concentrations in premenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 85: 722-727, 1993.
20. Ginsburg ES, Mello NK, Mendelson JH, Barbieri RL, Teoh SK, Rothman M, Gao X and Sholar JW: Effects of alcohol ingestion on estrogens in postmenopausal women. *JAMA* 276: 1747-1751, 1996.
21. Dorgan JF, Baer DJ, Albert PS, Judd JT, Brown ED, Corle DK, Campbell WS, Hartman TJ, Tejpar AA, Clevidence BA, Giffen CA, Chandler DW, Stanczyk FZ and Taylor PR: Serum hormones and the alcohol-breast cancer association in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 93: 710-715, 2001.
22. Kucheria K, Saxena R and Mohan D: Semen analysis in alcohol dependence syndrome. *Andrologia* 17: 558-563, 1985.
23. Gomathi C, Balasubramanian K, Bhanu NV, Srikanth V and Govindarajulu P: Effect of chronic alcoholism on semen - studies on lipid profiles. *Int J Androl* 16: 175-181, 1993.
24. Grillier I, Umie T, Elstner E, Collins SJ and Koeffler HP: Alterations of differentiation, clonal proliferation, cell cycle progression and bcl-2 expression in RAR alpha-altered sublines of HL-60. *Leukemia* 11: 393-400, 1997.
25. Okubo T, Yokoyama Y, Kano K and Kano I: ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERalpha and PR. *Food Chem Toxicol* 39: 1225-1232, 2001.
26. Maggiolini M, Carpino A, Bonofiglio D, Pezzi V, Rago V, Marsico S, Picard D and Ando S: The direct proliferative stimulus of dehydroepiandrosterone on MCF7 breast cancer cells is potentiated by overexpression of aromatase. *Mol Cell Endocrinol* 184: 163-171, 2001.
27. Morosetti R, Park DJ, Chumakov AM, Grillier I, Shiohara M, Gombart AF, Nakamaki T, Weinberg K and Koeffler HP: A novel, myeloid transcription factor, C/EBP epsilon, is upregulated during granulocytic, but not monocytic, differentiation. *Blood* 90: 2591-2600, 1997.
28. Bodart JF, Bechard D, Bertout M, Rousseau A, Gannon J, Vilain JP and Flament S: Inhibition of protein tyrosine phosphatases blocks calcium-induced activation of metaphase II-arrested oocytes of *Xenopus laevis*. *FEBS Lett* 457: 175-178, 1999.
29. Henderson IC and Canellos GP: Cancer of the breast: the past decade (first of two parts). *N Engl J Med* 302: 17-30, 1980.
30. Henderson IC and Canellos GP: Cancer of the breast: the past decade (second of two parts). *N Engl J Med* 302: 78-90, 1980.
31. Miller WR: Aromatase activity in breast tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39: 783-790, 1991.
32. Colantoni A, Emanuele MA, Kovacs EJ, Villa E and van Thiel DH: Hepatic estrogen receptors and alcohol intake. *Mol Cell Endocrinol* 193: 101-104, 2002.
33. Chung KW: Effects of chronic ethanol intake on aromatization of androgens and concentration of estrogen and androgen receptors in rat liver. *Toxicology* 62: 285-295, 1990.
34. Gavalier JS and Love K: Detection of the relationship between moderate alcoholic beverage consumption and serum levels of estradiol in normal postmenopausal women: effects of alcohol consumption quantitation methods and sample size adequacy. *J Stud Alcohol* 53: 389-394, 1992.
35. Meng Q, Gao B, Goldberg ID, Rosen EM and Fan S: Stimulation of cell invasion and migration by alcohol in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 448-453, 2000.
36. Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP, Smith CL and O'Malley BW: Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1858-1862, 1999.
37. El Khissi A and Leclercq G: Implication of proteasome in estrogen receptor degradation. *FEBS Lett* 448: 160-166, 1999.
38. Seo HS, Journe F, Larsimont D, Sotiriou C and Leclercq G: Decrease of estrogen receptor expression and associated ERE-dependent transcription in MCF-7 breast cancer cells after oligomycin treatment. *Steroids* 68: 257-269, 2003.
39. Alarid ET, Bakopoulos N and Solodin N: Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Mol Endocrinol* 13: 1522-1534, 1999.
40. Nagata C, Kabuto M, Takatsuka N and Shimizu H: Associations of alcohol, height, and reproductive factors with serum hormone concentrations in postmenopausal Japanese women. *Steroid hormones in Japanese postmenopausal women. Breast Cancer Res Treat* 44: 235-241, 1997.
41. Ginsburg ES, Owen WF Jr, Greenberg LM, Shea BF, Lazarus JM and Walsh BW: Estrogen absorption and metabolism in postmenopausal women with end-stage renal disease. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4414-4417, 1996.
42. Ginsburg ES, Walsh BW, Gao X, Gleason RE, Feltmate C and Barbieri RL: The effect of acute ethanol ingestion on estrogen levels in postmenopausal women using transdermal estradiol. *J Soc Gynecol Invest* 2: 26-29, 1995.
43. McGivern RF, Roselli CE and Handa RJ: Perinatal aromatase activity in male and female rats: effect of prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 12: 769-772, 1988.
44. Miller WR, Hawkins RA and Forrest APM: Significance of aromatase activity in human breast cancer. *Cancer Res* 42 (Suppl): 623-627, 1982.
45. Sasano H, Nagura H, Harada N, Goukon Y and Kimura M: Immunolocalization of aromatase and other steroidogenic enzymes in human breast disorders. *Hum Pathol* 25: 530-535, 1994.

46. Santen RJ, Martel J, Hoagland M, Naftolin F, Roa L, Harada N, Hafer L, Zaino R and Santner SJ: Stromal spindle cells contain aromatase in human breast tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 627-632, 1994.
47. Santner SJ, Pauley RJ, Tait L, Kaseta J and Santen RJ: Aromatase activity and expression in breast cancer and benign breast tissue stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 200-208, 1997.
48. Michael MD, Michael LF and Simpson ER: A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene. *Mol Cell Endocrinol* 134: 147-156, 1997.
49. Harada N: Aberrant expression of aromatase in breast cancer tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61: 175-184, 1997.
50. Castro GD, Delgado De Layno AM, Costantini MH and Castro JA: Rat breast microsomal biotransformation of ethanol to acetaldehyde but not to free radicals: its potential role in the association between alcohol drinking and breast tumor promotion. *Teratog Carcinog Mutagen* 23 (Suppl 1): 61-70, 2003.
51. Elstner E, Linker-Israeli M, Said J, Umiel T, De Vos S, Shintaku IP, Heber D, Binderup L, Uskokovic M and Koeffler HP: 20-epi-vitamin D3 analogues: a novel class of potent inhibitors of proliferation and inducers of differentiation of human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 55: 2822-2830, 1995.
52. Biggs PJ, Warren W, Venitt S and Stratton MR: Does a genotoxic carcinogen contribute to human breast cancer? The value of mutational spectra in unravelling the aetiology of cancer. *Mutagenesis* 8: 275-283, 1993.

1.2. Etude des effets d'autres alcools sur la prolifération, l'expression de l'aromatase et de l'ER α dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7

Analysis of the effects of different alcohols on MCF-7 human breast cancer cells. Nicolas ETIQUE, Dominique CHARDARD, Amand CHESNEL, Stephane FLAMENT and Isabelle GRILLIER-VUISSOZ. Annals of the New York Academy of Sciences. 2004, 1030:78-85.

1.2.1. Introduction

Nos précédents travaux ont permis de confirmer l'effet de l'éthanol sur la prolifération mais également sur l'expression de l'ER α dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Przylipiak *et al.*, 1996; Singletary *et al.*, 2001; Etique *et al.*, 2004a). De plus, nous avons montré pour la première fois une surexpression de l'aromatase dans les cellules cancéreuses exposées à l'éthanol (Etique *et al.*, 2004a). Outre l'éthanol, les femmes peuvent être exposées à d'autres alcools à courte chaîne aliphatique tels que le méthanol ou le butanol-1. En effet, le méthanol peut être présent en faible quantité dans certaines boissons alcoolisées des pays en voie de développement. De plus, avec le butanol, il peut aussi être utilisé comme solvant des graisses, de la paraffine et des résines dans certaines industries (Windholz *et al.*, 1976).

L'intérêt de cette étude est moins important d'un point de vue épidémiologique car la consommation chronique de méthanol ou de butanol ne sera jamais aussi importante que celle de l'éthanol. Cependant, nous ne pouvons exclure qu'une exposition modérée à ces molécules pourrait jouer un rôle dans les cancers du sein hormono-dépendants. Par contre, d'un point de vue moléculaire, la comparaison des effets de ces différents alcools pourrait nous aider à mieux comprendre les mécanismes d'action de ces composés.

Comme pour l'étude précédente nous nous sommes focalisés sur l'étude de la prolifération, de l'expression de l'ER α et de l'aromatase.

1.2.2. Principaux résultats

Tout d'abord, nous avons comparé l'effet de ces trois alcools sur la prolifération des cellules MCF-7. Nous avons utilisé une concentration de 0,1% qui s'était avérée optimale

pour l'éthanol. Après 6 jours de traitement, alors que l'éthanol augmentait significativement la prolifération cellulaire d'environ 28 %, le méthanol et le butanol entraînent une diminution de la croissance de 15 % et 38 % respectivement.

Dans un second temps, nous avons étudié le taux d'ARNm et le taux protéique de l'ER α dans des cellules MCF-7 exposées pendant 6 jours à 0,1 % de ces différents alcools. Comme pour l'éthanol, le méthanol et le butanol n'ont aucun effet sur le taux d'ARNm de l'ER α . En revanche en ce qui concerne le taux protéique, le méthanol et l'éthanol augmentent significativement, de 1,8 et 2 fois respectivement, la concentration du récepteur. Le butanol n'a quant à lui aucun effet.

Enfin, nous avons étudié l'expression de l'aromatas dans les mêmes conditions de traitement. Seul l'éthanol est capable de stimuler le taux d'ARNm de l'enzyme. Cette augmentation est de l'ordre de 2,2 fois. Aucune différence significative n'est observée en présence de méthanol et de butanol.

1.2.3. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons confirmé les effets de l'éthanol sur la prolifération, l'expression de l'ER α et de l'aromatas dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7. Les deux autres alcools entraînent une diminution significative de la prolifération cellulaire. Concernant l'expression de l'ER α , seul le méthanol est capable d'augmenter le taux protéique d'ER α . Il semble étonnant que cette augmentation ne soit pas associée comme pour l'éthanol à une stimulation de la prolifération. Par ailleurs, l'étude de l'expression de l'aromatas révèle que les effets de l'éthanol ne sont reproduits par aucun des autres solvants.

Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation de l'expression de l'aromatas pourrait être un événement clé dans la stimulation de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires hormono-dépendantes induite par l'éthanol. La surexpression de cette enzyme pourrait être à l'origine d'une synthèse accrue d'œstrogènes par les cellules MCF-7, qui verraient alors leur prolifération stimulée.

Analysis of the Effects of Different Alcohols on MCF-7 Human Breast Cancer Cells

NICOLAS ETIQUE, DOMINIQUE CHARDARD, AMAND CHESNEL,
STEPHANE FLAMENT,^a AND ISABELLE GRILLIER-VUISOZ

*EA 3442 Génétique, Signalisation, Différenciation, Université Henri Poincaré,
Nancy I. Faculté des Sciences, Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France*

ABSTRACT: Alcohol consumption is known to be an increased risk factor for breast cancer, but the underlying molecular mechanisms are not well understood. We have recently shown that the exposure of MCF-7 breast cancer cells to 0.1% ethanol enhanced their proliferation and increased their content in both estrogen receptor- α (ER α) and aromatase. The aim of the present work was to determine if the effects of ethanol could be mimicked by other short-chain aliphatic alcohols such as methanol and 1-butanol. Our results show that these compounds do not stimulate MCF-7 cell proliferation. An increase in ER α content was observed by Western blot in methanol-treated cells, but this parameter was not affected in butanol-treated cells. Neither of these two alcohols induced an increase in aromatase mRNA level. So despite a similarity in molecular structure, these primary alcohols do not exert the same effects. Taken together, these results suggest that the increase in aromatase expression might be a key event required for the enhanced proliferation observed in the presence of ethanol.

KEYWORDS: breast cancer; aromatase; estrogen receptor; alcohol; proliferation

INTRODUCTION

Breast cancer accounts for about 1 in 10 cases of cancer and is the most frequent form of cancer affecting women.¹ About 60% of patients have hormone-dependent breast cancer, which means that their tumors express estrogen receptors (ERs) and require estrogens for their growth.²⁻⁴ The proportion of patients with hormone-sensitive tumors is higher among postmenopausal women. In these patients, breast tumors display a high level of estrogens despite the low plasma level.^{5,6} Previous studies have demonstrated that the expression of aromatase (CYP 19), the cytochrome P450 responsible for estrogen synthesis, is increased in breast tumors.⁷

Epidemiological data have shown that chronic abuse of alcohol, even with a moderate dosage, significantly increases the incidence of breast cancer.⁸⁻¹¹ This increased risk is associated with a higher frequency of ER-positive tumors. In contrast, no correlation or even an inverse correlation has been found for patients exhibiting

^aAddress for correspondence: Pr. S. Flament, Université Henri Poincaré-Nancy I. Faculté des Sciences, EA3442, Entrée 1B, 9^{ème} étage, Boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France. Voice: 33-(0)-3-83-68-42-52; fax: 33-(0)-3-83-90-32-77.
e-mail: stephane.flament@persmail.uhp-nancy.fr

ER-negative tumors. But to date, the molecular mechanism of alcohol-induced carcinogenesis is not well understood.

We and others have shown that ethanol could enhance cell proliferation and increase the ER α content of ER-positive breast cancer cells.^{12–15} This alcohol can also stimulate ER signaling in human breast cancer cell lines.¹⁶ A recent study in our laboratory has shown that ethanol could also stimulate aromatase expression.¹⁵ This is consistent with the fact that both in premenopausal and postmenopausal women, the level of estrogens is increased in cases of alcohol consumption.^{17–19} Therefore, this increase in aromatase expression could provide a source of estrogens that could stimulate the proliferation of ER-positive malignant clones derived from breast epithelial cells.

The aim of our study was to determine if, as recently shown with ethanol, other primary alcohols, such as methanol and 1-butanol, could enhance MCF-7 human breast cancer cell proliferation and both ER α and aromatase expression. This could contribute to a better understanding of the alcohol signaling pathway in breast cancer.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

MCF-7 human breast cancer cells were grown at 37°C under 5% CO₂ in phenol red-free DMEM, supplemented with 5% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, and 100 nM E₂. For cell proliferation assays, cells were seeded on six-well plates at a density of 2×10^4 cells/well in 2 mL of medium lacking alcohol. After 24 h of cell attachment, the medium was replaced and supplemented with either methanol, ethanol, or butanol at 0.1%. Cells were exposed to these alcohols for 6 days, with alcohol-containing medium being renewed daily. At the end of the treatment, cells were washed with PBS, trypsinized, and counted with the CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega).

Semiquantitative RT-PCR

The analysis of P450-aromatase and ER α mRNA expression was performed by RT-PCR. At the end of the treatment, total RNA was extracted from cells using TRIZOL reagent (Invitrogen, Basel, Switzerland) as suggested by the manufacturer. cDNA was synthesized in a 20- μ L volume containing 2 μ g of RNA, 1.5 μ g of random hexamer primer, 1 $\times$ Invitrogen Buffer, 2 mM MgCl₂, 7.5 mM DTT, 0.25 mM of each dNTP, 20 U of RNase inhibitor, and 200 U of MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The mixture was incubated for 60 min at 37°C and subsequently for 5 min at 94°C to stop the reaction.

The cDNAs obtained were further amplified by PCR. The sequences of primers have been described previously.¹⁵ PCR was carried out in a thermal cycler in a final volume of 30 μ L containing 2 μ L of cDNA, 1 $\times$ Invitrogen Taq Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 125 μ M of each dNTP, 0.33 μ M of each primer, and 1.5 U of Taq polymerase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Negative controls were always included. Amplification was carried out under the following conditions: 94°C for 5 min, 25–35 1-min cycles at 94°C, 1 min at 54°C, and 1 min at 72°C, followed by a 10-min extension step at 72°C. A total of 30 μ L of the amplified PCR product was mixed with 6 μ L of loading buffer and submitted to electrophoresis on a 2% agarose gel at

90 V for 60 min at room temperature. The gel was stained with ethidium bromide and viewed and photographed on a UV transilluminator (GelDoc 2000; Bio-Rad Laboratories). A software package (Quantity One version 4.3.1; Bio-Rad Laboratories) was used to analyze the PCR products.

Electrophoresis and Western Blotting

MCF-7 cells were plated in 75 cm² flasks at 2×10^5 cells/flask and exposed to alcohol. At the end of the treatment, they were washed twice with cold PBS and collected in extracting buffer containing 50 mM Tris, 10 mM DTT, pH 6.8, 2% SDS, and 10% glycerol. After heating (100°C, 5 min), an aliquot was used for protein concentration determination using the RC-DC reagent (Bio-Rad Laboratories). For each sample, 50 µg of total proteins was separated by 10% SDS-PAGE. Separated proteins were subjected to Western blot analysis as previously reported.²⁰ ERα was detected using the monoclonal antibody F-10 (SC-8002; Santa Cruz Biotechnology).

Statistical Analysis

The results are expressed as means ± SEM of several experiments as indicated in the text. Data were compared by means of a Student's *t*-test.

RESULTS

Cell Proliferation of Alcohol-treated MCF-7 Cells

Relative cell proliferation was measured after 6 days of exposure to the different alcohols and compared with that in untreated control cells (FIG. 1). When MCF-7 cells were grown in the presence of 0.1% ethanol, a significant increase in cell proliferation (28%) was observed ($P < 0.05$). In contrast, in the presence of the same concentration of either methanol or butanol, we measured significant decreases in the proliferation rate in comparison with control cells of 15% and 38%, respectively ($P < 0.05$).

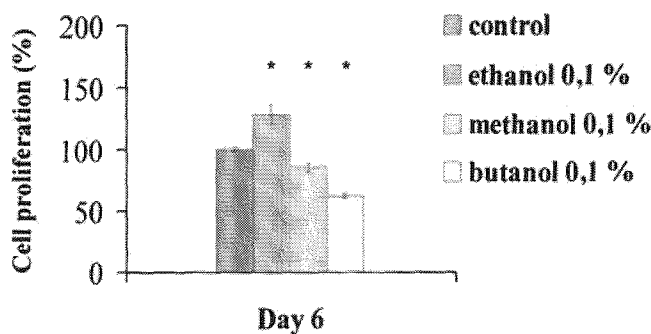


FIGURE 1. Effects of different alcohols on the proliferation of MCF-7 cells. After 6 days of treatment, cell numbers were evaluated using the CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay. Results are given as means ± SEM of three different counts. * Significantly different from untreated control (Student's *t*-test, $P < 0.05$).

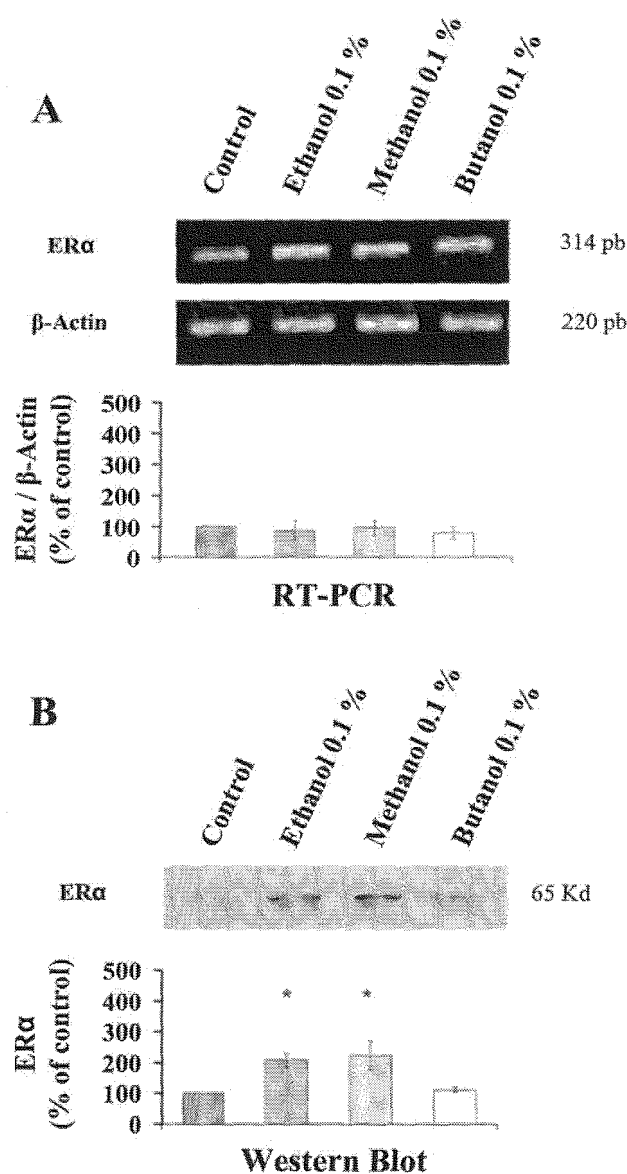


FIGURE 2. Expression of ERα in control versus alcohol-treated MCF-7 cells (0.1% for 6 days). **(A)** mRNA analysis. The gels at top show the result of a representative RT-PCR experiment; the graph at bottom shows the result of the semiquantitative analysis performed on six different experiments. The 314-bp amplified ERα product was quantified by densitometry and expressed relative to the control gene, β-actin. **(B)** Protein analysis. The gel at top shows the result of a typical Western blot; the graph at bottom shows the result of the semiquantitative analysis performed on three different experiments. ERα is expressed as a percentage of control. * Significantly different from control (Student's *t*-test, $P < 0.05$).

ER α and Aromatase Expression in Alcohol-treated MCF-7 Cells

Next, we investigated the molecular mechanisms underlying this enhanced cell proliferation. MCF-7 cells were incubated in alcohol-containing medium (0.1%), and after 6 days of treatment the cells were harvested for mRNA and protein analysis. Semiquantitative RT-PCR analyses of ER α mRNA content did not reveal a significant increase regardless of the alcohol used (Fig. 2A). Western blot studies showed a significant increase in the ER α protein level both in ethanol-treated (2-fold) and methanol-treated (1.8-fold) cells compared with controls ($P < 0.05$) (Fig. 2B). On the contrary, no significant change was observed in the presence of butanol.

To determine whether, like ethanol, other short-chain aliphatic alcohols could stimulate aromatase expression, semiquantitative RT-PCR studies were performed. We observed a 2.2-fold increase in aromatase mRNA level in MCF-7 cells grown for 6 days in the presence of 0.1% ethanol ($P < 0.05$) (Fig. 3). Neither methanol nor butanol induced a significant change in aromatase mRNA level (1.2- and 0.75-fold, respectively).

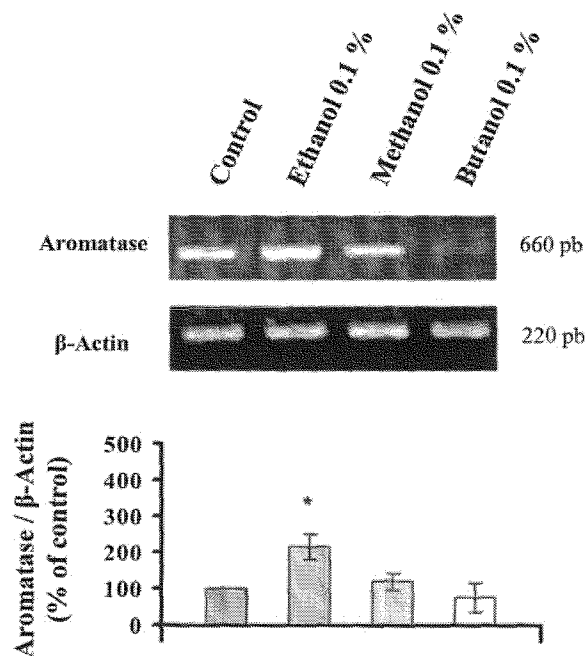


FIGURE 3. Expression of P450-aromatase mRNA in control versus alcohol-treated MCF-7 cells (0.1% for 6 days). The gels at top show the result of a representative RT-PCR experiment; the graph at bottom shows the result of the semiquantitative analysis performed on two different experiments. The 660-bp amplified aromatase product was quantified by densitometry and expressed relative to β -actin. The results were then expressed as a percentage of control. * Significantly different from control (Student's t -test, $P < 0.05$).

DISCUSSION

Alcohol consumption is associated with an increased risk for breast carcinogenesis, although the underlying mechanisms are not completely understood.⁸⁻¹¹ An increase in the proliferation rate is observed when ER-positive breast cancer cells are exposed to ethanol-containing medium, whereas no effect was obtained with ER-negative breast cancer cells.¹²⁻¹⁴ The level of ER α is higher in ethanol-treated MCF-7 cells grown in the presence of ethanol.^{13,15} Moreover, alcohol intake has been associated with an increased level of circulating estrogens.¹⁷⁻¹⁹ We recently reported an increase in aromatase expression after ethanol treatment of MCF-7 cells.¹⁵

The present study was performed to determine if these effects of ethanol on MCF-7 breast cancer cells could be mimicked by other short-chain aliphatic alcohols such as methanol or 1-butanol. Such a comparison is interesting from a molecular point of view to understand the *in vitro* effects of these compounds. The interest from an epidemiologic point of view is lower because the chronic consumption of either methanol or butanol will never be as high as that of ethanol. Nevertheless, it should be kept in mind that methanol is a common adulterant in liquor in developing countries and that both methanol and butanol are used as solvents for fats, waxes, and resins in industry; consequently, even if it is moderate, an exposure to these molecules could play a part in breast cancer.²¹

Regarding MCF-7 proliferation, an increase was observed after 6 days of culture in the presence of 0.1% ethanol, whereas a decrease was observed in the presence of the same concentration of either methanol or butanol. This does not seem to be the result of a toxic effect of these two compounds, because using trypan blue we did not observe a higher level of cell membrane permeabilization in cultures tested in the presence of 0.1% methanol than in the two other conditions (data not shown). Moreover, in several toxicological studies, these three compounds were shown to have increasing effects according to their hydrophobicity. For instance, the study of lactate dehydrogenase release, which indicates a disruption of membrane integrity, revealed a positive and linear correlation with hydrophobicity (butanol > ethanol > methanol).²² Additionally, the ability to induce heat shock protein (HSP) synthesis, which is an indicator of toxicity, was also correlated with the lipophilicity of these alcohols.²³

When we looked at the expression of ER α content, significant changes at the mRNA level were observed with none of the three alcohols tested. However, at the protein level, the significant increase previously reported in ethanol treatment was also observed on Western blots of methanol-treated MCF-7 cells but not of butanol-treated cells. It is surprising that in methanol-treated cells the increase in ER α expression is not associated with a stimulation of cell proliferation, since ethanol-induced proliferation seems to be related to ER signaling in breast cancer cells.^{13,16}

Finally, the increase in aromatase expression that we observed after ethanol exposure was reproduced by neither methanol nor butanol. This result reinforces the idea that the increase in the expression of the estrogen-producing enzyme aromatase could be a key event for ER-positive breast cancer cell proliferation, as suggested by the fact that ethanol does not stimulate the proliferation of ER-negative cell lines.¹³

How could the ethanol-induced increase in aromatase expression be explained? It has been reported that promoters I.3 and II are the two major promoters directing aromatase expression in breast cancer cells.²⁴ Both of these promoters are sensitive to cAMP.^{25,26} The reason for the enhanced expression of P450 aromatase might be

an increase in cAMP amount, which has already been shown to occur after ethanol treatment of MCF-7 cells.¹³ In addition, it might be interesting to analyze cyclooxygenases. Indeed, these enzymes catalyze the conversion of arachidonic acid to prostanooids, which exert their biological action via their G protein-coupled receptors on the cell surface and by signaling through elevation of intracellular cAMP.²⁷ Interestingly, ethanol has been shown to induce an increase in cyclooxygenase activity as well as prostaglandin E₂ production in other models.^{28,29}

To conclude, this study supports data suggesting that ethanol is an increased risk factor for breast cancer, showing the impact of ethanol on the estrogen signaling pathway and indicating the involvement of P450-aromatase. The understanding of the signaling pathway that is activated by ethanol in breast cancer cells might be of interest for breast cancer therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

These studies were supported by grants from the Université Henri Poincaré, the Ligue Contre le Cancer, comités de la Meurthe et Moselle, de la Meuse et des Vosges, the Association pour la Recherche sur le Cancer, and the Conseil Régional de Lorraine. N.E. is recipient of a grant of the Ligue Contre le Cancer, comité de la Meurthe et Moselle. We thank Nicolas Atrux-Tallau for his participation in this work and Martine Callier for technical assistance in molecular biology.

REFERENCES

1. SASCO, A.J. 2003. Breast cancer and the environment. *Horm. Res.* **60**(Suppl. 3): 50.
2. WEICHELBAUM, R.R., S. HELLMAN, A.J. PIRO, *et al.* 1978. Proliferation kinetics of a human breast cancer line in vitro following treatment with 17 β -estradiol and 1- β -D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.* **38**: 2339–2342.
3. REDDEL, R.R. & R.L. SUTHERLAND. 1984. Tamoxifen stimulation of human breast cancer cell proliferation in vitro: a possible model for tamoxifen tumour flare. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **20**: 1419–1424.
4. LYKKESFELDT, A.E. & P. BRIAND. 1986. Indirect mechanism of oestradiol stimulation of cell proliferation of human breast cancer cell lines. *Br. J. Cancer* **53**: 29–35.
5. KIRMA, N., K. GILL, U. MANDAVA, *et al.* 2001. Overexpression of aromatase leads to hyperplasia and changes in the expression of genes involved in apoptosis, cell cycle, growth, and tumor suppressor functions in the mammary glands of transgenic mice. *Cancer Res.* **61**: 1910–1918.
6. LIPPMAN, M.E. & R.B. DICKSON. 1989. Mechanisms of growth control in normal and malignant breast epithelium. *Recent Prog. Horm. Res.* **45**: 383–435.
7. CHEN, S., T. ITOH, K. WU, *et al.* 2002. Transcriptional regulation of aromatase expression in human breast tissue. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **83**: 93–99.
8. LONGNECKER, M.P. 1994. Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review. *Cancer Causes Control* **5**: 73–82.
9. HANKINSON, S.E., W.C. WILLETT, J.E. MANSON, *et al.* 1995. Alcohol, height, and adiposity in relation to estrogen and prolactin levels in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**: 1297–1302.
10. WOLFF, M.S. & A. WESTON. 1997. Breast cancer risk and environmental exposures. *Environ. Health Perspect.* **105**: 891–896.
11. ARONSON, K. 2003. Alcohol: a recently identified risk factor for breast cancer. *CMAJ* **168**: 1147–1148.
12. PRZYLIPIAK, A., T. RABE, J. HAFNER, *et al.* 1996. Influence of ethanol on in vitro growth of human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Arch. Gynecol. Obstet.* **258**: 137–140.

13. SINGLETARY, K.W., R.S. FREY & W. YAN. 2001. Effect of ethanol on proliferation and estrogen receptor- α expression in human breast cancer cells. *Cancer Lett.* **165**: 131–137.
14. IZEVBIGIE, E.B., S.I. EKUNWE, J. JORDAN, *et al.* 2002. Ethanol modulates the growth of human breast cancer cells in vitro. *Exp. Biol. Med.* **227**: 260–265.
15. ETIQUE, N., D. CHARDARD, A. CHESNEL, *et al.* 2004. Ethanol stimulates proliferation, ER α and aromatase expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* **13**: 149–155.
16. FAN, S., Q. MENG, B. GAO, *et al.* 2000. Alcohol stimulates estrogen receptor signaling in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* **60**: 5635–5639.
17. REICHMAN, M.E., J.T. JUDD, C. LONGCOPE, *et al.* 1993. Effects of alcohol consumption on plasma and urinary hormone concentrations in premenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**: 722–727.
18. GINSBURG, E.S., N.K. MELLO, J.H. MENDELSON, *et al.* 1996. Effects of alcohol ingestion on estrogens in postmenopausal women. *J. Am. Med. Assoc.* **276**: 1747–1751.
19. DORGAN, J.F., D.J. BAER, P.S. ALBERT, *et al.* 2001. Serum hormones and the alcohol-breast cancer association in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**: 710–715.
20. BODART, J.F., D. BECHARD, M. BERTOUT, *et al.* 1999. Inhibition of protein tyrosine phosphatases blocks calcium-induced activation of metaphase II-arrested oocytes of *Xenopus laevis*. *FEBS Lett.* **457**: 175–178.
21. WINDHOLZ, M., S. BUDAVARI, L.Y. STROUMTSOS, *et al.*, Eds. 1976. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Ninth edition. Merck. Rahway, NJ.
22. MCKARNS, S.C., C. HANSCH, W.S. CALDWELL, *et al.* 1997. Correlation between hydrophobicity of short-chain aliphatic alcohols and their ability to alter plasma membrane integrity. *Fundam. Appl. Toxicol.* **36**: 62–70.
23. NEUHAUS-STEINMETZ, U. & L. RENSING. 1997. Heat shock protein induction by certain chemical stressors is correlated with their cytotoxicity, lipophilicity and protein-denaturing capacity. *Toxicology.* **123**: 185–195.
24. CHEN, S., T. ITOH, K. WU, *et al.* 2002. Transcriptional regulation of aromatase expression in human breast tissue. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **83**: 93–99.
25. MICHAEL, M.D., L.F. MICHAEL & E.R. SIMPSON. 1997. A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* **134**: 147–156.
26. HARADA, N. 1997. Aberrant expression of aromatase in breast cancer tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **61**: 175–184.
27. REGAN, J.W. 2003. EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Sci.* **74**: 143–153.
28. LUO, J., C.L. LINDSTROM, A. DONAHUE, *et al.* 2001. Differential effects of ethanol on the expression of cyclo-oxygenase in cultured cortical astrocytes and neurons. *J. Neurochem.* **76**: 1354–1363.
29. SIMONYI, A., D. WOODS, A.Y. SUN, *et al.* 2002. Grape polyphenols inhibit chronic ethanol-induced COX-2 mRNA expression in rat brain. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **26**: 352–357.

2. ETHANOL ET POTENTIEL METASTATIQUE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES

Ethanol stimulates the secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in MCF-7 human breast cancer cells. Nicolas ETIQUE, Isabelle GRILLIER-VUISSOZ and Stéphane FLAMENT. Oncology Reports. 2006, 15(3):603-608.

2.1. Introduction

Outre une augmentation de l'incidence du cancer du sein, la consommation d'alcool est associée à des tumeurs mammaires invasives (Vaeth et Satariano, 1998; Stoll, 1999). De telles observations suggèrent que l'alcool pourrait à la fois favoriser le développement de la tumeur et la dissémination métastatique des cellules cancéreuses. De nombreuses analyses expérimentales réalisées *in vitro* et *in vivo* confirment cette idée (Yirminia *et al.*, 1992; Meng *et al.*, 2000; Luo et Miller, 2000). Nos résultats montrant une stimulation par l'éthanol de la prolifération obtenus dans des conditions de culture indépendantes de l'ancrage vont aussi dans ce sens (Etique *et al.*, 2004a). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont que partiellement connus.

L'invasion et la formation de métastases requièrent notamment la dégradation de la matrice extracellulaire et particulièrement le passage au travers de la lame basale. Cette dégradation nécessite l'intervention d'enzymes protéolytiques telles que les métalloprotéases (Nakajima *et al.*, 1987; Tryggvason *et al.*, 1987). Cette famille d'enzymes est composée de 19 membres dont les métalloprotéases 2 et 9 (MMP-2 et MMP-9) décrites comme essentielles dans la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion des cellules tumorales mammaires (Nakajima *et al.*, 1987; Tryggvason *et al.*, 1987; Egelblad et Werb, 2002).

Des études révèlent que la sécrétion des MMP-2 et -9, par les cellules cancéreuses mammaires, peut être stimulée par les œstrogènes (Wolczynski *et al.*, 2001; Mitropoulo *et al.*, 2003). A l'inverse, les anti-œstrogènes sont capables d'inhiber la sécrétion de MMP-9 (Abbas Abidi *et al.*, 1997; Wolczynski *et al.*, 2001). Nos précédents travaux montrant une surexpression de l'aromatase et de l'ER α en présence d'éthanol dans les cellules MCF-7 suggèrent que l'éthanol est capable d'activer la voie de signalisation des œstrogènes (Etique *et al.*, 2004a). Ainsi nous pensons que l'éthanol pourrait stimuler la sécrétion des

métalloprotéases 2 et 9 par les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et ainsi augmenter leur potentiel métastatique.

2.2. Principaux résultats

Dans un premier temps nous avons étudié l'effet de l'E₂ (1 nM) et de l'éthanol à différentes concentrations (0,1, 0,3, 0,5 et 0,7 %) sur la sécrétion des MMP-2 et -9 dans les cellules MCF-7. Les expériences ont été réalisées après 24 heures de traitement et en absence de sérum de veau fœtal car celui-ci contient des métalloprotéases pouvant fausser les résultats. Les zymographies en gélatine montrent que l'éthanol à 0,3 et 0,5 % augmente significativement la sécrétion des deux métalloprotéases. La sécrétion de MMP-9 est maximale en présence de 0,3 % d'éthanol ($\times 1,3$ fois) tandis que celle de MMP-2 est maximale pour une concentration de 0,5% d'éthanol ($\times 1,9$ fois). L'E₂ augmente également significativement la sécrétion des 2 enzymes ($\times 1,4$ et $\times 1,8$ fois respectivement).

Notre hypothèse étant que l'éthanol stimule la sécrétion de MMP-2 et -9 par activation de la voie de signalisation des œstrogènes, nous avons utilisé un antiœstrogène : l'ICI 182,780. La concentration optimale d'utilisation a été déterminée par l'étude de l'expression du PR (récepteur à la progestérone), un gène cible de l'E₂. Elle est de 100 nM conformément à la littérature (De Cremoux *et al.*, 2003). Utilisé à cette concentration, l'ICI 182,780 est capable d'inhiber significativement la sécrétion des MMP-2 et -9 induite par l'E₂ et celle de MMP-9 induite par l'éthanol. En revanche cet inhibiteur n'a aucun effet sur la sécrétion de MMP-2 induite par l'éthanol.

Afin de mieux caractériser les effets de l'éthanol sur MMP-2 et -9, nous avons également étudié le taux d'ARNm de ces 2 enzymes par RT-PCR semi-quantitative. Le taux d'ARNm de MMP-9 n'est affecté ni par l'E₂ ni par l'éthanol à 0,3 et 0,5%. L'E₂ n'a également aucun effet sur l'expression de MMP-2. En revanche l'éthanol stimule significativement l'expression de cette enzyme et ce d'environ 2 fois.

2.3. Conclusion

Ces travaux nous ont permis de démontrer que l'éthanol était capable de stimuler la sécrétion des métalloprotéases-2 et -9 dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7.

Dans le cas de MMP-9, cette stimulation passe par l'activation de l'ER α car elle est inhibée par l'antiestrogène : ICI 182,780. Par ailleurs, les analyses du taux d'ARNm montrent que ni l'éthanol ni l'E₂ n'ont d'effet sur l'expression du gène codant MMP-9 suggérant une action post-transcriptionnelle de ces 2 composés.

En ce qui concerne la stimulation de MMP-2, l'ER α ne semble pas être impliqué puisque l'ICI 182,780 n'a aucun effet. Les analyses du taux d'ARNm montrent contrairement à MMP-9 une stimulation de la transcription du gène. Ce résultat confirme l'implication de mécanismes moléculaires différents dans la stimulation de la sécrétion de MMP-2 et MMP-9 par l'éthanol. Il suggère en outre que l'action de l'éthanol sur MMP-2 a probablement lieu au niveau transcriptionnel.

L'ensemble de ces travaux permet d'expliquer, en partie, la stimulation de l'invasion et de la migration des cellules cancéreuses mammaires observée en réponse à un traitement à l'éthanol. Certes, les mécanismes moléculaires concernant la stimulation de l'expression et de la sécrétion de MMP-2 par l'éthanol restent à élucider, mais nous savons désormais que l'éthanol stimule la sécrétion de MMP-9 via le récepteur alpha aux œstrogènes. De plus, cette stimulation a lieu dans un milieu sans sérum et donc dépourvu d'hormones stéroïdes suggérant une activation ligand-indépendante du récepteur.

Ethanol stimulates the secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in MCF-7 human breast cancer cells

NICOLAS ETIQUE, ISABELLE GRILLIER-VUISSOZ and STEPHANE FLAMENT

EA 3442 Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Reproduction et du Développement,
Université Henri Poincaré - Nancy I, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Received August 1, 2005; Accepted September 19, 2005

Abstract. Alcohol consumption is a well-established risk factor for hormone-dependent breast cancer. *In vitro* studies performed to understand the mechanisms by which ethanol acts on breast cancer cells have shown that this compound stimulates both proliferation and migration. In the present study, we show by gelatin zymography that, when exposed to ethanol, MCF-7 human breast cancer cells display a higher amount of active metalloproteinases (MMP) 2 and 9 in their culture medium. This increase is somewhat higher than those observed in the case of 17 β -estradiol (E₂) exposure. As expected, anti-estrogen ICI 182,780 inhibits the E₂-induced overexpression of a well-known estrogen responsive gene, the progesterone receptor, in MCF-7 cells. ICI 182,780 also inhibits the E₂-induced increase in MMP-2 and -9 secretion. Nevertheless, in the case of ethanol exposure, this ER antagonist was only efficient on MMP-9 secretion. In addition, although MMP-9 transcription was not sensitive to E₂ or ethanol, MMP-2 transcription was stimulated in MCF-7 cells exposed to ethanol. Collectively, these results give new insights into the effects of alcohol on breast cancer cell migration, which are not due solely to an estrogen-like activity of alcohol.

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women: it affects 1 in 12 women in the world and, in 2004, approximately 753,000 women were dying in Europe from this disease (1). Seventy percent of human breast cancers are related to sex hormone exposure and about 60% of all patients have hormone-dependent breast cancer which means that their tumors express estrogen receptors (ER) and require estrogens

for growth (2-4). Most of the effects of these hormones on tumor development are mediated by their nuclear receptor, ER α , which induces a cascade of events leading to the transcription of estrogen responsive genes. In post-menopausal women, the concentration of estrogens in breast tumor tissue is several-fold greater than those measured in plasma (5). This is related to the fact that the expression of aromatase (CYP 19), the cytochrome P₄₅₀ responsible for estrogen synthesis, is increased in breast tumors (6).

Epidemiological studies have shown that chronic abuse of alcohol not only increases significantly the incidence of breast cancer but also is associated with advanced and invasive breast tumors, suggesting that alcohol may enhance tumor development and metastatic spread (7,8). These data are supported by experimental studies using animal models and cell culture systems, which show that ethanol promotes mammary tumorigenesis and stimulates proliferation as well as invasion of breast cancer cells (9-14).

Invasion and metastasis are the major causes of morbidity and mortality in breast cancer patients. They require the degradation of the extracellular matrix (ECM) and particularly the basement membrane, which acts as a barrier to tumor cell passage. This complex matrix consists of a type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, nidogen and fibronectin (15). The degradation of the extracellular matrix by neoplastic cells involves a cascade of proteolytic enzymes (16). Secretion of metalloproteinases, serine proteases and cathepsins appears to mediate this process. Among the members of the matrix metalloproteinase (MMP) family, gelatinase A (72 kDa gelatinase, type IV collagenase, MMP-2) and B (92 kDa gelatinase, type IV collagenase, MMP-9) play a critical role in extracellular matrix degradation and tumor cell invasion in breast cancer (15,17).

A few studies show that estrogens play a key role in metastatic process since 17 β -estradiol stimulates the secretion of the type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in breast cancer cells (18,19). Moreover, expression of MMP-9 in MCF-7 cells is inhibited by anti-estrogens (19,20). Recently, we have shown in ER-positive breast cancer cells MCF-7, that ethanol enhanced cell proliferation and clonal growth (14). This result is associated with an increase in ER α and aromatase, suggesting that the estrogen signaling pathway is stimulated by ethanol (14,21). Hence, we postulated that alcohol exposure could increase the expression/activity of MMP-2 and -9 and promote metastasis.

Correspondence to: Professor Stephane Flament, Université Henri Poincaré-Nancy I, Faculté des Sciences, EA3442, Entrée 1B - 9ème étage, Boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France
E-mail: stephane.flament@persmail.uhp-nancy.fr

Key words: breast cancer, ethanol, metalloproteinases, estrogen receptor

The results of the present work show that MMP-2 and -9 secretion is increased in ethanol-treated MCF-7 breast cancer cells, but this effect cannot be ascribed to a strict estrogen-like action of ethanol.

Materials and methods

Materials. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), L-glutamine and 17 β -estradiol (E_2) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and FCS from Eurobio (Les Ulis, France). ICI 182,780 was purchased from Tocris Cookson (Bristol, UK).

Cell culture and treatment. The MCF-7 (HTB 22; human breast adenocarcinoma, ER-positive) cell line was obtained from American Tissue Culture Collection (Rockville, MD). Cells were routinely grown at 37°C in a 5% (v/v) CO₂ humidified atmosphere. They were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine.

For RT-PCR analyses, cells were seeded in 6-well plates at a density of 8x10⁴ cells/well in 2 ml of DMEM supplemented with 5% FCS and 2 mM L-glutamine. After 24 h of incubation to allow for cell attachment, the medium was replaced with phenol-red free DMEM supplemented with 1% FCS and 2 mM L-glutamine. After 24 h, the medium was replaced with fresh medium supplemented with ethanol at different concentrations (0.0, 0.1, 0.3, 0.5 or 0.7%) and/or various compounds.

For gelatin zymography analyses, cells were seeded in 6-well plates at a density of 8x10⁴ cells/well in 2 ml of DMEM supplemented with 5% FCS and 2 mM L-glutamine. After 3 days of culture, this medium was removed, the cells were washed with PBS and incubated with 1 ml of phenol-red free DMEM without FCS but with 2 mM L-glutamine and different concentrations of ethanol (0, 0.1, 0.3, 0.5 or 0.7%) and/or various compounds.

Semi-quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized in a 20 μ l volume containing 2 μ g RNA, 1.5 μ g random hexamer primer, 1X Invitrogen buffer, 7.5 mM DTT, 0.6 mM of each dNTP, 4 U RNase inhibitor, and 100 U of MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The mixture was incubated for 120 min at 37°C and subsequently for 5 min at 94°C in order to stop the reaction.

The cDNAs were further amplified by PCR. The specific primers were 5'-TGCTCAAGGAGGGCCTGCCGACAGGT-3' and 5'-CTACTGAAAGAAGTTGCCTCTCGCC-3' for progesterone receptor (22), 5'-GTGCTGAAGGACACACTAAAGAAGA-3' and 5'-TTGCCATCCTTCTCAAAGTTGTAGG-3' for MMP-2 (23), 5'-CACTGTCCACCCCTCAGAGC-3' and 5'-GCCACTTGTTCGGCGATAAAGG-3' for MMP-9 (23) and 5'-TACATGGGTGGGGTGTGTGAA-3' and 5'-AAGAGAGGCATCCTCACCT-3' for β -actin (14). PCR was carried out in a thermal cycler in a final volume of 25 μ l containing 2 μ l cDNA, 1X Eppendorf Taq buffer, 0.5X Eppendorf Taq Master, 1.5-2.5 mM MgCl₂, 125 μ M of each dNTP, 0.33 μ M of each primer, and 0.5 U Taq polymerase (Eppendorf, Le Pecq, France). Negative controls were always included.

Amplification was carried out under the following conditions: 94°C for 5 min, 25-40 1-min cycles at 94°C, 1 min at 54-65°C, and 1 min at 68°C, followed by a 10-min extension step at 68°C. The PCR products (25 μ l) were mixed with loading buffer (3 μ l) and submitted to electrophoresis in a 2% agarose gel at 90 V for 60 min at room temperature. The gel was stained with ethidium bromide, viewed and photographed on a UV-transilluminator (GelDoc 2000, Bio-Rad Laboratories). A software package (Quantity One v.4.3.1, Bio-Rad Laboratories) was used to quantify the PCR products.

Gelatin zymography. The media were collected and centrifuged at 1,500 x g for 10 min. Supernatant proteins were precipitated for 2 h at 4°C with a 70% ammonium sulphate solution. They were centrifuged at 12,000 x g for 10 min and solubilized in 40 μ l of phenol-red free DMEM. Each sample was mixed with 15 μ l of a loading buffer (Tris-Base) containing 30% glycerol, 7.7% sodium dodecyl sulphate (SDS) and 0.3% bromophenol blue at pH 6.8. Samples were loaded in a 10% polyacrylamide-SDS gel containing 0.1% gelatin and were electrophoresed in a mini Protean II Dual slab cell (Bio-Rad) at 100 V for 2 h. Following electrophoresis, gels were washed twice for 90 min with 2.5% Triton X-100 in Tris-buffered saline (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) to remove SDS. Gels were then incubated for 36 h at 37°C in catalytic buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM CaCl₂) and stained in 0.025% Coomassie blue in methanol:acetic acid:water (10:1:10 v:v:v) for 2 h. Finally, gels were destained with methanol:acetic acid:water (2:1:10 v:v:v) for 24 h. Proteolytic activity appeared as clear bands on a dark blue background. The bands were identified by their molecular weight: 72 and 92 kDa corresponding to MMP-2 and -9, respectively. Proteolytic activity was evaluated using a GelDoc 2000 imaging system (Bio-Rad Laboratories) and a software package (Quantity One v.4.3.1).

Statistical analysis. The results are expressed as mean $\pm$ standard error of several experiments as indicated in the text. Differences among treatment groups were tested using analysis of variance (ANOVA). Differences in which the P-value was <0.05 were statistically significant. In cases where significant differences were detected, specific post-hoc comparisons between treatment groups were examined using Fisher's least-significant differences test (SPSS v11.0 computer software).

Results

Ethanol and E_2 increase MMP-2 and -9 secretion in MCF-7.

We evaluated the effect of ethanol and E_2 on the levels of MMP-2 and -9 of MCF-7 human breast cancer cells. Different concentrations of ethanol (0.1, 0.3, 0.5 and 0.7%) and E_2 (1 nM) were tested. Cells were incubated with ethanol or E_2 for 24 h and the culture medium was analyzed by gelatin zymography. At concentrations of 0.3 and 0.5%, ethanol significantly increased the amounts of MMP-9 and -2 (Fig. 1). MMP-9 maximal secretion was observed for ethanol 0.3% with a 1.6-fold increase compared to control ($P < 0.05$) and MMP-2 maximal secretion was observed for ethanol 0.5% with a 1.9-fold increase compared to control ($P < 0.05$). Like ethanol,

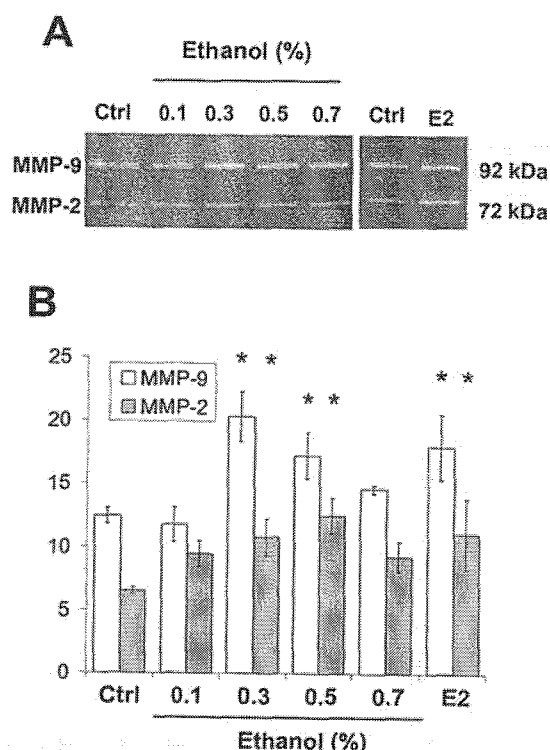


Figure 1. Ethanol and E_2 stimulate MMP-2 and -9 secretion in MCF-7 human breast cancer cells. A representative zymographic gel (A) shows that MMP-2 and -9 secretion is increased when MCF-7 cells are treated for 24 h with various concentrations of ethanol (0.1-0.7%) or E_2 (1 nM). Clear bands represent collagenases MMP-2 and -9 and were quantified by densitometry. Analysis of 5 independent experiments is represented on the histogram (B). Error bars represent standard deviations. *Significantly different from untreated control ($P<0.05$).

E_2 significantly stimulates the secretion of MMP-2 and -9 by MCF-7 breast cancer cells (1.8- and 1.4-fold respectively).

Involvement of the estrogen signaling pathway. Previous studies have shown that ethanol stimulates the estrogen signaling pathway in MCF-7 human breast cancer cells (14,21). Hence, we postulated that the effect of ethanol on the MMP level was dependent on the estrogen signaling pathway. To test this hypothesis, we used an anti-estrogen; the 'pure' antagonist, ICI 182,780 (24).

First, we determined the concentration of ICI 182,780 able to block the estrogen signaling pathway in MCF-7 cells. We analyzed, by semi-quantitative RT-PCR, the expression of a well-known estrogen responsive gene, the progesterone receptor (PR) (25). MCF-7 cells were treated by E_2 (1 nM) in the presence of different concentrations of ICI 182,780 (1, 10 and 100 nM). We observed a dose-dependent inhibition of E_2 -induced PR overexpression with maximum efficiency at the concentration of 100 nM ICI 182,780 (Fig. 2A).

Then, we determined if this optimal concentration of ICI 182,780 could inhibit E_2 - and ethanol-induced increase in MMP secretion. Results showed that ICI 182,780 inhibits significantly the increase in MMP-9 (Fig. 2B) and -2 (Fig. 2C) secretions that is observed when MCF-7 cells are stimulated by E_2 (1 nM). ICI 182,780 has the same effect on MMP-9 secretion induced by ethanol (0.3% or 0.5%) (Fig. 2B). In

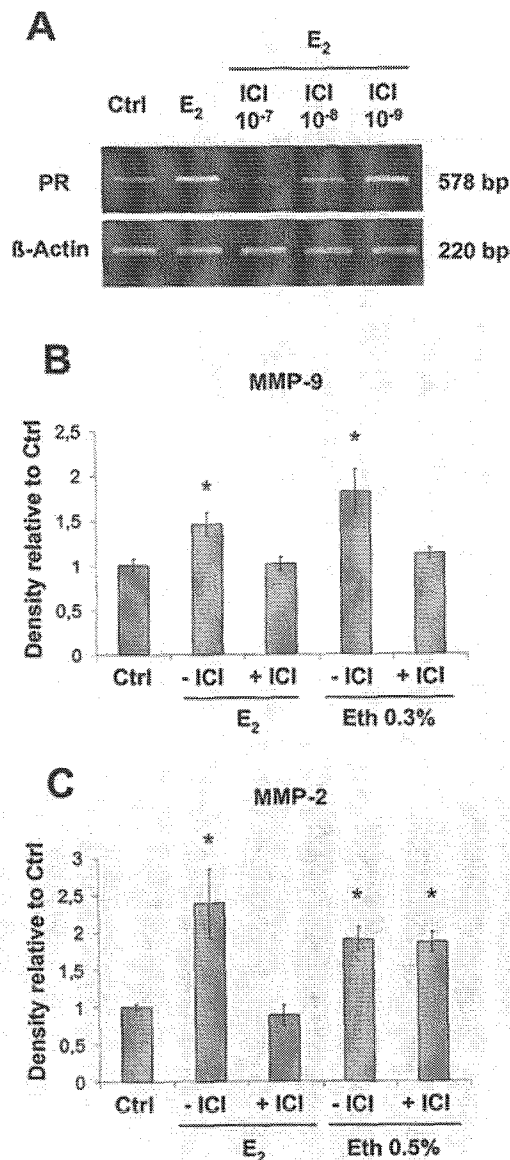


Figure 2. The 'pure' anti-estrogen, ICI 182,780, inhibits ethanol-induced increase in MMP-9 secretion whereas MMP-2 secretion still increases. (A) Representative gel of a RT-PCR analysis showing that 10^{-7} M ICI inhibits PR overexpression that is usually observed after 24-h 17β -estradiol treatment (1 nM) of MCF-7 cells. When used at the same concentration, ICI 182,780 affects the E_2 -induced increase in MMP secretion and ethanol-induced increase in MMP-9 secretion. Results of the semi-quantitative analysis performed on 3 independent experiments are shown for MMP-9 (B) and -2 (C). *Significantly different from untreated control ($P<0.05$).

contrast, ICI 182,780 did not affect the ethanol-induced increase in MMP-2 secretion (Fig. 2C).

Ethanol stimulates MMP-2 transcription in MCF-7 cells. Finally, in order to better characterize the effect of ethanol on MMP-2 and -9 in MCF-7 cells, we analysed their mRNAs. The results of our RT-PCR studies showed that E_2 (1 nM) does not affect the transcription of these MMPs (Fig. 3). So, E_2 stimulates MMP-2 and MMP-9 secretion without increasing their transcription. For ethanol treatment, we observed no effect on MMP-9 transcription but a high increase in the MMP-2 mRNA level, demonstrating that MMP-2 expression is not affected identically by ethanol and E_2 .

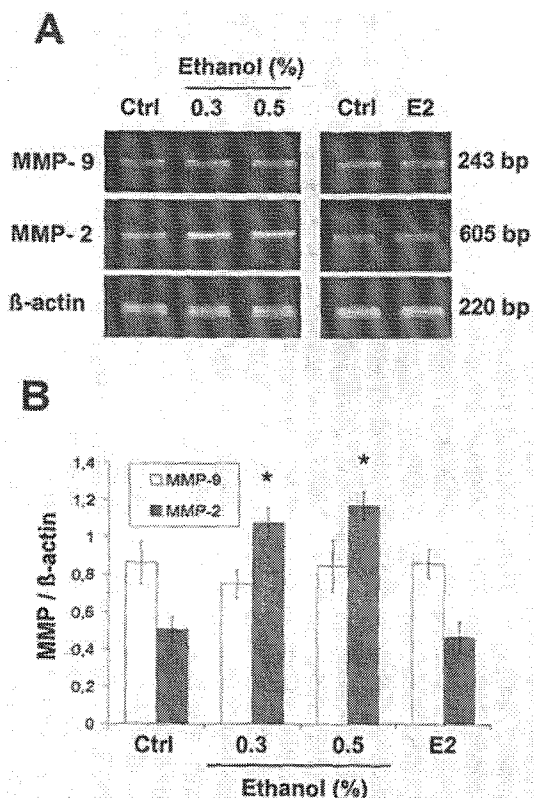


Figure 3. Ethanol stimulates MMP-2 transcription in MCF-7 human breast cancer cells. A representative gel of an RT-PCR experiment (A) shows that only MMP-2 expression is increased when MCF-7 cells are treated for 24 h with ethanol (0.3 and 0.5%). Results of the semi-quantitative analysis of 4 independent experiments are shown in the histogram (B). Error bars represent standard deviations. *Significantly different from untreated control ($P < 0.05$).

Discussion

More and more epidemiological studies show that alcohol consumption is associated with an increased risk factor for breast carcinogenesis (26-28) and with advanced and invasive breast tumors (7,8). These epidemiological data suggest that ethanol may enhance tumor development and the metastatic spread of breast cancer cells. This is confirmed by *in vitro* and *in vivo* studies showing that ethanol stimulates not only proliferation but also invasion and migration of breast cancer cells (9-14). Many studies have been realized in order to elucidate these effects. In MCF-7 cells, ethanol down-regulates the expression of E-cadherin and three major catenin, proteins responsible for the maintenance of cell adhesion and tissue integrity (11). In T47D human breast cancer cells, ethanol promotes metastasis by up-regulating the activity of erbB receptors (12). For our part, we have postulated that an increase in metalloproteinase expression could be involved in the stimulation of migration observed in breast cancer cells following ethanol exposure. Indeed, it has been recently shown in fibroblasts that ethanol stimulates the secretion of MMP-2 (29), which plays a critical role, together with MMP-9, in extracellular matrix degradation and tumor cell invasion in breast cancer (15,17). Moreover, ethanol activates the estrogen signaling pathway in breast cancer cells (14,21), and some studies show that estrogens are able to stimulate the secretion of MMP-2 and -9 (18,19).

By using gelatin zymography, we observed an increase in MMP-2 and -9 secretion in MCF-7 cells following ethanol exposure. For MMP-9, the maximal secretion was observed at a dose of 0.3% ethanol with a 1.6-fold increase compared to control and, for MMP-2, the maximal secretion was observed at a concentration of 0.5% with a 1.9-fold increase compared to control. This increase is somewhat higher than those observed when MCF-7 cells are exposed to 1 nM 17 β -oestradiol: a 1.4-fold increase for MMP-9 secretion and a 1.8-fold increase for MMP-2. This suggests that ethanol could have a stronger metastatic potential than E₂.

How does ethanol stimulate metalloproteinase secretion? An explanation for this effect could be the activation of the estrogen signaling pathway in MCF-7 cells exposed to ethanol. Indeed, several studies have shown such an effect of ethanol. For instance, following ethanol exposure, an increase occurs in the expression of aromatase, the estrogen-producing enzyme, and in the ER α content, the nuclear receptor mediating most of the estradiol effects (14,30). Alcohol also induces a dose-dependent increase in the transcription activity of the liganded estrogen receptor, ER α (21). Also, estradiol has been shown to stimulate MMP-2 and -9 secretions in MCF-7 cells (18,19,31). The pathway by which E₂ enhances MMP secretion is still unclear. It might be the result not only of nuclear estrogen receptor activation but also of the rapid stimulation of signal transduction from plasma membrane estrogen receptors that are G protein-coupled (31).

In order to test our hypothesis, we used an anti-estrogen; the 'pure' antagonist, ICI 182,780 (24). We determined the optimal concentration by analyzing its effect on the expression of a well-known estrogen responsive gene, the progesterone receptor (PR) (25). The concentration of 100 nM had the best efficiency, which is in accordance with a previous study (32). We observed that this concentration could inhibit E₂-induced increase in the secretion of the two MMPs. This result is in agreement with those showing that, in MCF-7 cells, another anti-estrogen, raloxifene, prevents E₂-induced increase in the gelatinolytic activity of MMP-2 and -9 (19). It is also concordant with the results of another study showing that several anti-estrogens, including ICI 182,780, inhibit E₂-induced MMP-9 secretion in MCF-7 cells (20). However, it is difficult to identify the nature of the estrogen receptor that mediates estradiol action on MMP-2 and -9. Indeed, ICI 182,780 is able to antagonize E₂ binding not only on its nuclear receptors but also on its membrane bound receptors (31).

ICI 182,780 also prevented ethanol-induced increase in MMP-9 secretion, which could be the result of an estrogen-like action. However, ethanol stimulation was performed in serum-free medium which should contain only trace amounts of steroids. Although the level of both aromatase and ER α is increased in MCF-7 exposed to ethanol, it is probably insufficient to activate an estrogenic pathway in serum- and hormone-free conditions (14). One might propose that, in that case, a ligand-independent activation of ER α could occur. The phosphorylation of ER α by protein kinase A (PKA) has been well documented in this mechanism (33). Besides, forskolin-induced ER activation, measured by the transcription of a reporter gene downstream a 2-ERE sequence, is inhibited by ICI 182,780 (34). Interestingly, ethanol has been shown to increase cAMP levels in MCF-7 cells (30). Hence, in our

study, in spite of the absence of serum and steroids in the medium, ethanol exposure could induce a PKA-mediated activation of ER α which could activate the transcription of a gene responsible for MMP-9 secretion, explaining that this effect is inhibited by the anti-estrogen. It is noteworthy that, in the case of ligand-independent activation of ER α , its degradation by the proteasome is inhibited in contrast to what occurs in the case of ligand-dependent activation (34). In our previous study of ethanol-treated MCF-7 cells, we observed by immunoblotting that the level of ER α was increased while no difference in the mRNA levels was observed by RT-PCR (14). This is in accordance with the hypothesis of a ligand-independent activation.

In contrast, ICI 182,780 had no effect on ethanol-induced MMP-2 secretion suggesting that, in this case, ethanol could use an estrogen receptor independent pathway. Interestingly, a recent study shows that, in fibroblasts, ethanol increases MMP-2 secretion by the protein kinase C pathway (PKC) (29). Nevertheless, TPA, a PKC activator, stimulated the secretion of MMP-9 while it did not change the level of MMP-2 in MCF-7 cells and in organotypic cultures of human breast cancer tissue (35,36). Another explanation for ethanol-induced MMP-2 secretion might be related to free radicals. Indeed, in the hormone-independent breast cancer cells, MDA-MB-231, generation of free radicals by the estradiol metabolite, 4-hydroxyestradiol, activates MMP-2 (37). So, free radicals could mediate ethanol action, especially on MMP-2. Indeed, breast cytosolic fractions can bioactivate ethanol to acetaldehyde and to hydroxyl and 1-hydroxyethyl free radicals (38).

Finally, in order to better characterize the effect of ethanol on MMP-2 and -9 in MCF-7 cells, we have performed RT-PCR analyses. Our results show that E₂ stimulates neither MMP-2 nor MMP-9 transcription. So, the steroid activates MMPs secretion independently of their transcription.

In the case of ethanol exposure, the level of MMP-9 mRNA did not change while those of MMP-2 mRNA increased significantly. This differential effect is not surprising since, despite the high homology in amino acid sequence between MMP-2 and -9, their promoters are composed of different cis elements (39). Hence, they can not only respond to different stimuli but also respond differently to the same stimulus. For instance, in melanoma cells, transfection with CD9 membrane protein up-regulates the expression of MMP-2 while it down-regulates MMP-9 (40). The differential regulation of MMP-2 and -9 seems also to be illustrated in MCF-7 cells in response to ethanol. The reason for the ethanol induced increase in MMP-2 transcription, as well as the relationship between MMP-2 overexpression and the stimulation of its secretion, remains unknown.

In conclusion, our study showing an increase in MMP-2 and MMP-9 secretion by MCF-7 cells in response to ethanol helps to explain the increased migration of breast cancer cells observed in response to ethanol treatment and supports data suggesting that ethanol is an increased risk factor for advanced and invasive breast tumors. Our comparison between E₂ and ethanol effects shows that the two metalloproteinases are regulated differently regarding not only their secretion but also their transcription. ER α is clearly involved in some of the effects of ethanol but further study is required to elucidate the mechanism.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Université Henri Poincaré (BQR), Ligue Contre le Cancer, Comité de la Meurthe et Moselle, et Comité de la Meuse, Association pour la Recherche sur le Cancer, Cancéropole Grand Est, Institut de Recherches Scientifiques sur les Boissons and Conseil Régional de Lorraine. N.E. is a recipient of a doctoral grant from the Ligue Contre le Cancer, Comité de la Meurthe et Moselle. We would like to thank Martine Callier for technical assistance in molecular biology.

References

- Boyle P and Ferlay J: Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 16: 481-488, 2005.
- Weichselbaum RR, Hellman S, Piro AJ, Nove JJ and Little JB: Proliferation kinetics of a human breast cancer line *in vitro* following treatment with 17 β -estradiol and 1- β -D-arabino-furanosylcytosine. *Cancer Res* 38: 2339-2342, 1978.
- Reddel RR and Sutherland RL: Tamoxifen stimulation of human breast cancer cell proliferation *in vitro*: a possible model for tamoxifen tumour flare. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20: 1419-1424, 1984.
- Lykkesfeldt AE and Briand P: Indirect mechanism of oestradiol stimulation of cell proliferation of human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 53: 29-35, 1986.
- Pasqualini JR, Chetrite G, Blacker C, Feinstein MC, Delalande L, Talbi M and Maloche C: Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and post-menopausal breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1460-1464, 1996.
- Chen S, Itoh T, Wu K, Zhou D and Yang C: Transcriptional regulation of aromatase expression in human breast tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83: 93-99, 2002.
- Vaeth PA and Satariano WA: Alcohol consumption and breast cancer stage at diagnosis. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 928-934, 1998.
- Stoll BA: Alcohol intake and late-stage promotion of breast cancer. *Eur J Cancer* 35: 1653-1658, 1999.
- Przylipek A, Rabe T, Hafner J, Przylipek M and Runnebaum B: Influence of ethanol on *in vitro* growth of human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Gynecol Obstet* 258: 137-140, 1996.
- Singletary K: Ethanol and experimental breast cancer: a review. *Alcohol Clin Exp Res* 21: 334-339, 1997.
- Meng Q, Gao B, Goldberg ID, Rosen EM and Fan S: Stimulation of cell invasion and migration by alcohol in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 448-453, 2000.
- Luo J and Miller MW: Ethanol enhances erbB-mediated migration of human breast cancer cells in culture. *Breast Cancer Res Treat* 63: 61-69, 2000.
- Izevbigie EB, Ekunwe SI, Jordan J and Howard CB: Ethanol modulates the growth of human breast cancer cells *in vitro*. *Exp Biol Med* 227: 260-265, 2002.
- Etique N, Chardard D, Chesnel A, Merlin JL, Flament S and Grillier-Vuissoz I: Ethanol stimulates proliferation, ER α and aromatase expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Mol Med* 13: 149-155, 2004.
- Nakajima M, Welch DR, Belloni PN and Nicolson GL: Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res* 47: 4869-4876, 1987.
- Tryggvason K, Hoyhtya M and Salo T: Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim Biophys Acta* 907: 191-217, 1987.
- Egeblad M and Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 161-174, 2002.
- Mitropoulou TN, Tzanakakis GN, Kleisas D, Kalofonos HP and Karamanos NK: Letrozole as a potent inhibitor of cell proliferation and expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) by human epithelial breast cancer cells. *Int J Cancer* 104: 155-160, 2003.

19. Wolczynski S, Surazynski A, Swiatecka J and Palka J: Estrogenic and antiestrogenic effects of raloxifene on collagen metabolism in breast cancer MCF-7 cells. *Gynecol Endocrinol* 15: 225-233, 2001.
20. Abbas Abidi SM, Howard EW, Dmytryk JJ and Pento JT: Differential influence of antiestrogens on the *in vitro* release of gelatinases (type IV collagenases) by invasive and non-invasive breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 15: 432-439, 1997.
21. Fan S, Meng Q, Gao B, Grossman J, Yadegari M, Goldberg ID and Rosen EM: Alcohol stimulates estrogen receptor signaling in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 60: 5635-5639, 2000.
22. Fazzari A, Catalano MG, Comba A, Becchis M, Raineri M, Frairia R and Fortunati N: The control of progesterone receptor expression in MCF-7 breast cancer cells: effects of estradiol and sex hormone-binding globulin (SHBG). *Mol Cell Endocrinol* 172: 31-36, 2001.
23. Bartsch JE, Staren ED and Appert HE: Matrix metalloproteinase expression in breast cancer. *J Surg Res* 110: 383-392, 2003.
24. Wakeling AE and Bowler J: ICI 182,780, a new antiestrogen with clinical potential. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43: 173-177, 1992.
25. Vegeto E, Cocciolo MG, Raspagliesi F, Piffanelli A, Fontanelli R and Maggi A: Regulation of progesterone receptor gene expression. *Cancer Res* 50: 5291-5295, 1990.
26. Aronson K: Alcohol: a recently identified risk factor for breast cancer. *Can Med Assoc J* 168: 1147-1148, 2003.
27. Longnecker MP: Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review. *Cancer Causes Control* 5: 73-82, 1994.
28. Wolff MS and Weston A: Breast cancer risk and environmental exposures. *Environ Health Perspect* 105: 891-896, 1997.
29. Aye MM, Ma C, Lin H, Bower KA, Wiggins RC and Luo J: Ethanol-induced *in vitro* invasion of breast cancer cells: the contribution of MMP-2 by fibroblasts. *Int J Cancer* 112: 738-746, 2004.
30. Singletary KW, Frey RS and Yan W: Effect of ethanol on proliferation and estrogen receptor-alpha expression in human breast cancer cells. *Cancer Lett* 165: 131-137, 2001.
31. Razandi M, Pedram A, Park ST and Levin ER: Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 278: 2701-2712, 2003.
32. De Cremoux P, Tran-Perennou C, Brockdorff BL, Boudou E, Brunner N, Magdelenat H and Lykkesfeldt AE: Validation of real-time RT-PCR for analysis of human breast cancer cell lines resistant or sensitive to treatment with antiestrogens. *Endocr Relat Cancer* 10: 409-418, 2003.
33. Cenni B and Picard D: Ligand-independent activation of steroid receptors: new roles for old players. *Trends Endocrinol Metab* 10: 41-46, 1999.
34. Tsai HW, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS and Shupnik MA: Protein kinase A activation of estrogen receptor alpha transcription does not require proteasome activity and protects the receptor from ligand-mediated degradation. *Endocrinology* 145: 2730-2738, 2004.
35. Liu TT, Crepin M, Liu JM, Barritault D and Ledoux D: FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 1174-1182, 2002.
36. Wu TT, Tsai JH, Tsai JH, Kuo SJ, Yu SY, Huang CY, Hsieh HY, Hsieh YS and Liu JY: Augmented release of matrix metalloproteinase-9 by PKC activation in organotypic cultures of human breast cancer and adjacent normal breast tissue and fibroadenoma. *Chin J Physiol* 47: 73-78, 2004.
37. Paquette B, Bisson M, Baptiste C, Theriault H, Lemay R and Cantin AM: Invasiveness of breast cancer cells MDA-MB-231 through extracellular matrix is increased by the estradiol metabolite 4-hydroxyestradiol. *Int J Cancer* 113: 706-711, 2005.
38. Castro GD, Delgado de Layno AM, Costantini MH and Castro JA: Cytosolic xanthine oxidoreductase mediated bioactivation of ethanol to acetaldehyde and free radicals in rat breast tissue. Its potential role in alcohol-promoted mammary cancer. *Toxicology* 160: 11-18, 2001.
39. Westermarck J and Kahari VM: Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 13: 781-792, 1999.
40. Hong IK, Kim YM, Jeoung DI, Kim KC and Lee H: Tetraspanin CD9 induces MMP-2 expression by activating p38 MAPK, JNK and c-Jun pathways in human melanoma cells. *Exp Mol Med* 37: 230-239, 2005.

3. ETHANOL ET VOIE DE SIGNALISATION DES ŒSTROGÈNES

Ethanol treatment of breast cancer cells induces a ligand-independent activation of ER α mediated by cyclic AMP/PKA signaling pathway. Nicolas ETIQUE, Stéphane FLAMENT and Isabelle GRILLIER-VUISSOZ. Article soumis pour publication au journal Oncogene.

3.1. Introduction

SCD UHP NANCY 1
Bibliothèque des Sciences
Rue du Jardin Botanique - CS 20148
54601 VILLERS LES NANCY CEDEX

L'éthanol stimule la prolifération des cellules cancéreuses mammaires hormono-dépendantes (Przylipiak *et al.*, 1996; Singletary *et al.*, 2001; Etique *et al.*, 2004a). Nous avons montré que cet effet était associé à une augmentation du taux d'ER α et de l'aromatase, enzyme responsable de la biosynthèse des œstrogènes (Etique *et al.*, 2004a). Outre la prolifération, l'éthanol est capable de stimuler la migration des cellules tumorales (Yirminia *et al.*, 1992; Meng *et al.*, 2000; Luo et Miller, 2000). Dans ce contexte, nous avons montré que l'éthanol pouvait stimuler la sécrétion des métalloprotéases 2 et 9 par les cellules MCF-7. La sécrétion de MMP-9 induite par l'éthanol est dépendante de l'activation de l'ER α (Etique *et al.*, 2004b).

Ces résultats suggèrent que la plupart des effets de l'éthanol sur les cellules cancéreuses mammaires sont médiés par l'ER α . D'ailleurs, il a été montré que l'éthanol pouvait augmenter l'activité de l'ER α dans les cellules MCF-7 (Fan *et al.*, 2000). Nous pensons que l'éthanol pourrait avoir un effet œstrogéno-mimétique sur les cellules cancéreuses mammaires. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels il exerce cette action restent à déterminer.

Notre hypothèse de départ, en accord avec les travaux sur la prolifération des cellules, était que l'éthanol via la surexpression d'aromatase, pouvait induire une augmentation de la concentration locale en œstrogènes et ainsi stimuler l'ER α dans les cellules MCF-7. Néanmoins, nos résultats sur la sécrétion de MMP-9 ont montré une activation du récepteur malgré l'absence d'hormones stéroïdes (milieu sans sérum de veau fœtal), suggérant plutôt une activation ligand-indépendante de l'ER α . Nous avons donc testé cette hypothèse dans le but d'élucider le mécanisme par lequel l'éthanol est capable d'activer l'ER α .

3.2. Principaux Résultats

Dans un premier temps nous avons étudié l'expression de deux gènes cibles de l'ER α , le gène pS2 et celui codant le récepteur à la progestérone (PR) (Kumar *et al.*, 1987; Nunez *et al.*, 1989). Les cellules MCF-7 ont été traitées pendant 24 heures avec différentes concentrations d'éthanol (0,1, 0,3, 0,5 et 0,7 %). Une augmentation significative du taux d'ARN messagers de PR et pS2 est observée dans les cellules traitées avec 0,1 et 0,3 % d'éthanol. L'augmentation est maximale pour la concentration de 0,3 % d'éthanol ($\times 1,3$ fois pour pS2 et $\times 1,6$ fois pour PR). Cette surexpression est inhibée par l'antioestrogène ICI 182,780 confirmant l'implication de l'ER α .

Nous avons ensuite traité les cellules pendant 24 heures avec la concentration optimale de 0,3 % d'éthanol, dans un milieu dépourvu de sérum et donc d'hormones stéroïdes. Dans ces conditions, l'éthanol augmente significativement l'expression de PR et pS2 de 3,1 et 1,4 fois. Il est également capable de stimuler l'expression d'un gène rapporteur, codant la luciférase, placé sous le contrôle d'un promoteur contenant un élément de réponse aux œstrogènes (ERE). Ces résultats montrent que l'activation de l'ER α par l'éthanol ne dépend pas de la présence d'œstrogènes. Nous avons confirmé cette activation ligand-indépendante de l'ER α par une étude de la protéolyse du récepteur. En effet, les données de la littérature indiquent que la fixation d'un ligand agoniste (E₂) ou antagoniste (ICI 182,780) induit une protéolyse de l'ER α (Wakeling et Bowler, 1992; Wijayaratne et McDonell, 2001; laios *et al.*, 2005). Lorsque les cellules MCF-7 sont traitées à l'éthanol (0,3 %), aucune protéolyse n'est observée, montrant qu'aucun ligand ne se fixe sur l'ER α et que son activation par l'éthanol se fait selon la voie ligand-indépendante.

L'activation ligand-indépendante de l'ER α peut être médiée par plusieurs voies de signalisation dont la voie des MAPKs et de la PKA (Aronica *et al.*, 1994; Le Goff *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1995; Bunone *et al.*, 1996). Nous avons testé ces 2 voies en étudiant la surexpression de PR et pS2 induite par l'éthanol en présence d'inhibiteurs sélectifs des MAPK et de la PKA. Seul l'inhibiteur de la PKA, H89, est capable d'inhiber la surexpression de PR et pS2 induite par l'éthanol. L'activation ligand-indépendante de l'ER α par l'éthanol est donc médiée par la PKA. Nous avons confirmé l'activation de cette enzyme par l'éthanol en étudiant un facteur de transcription qu'elle active spécifiquement par phosphorylation : la protéine CREB (Shaywitz et Greenberg, 1999). Lorsque les cellules sont exposées à l'éthanol, la quantité de protéine CREB phosphorylée est supérieure confirmant ainsi l'activation de la

PKA par l'éthanol. Des transfections, réalisées avec un plasmide contenant un gène rapporteur placé en aval d'un promoteur contenant des éléments de réponse à l'AMPc (CRE), montrent également que l'éthanol est capable d'activer ce facteur de transcription et donc la PKA. Cette enzyme peut être activée par l'AMPc. De plus, il a été montré que l'éthanol augmentait le taux d'AMPc intracellulaire dans les cellules MCF-7 (Singletary *et al.*, 2001). Nous avons testé l'hypothèse d'une activation de l'adénylate cyclase par l'éthanol, en étudiant l'expression du PR en présence d'un inhibiteur sélectif de l'adénylate cyclase, le SQ22536. Ce composé inhibe la surexpression de PR induite par l'éthanol montrant que l'adénylate cyclase est également impliquée dans l'activation de l'ER α induite par l'éthanol.

L'activité de l'adénylate cyclase peut être stimulée par les récepteurs couplés aux protéines G. Des travaux réalisés sur des cellules de neuroblastomes, NG108-15, montrent que le récepteur A_{2a} à l'adénosine est impliqué dans l'augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire de ces cellules lorsqu'elles sont traitées à l'éthanol (Nagy *et al.*, 1990). Nous avons émis l'hypothèse qu'un mécanisme similaire pouvait avoir lieu dans les cellules MCF-7. Tout d'abord, nous avons montré par RT-PCR que ce récepteur était présent dans ces cellules. Puis, nous avons utilisé un inhibiteur sélectif de ce récepteur, le MSX-3. Celui-ci inhibe la surexpression de PR induite par l'éthanol. Enfin, nous avons montré qu'un agoniste de ce récepteur, le CGS21680, stimule l'expression des gènes cibles de l'ER α dans les cellules MCF-7.

3.3. Conclusion

Ces travaux nous ont permis d'une part de confirmer que l'éthanol pouvait activer l'ER α dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et d'autre part de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette activation.

Il semble que l'éthanol active un récepteur membranaire, le récepteur A_{2a} à l'adénosine, qui va stimuler l'adénylate cyclase. Cette enzyme va induire une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc. Cette augmentation avait été décrite dans une étude publiée en 2001 (Singletary *et al.*, 2001). L'AMPc par fixation à la sous unité régulatrice de la PKA va activer cette kinase. Celle-ci, outre l'activation de la protéine CREB, va permettre l'activation de l'ER α par un mécanisme qui reste à élucider. L'ER α ainsi activé va stimuler l'expression des ses gènes cibles et notamment PR et pS2.

Même si les mécanismes par lesquels la PKA active l'ER α restent à élucider, ces résultats permettent de mieux comprendre les effets de l'éthanol sur la prolifération et la migration des cellules cancéreuses mammaires. Ils ont permis également de mettre en évidence une nouvelle cible thérapeutique : le récepteur A_{2a} à l'adénosine. Son activation par l'adénosine présente en forte concentration dans l'environnement des tumeurs mammaires pourrait favoriser la tumorigenèse (Mujumdar *et al.*, 2004).

**Ethanol treatment of MCF-7 breast cancer cells induces a ligand-independent activation
of ER α mediated by cyclic AMP/PKA signaling pathway.**

Nicolas Etique, Stéphane Flament*, and Isabelle Grillier-Vuissoz*

EA 3442 Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Reproduction et du Développement,
Nancy-Université, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, BP 239, 54506
Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

*These authors contributed equally to the supervision of the study

Requests for reprints: Prof. S. Flament

Université Henri Poincaré-Nancy I, Faculté des Sciences, EA3442, Entrée 1B – 9^{ème} étage,
Boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France.

Phone : +33 - 3-83-68-42-52 Fax : +33 - 3-83-68-41-96

E-mail : stephane.flament@scbiol.uhp-nancy.fr

Key words: breast cancer, ethanol, estrogen receptor, PKA, cyclic AMP.

Running title: ligand-independent activation of ER α by ethanol in MCF-7

Abstract

Alcohol consumption is an increased risk factor for hormone-dependent breast cancer but the underlying molecular bases are unknown. Several studies suggest that ethanol could activate the estrogen signaling pathway. The aim of this work was to identify the molecular players involved in this phenomenon. Exposure of MCF-7 cells to ethanol, even in serum free medium, induced an increase in the mRNA level of two well known estrogen target genes: progesterone receptor (PR) and pS2. This effect was inhibited in the presence of the antiestrogen ICI 182,780. This suggested a ligand-independent activation of ER α that was confirmed by the absence of ER α proteolysis in ethanol-treated cells. The use of protein kinase A (PKA) inhibitor (H89), the study of phospho-CREB by Western Blot and transfection experiments with a CRE-reporter construct demonstrated that PKA was involved in ethanol-induced PR and pS2 transcription. Besides, adenylyl cyclase inhibition impaired the estrogen signaling pathway activation induced by ethanol. Finally, we show that the A_{2a} Adenosine Receptor mediates the action of ethanol. Taken together, these results provide a better understanding of ethanol-induced breast cancer. It may have an important therapeutic relevance by unmasking new targets for clinical treatments.

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women. About 70% of human breast cancers are related to sex hormone exposure and 60% of all patients have hormone-dependent breast cancer. These tumours express estrogen receptors (ER) and require estrogens for tumour growth (Weichselbaum *et al.*, 1978; Reddel and Sutherland, 1984; Lykkesfeldt and Briand, 1986). The effects of these hormones on tumor development are mediated by the receptor ER α . The latter is a member of the superfamily of steroid nuclear receptors that commonly function as ligand-regulated transcription factors. In cells, ER α is associated in a protein complex containing heat shock protein 90, which prevents the association of the receptor with DNA. In the best understood mode of action, or “classical pathway”, ligand binding induces a conformational change of ER α and the dissociation of the protein complex. The liganded receptor then binds to specific estrogen response elements (EREs) within target genes and recruits a p160/p300 coactivator complex to the promoter (Hall and McDonnell *et al.*, 2005, Singh and Kumar, 2005). This coactivator complex promotes gene transcription by remodeling chromatin and by contacting the basal transcription machinery. For instance, Progesterone Receptor (PR) and pS2 are two estrogen target genes that are often studied in breast cancer (Kumar *et al.*, 1987; Nunez *et al.*, 1989). A second mode of action has been described in which, following hormone binding, the ER α could utilize unspecified protein-protein interactions to enhance the activity of heterologous transcription factors such as AP-1 (Gaub *et al.*, 1990; Denardo *et al.*, 2005) or Sp1 (Xie *et al.*, 1999).

In addition to these hormone-dependent ER α activations, hormone-independent activation also occurs in human breast cancer cells. Indeed, many studies have shown that ER α activity can be stimulated by modulation of several kinase pathways (Coleman and Smith, 2001). As an example, the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway activated by epidermal growth factor directly phosphorylates ER α in the absence of ligand

and induces ER transactivation (Kato *et al.*, 1995; Bunone *et al.*, 1996). Similarly, ligand-independent ER activators can act *via* the protein kinase A (PKA) signaling pathway. Activation of PKA by 8-bromo-cyclic AMP, a stable form of cyclic AMP, and an activator of adenylyl cyclase, cholera toxin or forskolin, enhances ER phosphorylation and activity (Le Goff *et al.*, 1994, Aronica *et al.*, 1994).

Many epidemiological studies show that chronic alcohol consumption, even with a moderate dosage, increases significantly the incidence of breast cancer (Longnecker, 1994; Aronson, 2003) and promotes mammary tumorigenesis (Singletary *et al.*, 1991; Singletary *et al.*, 1995). Estrogens seem to be implicated in these effects since the increased risk is associated with a higher frequency of ER-positive tumours. Moreover, in pre- and post-menopausal women, alcohol consumption increases the circulating level of estrogens and DHEA (Reichman *et al.*, 1993; Dorgan *et al.*, 2001).

In ER-positive breast cancer cells, several studies have shown that ethanol enhances cell proliferation (Singletary *et al.*, 2001; Izevbigie *et al.*, 2002; Etique *et al.*, 2004). We have demonstrated that this effect is associated with an increase in the expression of ER α and aromatase, the enzyme responsible for estrogen synthesis (Etique *et al.*, 2004). Ethanol can also stimulate cell invasion (Meng *et al.*, 2000, Luo *et al.*, 2000). Interestingly, we have recently shown in MCF-7, that ethanol increases MMP-9 secretion via ER α activation (Etique *et al.*, 2006). These results suggest that the estrogen signaling pathway plays a key role in the effects induced by ethanol in breast cancer cells. Furthermore, it has been reported that ethanol increases estrogen receptor activity in MCF-7 (Fan *et al.*, 2000). Thus, ethanol could act as an estrogen-like compound on breast cancer cells but the interactions between ethanol and the estrogen signaling pathway are not clearly understood.

In the present study, we show that ethanol treatment stimulates the transcription of estrogen responsive genes in MCF-7 cells. We demonstrate that ethanol induces the cyclic AMP/PKA signaling pathway leading to the activation of ER α in a ligand-independent manner.

Results

Ethanol stimulates the expression of ER α target genes.

To investigate the involvement of ER α signaling pathway in ethanol activity, we studied two well known estrogen responsive genes: the progesterone receptor (PR) and pS2 (Kumar *et al.*, 1987; Nunez *et al.*, 1989). Their expression was analyzed by semi-quantitative RT-PCR in MCF-7 breast cancer cells treated with various concentration of ethanol (0.1 to 0.7% *i.e.* 17 to 119 mmol/L) or E₂ (1 nmol/L) for 24 hours (Figure 1a, b). In case of E₂ stimulation, our results showed a significant 2.1-fold and 1.4-fold increase in the PR and pS2 mRNA levels, respectively, compared to control levels ($p < 0.05$). In ethanol-treated breast cancer cells, we observed a significant 1.6-fold increase in PR mRNA level for either 0.1 or 0.3% ethanol and a 1.3-fold increase in pS2 expression for a dose of 0.3% ($p > 0.05$). One should note that according to Widmark formula, a woman drinking 0.6 g alcohol per kg of body weight over a one-hour period has blood ethanol concentrations of approximately 0.1% one hour later, a value that will decrease very slowly thereafter (Gubala and Zuba, 2003). In the following experiments, ethanol was always used at 0.3%.

In order to determine whether ER α is involved in the ethanol-induced increase in PR and pS2 expression, we used an antiestrogen: the "pure" antagonist ICI 182,780 (Wakeling and Bowler, 1992). We have recently shown that this compound was able to block the E₂-triggered increase in PR expression in MCF-7 cells with the best efficiency observed at the concentration of 100 nmol/L (Etique *et al.*, 2006). By semi-quantitative RT-PCR analysis, we showed that at this concentration, ICI 182,780 inhibits significantly the increase in both PR and pS2 mRNAs expression induced by E₂ (1 nmol/L) as well as ethanol (Figure. 2a, b). Moreover, the level of PR mRNAs was lower than in control cells. This could be explained by the fact that ICI 182,780 binds to ER α and inhibits ER signalling not only by competition with the agonists but also by ER α proteolysis induction (Wijayaratne and McDonell, 2001).

However, pS2 expression was similar to those of control cells suggesting that the E₂ sensitivity of pS2 expression is different from those of PR in MCF-7 cells. These results demonstrated that ethanol is able to activate the estrogen signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells and enhance the transcription of ER α target genes.

ER α activation by ethanol is ligand-independent.

Our previous study showing that ethanol treatment leads to an increase in aromatase expression in breast cancer cells suggested that ER α activation could be the result of an increase in local estrogen concentration (Etique *et al.*, 2004). To test this hypothesis, we decided to use serum free medium which does not contain steroid hormones. PR and pS2 expressions in MCF-7 cells treated for 24 hours with ethanol (0.3%) were analyzed by semi-quantitative RT-PCR (Figure 3a, b). In control cells, the level of PR expression was lower than in our previous experiment using 1% FCS (compare with figures 1 and 2). This is consistent with the absence of steroids in the medium. pS2 expression was decreased too, but more modestly. This is in agreement with the lower sensitivity to E₂ of this gene in our conditions. Despite the absence of steroid hormones, ethanol still increased pS2 expression significantly (1.4-fold) and to a greater extent PR expression (3.1-fold). Interestingly, these increases were similar to those observed in MCF-7 cells exposed to 1 nmol/L E₂. Moreover, this ethanol-induced increase in PR and pS2 expression was inhibited by ICI 182,780 (100 nmol/L). The difference of PR expression level in cells exposed to ICI 182,780 versus control cells was not so important than in our previous experiments performed in the presence of 1% FCS. This is in agreement with the absence of steroid hormones in the medium. But again, the basal level of pS2 expression was not affected by the presence of ICI 182,780. This reinforces the lower sensitivity of its expression to E₂.

In order to confirm the transcriptional activation of ER α target genes by ethanol in steroid free medium, we used another approach. MCF-7 cells were grown in medium containing 10% FCS stripped in dextran-coated charcoal and transiently transfected with the reporter construct pERE-tk-Luc. They were treated for 24 hours with 0.3% ethanol in presence or absence of ICI 182,780 (100 nmol/L), respectively. In these conditions, ethanol treatment significantly increased luciferase activity and this stimulatory effect was inhibited by ICI 182780 (Figure 3c). Hence, we hypothesized that ethanol treatment triggered a ligand-independent activation of ER α .

To confirm this hypothesis, we studied changes in ER α protein content by Western immunoblotting (Figure 3c). Indeed, it is well known that the binding of E₂ to ER α rapidly decreases ER α protein levels, which is required for the increase in transcriptional activity (Wijayaratne and McDonnell, 2001). Ligand-induced ER α degradation also occurs upon treatment with the isomer 17 α -E₂ as well as antiestrogens such as ICI 182,780 even though these compounds are unable to activate ER α (Wakeling and Bowler, 1992; Wijayaratne and McDonnell, 2001). Like in RT-PCR analyses, MCF-7 cells were treated for 24 hours, in serum free condition, with ethanol (0.3%) or E₂ (1 nmol/L) in presence or absence of ICI 182,780 (100 nmol/L). In the presence of E₂ or ICI 182,780, we observed a decrease in ER α protein level. In contrast, ER α protein level remained constant in ethanol-treated cells. This result confirmed that ethanol-induced ER α activation was ligand-independent.

Ethanol-induced ER α activation is mediated by PKA.

In breast cancer cells, ligand-independent ER α activation can be mediated by several kinase pathways including the MAPK and PKA (Aronica *et al.*, 1994; Le Goff *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1995; Bunone *et al.*, 1996). To assess whether these kinases could play a key role in

ethanol-induced activation of the ER α , we examined the effect of specific MAPK (PD98059) and PKA (H89) inhibitors. Estrogen-responsive gene expression was studied by semi-quantitative RT-PCR in MCF-7 cells that were treated with ethanol (0.3%) for 24 hours, in serum free condition, in presence or absence of H89 (10 μ mol/L) or PD98059 (50 μ mol/L), respectively. The MAPK inhibitor did not impair the increase in ER α transcriptional activity observed in MCF-7 exposed to ethanol (Figure 4a, b). In contrast, ethanol-induced increase in PR and pS2 expression was inhibited by the PKA inhibitor. This result established that the ligand-independent activation of ER α by ethanol was mediated by PKA.

Ethanol treatment stimulates the cyclic AMP/PKA pathway in MCF-7 breast cancer cells.

The inhibitory effect of H89 on ethanol-induced activation of ER α suggested that the cyclic AMP/PKA pathway was stimulated in MCF-7 cells exposed to ethanol. In order to confirm this hypothesis, we studied CREB, a transcription factor that can be activated by PKA-dependent phosphorylation of serine 133 (S133) (Shaywitz and Greenberg, 1999). MCF-7 cells were grown during 24 hours in serum free containing 0.3% ethanol. Then, proteins from cell lysates were examined by Western blot analysis using an antibody that recognizes CREB phosphorylated at residue S133 (Figure 5a). Ethanol induced the phosphorylation of CREB. Furthermore, cotreatment of cells with H89 resulted in a complete inhibition of ethanol-induced S133 phosphorylated CREB levels.

CREB activation by phosphorylation was further analyzed by its ability to interact with its DNA-response element, the CRE (cyclic AMP response element). MCF-7 cells were transiently transfected with the reporter construct pCRE-SEAP and treated for 24 hours with 0.3% ethanol in presence or absence of H89 (10 μ mol/L), respectively. Ethanol treatment significantly increased CRE-SEAP activity (Figure 5b). This stimulatory effect was inhibited

by H89. These results confirmed that ethanol was able to upregulate the activity of PKA in MCF-7 cells.

PKA activity can be activated by the binding of cyclic AMP to its regulatory subunits (Herberg *et al.*, 1996). Using a specific adenylyl cyclase inhibitor (SQ22536), we determined the involvement of this enzyme in ethanol-induced ER α activation. PR expression was analyzed by semi-quantitative RT-PCR in MCF-7 cells treated with ethanol (0.3%) for 24 hours in the presence or absence of SQ22536 in serum free medium, respectively. The increase in PR expression usually induced by ethanol was significantly inhibited by SQ22536 (30 and 150 $\mu\text{mol/L}$) (Figure 5c, d). This result showed that adenylyl cyclase is also involved in the ethanol-induced activation of ER α .

Ethanol activates the cyclic AMP/PKA pathway via the A_{2a} Adenosine Receptor

Adenylyl cyclase activity can be stimulated by several G protein-coupled receptors. In NG108-15 cells (neuroblastoma x glioma hybrid cells), it has been shown that acute ethanol-induced increase in extracellular adenosine activates A₂ receptors to stimulate cyclic AMP production (Nagy *et al.*, 1990). To test this hypothesis, we first studied by RT-PCR the presence of the A_{2a} Adenosine Receptor (A_{2a} AR) in MCF-7 cells (Figure 6a). The amplified product obtained with specific primers was of the appropriate size for A_{2a} AR (244 bp) and its identity was confirmed by sequencing (data not shown).

Secondly, using a specific A_{2a} AR antagonist (MSX-3), we determined the involvement of this receptor in ethanol-induced ER α activation. PR gene expression was studied by semi-quantitative RT-PCR in MCF-7 cells that were treated with ethanol (0.3%) for 24 hours, in serum free conditions, in presence or absence of MSX-3 (10 and 30 $\mu\text{mol/L}$). MSX-3 induced a dose-dependent inhibition of ethanol-induced increase in PR expression, with a complete inhibition observed in the presence of 30 $\mu\text{mol/L}$ of MSX-3 (Figure 6b, c). Then, we studied

if PR expression could be stimulated by the A_{2a} AR agonist CGS21680, independently of ethanol. We observed an increased level of PR mRNA following a 24-hour treatment with 1 μmol/L of this agonist, an effect that was abolished in the presence of the PKA inhibitor H89 (Figure 6d). These results showed that A_{2a} AR is involved in the ethanol-induced ligand-independent activation of ERα.

Discussion

Alcohol consumption increases the risk for breast cancer in women by still undefined pathways (Longnecker, 1994; Aronson, 2003). A growing number of *in vivo* and *in vitro* studies have been performed in order to identify the mechanisms involved in alcohol effects (Singletary *et al.*, 1991; Singletary *et al.*, 1995; Fan *et al.*, 2000; Luo and Miller, 2000; Meng *et al.*, 2000; Singletary *et al.*, 2001; Izevbigie *et al.*, 2002; Etique *et al.*, 2004; Etique *et al.*, 2006). One explanation could be that ethanol activates the estrogen signaling pathway which is responsible for estrogen-dependent breast cancers. Indeed, ethanol treatment stimulates the proliferation of hormone-dependent breast cancer cells (Przylipek *et al.*, 1996; Singletary *et al.*, 2001; Izevbigie *et al.*, 2002; Etique *et al.*, 2004). One study reported that ethanol could stimulate estrogen receptor signaling in human breast cancer cell lines (Fan *et al.*, 2000). The authors showed that when MCF-7 or T-47-D cells were transfected with a plasmid containing an ERE-TK-luc construct and then incubated with E₂ plus ethanol, there was a dose-dependent increase in E₂-stimulated reporter activity. Moreover, ethanol can also stimulate breast cancer cell invasion and migration (Meng *et al.*, 2000). We have recently observed that this might be related to an increase in MMP-2 and MMP-9 secretion (Etique *et al.*, 2006). Interestingly, this effect was partially inhibited by the anti-estrogen ICI 162,780, suggesting again an activation of ER α in ethanol-treated cells. The present work was performed to demonstrate the activation of ER α in breast cancer cells incubated in ethanol containing medium and to determine the molecular bases of this activation.

First, we studied mRNA expression of two well known estrogen regulated genes: those encoding the progesterone receptor (Kumar *et al.*, 1987) and those encoding pS2 (Nunez *et al.*, 1989). Both PR and pS2 mRNAs were increased after 24 hours of ethanol treatment, with the most efficient dose being 0.3% ethanol. In regard to alcohol consumption, it can be reminded that a woman drinking 0.6 g alcohol per kg of body weight over a one-hour

period has blood ethanol concentrations of approximately 0.1% one hour later (Gubala *et al.*, 2003). So, the concentrations that are efficient in our study are in the range of those measured *in vivo* following moderate alcohol consumption. No significant increase in PR and pS2 transcription level was observed at higher doses. One might suggest that this was due to a decreased cell viability. However, studies by the MTT dye conversion assay showed that after a 24 hours treatment, MCF-7 cell viability was not affected below 100 mmol/L (0.58%) ethanol (Meng *et al.*, 2000). Nevertheless, our results showing that high doses of ethanol do not stimulate significantly the expression of E₂-regulated genes are consistent with the fact that the increase in cell proliferation induced by ethanol after a 24 hours exposure is not observed at high doses of alcohol (Izevbogie *et al.*, 2002).

What are the molecular events that result in the higher expression of PR and pS2 observed in MCF-7 cells incubated during 24 hours in 0.3% ethanol? Although the expression of both genes is regulated by estrogens, other factors could be involved. For instance, the level of MCF-7 cell pS2 mRNA can also be increased by the tumour promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (Kastner *et al.*, 1990). Similarly, PR expression in MCF-7 can be stimulated by several transcription factors such as HOXA5 (Raman *et al.*, 2000). However, since the pure antiestrogen ICI 182,780 abolished the ethanol-induced increase in PR and pS2 expression, this clearly demonstrated the involvement of ER α in this phenomenon.

Since we have previously shown that ethanol-treated MCF-7 cells displayed a higher level of aromatase (Etique *et al.*, 2004), we hypothesized that ethanol-induced stimulation of ER α was the result of a local production of estrogens *via* aromatase. Indeed, when MCF-7 cells are cultured in a low estrogen medium and treated with aromatizable androgens, there is a significant cell growth stimulation which is completely inhibited by the aromatase inhibitor letrozole (Sonne-Hansen *et al.*, 2005). Then, the increase in PR and pS2 expression can also

be the consequence of the aromatization of testosterone to E₂ (Burak *et al.*, 1997; Sonne-Hansen *et al.*, 2005). Similar processes seem to occur in breast tumours and women with estrogen responsive breast cancer receive not only anti-estrogen therapy with tamoxifen but also aromatase inhibitors (Nabholtz *et al.*, 2000). In order to determine if steroids are required for ethanol to stimulate PR and pS2 expression, we performed experiments in serum free medium.

In this condition, ethanol treatment (0.3%) still increased PR and pS2 mRNA levels, with an efficiency similar to those observed for E₂ (100 nmol/L). The response observed for PR was higher in serum free medium than in FCS-containing medium with ethanol or E₂ whereas pS2 response was similar in both conditions. Our result about PR expression in response to E₂ is consistent with the higher sensitivity of MCF-7 cells to this steroid in term of cell proliferation, that has already been reported in newborn calf serum versus fetal calf serum containing medium, the latter containing a higher concentration of steroids (Sonne-Hansen *et al.*, 2005).

The induction of E₂ target genes expression by ethanol in serum free medium suggested that steroids were not involved in this mechanism. However, the inhibition of ethanol effect by ICI 162,780 prompted us to hypothesize that ER α was still implicated. Then we proposed that ethanol treatment leads to a ligand-independent activation of the receptor. Indeed, ER α activation can occur without any estrogen in the culture medium and then is dependent on several kinase pathways including the MAPK and PKA pathways (Le Goff *et al.*, 1994; Aronica *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1995; Bunone *et al.*, 1996). To confirm our hypothesis, we analyzed the ER α protein content by Western blot. Indeed, it is well described that ER α is downregulated in the presence of its cognate ligand E₂, as well as in the presence of antiestrogens, through the ubiquitin proteasome pathway (Wijayaratne *et al.*, 2001; Preisler-Mashek *et al.*, 2002). On the contrary, ligand-independent stimulation of ER α transcription by

the PKA pathway does not lead from receptor degradation (Tsai *et al.*, 2004). Western immunoblotting analyses showed that in MCF-7 cells incubated for 24 hours in ethanol containing medium, the ER α protein level was similar to those of control cells. The lower ER α detection observed in E₂-treated cells as well as in ICI 182,780-treated cells was consistent with other studies showing that ER α proteolysis is triggered by treatment with ER α ligands, with a faster and higher efficiency observed for ICI 182,780 than for E₂ itself (Marsaud *et al.*, 2003). This absence of ER α proteolysis following exposure to ethanol confirmed our hypothesis of a ligand-independent activation of the receptor.

Then, the use of selective inhibitors of PKA (H89) and MEK (PD98059) allowed us to identify the kinase pathway involved in this mechanism. Indeed, H89 was the only one capable of abolishing the increase in PR and pS2 mRNA levels induced by ethanol. The activation of PKA by ethanol was confirmed by several analyses. It is well known that CREB is activated by PKA (Dash *et al.*, 1991). An antibody raised against phosphorylated CREB (at Ser 133) detected a higher amount of phospho-CREB in ethanol-treated MCF-7 cells. An event downstream of CREB phosphorylation is its association to CREB-binding protein (CBP) and the subsequent transcription of target genes with CRE in their promoter. As expected ethanol stimulated the expression of the SEAP reporter gene in MCF-7 cells transfected with a CRE-SEAP construct. These findings are consistent with the fact that treatment of MCF-7 cells with PKA activators stimulates pS2 transcription in the absence of detectable estrogens (Chalbos *et al.*, 1993; El-tanani and green, 1996). Nevertheless, the nature of the relationship between PKA and ER α in ethanol-treated MCF-7 cells remains to be elucidated. Does ER α activation require its association with other partners like PKA phosphorylated-CREB and CBP or does PKA directly phosphorylate ER α (Le Goff *et al.*, 1994; Lazennec *et al.*, 2001)? Since it has been shown that forskolin-triggered PKA activation protects ER α from ligand-mediated degradation (Tsai *et al.*, 2004), we rather agree with the second hypothesis. Indeed,

a 6-day ethanol exposure in serum-containing medium (1%) increases the ER α protein content which could be the result of a reduced proteolysis (Etique *et al.*, 2004). Additional studies are needed to confirm that point.

Nevertheless, our results showing the activation of PKA are in agreement with a previous study showing an increase in cyclic AMP in MCF-7 and T47-D breast cancer cells exposed to ethanol (Singletary *et al.*, 2001). Furthermore, using an inhibitor of adenylyl cyclase (SQ22536), we observed a blockade of ethanol-induced increase of PR mRNA expression in MCF-7 cells. Adenylyl cyclase can be activated by G protein-coupled membrane receptors. Interestingly, ethanol has been reported to stimulate cyclic AMP production in both neuroblastoma x glioma hybrid cells (NG 108-15) and lymphoma cells *via* the A_{2a} AR (Nagy *et al.*, 1990). In MCF-7 cells, several arguments are supporting the involvement of A_{2a} AR. First, RT-PCR analyses clearly showed the presence of a transcript for the A_{2a} AR isoform. Moreover, the increase in PR expression observed following a 24-hour ethanol treatment was inhibited by a selective A_{2a} AR antagonist. Furthermore, a selective agonist of A_{2a} AR stimulated PR mRNA expression similarly to ethanol or E₂. We clearly demonstrate the role of A_{2a} AR in ethanol-induced pathway but the link between ethanol and the receptor remains to be determined. In S49 lymphoma cells, ethanol exposure increases extracellular adenosine by inhibiting the adenosine uptake *via* the nucleoside transporter (Nagy *et al.*, 1990). A similar process could be involved in ethanol-treated MCF-7 cells to explain A_{2a} AR activation. Besides, since A_{2a} AR is linked to estrogen signaling pathway, and since it can be activated by extracellular adenosine whose concentration is elevated in breast tumors environment (Mujoomdar *et al.*, 2004), this receptor could constitute an interesting target for the design of new therapeutic agents.

In conclusion, our study demonstrates that ethanol treatment of MCF-7 breast cancer cells stimulates A_{2a} AR that in turn activates adenylyl cyclase leading to an increase in cyclic AMP production and PKA activation. Once activated, the PKA pathway will trigger two important events: an increase in the expression of genes with CRE in their promoter, like aromatase, (Etique *et al.*, 2004; Michael *et al.*, 1997) as well as a ligand-independent activation of ER α and transcription of target genes (Figure 7). Both events could have a dramatic effect on breast cancer cell proliferation since estrogen signaling pathway plays a key role in that process. Moreover, since phosphorylation of ER α by PKA at Ser 305 converted tamoxifen from an ER α inhibitor to a growth stimulator (Michalides *et al.*, 2004), the activation of the cyclic AMP/PKA pathway following alcohol consumption could also have a negative impact on breast cancer therapy.

Materials and methods

Materials

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), L-glutamine, 17- β -estradiol (E_2), MSX-3 and CGS21680 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and foetal calf serum (FCS) from Eurobio (Les Ulis, France). ICI 182,780 was purchased from Tocris Cookson (Bristol, UK). H89, PD98059 and SQ22536 were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). These chemicals were dissolved in ethanol. When added to the medium of ethanol-treated cells, the ethanol final concentration did not exceed 0.3%. For non-ethanol treated-cells, the chemicals were diluted in medium with an ethanol final concentration lower than 0.01 %.

Cell culture and treatment

The MCF-7 (HTB 22; human breast adenocarcinoma, ER-positive) cell line was obtained from the American Tissue Culture Collection (Rockville, MD). Cells were routinely grown at 37°C in a 5% (v/v) CO₂ humidified atmosphere. They were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and 2 mmol/L L-glutamine.

For RT-PCR analyses, cells were seeded in 6-well plates at a density of 8×10^4 cells/well in 2 mL of DMEM supplemented with 5% FCS and 2 mmol/L L-glutamine. After 24 hours of incubation to allow for cell attachment, the medium was replaced with phenol-red free DMEM supplemented with 1% FCS and 2 mmol/L L-glutamine. After 24 hours, the medium was eliminated and cells were washed three times with PBS. Cells were treated for 24 hours with ethanol at different concentrations and/or various compounds in phenol red free DMEM supplemented with 2 mmol/L L-glutamine with 1% FCS. Ligand-independent studies were performed in similar conditions but in serum free medium.

For Western immunoblotting analyses, cells were treated in the same conditions but were seeded in 75 cm² flasks at a density of 1.5 x 10⁶ cells/flask.

Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from cells using TRIZOL reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized in a 20 µL volume containing 2 µg RNA, 1.5 µg random hexamer primer, 1X Invitrogen Buffer, 7,5 mmol/L DTT, 0.6 mmol/L of each dNTP, 4 U RNase inhibitor, and 100 U of MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). The mixture was incubated for 120 minutes at 37°C and subsequently for 5 minutes at 94°C in order to stop the reaction.

The cDNAs were further amplified by PCR. The specific primers were 5'-TGCTCAAGGAGGGCCTGCCGCAGGT-3' and 5'-CTACTGAAAGAAGTTGCCTCTCGCC-3' for Progesterone Receptor (Fazzari *et al.*, 2001), 5'-TTCTATCCTAATACCATCGACG-3' and 5'-TTTGAGTAGTCAAAGTCAGAGC-3' for pS2 (Catalano *et al.*, 2004), 5'-AACCTGCAGAACGTCACCAA-3' and 5'-GTCACCAAGCCATTGTACCG-3' for Adenosine A_{2a} Receptor (A_{2a} AR) (Christofi *et al.*, 2001) and 5'-TACATGGGTGGGGTGTGAA-3' and 5'-AAGAGAGGCATCCTCACCT-3' for β-Actin (Etique *et al.*, 2004). PCR was carried out in a thermal cycler in a final volume of 25 µL containing 2 µL cDNA, 1X Eppendorf Taq Buffer (Eppendorf, Le Pecq, France), 0,5X Eppendorf Taq Master, 1.5 to 2.5 mmol/L MgCl₂, 125 µmol/L of each dNTP, 0.33 µmol/L of each primer, and 0.5 U Taq polymerase. Negative controls were always included. Amplification was carried out under the following conditions: 94°C for 5 minutes, 25-30 one-minute cycles at 94°C (25 cycles for pS2 and β-Actin ; 30 cycles for PR and A_{2a} AR) 1 minute at 54°C to 65°C, and 1 minute at 68°C, followed by a 10-minute extension step at 68°C. For each gene, the amplification took place in the linear phase of the PCR reaction. The PCR

products (25 μ L) were mixed with loading buffer (3 μ L) and submitted to electrophoresis in a 2% agarose gel at 90 V for 60 minutes at room temperature. The gel was stained with ethidium bromide, viewed and photographed on an UV-transilluminator (GelDoc 2000, Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette). A software package (Quantity One v.4.3.1, Bio-Rad Laboratories) was used to quantify the PCR products.

Western immunoblotting

At the end of the treatment, cells were washed twice with cold PBS. Proteins were extracted with lysis buffer containing: 25 mmol/L MOPS pH 7.2, 60 mmol/L β -glycerophosphate, 15 mmol/L nitrophenylphosphate, 15 mmol/L EDTA, 15 mmol/L $MgCl_2$, 2 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L sodium orthovanadate and protease inhibitors (10 μ g/mL aprotinin, 5 μ g/mL pepstatin, 10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL soybean trypsin inhibitor and 100 μ mol/L benzamidine). After boiling (100°C, 5 minutes), an aliquot was used for protein concentration determination. Thirty micrograms of total proteins were subjected to SDS-PAGE (10%). After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked in TBST buffer with 5% non-fat powder milk (TBST-Buffer : Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7.4, NaCl 150 mmol/L, 0.1% Tween 20) and incubated for 1 hour with primary antibody. The anti-ER α (clone F-10, SC-8002, Santa Cruz, CA) was diluted at 1:250, the anti-phospho-CREB (clone 10E9, Upstate, UK) at 1:2000 and the anti-Actin (Clone 22a, Santa Cruz) at 1:1000. After washing with TBST, the membranes were incubated for 1 hour in peroxidase-linked secondary antibody (Santa Cruz), washed again and developed using a chemiluminescence method (Amersham, Orsay, France).

Transient transfection assays

MCF-7 cells were plated at a density of 5×10^5 cells in 6-well plates in 2 mL of DMEM supplemented with 5% FCS and 2 mmol/L L-glutamine, and allowed to adhere for 24 hours. A 5:1 ratio of pCRE-SEAP or pERetkLuc vector and β -galactosidase (β -Gal) control vector were cotransfected using Exgen 500 (Euromedex, France), as recommended by the manufacturer.

3 μ g of pCRE-SEAP or pERetkLuc and 0.6 μ g of β -gal control vector were used for each well. The pCRE-SEAP vector contained the secreted alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene, with 3 tandem copies of the cyclic AMP Response Element (CRE) consensus sequence that upon CREB binding could induce transcription and activation of the SEAP reporter. The pERetkLuc vector contained the luciferase reporter gene, with one copy of the estrogen response element (ERE) consensus sequence that upon ER α binding could induce transcription of the luciferase reporter. The β -Gal control vector contained the CMV promoter and enhancer sequences, and served as a control for normalization of transfection efficiencies. After transfection, cells were allowed to grow for 24 hours in phenol-red free DMEM supplemented with 10% FCS stripped in dextran-coated charcoal and 2 mmol/L L-glutamine. Cells were then treated for 24 hours in fresh medium. SEAP activity was measured in using the BD Great Escape SEAP detection kit (BD Biosciences, CA) and Luciferase activity in using the Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega, Charbonnières, France) as recommended by the manufacturer. β -Gal activity was measured using the β -Galactosidase Enzyme Assay System (Promega). SEAP and Luciferase activity were detected using a luminometer and β -Gal activity using a spectrophotometer. SEAP and luciferase reporter activity was normalized with the β -Gal activity.

Statistical analysis

The results are expressed as mean $\pm$ standard error of several experiments as indicated in the text. Differences among treatment groups were tested using analysis of variance (ANOVA). Differences in which P was less than 0.05 were statistically significant. When significant differences were detected, specific post-hoc comparisons between treatment groups were examined with the Student Newman's Keuls test (SPSS v11.0 Computer Software).

Acknowledgements

The authors would like to thank Martine Callier for technical assistance in molecular biology, and doctors M. Duterque-Coquillaud and F. Küpper for critical reading of the manuscript. This work was supported by “ Université Henri Poincaré (BQR) “, “ Ligue Contre le Cancer, comités de la Meurthe et Moselle, de la Meuse et de la Haute-Marne“, “ Association pour la Recherche sur le Cancer “ , “Cancéropôle Grand Est”, “Institut de Recherches Scientifiques sur les Boissons” and “Conseil Régional de Lorraine”.

Figure 1 Ethanol stimulates the expression of two ER-responsive genes in MCF-7 cells. A, semi-quantitative RT-PCR analysis of PR and pS2 mRNAs. MCF-7 cells were stimulated for 24 hours with various concentration of ethanol (0.1% to 0.7%) or E₂ (1 nmol/L). β -Actin mRNA levels were determined as an internal control. B, the histogram represents the mean $\pm$ S.E. of four separate experiments in which the band intensities were evaluated in terms of optical density arbitrary units (A.U). *, Significantly different from untreated control ($P < 0.05$).

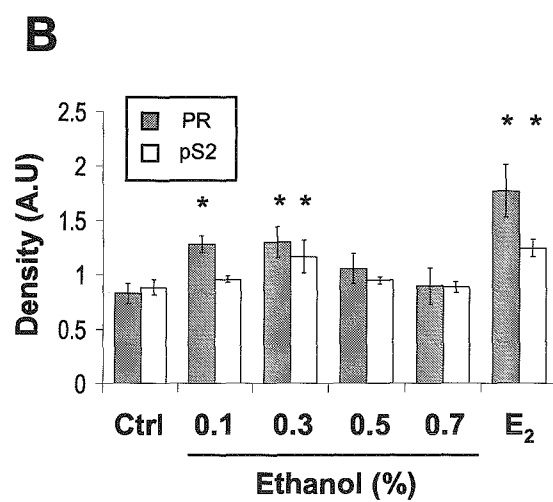
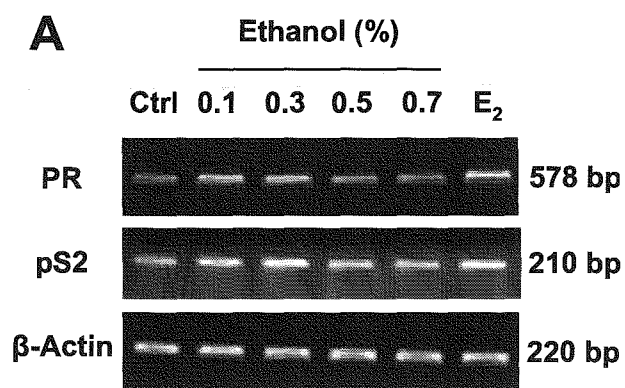


FIGURE 1

Figure 2 Induction of PR and pS2 gene expression by ethanol is inhibited by the pure antiestrogen ICI 182,780. A, semi-quantitative RT-PCR analysis of PR and pS2 mRNAs. MCF-7 cells were stimulated for 24 hours with 0.3% ethanol (Eth) or 1 nmol/L E₂ in the presence or absence of 10 µmol/L ICI 182,780 (ICI). β-Actin mRNA levels were determined as an internal control. B, the histogram represents the mean ± S.E. of four separate experiments in which the band intensities were evaluated in terms of optical density arbitrary units (A.U). *, Significantly different from untreated control ($P < 0.05$).

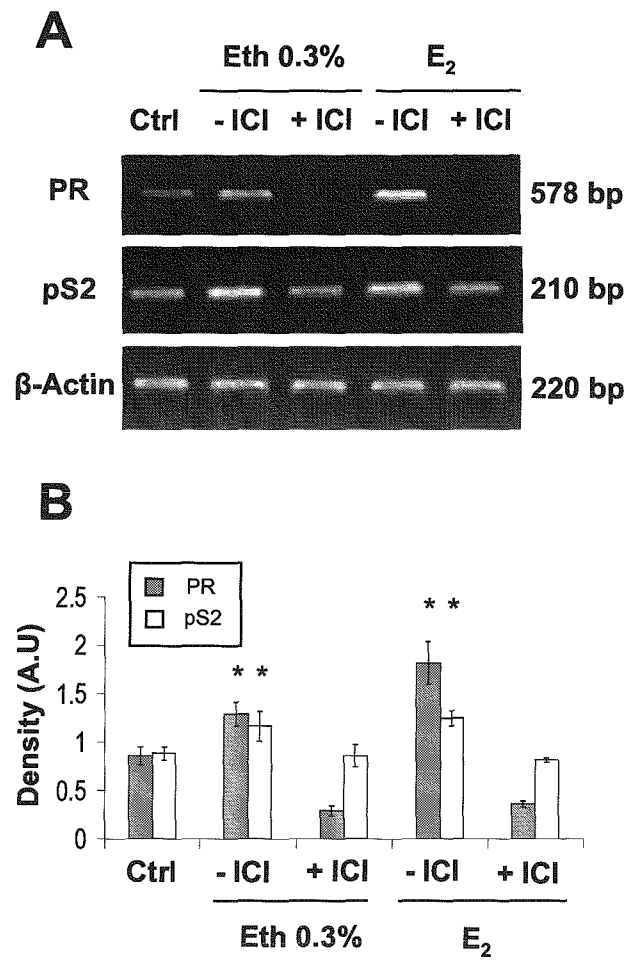


FIGURE 2

Figure 3 ER α activation by ethanol is ligand-independent. A, semi-quantitative RT-PCR analysis of PR and pS2 mRNAs. MCF-7 cells were treated for 24 hours in serum free medium supplemented with 0.3% ethanol (Eth) or 1 nmol/L E₂, in the presence or absence of 10 μ mol/L ICI 182,780 (ICI). β -Actin mRNA levels were determined as an internal control. B, the histogram represents the mean $\pm$ S.E. of four separate experiments in which the band intensities were evaluated in terms of optical density arbitrary units (A.U). C, MCF-7 cells were transiently cotransfected with pERetkLuc and pCMV- β Gal. The cells were treated for 24 hours with ethanol (0.3%) or E₂ (1 nmol/L) in the presence or absence of ICI 182,780 (10 μ mol/L). Luciferase reporter activity was measured, normalized with the β -Gal activity and expressed as percentage of the control assumed as 100%. The values represent the means $\pm$ S.E. of three different experiments. In each experiment, the activities of transfected plasmids were assayed in triplicate transfections. D, immunoblot of ER α from MCF-7 cells treated in serum free condition with ethanol (0.3%) or E₂ (1 nmol/L), in the presence and absence of ICI 182,780 (10 μ mol/L) for 24 hours. *, Significantly different from untreated control ($P < 0.05$).

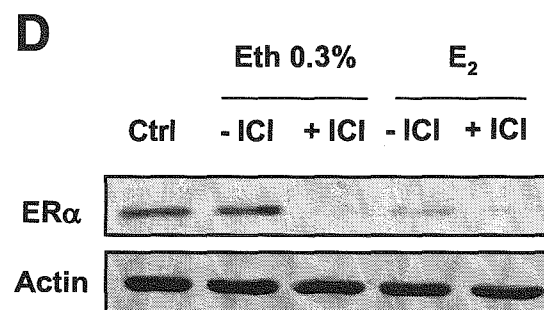
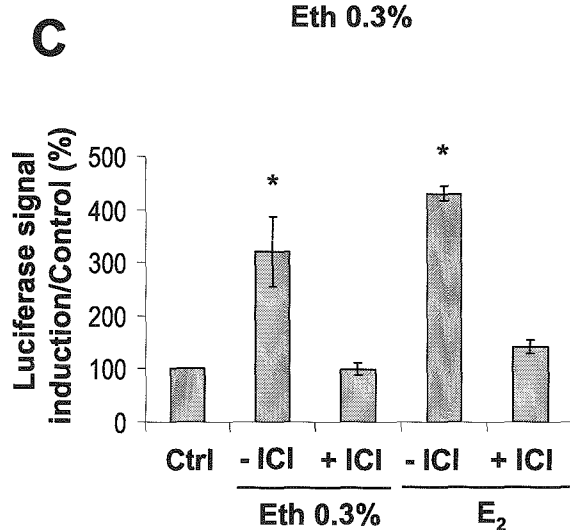
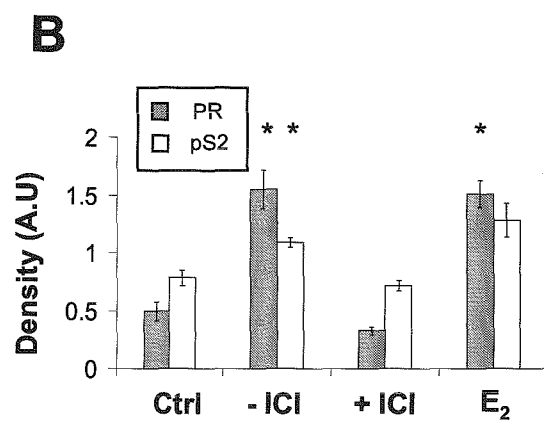
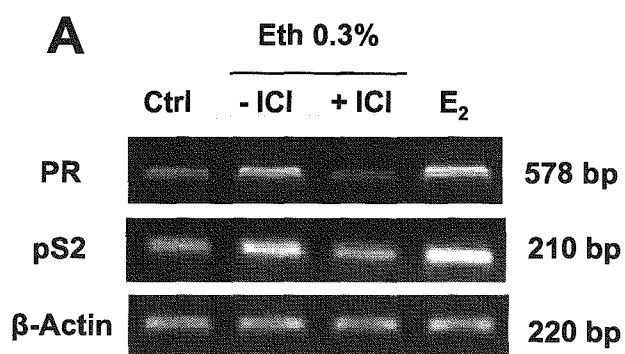
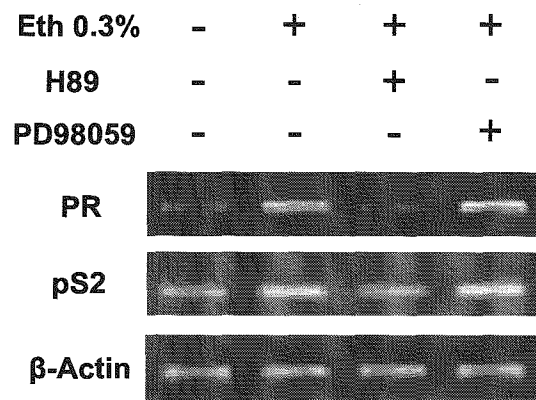


FIGURE 3

Figure 4 Ethanol-induced ER α activation is mediated by PKA. A, semi-quantitative RT-PCR analysis of PR and pS2 mRNAs. MCF-7 cells were treated for 24 hours, in serum free conditions, with 0.3% ethanol (Eth) and 10 μ mol/L H89 or 50 μ mol/L PD98059. β -Actin mRNA levels were determined as an internal control. B, the histogram represents the mean $\pm$ S.E. of four separate experiments in which the band intensities were evaluated in terms of optical density arbitrary units (A.U). *, Significantly different from untreated control ($P < 0.05$).

A



B

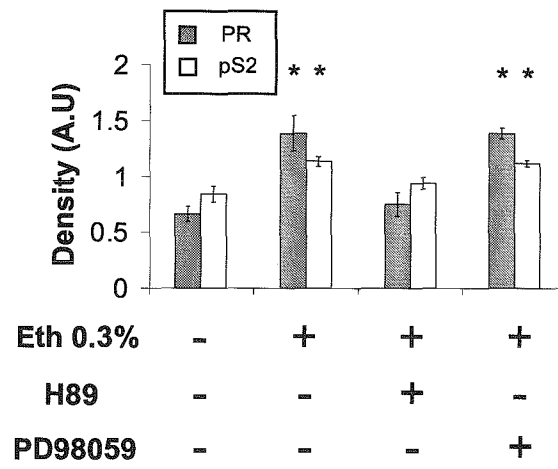


FIGURE 4

Figure 5 The cyclic AMP/PKA pathway is stimulated in MCF-7 cells exposed to ethanol. A, immunoblot of phosphorylated CREB (pCREB). MCF-7 cells were either untreated or treated for 24 hours with ethanol (0.3%) in the presence or absence of H89 (10 μ mol/L). Actin serves as loading control. B, MCF-7 cells were transiently cotransfected with pCRE-SEAP and pCMV- β Gal. The cells were treated for 24 hours with ethanol (0.3%) in the presence or absence of H89 (10 μ mol/L). SEAP reporter activity was measured, normalized with the β -Gal activity and expressed as percentage of the control assumed as 100%. The values represent the means $\pm$ S.E. of three different experiments. In each experiment, the activities of transfected plasmids were assayed in triplicate transfections. C, semi-quantitative RT-PCR analysis of PR mRNA. MCF-7 cells were treated for 24 hours, in serum free condition, with ethanol (0.3%) and the adenylyl cyclase inhibitor SQ22536 (SQ) (30 and 150 μ mol/L). β -Actin mRNA levels were determined as an internal control. D, the histogram represents the mean $\pm$ S.E. of four separate experiments in which the band intensities were evaluated in terms of optical density arbitrary units (A.U). *, Significantly different from untreated control ($P < 0.05$).

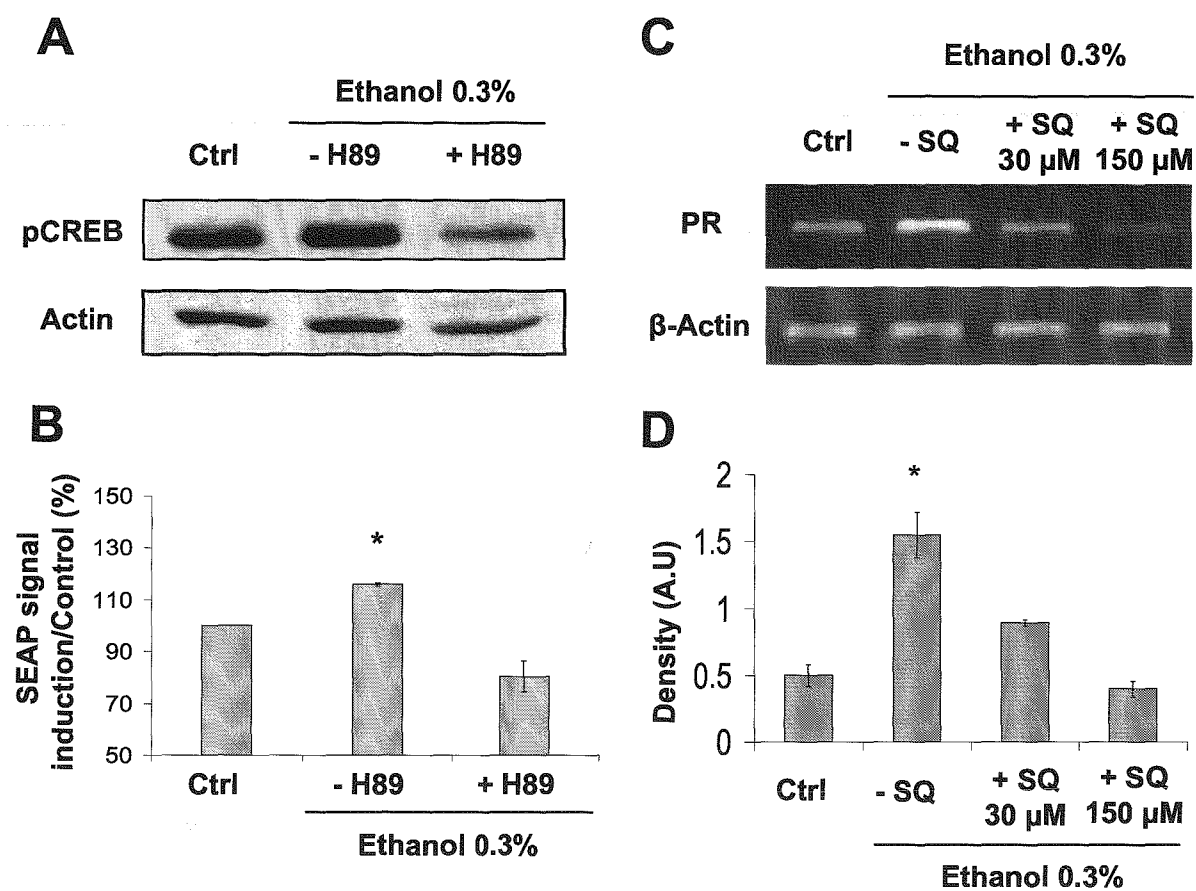


FIGURE 5

Figure 6 A_{2a} AR is involved in ethanol-induced ER α activation. A, RT-PCR analysis of A_{2a} AR transcript in MCF-7. Total RNA was extracted from control cells and used for RT-PCR. Lane 1, DNA marker; Lane 2, sample without cDNA; Lane 3, MCF-7. B, semi-quantitative RT-PCR analysis of PR mRNA. MCF-7 cells were treated for 24 hours, in serum free conditions, with ethanol (0.3%) and a selective A_{2a} AR antagonist, MSX-3 (MSX) (10 and 30 μ mol/L). β -Actin mRNA levels were determined as an internal control. C, the histogram represents the mean $\pm$ S.E. of four separate experiments in which the band intensities were evaluated in terms of optical density arbitrary units (A.U). *, Significantly different from untreated control ($P < 0.05$). D, semi-quantitative RT-PCR analysis of PR mRNA. MCF-7 cells were treated for 24 hours, in serum free condition, with 1 μ mol/L of the selective A_{2a} AR agonist CGS21680 (CGS), 1 nmol/L E₂ or 0.3% ethanol (Eth). The agonist was also added in H89-containing medium (10 μ mol/L). β -Actin mRNA levels were determined as an internal control.

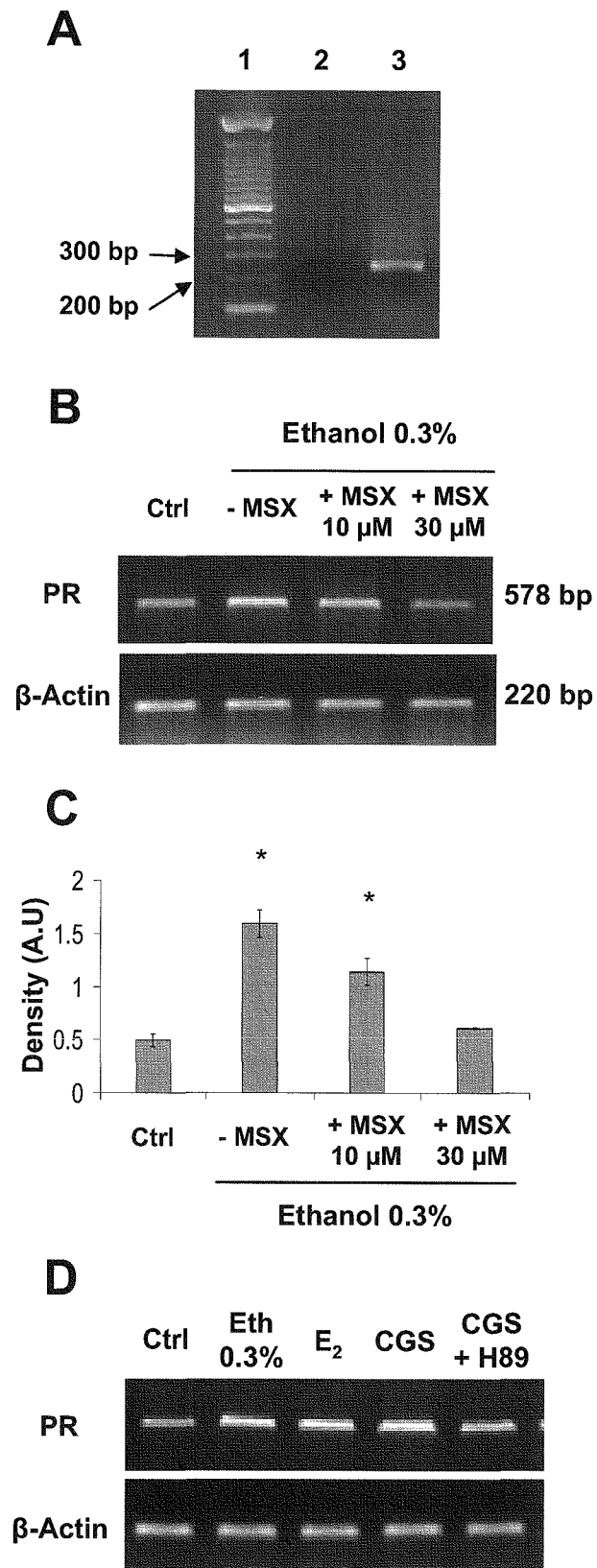


FIGURE 6

Figure 7 Schematic representation of ethanol effects in MCF-7 cells. Ethanol activates the A_{2a} Adenosine Receptor (A_{2a} AR) leading to the activation of adenylyl cyclase (AC) and the increase in intracellular cyclic AMP (cAMP) level (Singletary et al, 2001). Increased cyclic AMP stimulates PKA activity which phosphorylates CREB. Phosphorylation of CREB upregulates cyclic AMP-inducible gene transcription. PKA also induces a ligand-independent activation of $ER\alpha$ either by a direct phosphorylation (Le Goff et al, 1994) and/or by an interaction with phosphorylated CREB (Lazennec et al, 2001). The activated receptor then binds to specific estrogens response elements (EREs) within target genes, recruits the coactivator complex and promotes gene transcription.

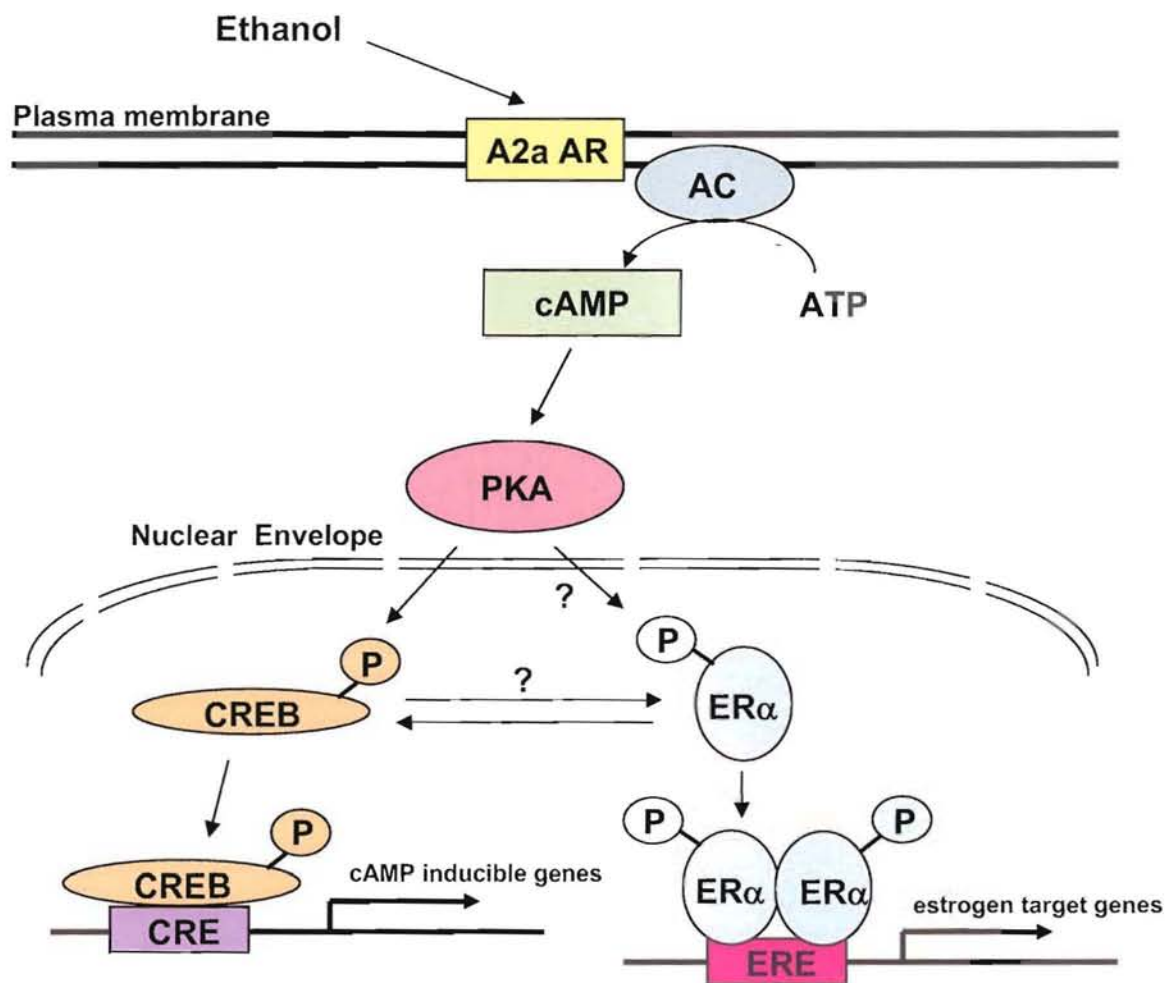


FIGURE 7

References

1. Aronica SM, Kraus WL and Katzenellenbogen BS. (1994). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8517-8521.
2. Aronson K. (2003). *CMAJ*, **168**, 1147-1148.
3. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ and Picard D. (1996). *EMBO J*, **15**, 2174-2183.
4. Burak WE, Jr., Quinn AL, Farrar WB and Brueggemeier RW. (1997). *Breast Cancer Res Treat*, **44**, 57-64.
5. Catalano S, Mauro L, Marsico S, Giordano C, Rizza P, Rago V, Montanaro D, Maggiolini M, Panno ML and Ando S. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 19908-19915.
6. Chalbos D, Philips A, Galtier F and Rochefort H. (1993). *Endocrinology*, **133**, 571-576.
7. Christofi FL, Zhang H, Yu JG, Guzman J, Xue J, Kim M, Wang YZ and Cooke HJ. (2001). *J Comp Neurol*, **439**, 46-64.
8. Coleman KM and Smith CL. (2001). *Front Biosci*, **6**, D1379-D1391.
9. Dash PK, Karl KA, Colicos MA, Prywes R and Kandel ER. (1991). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5061-5065.
10. DeNardo DG, Kim HT, Hilsenbeck S, Cuba V, Tsimelzon A and Brown PH. (2005). *Mol Endocrinol*, **19**, 362-378.
11. Dorgan JF, Baer DJ, Albert PS, Judd JT, Brown ED, Corle DK, Campbell WS, Hartman TJ, Tejpar AA, Clevidence BA, Giffen CA, Chandler DW, Stanczyk FZ and Taylor PR. (2001). *J Natl Cancer Inst*, **93**, 710-715.

12. el Tanani MK and Green CD. (1996). *Mol Cell Endocrinol*, **124**, 71-77.
13. Etique N, Chardard D, Chesnel A, Merlin JL, Flament S and Grillier-Vuissoz I. (2004). *Int J Mol Med*, **13**, 149-155.
14. Etique N, Grillier-Vuissoz I and Flament S. (2006). *Oncol Rep*, **15**, 603-608.
15. Fan S, Meng Q, Gao B, Grossman J, Yadegari M, Goldberg ID and Rosen EM. (2000). *Cancer Res*, **60**, 5635-5639.
16. Fazzari A, Catalano MG, Comba A, Becchis M, Raineri M, Frairia R and Fortunati N. (2001). *Mol Cell Endocrinol*, **172**, 31-36.
17. Gaub MP, Bellard M, Scheuer I, Chambon P and Sassone-Corsi P. (1990). *Cell*, **63**, 1267-1276.
18. Gubala W and Zuba D. (2003). *Pol J Pharmacol*, **55**, 639-644.
19. Hall JM and McDonnell DP. (2005). *Mol Interv*, **5**, 343-357.
20. Herberg FW, Taylor SS and Dostmann WR. (1996). *Biochemistry*, **35**, 2934-2942.
21. Izevbigie EB, Ekunwe SI, Jordan J and Howard CB. (2002). *Exp Biol Med (Maywood)*, **227**, 260-265.
22. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H and Chambon P. (1990). *EMBO J*, **9**, 1603-1614.
23. 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). *Science*, **270**, 1491-1494.

24. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR and Chambon P. (1987). *Cell*, **51**, 941-951.
25. Lazennec G, Thomas JA and Katzenellenbogen BS. (2001). *J Steroid Biochem Mol Biol*, **77**, 193-203.
26. Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ and Katzenellenbogen BS. (1994). *J Biol Chem*, **269**, 4458-4466.
27. Longnecker MP. (1994). *Cancer Causes Control*, **5**, 73-82.
28. Luo J and Miller MW. (2000). *Breast Cancer Res Treat*, **63**, 61-69.
29. Lykkesfeldt AE and Briand P. (1986). *Br J Cancer*, **53**, 29-35.
30. Marsaud V, Gougelet A, Maillard S and Renoir JM. (2003). *Mol Endocrinol*, **17**, 2013-2027.
31. Meng Q, Gao B, Goldberg ID, Rosen EM and Fan S. (2000). *Biochem Biophys Res Commun*, **273**, 448-453.
32. Michael MD, Michael LF and Simpson ER. (1997). *Mol Cell Endocrinol*, **134**, 147-156.
33. Michalides R, Griekspoor A, Balkenende A, Verwoerd D, Janssen L, Jalink K, Floore A, Velds A, van't Veer L and Neeffjes J. (2004). *Cancer Cell*, **5**, 597-605.
34. Mujoomdar M, Bennett A, Hoskin D and Blay J. (2004). *J Cell Physiol*, **201**, 429-438.
35. Nabholz JM, Buzdar A, Pollak M, Harwin W, Burton G, Mangalik A, Steinberg M, Webster A and von Euler M. (2000). *J Clin Oncol*, **18**, 3758-3767.
36. Nagy LE, Diamond I, Casso DJ, Franklin C and Gordon AS. (1990). *J Biol Chem*, **265**, 1946-1951.

37. Nunez AM, Berry M, Imler JL and Chambon P. (1989). *EMBO J*, **8**, 823-829.
38. Preisler-Mashek MT, Solodin N, Stark BL, Tyrivier MK and Alarid ET. (2002). *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **282**, E891-E898.
39. Przylipiak A, Rabe T, Hafner J, Przylipiak M and Runnebaum R. (1996). *Arch Gynecol Obstet*, **258**, 137-140.
40. Raman V, Tamori A, Vali M, Zeller K, Korz D and Sukumar S. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 26551-26555.
41. Reddel RR and Sutherland RL. (1984). *Eur J Cancer Clin Oncol*, **20**, 1419-1424.
42. Reichman ME, Judd JT, Longcope C, Schatzkin A, Clevidence BA, Nair PP, Campbell WS and Taylor PR. (1993). *J Natl Cancer Inst*, **85**, 722-727.
43. Shaywitz AJ and Greenberg ME. (1999). *Annu Rev Biochem*, **68**, 821-861.
44. Singh RR and Kumar R. (2005). *J Cell Biochem*, **96**, 490-505.
45. Singletary K, Nelshoppen J and Wallig M. (1995). *Carcinogenesis*, **16**, 959-964.
46. Singletary KW, McNary MQ, Odoms AM, Nelshoppen J and Wallig MA. (1991). *Nutr Cancer*, **16**, 13-23.
47. Singletary KW, Frey RS and Yan W. (2001). *Cancer Lett*, **165**, 131-137.
48. Sonne-Hansen K and Lykkesfeldt AE. (2005). *J Steroid Biochem Mol Biol*, **93**, 25-34.
49. Tsai HW, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS and Shupnik MA. (2004). *Endocrinology*, **145**, 2730-2738.
50. Wakeling AE and Bowler J. (1992). *J Steroid Biochem Mol Biol*, **43**, 173-177.

51. Weichselbaum RR, Hellman S, Piro AJ, Nove JJ and Little JB. (1978). *Cancer Res*, **38**, 2339-2342.
52. Wijayaratne AL and McDonnell DP. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 35684-35692.
53. Xie W, Duan R and Safe S. (1999). *Endocrinology*, **140**, 219-227. **Titles and**

4. EFFETS DE L'ETHANOL ET CYCLOOXYGENASE-2

4.1. Introduction

L'éthanol stimule la prolifération des cellules cancéreuses mammaires hormono-dépendantes (Przylipek *et al.*, 1996; Singletary *et al.*, 2001; Etique *et al.*, 2004a) mais également leur migration (Yirminia *et al.*, 1992; Meng *et al.*, 2000; Luo et Miller, 2000). Ces effets peuvent en partie être expliqués par l'activation ligand indépendante de l'ER α et l'augmentation de la sécrétion de la métalloprotéase MMP-9 (Etique *et al.*, 2006). Nos travaux nous ont également permis de montrer une surexpression de l'aromatase et de la métalloprotéase MMP-2 dans les cellules traitées à l'éthanol (Etique *et al.*, 2004a ; Etique *et al.*, 2006). Néanmoins, les mécanismes moléculaires responsables de cette surexpression restent à déterminer.

La prostaglandine G/H endoperoxyde synthase, également appelée COX, est l'enzyme qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines. Deux isoformes de cette enzyme ont été identifiées, la cyclooxygénase-1 (COX-1) et la cyclooxygénase-2 (COX-2). Ces 2 isoformes issues du gène *COX* sont exprimées dans de nombreux tissus. COX-1, qui est responsable de la synthèse de prostaglandines durant l'homéostasie, est constitutivement exprimée à un niveau plutôt faible. A l'inverse, *COX-2* est un gène à réponse précoce et immédiate, qui est inductible en réponse à diverses stimulations telles que le sérum, les promoteurs de tumeurs, les mitogènes, les endotoxines et les hormones (Richards *et al.*, 2002). Dans les cancers du sein, l'isoforme COX-2 est détectée dans le tissu tumoral mais pas dans le tissu sain (Parrett *et al.*, 1997). En outre, de plus fortes quantités de prostaglandines sont produites par le tissu tumoral comparé au tissu normal (Bennett, 1986). De nombreuses études montrent que ces prostaglandines sont impliquées non seulement dans la prolifération mais également dans la migration des cellules cancéreuses mammaires (Timoshenko *et al.*, 2003; Kundu *et al.*, 2002). De ce fait, certains inhibiteurs de COX-2 sont à l'essai, comme traitement adjuvant dans les cancers du sein, et donnent des taux de réponse intéressants (Chow *et al.*, 2005).

Les prostaglandines majoritairement synthétisées par COX-2 sont les prostaglandines E₂ (PGE₂). Elles sont capables d'activer les voies de signalisation de la PKA et de la PKC par l'intermédiaire des récepteurs aux prostanoïdes appelés EP₁, EP₂, EP₃ et EP₄. Dans les cellules cancéreuses mammaires, il a été montré que les PGE₂, via les récepteurs EP₁ et EP₂, étaient

capables d'augmenter le taux d'AMPc intracellulaire ainsi que l'expression de l'aromatase et la biosynthèse des œstrogènes (Brodie *et al.*, 2001; Brueggemeier *et al.*, 2003). D'autres études montrent que l'expression de la protéine COX-2 est associée à l'expression de la protéine MMP-2 dans les cancers du sein (Sivula *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que la protéine COX-2 pourrait, via la production de PGE2, jouer un rôle dans les effets de l'éthanol. Cette hypothèse est confortée par des études montrant que dans les hépatocytes et les cellules de Kupffer de rat, ainsi que dans les astrocytes humains, l'éthanol est capable de stimuler l'expression de COX-2 (Spitzer *et al.*, 2002 ; Blanco *et al.*, 2004). Notre étude vise à étudier l'expression et l'activité de cette enzyme dans les cellules cancéreuses mammaires traitées à l'éthanol.

4.2. Matériel et méthodes

4.2.1. Matériel

Le milieu DMEM, la L-glutamine et le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ont été achetés à la société Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) et le sérum de veau fœtal (SVF) à la société Eurobio (Les Ulis, France). Le célécoxib provient de la société Calbiochem (La Jolla, CA).

4.2.2. Culture cellulaire et traitement

La ligné cellulaire MCF-7 (HTB 22; adénocarcinome humain mammaire, ER-positive) a été obtenue à l'ATCC (Rockville, MD). Les cellules sont entretenues à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % (v/v) de CO₂. Elle sont cultivées dans un milieu DMEM contenant 10% de SVF et 2 mmol/L de L-glutamine.

Pour les analyses de RT-PCR, les cellules sontensemencées dans des plaques à 6 puits à la densité de 8×10^4 cellules/puits dans 2 mL de DMEM contenant 5 % de SVF et 2 mmol/L de L-glutamine. Après une incubation de 24 heures pour permettre l'adhésion des cellules, le milieu est remplacé par du DMEM sans rouge phénol, contenant 1 % de SVF et 2 mmol/L de L-glutamine. Après 24 heures, le milieu est éliminé et les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS. Les cellules sont traitées pendant 24 heures avec de l'éthanol à différentes concentrations (0,1; 0,3; 0,5 et 0,7 %) dans du milieu DMEM sans rouge phénol, contenant 1 % de SVF et 2 mmol/L de L-glutamine.

Pour les dosages de prostaglandines, les cellules sontensemencées dans des plaques à 6 puits à la densité de 8×10^4 cellules/puits dans 2 mL de DMEM contenant 5 % de SVF et 2 mmol/L de L-glutamine. Après 2 jours de culture, le milieu est remplacé par du DMEM sans rouge phénol, contenant 1 % de SVF et 2 mmol/L de L-glutamine. Après 24 heures, le milieu est éliminé et les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS. Les cellules sont traitées pendant 24 heures avec les différents composés à tester dans du milieu DMEM sans rouge phénol, contenant 1% de SVF et 2 mmol/L de L-glutamine.

4.2.3. RT-PCR semi-quantitative

Le protocole détaillé a déjà été décrit précédemment (Voir partie résultat 1.1). Lors de cette étude les amorces spécifiques utilisées pour l'amplification des transcrits du gène Cox-2 étaient 5'-GCAGGCTAATACTGATAGGAGAGA-3' pour l'amorce sens et 5'-CTTTCAAGGAGAATGGTGCTCCAA-3' pour l'amorce antisens. 2,5 mM de $MgCl_2$ et 35 cycles d'amplification ont été nécessaires pour la technique de PCR. Le fragment amplifié avait une taille de 603 pb.

4.2.4. Dosage des prostaglandines E₂ (PGE₂)

Pour étudier la production de PGE₂ par les cellules, le milieu de culture a été collecté puis centrifugé à 10 000 x g pendant 10 minutes. Le taux de PGE₂ dans le surnageant a été mesuré à l'aide du "Prostaglandin E₂ Express EIA kit" commercialisé par la société Cayman Chemicals.

4.3. Résultats

Dans un premier temps nous avons étudié l'expression du gène Cox-2 dans des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 traitées durant 24 heures par différentes concentrations d'éthanol (0,1; 0,3; 0,5 et 0,7 %) (Figure 26A). L'analyse densitométrique montre une expression significativement plus forte du gène Cox-2 dans les cellules traitées avec 0,3, 0,5 et 0,7 % d'éthanol (Figure 26B).

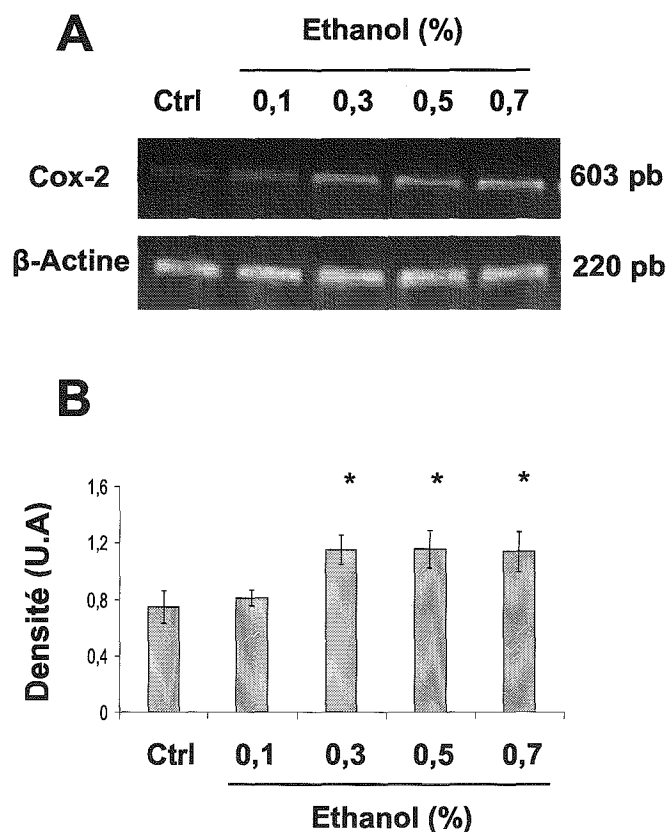


Figure 26 : L'éthanol augmente significativement l'expression du gène *COX-2*. **A**, Un gel représentatif d'une expérience de RT-PCR semi-quantitative réalisée sur les ARNm de *COX-2*. Les cellules MCF-7 ont été stimulées durant 24 heures avec diverses concentrations d'éthanol (0,1 à 0,7 %). Le taux d'ARNm de la β -Actine sert de contrôle interne. **B**, L'histogramme représente la moyenne $\pm$ l'écart type de 4 expériences indépendantes dans lesquelles l'intensité de chaque bande a été déterminée par densité optique et exprimée en unités arbitraires (U.A). *, Significativement différent du témoin ($P < 0.05$).

Dans un second temps nous avons étudié l'activité de la protéine Cox-2 en mesurant la quantité de PGE2 libérée par les cellules dans le milieu de culture (Figure 27). Les cellules MCF-7 ont été traitées durant 24 heures avec de l'éthanol à la concentration optimale de 0,3 %, en présence ou en absence d'un inhibiteur de Cox-2 : le célécoxib. En parallèle, des cellules MCF-7 ont été traitées dans les mêmes conditions avec un stimulateur connu de l'activité de Cox-2, le PMA à 1 μ M (Liu *et al.*, 1996), en présence et en absence de célécoxib. Les résultats montrent une augmentation significative de la concentration en PGE2 dans le milieu

de culture des cellules traitées à l'éthanol et au PMA. Cette augmentation d'environ 60 % est inhibée par le célécoxib dans les 2 cas.

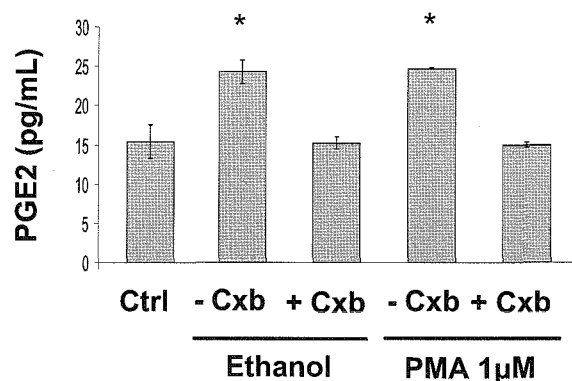


Figure 27 : L'éthanol augmente l'activité de la protéine COX-2. L'histogramme représente la concentration de PGE2 (en pg/ml) dans le milieu de culture de cellules MCF-7 traitées pendant 24 heures par de l'éthanol (0,3 %) ou du PMA (1 μM) en présence et en absence de célécoxib (10 μM). Les barres représentent la moyenne $\pm$ l'écart type de 3 expériences différentes. *, Significativement différent du témoin ($P < 0.05$).

4.4. Discussion et conclusion

Dans cette étude, nous nous proposons d'étudier l'expression et l'activité de COX-2 dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 traitées à l'éthanol.

Les résultats montrent que l'éthanol est capable de stimuler non seulement l'expression de COX-2 mais également son activité. Il semble néanmoins qu'une concentration minimale de 0,3 % soit nécessaire pour induire cette augmentation. Comme l'indiquent nos précédents résultats, cette concentration d'éthanol est en revanche incapable de stimuler la prolifération des cellules MCF-7. De plus, l'expression de l'aromatase est stimulée par l'éthanol à partir d'une concentration de 0,1% (Etique *et al.*, 2004a). Il semble donc difficile de relier la surexpression de COX-2 avec la stimulation de la croissance cellulaire et la surexpression d'aromatase observée dans les cellules MCF-7 traitées à l'éthanol.

En revanche, la stimulation de l'expression et de l'activité de COX-2 pourrait être responsable de la surexpression de la métalloprotéinase 2 observée dans les cellules MCF-7 traitées à l'éthanol (Etique *et al.*, 2006). En effet, plusieurs études suggèrent une association entre l'expression de COX-2 et de MMP-2 dans les cellules cancéreuses mammaires (Sivula

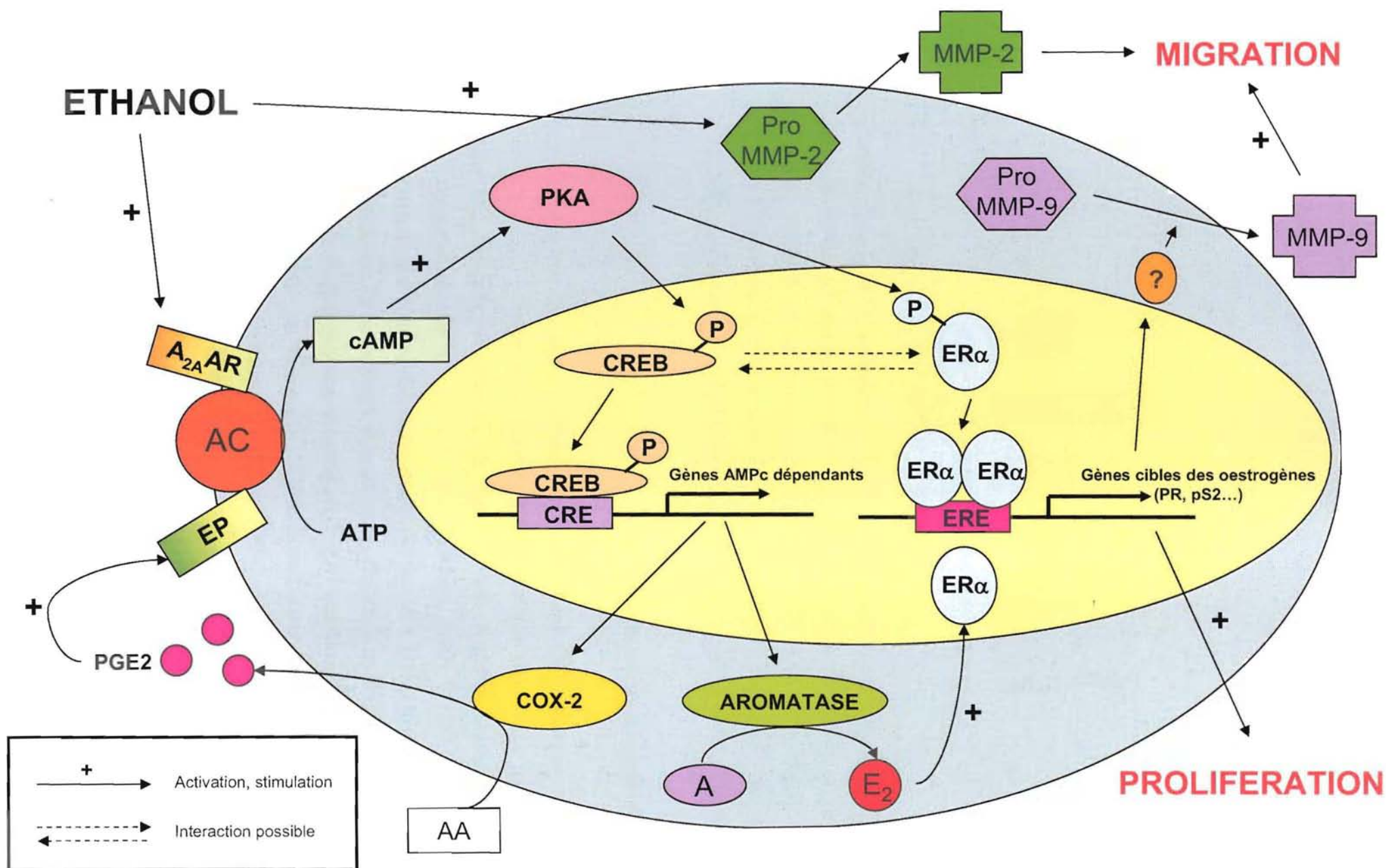


Figure 28 : Schéma résumant l'ensemble des mécanismes moléculaires induits par l'éthanol dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7. PKA : Protéine Kinase A; AA : Acide arachidonique; EP : Récepteur aux prostanoïdes; A_{2a}AR : Récepteur A_{2a} à l'adénosine; A : Androgènes; E₂ : 17β-oestradiol.

et al., 2005). De plus, dans d'autres types cellulaires il a été montré que les PGE2 pouvaient stimuler l'activité du promoteur des MMP-2 (Ito *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2004 ; Mayoral *et al.*, 2005). Enfin, nos précédents résultats indiquaient une surexpression de MMP-2 pour des doses d'éthanol de 0,3 et 0,5 %, soit les mêmes doses que celles nécessaires à la surexpression de COX-2.

D'autres études seront nécessaires pour établir clairement un lien entre les surexpressions de COX-2 et de MMP-2 induites par l'éthanol dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7. Il sera également nécessaire de confirmer l'absence de corrélation entre la surexpression de COX-2, celle de l'aromatase et la prolifération cellulaire observée dans les cellules traitées à l'éthanol. Néanmoins, ces résultats préliminaires permettent d'ouvrir de nouvelles pistes quant aux mécanismes moléculaires impliqués dans les effets de l'éthanol sur la tumorigénèse mammaire.

5. SYNTHÈSE DES RESULTATS

L'ensemble des résultats obtenus lors de nos études est résumé sur la figure 28. L'éthanol est capable d'activer le récepteur A_{2a} à l'adénosine (A_{2a}AR). Ce dernier active à son tour l'adénylate cyclase permettant ainsi d'augmenter la concentration intracellulaire en AMPc. Cette augmentation du taux d'AMPc va stimuler l'activité de la protéine kinase A (PKA), enzyme capable de phosphoryler et d'activer la protéine CREB. L'activation de cette protéine va stimuler la transcription de gènes régulés par des éléments de réponse à l'AMPc (CRE). Bien que nous ne l'ayons pas démontré, la PKA pourrait activer, par phosphorylation, le récepteur alpha aux oestrogènes (ER α), on parle alors d'activation ligand-indépendante du récepteur.

L'activation de l'ER α va permettre d'induire la transcription de gènes cibles des oestrogènes tels que le récepteur à la progestérone et la protéine pS2. On trouve également des gènes capables de stimuler la prolifération cellulaire. D'autres gènes cibles seraient capables de stimuler l'activation et la sécrétion de la métalloprotéinase-9 (MMP-9) favorisant ainsi la migration cellulaire.

Parmi les gènes susceptibles d'être induits par la protéine CREB, nous avons démontré une surexpression de l'aromatase qui va permettre d'augmenter la concentration locale en oestrogènes (E₂) par aromatisation des androgènes (A). Les oestrogènes produits vont permettre l'activation de l'ER α , on parle cette fois d'activation ligand-dépendante du récepteur.

Un autre gène susceptible d'être induit par la protéine CREB est celui codant la protéine COX-2. La surexpression de cette protéine va permettre d'augmenter la concentration locale en prostaglandines E_2 (PGE2) produites à partir de l'acide arachidonique (AA). Les prostaglandines PGE2 sont également capables de stimuler l'adénylate cyclase et d'activer la voie AMPc/PKA via leurs récepteurs, les récepteurs aux prostanoïdes (EP).

En outre, l'éthanol est capable de stimuler l'expression, l'activation et la sécrétion de la métalloprotéinase-2 (MMP-2) également impliquée dans les processus invasifs et migratoires des cellules cancéreuses mammaires.

Chapitre 3 :

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

De nombreuses données épidémiologiques montrent qu'une consommation régulière d'alcool, même modérée, augmente significativement le risque de développer un cancer du sein. Les études réalisées *in vitro* et *in vivo* pour confirmer ces données indiquent que l'éthanol peut non seulement induire la cancérogenèse mammaire, mais également stimuler la tumorigenèse et l'invasion des cellules tumorales. Ces effets semblent liés à l'hormono-dépendance des cellules cancéreuses. Nos études visaient à mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'action de l'éthanol.

1. PERTINENCE BIOLOGIQUE DES DOSES D'ETHANOL ET DE LA DUREE DES TRAITEMENTS

Les expériences *in vitro* ayant pour objectif d'étudier les effets de l'éthanol sur la tumorigenèse mammaire présentent une difficulté majeure : devoir utiliser des doses d'éthanol et des durées d'exposition correspondant à des conditions physiologiques. Il est facile de mesurer la quantité d'alcool présente dans le sang. En revanche, il est plus difficile de déterminer précisément la quantité d'éthanol à laquelle sont exposées les cellules tumorales mammaires. Les propriétés physico-chimiques de l'éthanol suggèrent que sa distribution est très rapide, notamment dans les organes très vascularisés comme le cerveau, les poumons ou encore le foie. D'ailleurs des études révèlent que dans ces organes, la concentration en éthanol est très rapidement équilibrée avec celle du sang (Jones *et al.*, 1990). Comme la plupart des glandes, la glande mammaire est très vascularisée, suggérant que la concentration en éthanol dans cet organe est aussi proche de celle du sang. De plus, des études montrent qu'une heure seulement après avoir consommé de l'alcool, le lait des femmes allaitant leur enfant présente une concentration d'alcool correspondant à environ 50 % de celle retrouvée dans le sang (Mennella et Beauchamp, 1991). Les doses utilisées lors de nos études variaient de 0,1 à 0,7 % correspondant à des concentrations sanguines de 1 à 7 g/L de sang. Il n'est pas rare de rencontrer une concentration d'alcool dans le sang de 1 g/L (0,1 %) chez les alcooliques voire même chez les consommatrices occasionnelles puisque pour une femme de 65 kg, cette concentration correspond à une consommation de 39 g d'éthanol soit environ ½ litre de vin. En revanche, un risque de coma mortel notamment par dépression respiratoire ou cardiaque s'observe à partir d'une concentration de 4 g/L de sang. Aussi, les doses supérieures ou égales à 0,4 % d'éthanol ne devraient pas être retrouvées au niveau des tumeurs mammaires et les

résultats observés *in vitro* au delà de ces doses sont donc difficilement transposables dans un contexte physiologique. Toutefois, il ne faut pas négliger les doses supérieures à 0,3 % car il peut exister une différence entre les doses appliquées et les doses réellement présentes dans le milieu. Il n'est pas certain, même pour des traitements de 24 heures, que la concentration en éthanol reste identique durant toute la période d'incubation. En effet, les cellules étant incubées à 37°C, il est possible que l'éthanol puisse s'évaporer progressivement et qu'une concentration initiale de 0,4 % soit réduite à 0,3 % au bout de quelques heures. Pour les traitements de durée supérieure à 24 heures, le milieu a été changé quotidiennement dans le but de limiter ce phénomène d'évaporation et de maintenir des concentrations d'éthanol proches de celles désirées.

Toujours dans un but de transposition aux conditions physiologiques, il est important de prendre en compte la durée d'exposition des cellules à l'éthanol. Lors de nos travaux, nous avons étudié les effets de l'éthanol sur les cellules MCF-7 suite à des traitements courts, de l'ordre de 24 heures, mais également suite à des traitements longs allant jusqu'à six jours. Chez les alcooliques, la consommation régulière d'alcool en quantité importante peut permettre de maintenir une certaine concentration d'éthanol dans le sang pendant plusieurs jours. Chez les consommatrices occasionnelles, suite à une prise d'alcool la concentration d'éthanol dans le sang augmente rapidement puis va diminuer très lentement à raison de 0,16 g/L/h. Cette métabolisation lente peut permettre le maintien pendant plusieurs heures d'une concentration non négligeable d'alcool non seulement dans le sang mais également dans les organes. Ainsi, si les résultats obtenus sur une durée de 4 et 6 jours ne sont transposables qu'aux patientes alcooliques, les résultats obtenus après 24 h peuvent également s'appliquer aux consommatrices occasionnelles.

Enfin, si certains de nos résultats ont été obtenus avec des doses et des durées de traitements qui sont physiologiquement improbables, ils n'en sont pas moins intéressants. Ils peuvent en effet permettre de connaître précisément les effets de l'alcool sur ces cellules, de mettre en évidence de nouveaux mécanismes moléculaires ou encore de nouvelles cibles thérapeutiques. L'alcool pourra aussi être utilisé comme activateur ou répresseur de certaines protéines ou voies de signalisation. En outre, l'éthanol est souvent utilisé comme solvant dans les études *in vitro* nécessitant l'utilisation de composés hydrophobes et la connaissance des effets de ce solvant pourrait permettre d'expliquer certains résultats.

2. EFFETS DE L'ETHANOL SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de l'éthanol sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7. Deux concentrations d'éthanol ont été étudiées, 0,1 et 0,3 %, sur une période de 6 jours. Il s'agit de doses qui, comme nous l'avons vu précédemment, peuvent être considérées comme physiologiques. L'augmentation la plus significative a été observée pour une concentration de 0,1 % d'éthanol après 6 jours de traitement. Des expositions plus courtes ou des doses plus fortes ne stimulaient pas la croissance tumorale. Nous avons comparé nos résultats à ceux obtenus par d'autres équipes sur le même type cellulaire (Przylipiak *et al.*, 1996; Singletary *et al.*, 2001; Izevbigie *et al.*, 2002). Cependant, les conditions de culture, les méthodes d'études, les doses et la durée des traitements divergent. Globalement la conclusion est identique : l'éthanol stimule la prolifération des cellules tumorales. Certaines études rapportent une stimulation plus forte pour des concentrations d'éthanol de 0,3 % voire de 0,5 % (Singletary *et al.*, 2001), ce qui n'est pas le cas dans nos travaux. Pour quelles raisons n'observons nous pas d'effet avec une concentration de 0,3 % ? Il semble qu'il ne s'agisse pas d'un effet toxique de l'éthanol puisque la perméabilité membranaire des cellules est intacte comme en témoignent nos tests au bleu trypan. De plus, des études utilisant la méthode du MTT montrent que la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 n'est affectée que pour des concentrations d'éthanol supérieures à 0,6 % (Meng *et al.*, 2000). Cette absence de stimulation de la prolifération des cellules avec 0,3 % d'éthanol est d'autant plus étonnante qu'à cette concentration nous observons des effets optimaux sur l'activation de l'ER α , la sécrétion des métalloprotéases 2 et 9 ou encore sur l'activité de COX-2 dont les rôles dans la tumorigenèse mammaire sont clairement établis. Les raisons de cette absence de stimulation à 0,3 % restent donc à déterminer. Quoi qu'il en soit, les effets de l'éthanol sur la prolifération cellulaire ne se limitent pas aux cellules cultivées *in vitro* puisque des travaux montrent que la consommation d'alcool stimule le développement des tumeurs mammaires chez les rats (Schrauzer *et al.*, 1979).

L'effet prolifératif de l'éthanol ne peut être généralisé à toutes les cellules cancéreuses mammaires car une condition essentielle pour observer cet effet semble être le caractère hormono-dépendant des cellules tumorales. En effet, une étude réalisée sur des cellules ER-négatives, à savoir les lignées cellulaires MDA-MB-231 et BT-20, montre que l'éthanol n'a

aucun effet sur la prolifération de ces cellules. Ce lien entre les œstrogènes et l'éthanol est suspecté depuis longtemps. En effet, la concentration en œstrogènes circulants est plus forte chez les patientes alcooliques et de plus, il existe une corrélation forte entre l'augmentation du risque de développer des tumeurs ER + et la consommation d'alcool. C'est en se basant sur ces résultats que nous avons cherché à étudier le rôle joué par les œstrogènes dans l'effet prolifératif de l'éthanol. Nous nous sommes donc intéressés au récepteur alpha aux œstrogènes mais également à l'aromatase, enzyme responsable de la biosynthèse des œstrogènes.

2.1. Rôle de l'ER α

Le rôle de l'ER α dans l'effet prolifératif de l'éthanol semble incontestable puisque ce phénomène n'est observé que dans les cellules cancéreuses mammaires ER-positives (Singletary *et al.*, 2001). En revanche, les mécanismes par lesquels l'éthanol interagit avec l'ER α restent à élucider. Le mécanisme d'action de l'ER α est complexe et peut faire intervenir différentes voies d'activation, soit ligand-dépendante, soit ligand-indépendante. Nos travaux suggèrent l'intervention de ces deux voies. Tout d'abord, nous avons montré qu'après 6 jours de traitement, alors que la prolifération des cellules était plus forte en présence de 0,1 % d'éthanol, la quantité d'ER α dans les cellules était également augmentée (environ 3,3 fois). Ce résultat est en accord avec celui obtenu par une autre équipe qui montrait que dans les mêmes conditions, après 7 jours de traitement, le taux d'ER α était augmenté de 2,1 fois dans les cellules MCF-7 mais aussi dans les cellules ZR-75 (Singletary *et al.*, 2001). Ces auteurs observent également une augmentation du taux d'ER α après seulement 2 jours de traitement à l'éthanol. Pour notre part, lorsque nous avons étudié le taux d'ER α après 24 heures de traitement à l'éthanol, nous n'avons observé aucun changement. L'augmentation du taux d'ER α n'est donc pas une réponse précoce à l'exposition à l'éthanol. Cependant, cette augmentation du taux d'ER α pourrait être une première explication à l'effet prolifératif de l'éthanol. Il pourrait favoriser l'action des œstrogènes qui sont capables de stimuler l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire. Ceci est également suggéré par une étude montrant que dans des cellules MCF-7 traitées à l'éthanol, la quantité d'ER α augmente ainsi que son activité transcriptionnelle (Fan *et al.*, 2000).

Quelles sont les raisons de cette augmentation du taux d'ER α ? Pour comprendre ce phénomène, nous nous sommes intéressés au taux d'ARNm codant le récepteur, ce qui n'avait

pas été réalisé jusqu'alors. De façon surprenante, le taux d'ARNm de l'ER α n'est pas significativement plus élevé dans les cellules MCF-7 traitées à l'éthanol. Ce résultat suggère que l'augmentation du taux d'ER α n'est pas due à une stimulation de son expression mais plutôt à une stabilisation et à une accumulation du récepteur dans les cellules. Le fait que l'augmentation de la quantité du récepteur soit tardive, renforce l'idée d'une stabilisation. Mais c'est surtout la découverte d'une autre voie d'activation de l'ER α déclenchée par l'éthanol qui supporte cette hypothèse. En effet, nous avons démontré que l'éthanol est capable d'activer l'ER α par une voie ligand-indépendante médiée par la voie AMPc/PKA. Or, plusieurs études montrent que la fixation d'un ligand agoniste (E₂) ou antagoniste (ICI 182,780) entraîne une protéolyse de l'ER α par le protéasome (Wakeling et Bowler, 1992; Wijayaratne et McDonell, 2001). A l'inverse, une activation ligand-indépendante du récepteur, notamment par la PKA, favorise sa stabilisation en le protégeant d'une protéolyse induite par la fixation d'un ligand (Tsai *et al.*, 2004). Pour démontrer cette activation ligand-indépendante de l'ER α , nos études ont été menées en absence de toute source d'androgènes et d'œstrogènes. Aussi, nous avons dû utiliser un milieu de culture sans sérum de veau fœtal ou contenant du sérum de veau fœtal préalablement traité au charbon actif et au dextran.

Comment l'éthanol permet-il une activation ligand-indépendante de l'ER α ? Plusieurs voies de signalisation pouvaient être responsables et notre étude a permis de montrer qu'en inhibant spécifiquement la voie AMPc/PKA, nous étions capables de bloquer totalement ce processus. Ces résultats étaient en accord avec une étude précédente montrant une augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 exposées à l'éthanol (Singletary *et al.*, 2001). Nos travaux n'ont hélas pas permis d'expliquer le mécanisme par lequel la PKA active l'ER α et d'autres études seront nécessaires pour comprendre ce phénomène. En revanche, nous avons pu identifier le mécanisme par lequel l'éthanol activait la voie AMPc/PKA dans les cellules MCF-7. C'est notamment grâce à des études similaires réalisées sur des cellules de neuroblastomes NG108-15 et sur des cellules lymphoïdes S49 (Nagy *et al.*, 1990) que nous avons pu tester des hypothèses et notamment celle du récepteur A_{2a} à l'adénosine. Dans les cellules MCF-7, son inhibition bloquait les effets de l'éthanol alors que sa stimulation par un agoniste spécifique entraînait les mêmes effets que l'éthanol sur la transcription des gènes cibles de l'ER α . Le mécanisme par lequel l'éthanol active ce récepteur reste à déterminer dans les cellules MCF-7. Les travaux réalisés sur les cellules S49 suggèrent que l'éthanol active ce récepteur en favorisant l'augmentation de la quantité d'adénosine dans le milieu extracellulaire. Il s'agit de

la conséquence d'un blocage d'un transporteur de nucléosides (Nagy *et al.*, 1990). Un tel mécanisme pourrait être impliqué dans les cellules MCF-7 mais cela reste à confirmer.

L'activation ligand-indépendante du récepteur a été observée après seulement 24 heures de traitement alors qu'il faut attendre plusieurs jours avant d'observer une augmentation significative du taux d'ER α dans les cellules. Cela suggère que, dans un premier temps, seule la voie ligand-indépendante serait responsable des effets de l'éthanol. Cependant cette voie est-elle suffisante pour stimuler la prolifération des cellules ? Les effets significatifs de l'éthanol sur la prolifération n'ayant été observés qu'après 4 jours de traitement, il est possible que les 2 voies soient nécessaires pour stimuler la croissance des cellules. Cependant, la sensibilité de notre technique n'est peut-être pas suffisante pour détecter un effet plus précoce de l'éthanol sur la prolifération des cellules et la voie ligand-indépendante pourrait donc à elle seule stimuler la prolifération des cellules exposées à l'éthanol. Cela indiquerait alors qu'une absence d'œstrogènes ne suffit pas à stopper la croissance tumorale chez les patientes alcooliques. Ainsi, chez ces patientes, l'utilisation d'inhibiteur d'aromatase comme traitement curatif pourrait donc se révéler inutile. Par ailleurs, l'activation de l'ER α par la voie ligand-indépendante en présence d'éthanol suggère que, chez les patientes alcooliques, les traitements à base de tamoxifène pourraient aussi s'avérer inutiles. En effet, la phosphorylation de l'ER α par la PKA au niveau de la sérine 305 convertit le tamoxifène en stimulateur de la croissance cellulaire (Michalides *et al.*, 2004).

2.2. Rôle de l'aromatase

L'augmentation du taux d'œstrogènes circulants chez les femmes alcooliques suggère une augmentation de l'activité aromatase. Si de précédentes études ont permis de montrer qu'une consommation d'alcool entraîne une activité aromatase plus élevée dans certains tissus (Ginsburg, 1999), nous sommes les premiers à montrer une surexpression de l'aromatase dans les cellules cancéreuses mammaires. En effet, après 6 jours d'exposition à 0,1 % d'éthanol, le taux d'ARNm de l'aromatase dans les cellules MCF-7 est augmenté de 2,4 fois et le taux protéique d'environ 10 fois. Cette surexpression pourrait jouer un rôle non négligeable dans l'effet de l'éthanol sur la croissance tumorale. En effet, une quantité plus élevée d'aromatase peut permettre une augmentation rapide de la concentration locale en œstrogènes en utilisant, *in vitro*, les androgènes présents dans le sérum de veau fœtal et *in vivo* les androgènes circulants. Cette augmentation du taux d'œstrogènes peut avoir un impact d'autant plus

important sur la prolifération cellulaire que l'exposition à l'éthanol s'accompagne, comme nous l'avons vu précédemment, d'une surexpression de l'ER α . Nos travaux réalisés avec d'autres alcools à courte chaîne aliphatique (méthanol et butanol) placent également l'aromatase comme protéine clef des effets de l'éthanol sur la croissance tumorale. En effet, le méthanol augmente la quantité d'ER α dans les cellules mais n'a aucun effet sur leur prolifération. Il semble donc que la stimulation de l'ER α par les œstrogènes du sérum ou néosynthétisés grâce à l'aromatase aient une importance.

Comment l'éthanol induit-il une augmentation de l'expression d'aromatase dans les cellules ? Comme pour l'ER α , nous n'observons pas de surexpression significative de l'aromatase après 24 heures de traitement à l'éthanol (résultats non présentés). Il semble donc que cette surexpression soit tardive. Dans les cellules cancéreuses mammaires, le promoteur utilisé pour la transcription de l'aromatase contient un CRE (Michael *et al.*, 1997 ; Zhou *et al.*, 1999) et de nombreuses études révèlent que l'AMPc joue un rôle important dans la surexpression d'aromatase et la biosynthèse d'œstrogènes observée dans ces cellules. Singletary *et al.* montrent une augmentation de la concentration d'AMPc dans les cellules MCF-7 traitées à l'éthanol (Singletary *et al.*, 2001) et nos travaux indiquent que l'éthanol est capable d'activer la voie AMPc/PKA dans ces cellules. Ces phénomènes pourraient être responsables de la surexpression d'aromatase. Par ailleurs, nous observons une augmentation de l'activité COX-2 dans les cellules MCF-7 traitées à l'éthanol et les prostaglandines E₂ sont capables d'augmenter le taux d'AMPc intracellulaire dans les cellules cancéreuses mammaires ainsi que l'expression de l'aromatase et la biosynthèse des œstrogènes (Brodie *et al.*, 2001 ; Brueggemeier *et al.*, 2003). Néanmoins, nous montrons que la surexpression de COX-2 s'observe pour une concentration minimale d'éthanol de 0,3 % alors que celle de l'aromatase s'observe déjà à une concentration de 0,1 %. Il est donc difficile de relier la surexpression de COX-2 et celle de l'aromatase mais des études complémentaires seront nécessaires pour le confirmer.

2.3. L'AMPc : un facteur clef ?

Si nos travaux suggèrent que l'aromatase et l'ER α sont impliqués dans la prolifération cellulaire induite par l'éthanol, ils supposent également que l'AMPc pourrait être un facteur clef de ce phénomène. Non seulement sa concentration intracellulaire augmente dans les cellules cancéreuses mammaires traitées à l'éthanol (Singletary *et al.*, 2001) mais il intervient

également dans l'activation ligand-indépendante de l'ER α et probablement dans l'augmentation du taux d'aromatase que nous observons. Enfin, le gène *COX-2* surexprimé dans les cellules MCF-7 exposées à l'alcool contient dans sa région promotrice un CRE. L'AMPc s'inscrit donc comme le facteur commun de la plupart des effets que nous avons observés sur les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 traitées à l'éthanol. Ce résultat n'est pas étonnant puisqu'au niveau du cerveau ainsi que dans d'autres systèmes cellulaires, de nombreuses étapes clés de la voie de signalisation de l'AMPc (adénylate cyclase, protéine G, PKA et CREB) ont été décrites comme des cibles majeures de l'éthanol lors d'une exposition de courte ou de longue durée (Pandey *et al.*, 2001).

Si l'AMPc est un intermédiaire commun aux différents effets que nous observons, les mécanismes par lequel l'éthanol favorise sa biosynthèse semblent plus divers. Nos études sur l'activation ligand-indépendante de l'ER α montrent que l'éthanol active l'adénylate cyclase par l'intermédiaire du récepteur A_{2a} à l'adénosine. L'inhibition de ce récepteur inhibe totalement l'activation de l'ER α suggérant que seul l'A_{2a}AR est impliqué dans l'augmentation du taux d'AMPc. Cependant, nos résultats ont été obtenus après seulement 24 heures d'incubation et les travaux montrant une augmentation du taux d'AMPc dans les cellules MCF-7 traitées à l'éthanol indiquent que la concentration d'AMPc augmente progressivement durant 8 jours (Singletary *et al.*, 2001). Cette augmentation continue indique que non seulement le mécanisme favorisant la production d'AMPc se maintient au cours du temps mais aussi qu'il s'intensifie. Ainsi, après 24 heures de traitement, d'autres protéines que l'A_{2a}AR sont susceptibles d'intervenir dans l'activation de l'adénylate cyclase. C'est le cas notamment des prostaglandines E₂ (Brodie *et al.*, 2001) dont la biosynthèse est significativement augmentée après 24 heures de traitement à l'éthanol. Les œstrogènes sont également capables d'augmenter la production d'AMPc dans les cellules cancéreuses mammaires en stimulant l'adénylate cyclase (Aronica *et al.*, 1994). La surexpression d'aromatase induite par l'éthanol pourrait, en augmentant la concentration locale en œstrogènes, favoriser ce processus. Enfin, de nombreux récepteurs membranaires couplés à des protéines G sont capables d'activer l'adénylate cyclase. Ces récepteurs constituent des cibles potentielles de l'éthanol qui pourrait notamment stimuler la sécrétion de certains de leurs ligands.

3. EFFETS DE L'ETHANOL SUR LA MIGRATION DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES

Outre un effet sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires, des études révèlent que l'éthanol augmenterait le potentiel invasif et migratoire des cellules cancéreuses mammaires (Meng *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2000). C'est le cas notamment d'une étude réalisée sur des cellules MCF-7 montrant que l'alcool non seulement altère leur adhésion mais également augmente leur motilité et leurs capacités invasives (Meng *et al.*, 2000). Ces propriétés de l'éthanol sont d'autant plus intéressantes que les cellules MCF-7 ont un potentiel invasif relativement faible. Nos tests de croissance clonale semblent confirmer ces résultats puisqu'ils montrent une stimulation de 50 % de la croissance cellulaire dans des conditions de culture indépendantes de l'ancrage, après 15 jours de traitement avec 0,1% d'éthanol.

Quels sont les mécanismes responsables de ces effets ? Certaines études indiquent que l'éthanol diminue l'expression des molécules d'adhésion à savoir la E-cadherine et les trois caténines majeures (α , β et γ). D'autres études montrent que l'expression des récepteurs erbB-2, erbB-3 et erbB-4, fortement associés à l'invasion tumorale, est augmentée par l'éthanol. Pour notre part, nous nous sommes intéressés aux métalloprotéases 2 et 9 dont l'implication dans les processus invasifs des cellules cancéreuses mammaires a déjà été démontrée (Nakajima M *et al.*, 1987; Egeblad M *et al.*, 2002).

3.1. Sécrétion de la métalloprotéase 9

Nos travaux ont permis de montrer que l'éthanol, à la concentration de 0,3 %, pouvait stimuler significativement la sécrétion de la métalloprotéase 9 dans les cellules MCF-7. Nous montrons également que cette sécrétion est liée à l'ER α puisqu'un blocage spécifique de ce récepteur bloque totalement la sécrétion de la MMP-9 induite par l'éthanol. Par ailleurs, ces travaux ayant été réalisés dans un milieu dépourvu de sérum de veau fœtal, ils suggèrent que l'activation ligand-indépendante de l'ER α par l'éthanol est responsable de cette sécrétion. Néanmoins, des études complémentaires utilisant notamment des inhibiteurs de la voie AMPc/PKA seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Afin d'élucider le mode d'action de l'ER α sur la sécrétion de MMP-9 dans les cellules traitées à l'éthanol nous nous sommes intéressés à l'expression de cette enzyme. Ni l'éthanol, ni l'E₂, ne sont capables de stimuler l'expression du gène *MMP-9*. Ce résultat suggère que

l'ER α est incapable d'activer la transcription de ce gène et que l'augmentation de sécrétion n'implique que des événements post-transcriptionnels. L'analyse de la région promotrice de *MMP-9* va dans ce sens puisque aucun ERE n'est présent (Chakraborti *et al.*, 2003). On peut néanmoins noter la présence de sites de liaison pour AP-1 et Sp-1, facteurs capables d'interagir avec l'ER α pour activer la transcription (Webb *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2005). Mais actuellement, rien n'indique qu'une activation ligand-indépendante du récepteur puisse permettre ce genre d'interactions. Si l'ER α ne peut agir directement sur l'expression de *MMP-9*, il peut en revanche activer ou réprimer la transcription de gènes dont les produits protéiques permettraient de réguler la sécrétion de *MMP-9*. Les candidats sont alors nombreux et il existe peu d'études consacrées aux mécanismes liant l'ER α et la *MMP-9* dans les cellules cancéreuses mammaires. Une étude récente montre que l'activation d'un ER α membranaire par l'œstradiol peut, via la protéine Src, stimuler la sécrétion de *MMP-9* (Razandi *et al.*, 2003). Néanmoins, cette hypothèse implique que l'éthanol soit capable d'activer un ER α membranaire, ce qui n'a jamais été démontré jusqu'à présent. Des études complémentaires seront donc nécessaires pour déterminer comment l'ER α stimule la sécrétion de *MMP-9* dans les cellules traitées à l'éthanol.

3.2. Sécrétion de la métalloprotéase 2

Nous montrons également que l'éthanol est capable de stimuler la sécrétion de *MMP-2* dans les cellules MCF-7 traitées à l'éthanol. Cet effet de l'éthanol avait déjà été observé dans les fibroblastes mais également plus récemment sur d'autres lignées de cellules cancéreuses mammaires (Aye *et al.*, 2004; Ke *et al.*, 2006). La stimulation optimale s'observe pour une concentration de 0,5% d'éthanol, dose qui est rarement retrouvée physiologiquement. Néanmoins une stimulation significative est observée à partir de 0,3 %.

Contrairement à *MMP-9* et à la plupart des effets de l'éthanol que nous avons observés, la sécrétion de *MMP-2* ne semble pas être liée à l'ER α . Un antagoniste sélectif de ce récepteur ne bloque pas cet effet suggérant que l'éthanol utilise un mécanisme différent pour stimuler la sécrétion de *MMP-2*. L'étude d'expression que nous avons réalisée semble confirmer ce résultat. En effet, dans les cellules traitées à l'éthanol, le taux d'ARNm codant *MMP-2* est significativement supérieur à celui des cellules témoins ce qui n'était pas le cas pour *MMP-9*. L'éthanol est donc capable d'activer la transcription de *MMP-2* mais le mécanisme utilisé reste à déterminer. Des travaux récents montrent que dans les fibroblastes, l'éthanol augmente

l'expression de MMP-2 par la voie de signalisation de la PKC (Aye *et al.*, 2004). Cependant, d'autres études montrent que dans les cellules MCF-7 et des cultures de tissus cancéreux mammaires, des activateurs de la PKC stimulent la sécrétion de MMP-9 mais pas celle de MMP-2 (Liu *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004). Une autre hypothèse lie la surexpression de MMP-2 à la protéine COX-2. Dans les cellules cancéreuses mammaires traitées à l'éthanol, nous montrons une augmentation de l'expression et de l'activité de COX-2. Par ailleurs, il est décrit une association entre l'expression de COX-2 et de MMP-2 dans les cellules cancéreuses mammaires (Sivula *et al.*, 2005). Des travaux réalisés sur d'autres modèles cellulaires confirment cette association et montrent que les prostaglandines E₂ peuvent stimuler l'expression et l'activité de MMP-2 (Choi *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2004; Mayoral *et al.*, 2005). Selon les types cellulaires, les voies de signalisation utilisées sont différentes. Dans les chondrocytes, cette stimulation passe par la voie des MAPKs et de la PKC (Choi *et al.*, 2004) alors que dans les cellules cancéreuses pancréatiques, seule la voie des MAPK est impliquée (Ito *et al.*, 2004). Des études complémentaires devraient permettre de tester cette hypothèse et éventuellement de déterminer les voies de signalisation impliquées.

Il n'est cependant pas certain que la surexpression de MMP-2 puisse à elle seule expliquer la stimulation de la sécrétion de cette metalloprotéase. Plusieurs niveaux de régulation peuvent exister et l'éthanol pourrait agir au niveau post-transcriptionnel en stimulant la sécrétion et l'activation de MMP-2. Une étude montre que dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, la production de radicaux libres, par les métabolites de l'œstradiol, permet d'activer la MMP-2 (Paquette *et al.*, 2005). Le métabolisme de l'éthanol est également capable de générer des radicaux libres et une étude récente montre que dans des cellules cancéreuses mammaires HB2, surexprimant le récepteur ErbB2, l'éthanol est capable d'activer la MMP-2. Cette activation peut être inhibée par des antioxydants, montrant l'implication des radicaux libres dans ce processus (Ke *et al.*, 2006).

Si les résultats sur la stimulation de l'expression et de la sécrétion de MMP-2 dans les cellules MCF-7 traitées à l'éthanol restent à élucider, ils suggèrent que l'éthanol est capable d'activer d'autres voies de signalisation que celle des œstrogènes ou de la PKA. Les possibilités sont multiples : voie des MAPKs, de la PKC, de la PI3K et d'autres études devront être réalisées pour déterminer leur implication respective.

4. PERSPECTIVES

4.1. Poursuite des études *in vitro* sur les cellules MCF-7

Au terme de ce travail, plusieurs mécanismes moléculaires induits par l'éthanol ont été décrits dans les cellules MCF-7. Cependant, certaines voies d'activation ne sont pas complètement élucidées et nos travaux devront être complétés.

Nous avons mis en évidence une activation ligand-indépendante de l'ER α par la voie AMPc/PKA dans les cellules MCF-7 traitées à l'éthanol. Néanmoins, le mécanisme par lequel la PKA active l'ER α dans ce contexte reste à déterminer. Les travaux réalisés sur différents modèles cellulaires suggèrent que la PKA active l'ER α par phosphorylation (Aronica *et al.*, 1991; Aronica *et al.*, 1993). Cette phosphorylation semble avoir lieu au niveau du domaine AF-2 dans lequel se trouve d'ailleurs une sérine en position 305 (El-tanani *et al.*, 1997). Aussi, lors d'une exposition à l'éthanol, nous étudierons l'état de phosphorylation de l'ER α à l'aide d'un marquage métabolique au $^{32}\text{PO}_4\text{H}_3$ (Chen *et al.* 1999). Nous déterminerons également les sites de phosphorylation utilisés par la PKA à l'aide d'anticorps spécifiques de certains sites phosphorylés ou en réalisant des transfections de dominant négatifs de l'ER α comportant des mutations dans les sites potentiels de phosphorylation (Lazennec *et al.*, 2001). Nous pourrions ainsi déterminer si les sites de phosphorylation de l'ER α par la PKA, lors d'une exposition à l'éthanol, sont les mêmes que lors d'une activation induite par d'autres activateurs de la voie AMPc/PKA (AMPc, toxine cholérique). Par ailleurs, la littérature suggère que d'autres facteurs peuvent favoriser l'activation et l'activité transcriptionnelle de l'ER α (Fujimoto *et al.*, 1994; Ince *et al.*, 1994). De nombreux candidats existent. La protéine CREB dont nous avons observé l'activation dans les cellules traitées à l'éthanol en fait partie (Lazennec *et al.*, 2001). Des expériences d'immunoprécipitation devraient nous permettre de mettre en évidence ce genre d'interaction.

La sécrétion de MMP-9 induite par l'éthanol est dépendante de l'ER α et nos résultats obtenus en absence d'œstrogènes suggèrent qu'elle résulte d'une activation ligand-indépendante de ce récepteur. Des études de la sécrétion de MMP-9 induite par l'éthanol en présence d'inhibiteurs sélectifs de la voie AMPc/PKA (H89, SQ22536) permettront de confirmer cette hypothèse.

L'éthanol induit également une sécrétion et une surexpression de MMP-2 et les voies de signalisation impliquées dans ce processus restent à déterminer. Des inhibiteurs sélectifs

des principales voies de signalisation cellulaire (PKC, AMPc/PKA, MAPK,...) devraient permettre dans un premier temps de restreindre les recherches. L'implication des prostaglandines E₂ et de la protéine COX-2 pourrait être envisagée (Choi *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2004; Mayoral *et al.*, 2005). L'inhibition de cette enzyme (Celecoxib) et l'utilisation d'antagonistes des récepteurs aux prostaglandines devraient nous permettre d'éclaircir ce point.

Enfin, nous pensons d'une manière générale qu'une analyse par technique Microarray, des effets de l'éthanol sur les cellules MCF-7 serait nécessaire. Elle nous permettrait de confirmer les résultats obtenus en PCR semi-quantitative à savoir la surexpression de PR, pS2 ou encore MMP-2. Elle permettrait aussi d'isoler de nouveaux gènes cibles de l'éthanol. L'analyse de leur promoteur devrait nous permettre de mettre en évidence d'autres facteurs de transcription et voies de signalisation activés par l'éthanol.

4.2. Implication des voies de signalisation activées par l'éthanol dans la prolifération et la migration

Il est primordial de déterminer le rôle joué par l'activation ligand-indépendante de l'ER α , l'augmentation de la quantité d'aromatase, de COX-2 et de la sécrétion des métalloprotéases 2 et 9 sur la prolifération et la migration des cellules MCF-7 traitées à l'éthanol.

Pour ce faire, il sera nécessaire d'inhiber spécifiquement ces différents mécanismes et d'observer les effets de l'éthanol sur la croissance cellulaire et le potentiel métastatique des cellules MCF-7. Plusieurs stratégies pourront être utilisées. Tout d'abord, nous pourrions utiliser des inhibiteurs et antagonistes spécifiques de ces voies : H89 et SQ22536 pour la voie AMPc/PKA, celecoxib pour COX-2, fadrozole ou letrozole pour l'aromatase... Nous pourrions également utiliser une stratégie d'interférence ARN en utilisant des siRNAs spécifiques des ARNm des différentes protéines impliquées dans ces voies.

Le potentiel métastatique des cellules sera évalué en utilisant des chambres d'invasion utilisant des filtres couverts de Matrigel, ou encore le test de la blessure (Meng *et al.*, 2000). La prolifération cellulaire pourra être appréciée en utilisant la même technique que celle que nous avons utilisée lors de nos premiers travaux.

4.3. Utilisation d'autres lignées cellulaires et études *in vivo* des effets de l'alcool

Si les effets de l'éthanol sur la prolifération et la migration des cellules cancéreuses mammaires avaient déjà été étudiés dans différentes lignées (MCF-7, ZR-75, T47-D), nos

travaux ont été réalisés uniquement sur la lignée MCF-7. Lorsque les mécanismes que nous avons mis en évidence seront clairement identifiés, il sera nécessaire de vérifier leur implication dans les effets de l'éthanol sur d'autres lignées de cellules cancéreuses mammaires. Aussi, nous travaillerons avec d'autres lignées hormono-dépendantes (ZR-75, T47-D) mais également avec des lignées hormono-indépendantes (BT-20, SKBR3) qui n'expriment pas d'ER α . Dans ces dernières, nous vérifierons que les effets de l'éthanol que nous observons sont bien dépendants de l'ER α en regardant, par transfection, si l'expression du récepteur restitue les effets observés dans les lignées hormono-dépendantes. Concernant la migration cellulaire et l'implication des métalloprotéases 2 et 9, l'utilisation d'une lignée cellulaire plus métastatique telle que la lignée MDA-MB-231 transfectée pour exprimer l'ER α semble intéressante. Elle permettrait d'une part de confirmer nos résultats et d'autre part de déterminer le réel potentiel invasif de l'éthanol.

Dans un contexte physiologique les cellules entourant la tumeur (cellules fibroblastiques, inflammatoires et endothéliales) jouent un rôle non négligeable dans le développement tumoral ainsi que dans les processus invasifs et métastatiques (Radisky *et al.*, 2001). Aussi, afin de se rapprocher des conditions physiologiques et de mimer l'interaction stroma-tumeur, nous réaliserons des expériences de co-culture en trois dimensions (Matrigel et collagène) de cellules fibroblastiques et de cellules cancéreuses mammaires (Laurent-Matha *et al.*, 2005). Nous analyserons l'effet d'un traitement à l'éthanol sur la prolifération, l'apoptose, l'invasion et la migration des fibroblastes et des cellules cancéreuses mammaires.

Des tests réalisés *in vivo* seront également nécessaires pour valider la signification physiologique de nos résultats. Nous pourrions étudier la migration et la prolifération de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 dans un modèle de xénogreffe sur des souris athymiques consommant de façon journalière de l'alcool. Par ailleurs, une interférence ARN des ARNm de certaines protéines (COX-2, ER α , Aromatase,...) présente dans les cellules MCF-7, avant l'inoculation, nous permettra de valider *in vivo* les mécanismes que nous avons découverts.

4.4. Analyse de tumeurs de patientes alcooliques

Nous souhaitons également étudier les effets d'une consommation d'alcool sur les cellules cancéreuses mammaires de tumeurs de patientes alcooliques. Il serait en effet intéressant de comparer les taux d'aromatase, d'ER α mais également de la protéine COX-2 et

des MMP-2 et -9 de tumeurs issues de patientes alcooliques à ceux de tumeurs de femmes ne consommant pas d'alcool. Nous avons déjà pris contact avec le Centre Alexis Vautrin du Centre Hospitalier Universitaire de Nancy qui possède une tumorothèque. Cependant, jusqu'à présent les marqueurs sanguins de l'alcoolisme ne faisaient pas partie des tests habituellement réalisés chez les patientes dont provenaient ces tumeurs. Notre étude nécessitera une collaboration pour permettre la sélection de tumeurs de femmes alcooliques.

4.5. Le récepteur A_{2a} à l'adénosine : une nouvelle cible thérapeutique ?

Parmi les mécanismes d'action utilisés par l'éthanol dans les cellules cancéreuses mammaires nous avons mis en évidence une activation ligand-indépendante de l'ER α médiée par la voie AMPc/PKA. Nous montrons que cette voie de signalisation peut être initiée par le récepteur A_{2a} à l'adénosine et pour la première fois, nous démontrons son expression dans les cellules MCF-7. Sa capacité à permettre l'activation ligand-indépendante de l'ER α pourrait faire de ce récepteur une cible de choix dans la lutte contre les cancers du sein hormono-dépendants et particulièrement dans les cas de résistance au tamoxifène. En outre, des études montrent que la concentration en adénosine est élevée dans l'environnement des tumeurs mammaires (Mujoomdar *et al.*, 2004), ce qui favoriserait l'activation de l'A_{2a}AR et celle de l'ER α .

Comment l'éthanol active l'A_{2a}AR ? S'agit-il comme dans les cellules S49 d'une augmentation de la quantité d'adénosine dans le milieu extracellulaire (Nagy *et al.*, 1990) ? Des mesures par HPLC de la quantité d'adénosine présente dans le milieu de culture de cellules MCF-7 traitées à l'éthanol pourront être réalisées. Nous comparerons également l'influx d'adénosine dans les cellules traitées ou non à l'éthanol à l'aide de [3H]5'-deoxyadenosine (Nagy *et al.*, 1990).

Par ailleurs, nous vérifierons la présence de ce récepteur dans d'autres lignées de cellules cancéreuses mammaires et dans les tumeurs mammaires afin de savoir si ce récepteur est spécifique ou non des cellules cancéreuses hormono-dépendantes. Ensuite, il sera intéressant d'étudier l'effet d'un inhibiteur sélectif de l'A_{2a}AR (MSX-3) sur le développement de tumeurs mammaires, *in vivo*, en travaillant notamment sur un modèle de xénogreffe de cellules cancéreuses mammaires sur des souris athymiques. Enfin, nous aimerions comparer le niveau d'expression de ce récepteur dans des tumeurs ER-positives de patientes répondant

favorablement à une hormonothérapie à celui de tumeurs ER-positives de patientes résistantes à ce type de traitement. Cela permettrait de déterminer l'implication de ce récepteur dans les cas de résistance aux hormonothérapies à base de tamoxifène puisque cet anti-œstrogène n'a aucun effet sur l'activation ligand-indépendante de l'ER α par la PKA (Fujimoto *et al.*, 1994; Michalides *et al.*, 2004).

5. CONCLUSION GENERALE

Ces travaux ont permis de confirmer que l'éthanol pouvait stimuler la prolifération et la migration des cellules cancéreuses mammaires ER-positives. D'autre part, ils ont permis de mettre en évidence des enzymes et des voies de signalisation activées par l'éthanol et susceptibles d'être impliquées dans ces processus. Nous avons donc rempli notre objectif principal qui s'inscrivait dans une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la tumorigenèse mammaire induite par l'éthanol.

Certes, nous avons travaillé uniquement sur la lignée de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et nos travaux devront être complétés par d'autres études *in vitro* et surtout *in vivo*. Cependant, nos résultats ouvrent d'ores et déjà de nouvelles pistes de recherche quant au mode d'action de l'éthanol sur la tumorigenèse et la cancérogenèse mammaire. Par ailleurs, nos expériences ont permis de mettre en évidence une nouvelle cible thérapeutique à savoir le récepteur A_{2a} à l'adénosine. Ce dernier pourrait non seulement médier les effets de l'éthanol sur les cellules cancéreuses mammaires mais aussi favoriser le développement tumoral chez les patientes qui ne consomment pas d'alcool.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas Abidi,S.M., Howard,E.W., Dmytryk,J.J., and Pento,J.T. 1997. Differential influence of antiestrogens on the in vitro release of gelatinases (type IV collagenases) by invasive and non-invasive breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* 15:432-439.
- Andre,T., Chastre,E., Kotelevets,L., Vaillant,J.C., Louvet,C., Balosso,J., Le Gall,E., Prevot,S., and Gespach,C. 1998. [Tumoral angiogenesis: physiopathology, prognostic value and therapeutic perspectives]. *Rev. Med. Interne* 19:904-913.
- Aronica,S.M., and Katzenellenbogen,B.S. 1991. Progesterone receptor regulation in uterine cells: stimulation by estrogen, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and insulin-like growth factor I and suppression by antiestrogens and protein kinase inhibitors. *Endocrinology* 128:2045-2052.
- Aronica,S.M., and Katzenellenbogen,B.S. 1993. Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol. Endocrinol.* 7:743-752.
- Aronica,S.M., Kraus,W.L., and Katzenellenbogen,B.S. 1994. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:8517-8521.
- Aye,M.M., Ma,C., Lin,H., Bower,K.A., Wiggins,R.C., and Luo,J. 2004. Ethanol-induced in vitro invasion of breast cancer cells: the contribution of MMP-2 by fibroblasts. *Int. J. Cancer* 112:738-746.
- Balfe,P.J., McCann,A.H., Welch,H.M., and Kerin,M.J. 2004. Estrogen receptor beta and breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 30:1043-1050.
- Baraona,E., Abittan,C.S., Dohmen,K., Moretti,M., Pozzato,G., Chayes,Z.W., Schaefer,C., and Lieber,C.S. 2001. Gender differences in pharmacokinetics of alcohol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25:502-507.
- Bell-Parikh,L.C., and Guengerich,F.P. 1999. Kinetics of cytochrome P450 2E1-catalyzed oxidation of ethanol to acetic acid via acetaldehyde. *J. Biol. Chem.* 274:23833-23840.
- Benghiat,A., Cassidy,S.A., Davidson,H.E., Mancero,F.S., Pickard,J.G., and Tyrrell,C.J. 1986. Megestrol acetate in the treatment of advanced post-menopausal breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 12:43-45.
- Bennett,A. 1986. The production of prostanoids in human cancers, and their implications for tumor progression. *Prog. Lipid Res.* 25:539-542.
- Bjornstrom,L., and Sjoberg,M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol.* 19:833-842.
- Blanco,A.M., Pascual,M., Valles,S.L., and Guerri,C. 2004. Ethanol-induced iNOS and COX-2 expression in cultured astrocytes via NF-kappa B. *Neuroreport* 15:681-685.
- Blobel,G.A., Sieff,C.A., and Orkin,S.H. 1995. Ligand-dependent repression of the erythroid transcription factor GATA-1 by the estrogen receptor. *Mol. Cell Biol.* 15:3147-3153.
- Bosron,W.F., and Li,T.K. 1986. Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology* 6:502-510.
- Boudreau,N., and Myers,C. 2003. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res.* 5:140-146.
- Bowlin,S.J., Leske,M.C., Varma,A., Nasca,P., Weinstein,A., and Caplan,L. 1997. Breast cancer risk and alcohol consumption: results from a large case-control study. *Int. J. Epidemiol.* 26:915-923.

- Brain,E.G., Misset,J.L., and Rouess,J. 1999. Primary chemotherapy or hormonotherapy for patients with breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 25:187-197.
- Brennan,M., Wilcken,N., French,J., Ung,O., and Boyages,J. 2005. Management of early breast cancer--the current approach. *Aust. Fam. Physician* 34:755-760.
- Brodie,A.M., Lu,Q., Long,B.J., Fulton,A., Chen,T., Macpherson,N., DeJong,P.C., Blankenstein,M.A., Nortier,J.W., Slee,P.H., van,d., V, van Gorp,J.M., Elbers,J.R., Schipper,M.E., Blijham,G.H., and Thijssen,J.H. 2001. Aromatase and COX-2 expression in human breast cancers. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 79:41-47.
- Brueggemeier,R.W., Richards,J.A., and Petrel,T.A. 2003. Aromatase and cyclooxygenases: enzymes in breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86:501-507.
- Bulun,S.E., Noble,L.S., Takayama,K., Michael,M.D., Agarwal,V., Fisher,C., Zhao,Y., Hinshelwood,M.M., Ito,Y., and Simpson,E.R. 1997. Endocrine disorders associated with inappropriately high aromatase expression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 61:133-139.
- Bulun,S.E., Sebastian,S., Takayama,K., Suzuki,T., Sasano,H., and Shozu,M. 2003. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86:219-224.
- Bundred,N.J. 2001. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 27:137-142.
- Bunone,G., Briand,P.A., Miksicek,R.J., and Picard,D. 1996. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* 15:2174-2183.
- Burak,W.E., Jr., Quinn,A.L., Farrar,W.B., and Brueggemeier,R.W. 1997. Androgens influence estrogen-induced responses in human breast carcinoma cells through cytochrome P450 aromatase. *Breast Cancer Res. Treat.* 44:57-64.
- Campagnoli,C., Abba,C., Ambroggio,S., and Peris,C. 2005. Pregnancy, progesterone and progestins in relation to breast cancer risk. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97:441-450.
- Campbell,R.A., Bhat-Nakshatri,P., Patel,N.M., Constantinidou,D., Ali,S., and Nakshatri,H. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J. Biol. Chem.* 276:9817-9824.
- Carmichael,A.R., and Bates,T. 2004. Obesity and breast cancer: a review of the literature. *Breast* 13:85-92.
- Castles,C.G., Oesterreich,S., Hansen,R., and Fuqua,S.A. 1997. Auto-regulation of the estrogen receptor promoter. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62:155-163.
- Castoria,G., Migliaccio,A., Bilancio,A., Di Domenico,M., de Falco,A., Lombardi,M., Fiorentino,R., Varricchio,L., Barone,M.V., and Auricchio,F. 2001. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J.* 20:6050-6059.
- Castro,G.D., de Castro,C.R., Maciel,M.E., Fanelli,S.L., de Ferreyra,E.C., Gomez,M.I., and Castro,J.A. 2006. Ethanol-induced oxidative stress and acetaldehyde formation in rat mammary tissue: potential factors involved in alcohol drinking promotion of breast cancer. *Toxicology* 219:208-219.
- Chakraborti,S., Mandal,M., Das,S., Mandal,A., and Chakraborti,T. 2003. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol. Cell Biochem.* 253:269-285.
- Chen,D., Pace,P.E., Coombes,R.C., and Ali,S. 1999. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol. Cell Biol.* 19:1002-1015.
- Chen,S., Itoh,T., Wu,K., Zhou,D., and Yang,C. 2002. Transcriptional regulation of aromatase expression in human breast tissue. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83:93-99.

- Chen,S., Ye,J., Kijima,I., Kinoshita,Y., and Zhou,D. 2005. Positive and negative transcriptional regulation of aromatase expression in human breast cancer tissue. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 95:17-23.
- Choi,Y.A., Lee,D.J., Lim,H.K., Jeong,J.H., Sonn,J.K., Kang,S.S., and Baek,S.H. 2004. Interleukin-1beta stimulates matrix metalloproteinase-2 expression via a prostaglandin E2-dependent mechanism in human chondrocytes. *Exp. Mol. Med.* 36:226-232.
- Chow,L.W., Loo,W.T., and Toi,M. 2005. Current directions for COX-2 inhibition in breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* 59 Suppl 2:S281-S284.
- Cianfrocca,M., and Goldstein,L.J. 2004. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist.* 9:606-616.
- Clemons,M., Danson,S., and Howell,A. 2002. Tamoxifen ("Nolvadex"); a review. *Cancer Treat. Rev.* 28:165-180.
- Conley,A., and Hinshelwood,M. 2001. Mammalian aromatases. *Reproduction.* 121:685-695.
- Cooper,G.S., Sandler,D.P., Whelan,E.A., and Smith,K.R. 1996. Association of physical and behavioral characteristics with menstrual cycle patterns in women age 29-31 years. *Epidemiology* 7:624-628.
- Coutelle,C., Hohn,B., Benesova,M., Oneta,C.M., Quattrochi,P., Roth,H.J., Schmidt-Gayk,H., Schneeweiss,A., Bastert,G., and Seitz,H.K. 2004. Risk factors in alcohol associated breast cancer: alcohol dehydrogenase polymorphism and estrogens. *Int. J. Oncol.* 25:1127-1132.
- Cowin,P., Rowlands,T.M., and Hatsell,S.J. 2005. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:499-508.
- Coyle,Y.M. 2004. The effect of environment on breast cancer risk. *Breast Cancer Res. Treat.* 84:273-288.
- Daly,P.A. 2005. Genetic counselling in breast and colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 16 Suppl 2:ii163-ii169.
- deConinck,E.C., McPherson,L.A., and Weigel,R.J. 1995. Transcriptional regulation of estrogen receptor in breast carcinomas. *Mol. Cell Biol.* 15:2191-2196.
- Dellarco,V.L. 1988. A mutagenicity assessment of acetaldehyde. *Mutat. Res.* 195:1-20.
- Denger,S., Reid,G., Brand,H., Kos,M., and Gannon,F. 2001. Tissue-specific expression of human ERalpha and ERbeta in the male. *Mol. Cell Endocrinol.* 178:155-160.
- Deroo,B.J., and Korach,K.S. 2006. Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest* 116:561-570.
- Diaz-Cruz,E.S., Shapiro,C.L., and Brueggemeier,R.W. 2005. Cyclooxygenase inhibitors suppress aromatase expression and activity in breast cancer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 90:2563-2570.
- Donegan,W.L. 1997. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J. Clin.* 47:28-51.
- Doridot,V., Nos,C., Aucoeur,J.S., Sigal-Zafrani,B., Fourquet,A., and Clough,K.B. 2004. [Breast-conserving therapy of breast cancer]. *Cancer Radiother.* 8:21-28.
- Driggers,P.H., and Segars,J.H. 2002. Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. *Trends Endocrinol. Metab* 13:422-427.
- Duffy,M.J., Maguire,T.M., Hill,A., McDermott,E., and O'Higgins,N. 2000. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.* 2:252-257.
- Dumitrescu,R.G., and Cotarla,I. 2005. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J. Cell Mol. Med.* 9:208-221.
- Dumitrescu,R.G., and Shields,P.G. 2005. The etiology of alcohol-induced breast cancer. *Alcohol* 35:213-225.

- Edenberg, H.J. 2000. Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 64:295-341.
- Edwards, D.P. 2000. The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 5:307-324.
- Egeblad, M., and Werb, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2:161-174.
- El Tanani, M.K., and Green, C.D. 1997. Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* 11:928-937.
- Espina, N., Lima, V., Lieber, C.S., and Garro, A.J. 1988. In vitro and in vivo inhibitory effect of ethanol and acetaldehyde on O6-methylguanine transferase. *Carcinogenesis* 9:761-766.
- Etique, N., Chardard, D., Chesnel, A., Merlin, J.L., Flament, S., and Grillier-Vuissoz, I. 2004. Ethanol stimulates proliferation, ER α and aromatase expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 13:149-155.
- Etique, N., Grillier-Vuissoz, I., and Flament, S. 2006. Ethanol stimulates the secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 15:603-608.
- Evinger, A.J., III, and Levin, E.R. 2005. Requirements for estrogen receptor α membrane localization and function. *Steroids* 70:361-363.
- Fan, S., Meng, Q., Gao, B., Grossman, J., Yadegari, M., Goldberg, I.D., and Rosen, E.M. 2000. Alcohol stimulates estrogen receptor signaling in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 60:5635-5639.
- 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.* 15:1929-1940.
- Feigelson, H.S., and Henderson, B.E. 1996. Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis* 17:2279-2284.
- Flouriot, G., Griffin, C., Kenealy, M., Sonntag-Buck, V., and Gannon, F. 1998. Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor- α gene are generated by alternative splicing and promoter usage. *Mol. Endocrinol.* 12:1939-1954.
- 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* 114:448-454.
- Frasor, J., Danes, J.M., Komm, B., Chang, K.C., Lyttle, C.R., and Katzenellenbogen, B.S. 2003. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* 144:4562-4574.
- Freudenheim, J.L., Bonner, M., Krishnan, S., Ambrosone, C.B., Graham, S., McCann, S.E., Moysich, K.B., Bowman, E., Nemoto, T., and Shields, P.G. 2004. Diet and alcohol consumption in relation to p53 mutations in breast tumors. *Carcinogenesis* 25:931-939.
- Fujimoto, N., and Katzenellenbogen, B.S. 1994. Alteration in the agonist/antagonist balance of antiestrogens by activation of protein kinase A signaling pathways in breast cancer cells: antiestrogen selectivity and promoter dependence. *Mol. Endocrinol.* 8:296-304.
- Gavaler, J.S., Deal, S.R., Van Thiel, D.H., Arria, A., and Allan, M.J. 1993. Alcohol and estrogen levels in postmenopausal women: the spectrum of effect. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 17:786-790.
- Ginsburg, E.S., Mello, N.K., Mendelson, J.H., Barbieri, R.L., Teoh, S.K., Rothman, M., Gao, X., and Sholar, J.W. 1996. Effects of alcohol ingestion on estrogens in postmenopausal women. *JAMA* 276:1747-1751.
- Ginsburg, E.S. 1999. Estrogen, alcohol and breast cancer risk. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69:299-306.

- Giovannucci,E. 2004. Alcohol, one-carbon metabolism, and colorectal cancer: recent insights from molecular studies. *J. Nutr.* 134:2475S-2481S.
- Girdler,F., and Brotherick,I. 2000. The oestrogen receptors (ER alpha and ER beta) and their role in breast cancer: a review. *Breast* 9:194-200.
- Goulle,J.P. 2001. [Blood ethanol: analytical and forensic aspects]. *Ann. Pharm. Fr.* 59:278-283.
- Grandien,K., Backdahl,M., Ljunggren,O., Gustafsson,J.A., and Berkenstam,A. 1995. Estrogen target tissue determines alternative promoter utilization of the human estrogen receptor gene in osteoblasts and tumor cell lines. *Endocrinology* 136:2223-2229.
- 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* 15:73-78.
- Gubala,W., and Zuba,D. 2003. Gender differences in the pharmacokinetics of ethanol in saliva and blood after oral ingestion. *Pol. J. Pharmacol.* 55:639-644.
- Guinebretiere,J.M. 2005. [Angiogenesis and breast neoplasms. The pathologist's point of view]. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 33:140-146.
- Hamajima,N., Hirose,K., Tajima,K., Rohan,T., Calle,E.E., et al. 2002. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br. J. Cancer* 87:1234-1245.
- Hanahan,D., and Weinberg,R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hanf,V., and Gonder,U. 2005. Nutrition and primary prevention of breast cancer: foods, nutrients and breast cancer risk. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 123:139-149.
- Harada,N., Matsumoto,T., Yoshimura,N., Sakamoto,H., and Honda,S. 2001. Analysis of transcriptional regulation of human breast aromatase by in vitro and in vivo studies. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 79:151-156.
- Hartman,T.J., Baer,D.J., Graham,L.B., Stone,W.L., Gunter,E.W., Parker,C.E., Albert,P.S., Dorgan,J.F., Clevidence,B.A., Campbell,W.S., Tomer,K.B., Judd,J.T., and Taylor,P.R. 2005. Moderate alcohol consumption and levels of antioxidant vitamins and isoprostanes in postmenopausal women. *Eur. J. Clin. Nutr.* 59:161-168.
- Hayashi,S., Imai,K., Suga,K., Kurihara,T., Higashi,Y., and Nakachi,K. 1997. Two promoters in expression of estrogen receptor messenger RNA in human breast cancer. *Carcinogenesis* 18:459-464.
- Hayashi,S.I., Eguchi,H., Tanimoto,K., Yoshida,T., Omoto,Y., Inoue,A., Yoshida,N., and Yamaguchi,Y. 2003. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocr. Relat Cancer* 10:193-202.
- Heimann,R., and Hellman,S. 2000. Individual characterisation of the metastatic capacity of human breast carcinoma. *Eur. J. Cancer* 36:1631-1639.
- Henderson,B.E., and Feigelson,H.S. 2000. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21:427-433.
- Herynk,M.H., and Fuqua,S.A. 2004. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr. Rev.* 25:869-898.
- Houssami,N., Cuzick,J., and Dixon,J.M. 2006. The prevention, detection, and management of breast cancer. *Med. J. Aust.* 184:230-234.
- Howell,A., and Dowsett,M. 2004. Endocrinology and hormone therapy in breast cancer: aromatase inhibitors versus antioestrogens. *Breast Cancer Res.* 6:269-274.
- Howell,A. 2005. The future of fulvestrant ("Faslodex"). *Cancer Treat. Rev.* 31 Suppl 2:S26-S33.

- Ince,B.A., Montano,M.M., and Katzenellenbogen,B.S. 1994. Activation of transcriptionally inactive human estrogen receptors by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and ligands including antiestrogens. *Mol. Endocrinol.* 8:1397-1406.
- Ito,H., Duxbury,M., Benoit,E., Clancy,T.E., Zinner,M.J., Ashley,S.W., and Whang,E.E. 2004. Prostaglandin E2 enhances pancreatic cancer invasiveness through an Ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res.* 64:7439-7446.
- Izevbigie,E.B., Ekunwe,S.I., Jordan,J., and Howard,C.B. 2002. Ethanol modulates the growth of human breast cancer cells in vitro. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 227:260-265.
- Jain,M.G., Ferrenc,R.G., Rehm,J.T., Bondy,S.J., Rohan,T.E., Ashley,M.J., Cohe,J.E., and Miller,A.B. 2000. Alcohol and breast cancer mortality in a cohort study. *Breast Cancer Res. Treat.* 64:201-209.
- Johnson,K.C., Hu,J., and Mao,Y. 2000. Passive and active smoking and breast cancer risk in Canada, 1994-97. The Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. *Cancer Causes Control* 11:211-221.
- Jones,A.W., Hahn,R.G., and Stalberg,H.P. 1990. Distribution of ethanol and water between plasma and whole blood; inter- and intra-individual variations after administration of ethanol by intravenous infusion. *Scand. J. Clin. Lab Invest* 50:775-780.
- Jones,A.W., Hahn,R.G., and Stalberg,H.P. 1992. Pharmacokinetics of ethanol in plasma and whole blood: estimation of total body water by the dilution principle. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 42:445-448.
- Jones,A.W. 1993. Disappearance rate of ethanol from the blood of human subjects: implications in forensic toxicology. *J. Forensic Sci.* 38:104-118.
- Jones,A.W., and Jonsson,K.A. 1994. Food-induced lowering of blood-ethanol profiles and increased rate of elimination immediately after a meal. *J. Forensic Sci.* 39:1084-1093.
- Jones,K.L., and Buzdar,A.U. 2004. A review of adjuvant hormonal therapy in breast cancer. *Endocr. Relat Cancer* 11:391-406.
- 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* 270:1491-1494.
- Kaufmann,M., Jonat,W., Kleeberg,U., Eiermann,W., Janicke,F., Hilfrich,J., Kreienberg,R., Albrecht,M., Weitzel,H.K., Schmid,H., and . 1989. Goserelin, a depot gonadotrophin-releasing hormone agonist in the treatment of premenopausal patients with metastatic breast cancer. German Zoladex Trial Group. *J. Clin. Oncol.* 7:1113-1119.
- Ke,Z., Lin,H., Fan,Z., Cai,T.Q., Kaplan,R.A., Ma,C., Bower,K.A., Shi,X., and Luo,J. 2006. MMP-2 mediates ethanol-induced invasion of mammary epithelial cells over-expressing ErbB2. *Int. J. Cancer* 119:8-16.
- Key,T., Appleby,P., Barnes,I., and Reeves,G. 2002. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J. Natl. Cancer Inst.* 94:606-616.
- Kim,K., Barhoumi,R., Burghardt,R., and Safe,S. 2005. Analysis of estrogen receptor alpha-Sp1 interactions in breast cancer cells by fluorescence resonance energy transfer. *Mol. Endocrinol.* 19:843-854.
- Kim,K.J., Li,B., Winer,J., Armanini,M., Gillett,N., Phillips,H.S., and Ferrara,N. 1993. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362:841-844.
- Kitawaki,J., Fukuoka,M., Yamamoto,T., Honjo,H., and Okada,H. 1992. Contribution of aromatase to the deoxyribonucleic acid synthesis of MCF-7 human breast cancer cells and its suppression by aromatase inhibitors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42:267-277.

- Knight,L.C., Parkman,H.P., Brown,K.L., Miller,M.A., Trate,D.M., Maurer,A.H., and Fisher,R.S. 1997. Delayed gastric emptying and decreased antral contractility in normal premenopausal women compared with men. *Am. J. Gastroenterol.* 92:968-975.
- Knoblauch,R., and Garabedian,M.J. 1999. Role for Hsp90-associated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction. *Mol. Cell Biol.* 19:3748-3759.
- Kos,M., Reid,G., Denger,S., and Gannon,F. 2001. Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol. Endocrinol.* 15:2057-2063.
- Kumar,V., Green,S., Stack,G., Berry,M., Jin,J.R., and Chambon,P. 1987. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51:941-951.
- Kundu,N., Smyth,M.J., Samsel,L., and Fulton,A.M. 2002. Cyclooxygenase inhibitors block cell growth, increase ceramide and inhibit cell cycle. *Breast Cancer Res. Treat.* 76:57-64.
- 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.* 74:311-317.
- Labrie,F., Belanger,A., Cusan,L., and Candas,B. 1997. Physiological changes in dehydroepiandrosterone are not reflected by serum levels of active androgens and estrogens but of their metabolites: intracrinology. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 82:2403-2409.
- Laios,I., Journe,F., Nonclercq,D., Vidal,D.S., Toillon,R.A., Laurent,G., and Leclercq,G. 2005. Role of the proteasome in the regulation of estrogen receptor alpha turnover and function in MCF-7 breast carcinoma cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 94:347-359.
- Lamb,J., Ladha,M.H., McMahon,C., Sutherland,R.L., and Ewen,M.E. 2000. Regulation of the functional interaction between cyclin D1 and the estrogen receptor. *Mol. Cell Biol.* 20:8667-8675.
- Lamote,I., Meyer,E., Massart-Leen,A.M., and Burvenich,C. 2004. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids* 69:145-159.
- Lascombe,I., Beffa,D., Ruegg,U., Tarradellas,J., and Wahli,W. 2000. Estrogenic activity assessment of environmental chemicals using in vitro assays: identification of two new estrogenic compounds. *Environ. Health Perspect.* 108:621-629.
- Laufer,E.M., Hartman,T.J., Baer,D.J., Gunter,E.W., Dorgan,J.F., Campbell,W.S., Clevidence,B.A., Brown,E.D., Albanes,D., Judd,J.T., and Taylor,P.R. 2004. Effects of moderate alcohol consumption on folate and vitamin B(12) status in postmenopausal women. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58:1518-1524.
- Laurent-Matha,V., Maruani-Herrmann,S., Prebois,C., Beaujouin,M., Glondou,M., Noel,A., varez-Gonzalez,M.L., Blacher,S., Coopman,P., Baghdiguian,S., Gilles,C., Loncarek,J., Freiss,G., Vignon,F., and Liaudet-Coopman,E. 2005. Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth. *J. Cell Biol.* 168:489-499.
- Lazennec,G., Thomas,J.A., and Katzenellenbogen,B.S. 2001. Involvement of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and estrogen receptor phosphorylation in the synergistic activation of the estrogen receptor by estradiol and protein kinase activators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 77:193-203.
- 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.* 269:4458-4466.
- Lieber,C.S. 1999. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998)--a review. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 23:991-1007.
- Lin,Y., Kikuchi,S., Tamakoshi,K., Wakai,K., Kondo,T., Niwa,Y., Yatsuya,H., Nishio,K., Suzuki,S., Tokudome,S., Yamamoto,A., Toyoshima,H., and Tamakoshi,A. 2005. Prospective study of alcohol consumption and breast cancer risk in Japanese women. *Int. J. Cancer* 116:779-783.

- Liu,J.F., Crepin,M., Liu,J.M., Barritault,D., and Ledoux,D. 2002. FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293:1174-1182.
- Liu,X.H., and Rose,D.P. 1996. Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 56:5125-5127.
- Lucchi-Angellier,E. 2001. [Hormone therapy and breast cancer: a review]. *Rev. Med. Interne* 22:1213-1224.
- Luo,J., and Miller,M.W. 2000. Ethanol enhances erbB-mediated migration of human breast cancer cells in culture. *Breast Cancer Res. Treat.* 63:61-69.
- Ma,J., Stampfer,M.J., Christensen,B., Giovannucci,E., Hunter,D.J., Chen,J., Willett,W.C., Selhub,J., Hennekens,C.H., Gravel,R., and Rozen,R. 1999. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8:825-829.
- Maggiolini,M., Carpino,A., Bonofiglio,D., Pezzi,V., Rago,V., Marsico,S., Picard,D., and Ando,S. 2001. The direct proliferative stimulus of dehydroepiandrosterone on MCF7 breast cancer cells is potentiated by overexpression of aromatase. *Mol. Cell Endocrinol.* 184:163-171.
- Martin,M.B., Franke,T.F., Stoica,G.E., Chambon,P., Katzenellenbogen,B.S., Stoica,B.A., McLemore,M.S., Olivo,S.E., and Stoica,A. 2000. A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 141:4503-4511.
- Maskarinec,G., Takata,Y., Pagano,I., Lurie,G., Wilkens,L.R., and Kolonel,L.N. 2006. Alcohol consumption and mammographic density in a multiethnic population. *Int. J. Cancer* 118:2579-2583.
- Matthews,J., and Gustafsson,J.A. 2003. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol. Interv.* 3:281-292.
- Mayoral,R., Fernandez-Martinez,A., Bosca,L., and Martin-Sanz,P. 2005. Prostaglandin E2 promotes migration and adhesion in hepatocellular carcinoma cells. *Carcinogenesis* 26:753-761.
- Mendelson,J.H., Lukas,S.E., Mello,N.K., Amass,L., Ellingboe,J., and Skupny,A. 1988. Acute alcohol effects on plasma estradiol levels in women. *Psychopharmacology (Berl)* 94:464-467.
- Meng,Q., Gao,B., Goldberg,I.D., Rosen,E.M., and Fan,S. 2000. Stimulation of cell invasion and migration by alcohol in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273:448-453.
- Mennella,J.A., and Beauchamp,G.K. 1991. The transfer of alcohol to human milk. Effects on flavor and the infant's behavior. *N. Engl. J. Med.* 325:981-985.
- Michael,M.D., Michael,L.F., and Simpson,E.R. 1997. A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene. *Mol. Cell Endocrinol.* 134:147-156.
- Michalides,R., Griekspoor,A., Balkenende,A., Verwoerd,D., Janssen,L., Jalink,K., Floore,A., Velds,A., van't,V.L., and Neeffes,J. 2004. Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor alpha after PKA activation in breast cancer. *Cancer Cell* 5:597-605.
- Migliaccio,A., Di Domenico,M., Castoria,G., de Falco,A., Bontempo,P., Nola,E., and Auricchio,F. 1996. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* 15:1292-1300.
- Miller,K.D. 2002. Issues and challenges for antiangiogenic therapies. *Breast Cancer Res. Treat.* 75 Suppl 1:S45-S50.
- Mitropoulou,T.N., Tzanakakis,G.N., Kletsas,D., Kalofonos,H.P., and Karamanos,N.K. 2003. Letrozole as a potent inhibitor of cell proliferation and expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) by human epithelial breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 104:155-160.

- Morabia,A., Bernstein,M., Heritier,S., and Khatchatrian,N. 1996. Relation of breast cancer with passive and active exposure to tobacco smoke. *Am. J. Epidemiol.* 143:918-928.
- Mujoomdar,M., Bennett,A., Hoskin,D., and Blay,J. 2004. Adenosine stimulation of proliferation of breast carcinoma cell lines: evaluation of the [3H]thymidine assay system and modulatory effects of the cellular microenvironment in vitro. *J. Cell Physiol* 201:429-438.
- Murphy,L.C., and Watson,P. 2002. Steroid receptors in human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Biomed. Pharmacother.* 56:65-77.
- Nagy,L.E., Diamond,I., Casso,D.J., Franklin,C., and Gordon,A.S. 1990. Ethanol increases extracellular adenosine by inhibiting adenosine uptake via the nucleoside transporter. *J. Biol. Chem.* 265:1946-1951.
- Nakajima,M., Welch,D.R., Belloni,P.N., and Nicolson,G.L. 1987. Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res.* 47:4869-4876.
- Nakamura,K., Iwahashi,K., Furukawa,A., Ameno,K., Kinoshita,H., Ijiri,I., Sekine,Y., Suzuki,K., Iwata,Y., Minabe,Y., and Mori,N. 2003. Acetaldehyde adducts in the brain of alcoholics. *Arch. Toxicol.* 77:591-593.
- Nicholson,R.I., Hutcheson,I.R., Britton,D., Knowlden,J.M., Jones,H.E., Harper,M.E., Hiscox,S.E., Barrow,D., and Gee,J.M. 2005. Growth factor signalling networks in breast cancer and resistance to endocrine agents: new therapeutic strategies. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 93:257-262.
- Norfleet,A.M., Thomas,M.L., Gametchu,B., and Watson,C.S. 1999. Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry. *Endocrinology* 140:3805-3814.
- Nunez,A.M., Berry,M., Imler,J.L., and Chambon,P. 1989. The 5' flanking region of the pS2 gene contains a complex enhancer region responsive to oestrogens, epidermal growth factor, a tumour promoter (TPA), the c-Ha-ras oncoprotein and the c-jun protein. *EMBO J.* 8:823-829.
- O'Lone,R., Frith,M.C., Karlsson,E.K., and Hansen,U. 2004. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol. Endocrinol.* 18:1859-1875.
- Okubo,T., Truong,T.K., Yu,B., Itoh,T., Zhao,J., Grube,B., Zhou,D., and Chen,S. 2001. Down-regulation of promoter 1.3 activity of the human aromatase gene in breast tissue by zinc-finger protein, snail (SnH). *Cancer Res.* 61:1338-1346.
- Orso,F., Cottone,E., Hasleton,M.D., Ibbitt,J.C., Sismondi,P., Hurst,H.C., and De Bortoli,M. 2004. Activator protein-2gamma (AP-2gamma) expression is specifically induced by oestrogens through binding of the oestrogen receptor to a canonical element within the 5'-untranslated region. *Biochem. J.* 377:429-438.
- Osborne,C., Wilson,P., and Tripathy,D. 2004. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist.* 9:361-377.
- Pace,P., Taylor,J., Suntharalingam,S., Coombes,R.C., and Ali,S. 1997. Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 272:25832-25838.
- Pandey,S.C. 2004. The gene transcription factor cyclic AMP-responsive element binding protein: role in positive and negative affective states of alcohol addiction. *Pharmacol. Ther.* 104:47-58.
- Pappas,T.C., Gametchu,B., and Watson,C.S. 1995. Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J.* 9:404-410.
- Paquette,B., Bisson,M., Baptiste,C., Theriault,H., Lemay,R., and Cantin,A.M. 2005. Invasiveness of breast cancer cells MDA-MB-231 through extracellular matrix is increased by the estradiol metabolite 4-hydroxyestradiol. *Int. J. Cancer* 113:706-711.

- Platet,N., Cathiard,A.M., Gleizes,M., and Garcia,M. 2004. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 51:55-67.
- Polyak,K. 2001. On the birth of breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1552:1-13.
- Powell,C.E., Soto,A.M., and Sonnenschein,C. 2001. Identification and characterization of membrane estrogen receptor from MCF7 estrogen-target cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 77:97-108.
- Pratt,W.B., and Toft,D.O. 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18:306-360.
- Przylipiak,A., Rabe,T., Hafner,J., Przylipiak,M., and Runnebaum,R. 1996. Influence of ethanol on in vitro growth of human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Arch. Gynecol. Obstet.* 258:137-140.
- Purohit,A., and Reed,M.J. 2002. Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women. *Steroids* 67:979-983.
- Purohit,V. 2000. Can alcohol promote aromatization of androgens to estrogens? A review. *Alcohol* 22:123-127.
- Radisky,D., Hagios,C., and Bissell,M.J. 2001. Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin. Cancer Biol.* 11:87-95.
- Razandi,M., Pedram,A., Merchenthaler,I., Greene,G.L., and Levin,E.R. 2004. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol. Endocrinol.* 18:2854-2865.
- Reed,M.J., and Purohit,A. 2001. Aromatase regulation and breast cancer. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 54:563-571.
- Reichman,M.E., Judd,J.T., Longcope,C., Schatzkin,A., Clevidence,B.A., Nair,P.P., Campbell,W.S., and Taylor,P.R. 1993. Effects of alcohol consumption on plasma and urinary hormone concentrations in premenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.* 85:722-727.
- Ribieras,S., Tomasetto,C., and Rio,M.C. 1998. The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. *Biochim. Biophys. Acta* 1378:F61-F77.
- Richards,J.A., Petrel,T.A., and Brueggemeier,R.W. 2002. Signaling pathways regulating aromatase and cyclooxygenases in normal and malignant breast cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80:203-212.
- Ronckers,C.M., Erdmann,C.A., and Land,C.E. 2005. Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res.* 7:21-32.
- Ruggiero,R.J., and Likis,F.E. 2002. Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. *J. Midwifery Womens Health* 47:130-138.
- Russo,J., and Russo,I.H. 2004. Development of the human breast. *Maturitas* 49:2-15.
- Safe,S. 2001. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam. Horm.* 62:231-252.
- Sakorafas,G.H., Krespis,E., and Pavlakis,G. 2002. Risk estimation for breast cancer development; a clinical perspective. *Surg. Oncol.* 10:183-192.
- Saphner,T., Troxel,A.B., Tormey,D.C., Neuberg,D., Robert,N.J., Pandya,K.J., Edmonson,J.H., Rosenbluth,R.J., and Abeloff,M.D. 1993. Phase II study of goserelin for patients with postmenopausal metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 11:1529-1535.
- Sarkar,D.K., Liehr,J.G., and Singletary,K.W. 2001. Role of estrogen in alcohol promotion of breast cancer and prolactinomas. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25:230S-236S.
- Sasano,H., Uzuki,M., Sawai,T., Nagura,H., Matsunaga,G., Kashimoto,O., and Harada,N. 1997. Aromatase in human bone tissue. *J. Bone Miner. Res.* 12:1416-1423.

- Savkur,R.S., and Burris,T.P. 2004. The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J. Pept. Res.* 63:207-212.
- Schrauzer,G.N., McGinness,J.E., Ishmael,D., and Bell,L.J. 1979. Alcoholism and cancer. I. Effects of long-term exposure to alcohol on spontaneous mammary adenocarcinoma and prolactin levels in C3H/St mice. *J. Stud. Alcohol* 40:240-246.
- Schreihofe,D.A., Resnick,E.M., Lin,V.Y., and Shupnik,M.A. 2001. Ligand-independent activation of pituitary ER: dependence on PKA-stimulated pathways. *Endocrinology* 142:3361-3368.
- Schuur,E.R., McPherson,L.A., Yang,G.P., and Weigel,R.J. 2001. Genomic structure of the promoters of the human estrogen receptor-alpha gene demonstrate changes in chromatin structure induced by AP2gamma. *J. Biol. Chem.* 276:15519-15526.
- Sellers,T.A., Kushi,L.H., Cerhan,J.R., Vierkant,R.A., Gapstur,S.M., Vachon,C.M., Olson,J.E., Therneau,T.M., and Folsom,A.R. 2001. Dietary folate intake, alcohol, and risk of breast cancer in a prospective study of postmenopausal women. *Epidemiology* 12:420-428.
- Shang,Y., Hu,X., DiRenzo,J., Lazar,M.A., and Brown,M. 2000. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103:843-852.
- Shaywitz,A.J., and Greenberg,M.E. 1999. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* 68:821-861.
- 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* 95:927-937.
- Simpson,E.R., Mahendroo,M.S., Means,G.D., Kilgore,M.W., Hinshelwood,M.M., Graham-Lorence,S., Amarneh,B., Ito,Y., Fisher,C.R., Michael,M.D., and . 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* 15:342-355.
- Singh,R.R., and Kumar,R. 2005. Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis. *J. Cell Biochem.* 96:490-505.
- Singletary,K.W., McNary,M.Q., Odoms,A.M., Nelshopp,J., and Wallig,M.A. 1991. Ethanol consumption and DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats. *Nutr. Cancer* 16:13-23.
- Singletary,K.W., Frey,R.S., and Yan,W. 2001. Effect of ethanol on proliferation and estrogen receptor-alpha expression in human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 165:131-137.
- Sivula,A., Talvensaaari-Mattila,A., Lundin,J., Joensuu,H., Haglund,C., Ristimaki,A., and Turpeenniemi-Hujanen,T. 2005. Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 89:215-220.
- Slamon,D.J., Leyland-Jones,B., Shak,S., Fuchs,H., Paton,V., Bajamonde,A., Fleming,T., Eiermann,W., Wolter,J., Pegram,M., Baselga,J., and Norton,L. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344:783-792.
- Sommer,S., and Fuqua,S.A. 2001. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 11:339-352.
- Sonne-Hansen,K., and Lykkesfeldt,A.E. 2005. Endogenous aromatization of testosterone results in growth stimulation of the human MCF-7 breast cancer cell line. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 93:25-34.
- Soto,A.M., Sonnenschein,C., Chung,K.L., Fernandez,M.F., Olea,N., and Serrano,F.O. 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* 103 Suppl 7:113-122.
- Spitzer,J.A., Zheng,M., Kolls,J.K., Vande,S.C., and Spitzer,J.J. 2002. Ethanol and LPS modulate NF-kappaB activation, inducible NO synthase and COX-2 gene expression in rat liver cells in vivo. *Front Biosci.* 7:a99-108.

- Steele,C.M., and Ioannides,C. 1986. Differential effects of chronic alcohol administration to rats on the activation of aromatic amines to mutagens in the Ames test. *Carcinogenesis* 7:825-829.
- 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.* 15:4971-4979.
- Stoica,A., Saceda,M., Doraiswamy,V.L., Coleman,C., and Martin,M.B. 2000. Regulation of estrogen receptor-alpha gene expression by epidermal growth factor. *J. Endocrinol.* 165:371-378.
- Stoll,B.A. 1999. Alcohol intake and late-stage promotion of breast cancer. *Eur. J. Cancer* 35:1653-1658.
- Stull,M.A., Rowzee,A.M., Loladze,A.V., and Wood,T.L. 2004. Growth factor regulation of cell cycle progression in mammary epithelial cells. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 9:15-26.
- Suzuki,R., Ye,W., Rylander-Rudqvist,T., Saji,S., Colditz,G.A., and Wolk,A. 2005. Alcohol and postmenopausal breast cancer risk defined by estrogen and progesterone receptor status: a prospective cohort study. *J. Natl. Cancer Inst.* 97:1601-1608.
- Tang,Z., Treilleux,I., and Brown,M. 1997. A transcriptional enhancer required for the differential expression of the human estrogen receptor in breast cancers. *Mol. Cell Biol.* 17:1274-1280.
- Tanimoto,K., Eguchi,H., Yoshida,T., Hajiro-Nakanishi,K., and Hayashi,S. 1999. Regulation of estrogen receptor alpha gene mediated by promoter B responsible for its enhanced expression in human breast cancer. *Nucleic Acids Res.* 27:903-909.
- Tekmal,R.R., Ramachandra,N., Gubba,S., Durgam,V.R., Mantione,J., Toda,K., Shizuta,Y., and Dillehay,D.L. 1996. Overexpression of int-5/aromatase in mammary glands of transgenic mice results in the induction of hyperplasia and nuclear abnormalities. *Cancer Res.* 56:3180-3185.
- Terry,M.B., Zhang,F.F., Kabat,G., Britton,J.A., Teitelbaum,S.L., Neugut,A.I., and Gammon,M.D. 2006. Lifetime alcohol intake and breast cancer risk. *Ann. Epidemiol.* 16:230-240.
- Timoshenko,A.V., Xu,G., Chakrabarti,S., Lala,P.K., and Chakraborty,C. 2003. Role of prostaglandin E2 receptors in migration of murine and human breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* 289:265-274.
- Tokunaga,M., Land,C.E., Yamamoto,T., Asano,M., Tokuoka,S., Ezaki,H., and Nishimori,I. 1987. Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-1980. *Radiat. Res.* 112:243-272.
- Trétarre,B., Guizard,A.V., Fontaine,D. 2004. Cancer du sein chez la femme : incidence et mortalité, France 2000. *BEH.* 44:209-210
- Trosko,J.E. 2005. The role of stem cells and gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biomed. Pharmacother.* 59 Suppl 2:S326-S331.
- Tryggvason,K., Hoyhtya,M., and Salo,T. 1987. Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim. Biophys. Acta* 907:191-217.
- Tsai,H.W., Katzenellenbogen,J.A., Katzenellenbogen,B.S., and Shupnik,M.A. 2004. Protein kinase A activation of estrogen receptor alpha transcription does not require proteasome activity and protects the receptor from ligand-mediated degradation. *Endocrinology* 145:2730-2738.
- Vaeth,P.A., and Satariano,W.A. 1998. Alcohol consumption and breast cancer stage at diagnosis. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22:928-934.
- Van Thiel,D.H., Gavalier,J.S., Eagon,P.K., Chiao,Y.B., and Lester,R. 1981. Hypogonadism and feminization in alcoholic men: the past, present and future. *Curr. Alcohol* 8:29-40.
- Wakeling,A.E., and Bowler,J. 1992. ICI 182,780, a new antioestrogen with clinical potential. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43:173-177.

- Wazer,D.E., and Band,V. 1999. Molecular and anatomic considerations in the pathogenesis of breast cancer. *Radiat. Oncol. Investig.* 7:1-12.
- 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.* 13:1672-1685.
- Wijayarathne,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.* 276:35684-35692.
- Windholz,M., Budavari,S., Stroumtsos,L.Y. Eds. 1976. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Ninth edition. Merck. Rahway, NJ.
- Wittliff,J.L. 1984. Steroid-hormone receptors in breast cancer. *Cancer* 53:630-643.
- Wolczynski,S., Surazynski,A., Swiatecka,J., and Palka,J. 2001. Estrogenic and antiestrogenic effects of raloxifene on collagen metabolism in breast cancer MCF-7 cells. *Gynecol. Endocrinol.* 15:225-233.
- Wright,R.M., McManaman,J.L., and Repine,J.E. 1999. Alcohol-induced breast cancer: a proposed mechanism. *Free Radic. Biol. Med.* 26:348-354.
- Wu,T.T., Tsai,J.H., Tsai,J.H., Kuo,S.J., Yu,S.Y., Huang,C.Y., Hsieh,H.Y., Hsieh,Y.S., and Liu,J.Y. 2004. Augmented release of matrix metalloproteinase-9 by PKC activation in organotypic cultures of human breast cancer and adjacent normal breast tissue and fibroadenoma. *Chin J. Physiol* 47:73-78.
- Yang,C., Yu,B., Zhou,D., and Chen,S. 2002. Regulation of aromatase promoter activity in human breast tissue by nuclear receptors. *Oncogene* 21:2854-2863.
- Yirmiya,R., Ben-Eliyahu,S., Gale,R.P., Shavit,Y., Liebeskind,J.C., and Taylor,A.N. 1992. Ethanol increases tumor progression in rats: possible involvement of natural killer cells. *Brain Behav. Immun.* 6:74-86.
- Yue,W., Zhou,D., Chen,S., and Brodie,A. 1994. A new nude mouse model for postmenopausal breast cancer using MCF-7 cells transfected with the human aromatase gene. *Cancer Res.* 54:5092-5095.
- Yue,W., Wang,J.P., Li,Y., Bocchinfuso,W.P., Korach,K.S., Devanesan,P.D., Rogan,E., Cavalieri,E., and Santen,R.J. 2005. Tamoxifen versus aromatase inhibitors for breast cancer prevention. *Clin. Cancer Res.* 11:925s-930s.
- Zhang,Q.X., Hilsenbeck,S.G., Fuqua,S.A., and Borg,A. 1996. Multiple splicing variants of the estrogen receptor are present in individual human breast tumors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 59:251-260.
- Zhao,Y., Agarwal,V.R., Mendelson,C.R., and Simpson,E.R. 1996. Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene. *Endocrinology* 137:5739-5742.
- Zhou,C., Zhou,D., Esteban,J., Murai,J., Siiteri,P.K., Wilczynski,S., and Chen,S. 1996. Aromatase gene expression and its exon I usage in human breast tumors. Detection of aromatase messenger RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 59:163-171.
- Zhou,D., and Chen,S. 1999. Identification and characterization of a cAMP-responsive element in the region upstream from promoter 1.3 of the human aromatase gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 371:179-190.

Monsieur ETIQUE Nicolas

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1
en BIOLOGIE CELLULAIRE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER *N°1264*

Nancy, le *29/11/06*

Le Président de l'Université



Résumé

Plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'une consommation régulière d'alcool augmentait significativement la probabilité de développer un cancer mammaire. Les études réalisées *in vitro* et *in vivo* pour confirmer ces données indiquent que l'éthanol peut non seulement induire la cancérogenèse mammaire, mais également stimuler la tumorigénèse et l'invasion des cellules tumorales. Dans la mesure où ces effets semblent liés à l'hormono-dépendance des cellules cancéreuses, notre objectif visait à étudier les mécanismes moléculaires impliqués en utilisant la lignée MCF-7. Nous avons confirmé l'effet stimulateur de l'éthanol sur la prolifération de ces cellules. Celui-ci s'accompagne d'une augmentation du taux d'ER α , de COX-2 et de l'aromatase, enzyme responsable de la biosynthèse des oestrogènes. D'autres alcools tels que le méthanol ou le butanol-1 entraînent quant à eux une diminution significative de la prolifération cellulaire et n'induisent jamais d'augmentation du taux d'aromatase. Dans le contexte de la migration cellulaire, nous avons montré que l'éthanol stimulait la sécrétion des MMP-2 et -9 par les cellules MCF-7. La sécrétion de MMP-9 induite par l'éthanol est dépendante de l'activation de l'ER α . L'alcool pourrait agir non seulement par une production accrue d'oestrogènes liée à la surexpression d'aromatase mais aussi par une activation ligand-indépendante de l'ER α dont nous montrons qu'elle est liée à la voie AMPc/PKA et au récepteur A_{2a} à l'adénosine. Ce dernier pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique.

Mots clefs : Ethanol, cancer du sein, voie de signalisation des oestrogènes, prolifération cellulaire, migration cellulaire.