



**HAL**  
open science

## Effets des modulateurs du récepteur de la progestérone dans des modèles de cancer mammaire humain

Nathalie Esber

► **To cite this version:**

Nathalie Esber. Effets des modulateurs du récepteur de la progestérone dans des modèles de cancer mammaire humain. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS058 . tel-01242132

**HAL Id: tel-01242132**

**<https://theses.hal.science/tel-01242132>**

Submitted on 11 Dec 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2015SACLYS058

THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,  
préparée à l'Université Paris-Saclay-Bicêtre

ÉCOLE DOCTORALE N° 568  
**Signalisations et réseaux intégratifs en biologie**

Spécialité de doctorat (Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie)

Par

**Mme Nathalie Esber**

Effets des modulateurs du récepteur de la progestérone  
dans des modèles de cancer mammaire humain

**Thèse présentée et soutenue à « Bicêtre», le « 21/10/2015 » :**

**Composition du Jury :**

Mr, Schumacher, Michael, Directeurs ED 568 et UMR\_S1195, Président du jury  
Mr, Massaad, Charbel, PU (Doyen, Université Paris-Descartes), Rapporteur  
Mme, De Cremoux, Patricia, MCU-PH (Université Paris-Diderot), Rapporteur  
Mme, Resche-Rigon, Michèle, HRA-Pharma, Examinatrice  
Mr, Loosfelt, Hugues, DR (Inserm UMR\_S1185), Directeur de thèse  
Mme, Chabbert-Buffet, Nathalie, PUPH (Hôpital Tenon-UMPC), Co-directrice de thèse  
Mr, Lombès, Marc, DR1 (Directeur Inserm UMR\_S1185), Invité





**Titre : Effets des modulateurs du récepteur de la progestérone dans des modèles de cancer mammaire humain**

**Mots clés :** Cancer du sein, progestérone, récepteur de la progestérone, les antagonistes du récepteur de la progestérone, l'ulipristal acétate

Résumé: Le rôle des progestatifs et du récepteur de la progestérone (PR) dans la carcinogénèse mammaire est maintenant établi. Le PR est exprimé sous deux isoformes PRA et PRB dont l'expression est équimolaire mais qui diffèrent par leur activité transcriptionnelle des gènes cibles. La surexpression de PRA est associée à un pronostic défavorable du cancer mammaire, et est observée chez les femmes à haut risque génétique de cancer du sein. L'utilisation d'antagonistes pour inhiber l'activité de PR pourrait constituer une stratégie thérapeutique potentielle. L'objectif de cette thèse a été d'évaluer les effets de l'ulipristal acétate (UPA), un anti-progestatif, sur la tumorigénèse mammaire dans deux modèles d'études complémentaires. *In vitro*, dans la lignée cancéreuse mammaire bi-inductible (MDA-iPRAB) développée au laboratoire Nous avons démontré qu'UPA inhibe la prolifération cellulaire induite par la progestérone en présence de PRA. L'expression de certains gènes clés de la tumorigénèse mammaire, cibles de PRA a été

étudiée. Une corrélation entre avec la prolifération cellulaire et l'expression du facteur anti-apoptotique BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> (messager et protéine) a été démontrée. L'activation transcriptionnelle, dépendante de la progestérone et inhibée par l'UPA, s'accompagne d'un recrutement spécifique et sélectif de PRA sur des séquences régulatrices du gène BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>, comme le démontrent les expériences de ChIP. *In vivo*, nous avons évalué l'efficacité anti-tumorale de l'UPA ainsi qu'une nouvelle classe d'antagoniste sélective et passive de PR, les « APRns » dans un modèle murin de xénotransgreffe de tumeur mammaire humaine HBCx34. UPA ralentit la croissance tumorale, diminue la prolifération cellulaire (Ki67, PCNA) et inhibe l'expression de BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>. L'ensemble de nos résultats démontrent une action antiproliférative et apoptotique de l'UPA ce qui suggère une utilisation potentielle d'antagonistes de PR dans la prise en charge du cancer du sein.

**Title : Effect of progesterone receptor modulator in human breast cancer models**

**Keywords :** breast cancer, progesterone, progesterone receptor, antagonistes, ulipristal acetate

**Abstract:** The role of progestins and the progesterone receptor (PR) in breast tumorigenesis has now been elucidated. PR is expressed as two isoforms PRA and PRB, differing by their structure and their transcriptional activity. They are often co-expressed in normal breast tissue but the predominance of PRA expression is associated with mammary carcinogenesis, a bad prognosis and an endocrine-resistance. Antiprogestins inhibit mammary tumor growth in several experimental models. The aim of this thesis was to investigate the effect of a well-known selective PR modulator (SPRM), Ulipristal acetate (UPA) in two complementary breast cancer models. *In vitro*, we used the newly established bi-inducible breast cancer cell line "MDA-iPRAB", and demonstrated an anti-proliferative activity of UPA in progesterone-dependent, PRA-specific MDA-iPRAB cell proliferation. We also studied the expression of PRA-target genes involved in

mammary tumorigenesis, and showed a correlation between cell proliferation and the expression of the anti-apoptotic factor BCL2-L1 (transcript and protein). The transcriptional activation of BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> was stimulated by the progesterone in MDA-iPRA cell line, inhibited by UPA and was associated with a specific and selective recruitment of PRA to BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> regulatory regions (ChIP assays). *In vivo*, we evaluated the anti-tumoral activity of UPA and a new class of selective and passive progesterone receptor antagonist 'APRns' in patient-derived breast cancer xenograft in nude mice. UPA slowed down mammary tumor growth, decreased cell proliferation (Ki67, PCNA) and inhibited the BCL2-L1 expression. Further investigations are needed to determine the actions of APRns. In summary, UPA has an antiproliferative and a pro-apoptotic activity, which suggests a potential interest of UPA in breast cancer endocrine therapy.





## Remerciements

J'adresse en premier lieu mes sincères remerciements au Dr **Michael Schumacher** qui m'a fait l'honneur d'être le président de mon jury de thèse. Un grand merci au Pr **Charbel Massaad** et au Dr **Patricia De Cremoux** pour leur disponibilité et leurs commentaires riches et pertinents, qui ont contribué à améliorer la qualité de ce manuscrit.

Je remercie chaleureusement Dr **Michèle Resche-Rigon**, qui m'a fait le plaisir d'être examinatrice de ma thèse, et j'en profite pour adresser toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres de HRA-Pharma et plus particulièrement Dr **André Ulmann**, Dr **Erin Gainer**. Cette collaboration dans le cadre d'un financement CIFRE a été bénéfique grâce aux échanges réguliers (nos réunions trimestrielles) et cette translation entre le monde de la recherche fondamentale, la clinique et l'industrie pharmaceutique.

Je ne sais pas comment exprimer ma gratitude à **Marc Lombès** avec qui j'ai signé un contrat **Moral**. **Marc**, je te remercie pour m'avoir accueilli au sein de l'unité (depuis mon master), pour m'avoir fait confiance malgré les difficultés. **Marc** je manque de mots pour pouvoir te remercier, tellement c'est énorme. Tu es mon Idole et avec toi j'ai appris beaucoup de choses. Je te remercie pour ta disponibilité, tes idées, tes conseils, your positive energy, ton humour. Je te remercie pour nos réunions fructueuses, nos discussions sur les manips, les résultats, la correction de la thèse et les articles. Je n'oublierai jamais que tu a passé tes vacances en corrigeant ce manuscrit et mes 2 articles. Et là je peux terminer maintenant ma thèse en disant que j'ai eu vraiment de la chance et de l'honneur de travailler avec toi. Mes remerciements vont également à mes deux directeurs de thèse **Nathalie Chabbert-Bufferet** et **Hugues Loosfelt**. **Nathalie**, je te remercie pour ta patience, ta compréhension, tes conseils sur le plan scientifique et personnel. J'apprécie extrêmement les discussions et les réunions qu'on avait faites entre Tenon, St Antoine et la pitié, c'était une expérience inoubliable. Je te remercie sincèrement pour toutes les heures et le temps que tu as consacré à diriger cette thèse, malgré le travail énorme que tu accomplisses à l'hôpital au quotidien. **Hugues**, je suis extrêmement sensible à

tes qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long du master et de la thèse. Tu as été très patient avec moi pendant toutes ces longues périodes. Tu m'as encouragé et motivé quand j'étais bloquée surtout avec les manip de prolif.

Je remercie du plus profond de mon cœur ma famille (au Liban et dans le monde entier) qui m'a soutenue et me soutient toujours.....

Je remercie Anne Mantel, pour m'avoir accepté dans son master (mon deuxième master).

Ma voisine au labo et au Liban Mirella, sorry Dr Hage, ma copine de marche et de course, j'apprécie ta présence au labo, avec toi j'apprends tous les jours, ton enthousiasme et ton intelligence m'intriguent énormément...

Mes remerciements à mes supers collègues de labo : Say (pour ton SHALOM), Larbi (pour ton humour), Damien (pour ta simplicité), Stéphanie Chauvin (pour la femme chercheuse et sexy), Claudia (pour ton humeur, parce que tu m'as fait pleuré plusieurs fois, mais au fond je t'aime bien), Jérôme Fagart (pour tout ce qui est technique, tables for PlosOne et APRn), Lavinia (pour les manip d'immunohistochimie).....

Les jeunes du Labo : Mohsen, mon petit jeune libanais, merci pour l'ambiance de Zgharta (ma ville de naissance) et Saydet Zgharta, Florian, merci pour le chocolat, les pots et la bouffe.....☺ ☺ ☺

Mes amis : Salma et Safaa (mes deux louloutes), Georges, Charly, Maya, Mona, Oula et les autres au Liban et éparpillés dans le monde entier: Merci pour l'amitié et le soutien énorme et précieux en dehors du labo, Merci pour ces années passées et merci d'avance pour le futur ☺ ☺

Charlotte Paul et Bruno Franco : mes potes de western blot, de sorties et de beuveries, je vous aime beaucoup. Justine merci pour les manip et tes conseils, Ségo, Ingrid merci pour l'ambiance amicale au labo. Je remercie aussi tous les autres membres du labo sans exception...



*People come into your life for a reason. They might not know it themselves, why. You might not know it. But there's a reason*

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications suivantes :

*Chabbert-Bufferet N, Esber N, Bouchard P.* **'Fibroid growth and medical options for treatment'**- Fertil Steril. 2014 Sep;102(3):630-9. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.1238.

*Esber N, Le Billan F, Resche-Rigon M, Loosfelt H, Lombès M, Chabbert-Bufferet N.* **'Ulipristal Acetate inhibits Progesterone Receptor Isoform A mediated Human Breast Cancer Proliferation and BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> Expression'**-PlosOne, 2015

*Esber N, Cherbonnier C, Resche-Rigon M, Brion JD, Alami M, Loosfelt H, Lombès M, Chabbert-Bufferet N.* **'Anti-tumoral effects of antiprogestins in a patient derived breast cancer xenograft model'**- soumis

*Esber N, Amazit L, Loosfelt H, Chabbert-Bufferet N.* **'Modulateurs de PR : mécanismes d'action, nouveautés'** et **'Les modulateurs sélectifs du RP (SPRMs) : du nouveau dans la prise en charge des myomes utérins'**- Médecine Clinique Endocrinologie & Diabète. # 71- Juillet-Août 2014

#### **Communications orales et affichées :**

*Esber N, Resche-Rigon M, Loosfelt H, Lombès M, Chabbert-Bufferet N.* **'Effets des modulateurs du récepteur de la progestérone dans des modèles de cancer mammaire humain'**- Institut Biomédical de Bicêtre I2B (IFR)-journée de l'IFR- 18 septembre 2014.

*Esber N, Resche-Rigon M, Loosfelt H, Lombès M, Chabbert-Bufferet N.* **'Vers une application de nouveaux antagonistes du récepteur de la progestérone dans la prise en charge du cancer du sein'**- 31ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie- Lyon. Annales d'Endocrinologie. Volume 75, Issues 5-6, Octobre 2014, Pages 292.

*Esber N, Resche-Rigon M, Loosfelt H, Lombès M, Chabbert-Bufferet N.* **'Effets des modulateurs du récepteur de la progestérone dans des modèles de cancer mammaire humain'**- Journée de l'Ecole doctorale Biosigne ED419 (17 janvier, 15 octobre 2015).

*Esber N, Resche-Rigon M, Loosfelt H, Lombès M, Chabbert-Bufferet N.* **'Effets des antagonistes du récepteur de la progestérone dans des modèles de cancer mammaire humain'**- 32ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie (SFE)-Angers 2015.

## Table des matières

<b>Liste des abréviations</b>	<b>1</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>2</b>
<b>Liste des tables</b>	<b>2</b>
<b>Avant -propos</b>	<b>3</b>
<b>Introduction</b>	<b>7</b>
<b><u>1. Le cancer du sein</u></b>	<b>8</b>
<b>1.1 Le cancer du sein est une maladie plurielle et hétérogène: Classifications histologiques, moléculaires, histo-pronostiques et les facteurs de risque</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Classification histologique</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Classification moléculaire</b>	<b>10</b>
a. Les tumeurs lumineales	11
b. Les Tumeurs basales	12
c. Le sous-type Her2	13
d. Le sous-type normal like	13
e. Les Tumeurs Claudin-low	13
<b>1.4 Les facteurs de risque de cancer du sein</b>	<b>15</b>
<b><u>2. Progestérone, progestatifs et cancer du sein</u></b>	<b>19</b>
<b>2.1 Rôle physiologique de la progestérone au niveau des glandes mammaires</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Progestatifs et cancer de sein</b>	<b>25</b>
<b><u>3. Récepteur nucléaire de la progestérone (PR)</u></b>	<b>28</b>
<b>3.1 Structure et mécanisme d'action</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Les modifications post-traductionnelles</b>	<b>35</b>
a. La phosphorylation	35
b. L'ubiquitination	35
c. La sumoylation	36
d. L'acétylation	37
<b>3.3 Les corégulateurs</b>	<b>37</b>
a. Les coactivateurs	37
b. Les corépresseurs	40
<b>3.4 Signalisation PR et cellules cancéreuses mammaires</b>	<b>41</b>
<b><u>4. Les antagonistes et les modulateurs sélectifs de PR</u></b>	<b>43</b>
<b>4.1 La mifépristone (RU486)</b>	<b>46</b>
<b>4.2 L'Ulipristal acétate (UPA, CDB – 2914)</b>	<b>48</b>
<b>4.3 Les antagonistes passifs de PR : les APRns</b>	<b>48</b>

<b>Objectifs</b>	<b>53</b>
<b>Résultats</b>	<b>57</b>
<b>Chapitre 1 : l'Ulipristal acétate inhibe la prolifération cellulaire et l'expression de BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> dans la lignée cancéreuse mammaire humaine via l'isoforme PRA de récepteur de la progestérone</b>	<b>59</b>
<b>Introduction</b>	<b>61</b>
<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>67</b>
<b>Article 1: 'Ulipristal Acetate inhibits Progesterone Receptor Isoform A mediated Human Breast Cancer Proliferation and BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> Expression'</b> <i>Esber N, Le Billan F, Resche-Rigon M, Loosfelt H, Lombès M, Chabbert-Buffet N. PlosOne, soumis</i>	<b>71</b>
<b>Discussion</b>	<b>109</b>
<b>Chapitre 2: Etude in vivo : modèle de xénogreffe de tumeur humaine mammaire chez des souris nude</b>	<b>119</b>
<b>Introduction</b>	<b>121</b>
<b>Article 2 : 'Anti-tumoral effects of antiprogestins in a patient derived breast cancer xenograft model'</b> - <i>Esber N, Cherbonnier C, Resche-Rigon M, Brion JD, Alami M, Fagart Jérôme, Loosfelt H, Lombès M, Chabbert-Buffet N. en préparation</i>	<b>125</b>
<b>Discussion générale et perspectives</b>	<b>155</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>167</b>



## Liste des abréviations

Aa	Acides aminés
AF	<i>Activating Function</i> , Fonction activatrice
APR	<i>Anti-Progesterone Receptor</i>
BRCA	<i>Breast Cancer Early Onset</i>
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
KRT	<i>Cytokeratin, keratin</i>
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
E2	17 $\beta$ -oestradiol
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i> , Récepteur aux oestrogènes
Her2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HRT	<i>Hormonal Replacement Therapy</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
IF	<i>Inhibitory function</i> , Fonction inhibitrice
kDa	<i>Kilo Dalton</i>
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MPA	<i>Medroxyprogesterone Acetate</i>
NCoR	<i>Nuclear Receptor Corepressor</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
P4	Progestérone
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIC	Préinitiation de la transcription
Pol	ARN polymérase
PRbs	<i>Progesterone Receptor binding sites</i>
PR	<i>Progesterone Receptor</i> , Récepteur de la progestérone
PRA	Récepteur de la progestérone isoforme A
PRB	Récepteur de la progestérone isoforme B
PRE	<i>Progesterone Response Element</i> , Élément de réponse aux progestatifs
PRL	Prolactine
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
RU486	<i>Mifepristone</i>
SMRT	<i>Silencing mediator of retinoid and thyroid receptors</i>
SRC	<i>Steroid Receptor Coactivator</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
SERMs	<i>Selective Estrogen Receptor Modulators</i> , modulateurs sélectifs du récepteur des œstrogènes
SPRMs	<i>Selective Progesterone Receptor Modulators</i> modulateurs sélectifs du récepteur de la progestérone
TBP	<i>TATA box-binding protein</i>
TDLU	<i>Terminal ductal lobular unit</i>
TF	<i>Transcription factor</i>
TGF $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TSS	<i>Transcription Start Site</i>
UPA	<i>Ulipristal acetate</i>
WNT	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family</i>

## Listes des figures

Fig.1	Classification histologique du cancer de sein	10
Fig.2	Développement et structures des glandes mammaires humain et murin	21
Fig.3	Mécanismes de la prolifération cellulaire induite par la progestérone	25
Fig.4	Structure des isoformes du récepteur de la progestérone PRA et PRB	29
Fig.5	Mécanisme d'action du récepteur de la progestérone (PR)	30
Fig.6	Relation-structure fonction de PR	32
Fig.7	Modifications post-transcriptionnelles de PR	36
Fig.8	Le modèle classique d'action PR lié aux ligands	39
Fig.9	Structure chimiques de la progestérone et des SPRMs	47
Fig.10	Synthèse de l'APR19	49

## Liste des tables

Table 1	Les sous-types moléculaires du cancer de sein	11
Table 2	Les lignées cellulaires mammaires humaines	66

## **Avant-propos**

Le cancer du sein représente une maladie majeure et constitue ainsi un véritable problème de santé publique. Son étude, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et de nouvelles approches pharmacologiques curatives et/ou préventives apparaissent comme des priorités absolues, aujourd'hui.

Les données de la littérature ont établi de longue date un lien entre la carcinogenèse mammaire et les stéroïdes sexuels. Les données de base ont principalement évalué les effets des œstrogènes, permettant le développement des stratégies thérapeutiques et préventives ciblant la signalisation des œstrogènes (Shah et al., 2014). Depuis le début des années 2000, les données produites ont également mis en évidence un rôle de la progestérone (P4), des progestatifs et de leurs voies de signalisation dans la tumorigénèse mammaire (Brisken, 2013; Tanos et al., 2013). Il est connu que la progestérone stimule l'activité mitotique dans le tissu mammaire sain et les progestatifs induisent la prolifération des cellules cancéreuses mammaires et activent leur invasivité. Les femmes post-ménopausées qui suivent un traitement hormonal substitutif à base d'œstrogènes et de progestatifs présentent un risque accru de cancer de sein (Beral, 2003; Beral et al., 2011; Chlebowski and Anderson, 2012; Chlebowski et al., 2010; Chlebowski et al., 2003; Chlebowski et al., 2009).

Ces nouvelles données ouvrent un nouveau champ de la physiopathologie du cancer du sein et des perspectives thérapeutiques consistant à moduler l'activité des récepteurs de la progestérone (PR). L'importance de la progestérone et de son récepteur dans la physiopathologie a abouti au développement des ligands à activités agonistes et /ou antagonistes en fonction du contexte cellulaire nommés les modulateurs sélectifs de la



progestérone (SPRMs, selective progesterone receptor modulators). Ces SPRMs ont été proposés dans le traitement des tumeurs bénignes de l'utérus et en contraception (Chabbert-Buffet et al., 2005; Chabbert-Buffet et al., 2012; Giulianelli et al., 2013; Knutson and Lange, 2014; Lanari et al., 2012). L'évaluation des effets mammaires des SPRMs, en vue d'une utilisation au long cours, est un autre point d'intérêt important, afin d'en confirmer l'innocuité mammaire.

Enfin, compte tenu des effets potentiellement tumorigènes des progestatifs de synthèse, et des données *in vitro* et animales suggérant une activité anti-tumorale des molécules antiprogestatives, l'évaluation de leur mécanisme d'action moléculaire, encore mal élucidé, constitue un autre point d'intérêt majeur en vue de développement thérapeutique.

Dans cette thèse, nous débuterons par une introduction où nous rappellerons les principaux éléments contributifs pour la compréhension de sa démarche suivie par deux chapitres détaillés sur les deux modèles d'études complémentaires.

Dans le premier chapitre, nous présenterons le modèle cellulaire, la lignée cancéreuse mammaire basale humaine, récemment établie au sein de l'unité, la MDA-iPRAB (Khan et al., 2012). Dans ce modèle, nous avons étudié les effets de la progestérone, les isoformes du récepteur nucléaire de la progestérone et ses ligands synthétiques, les progestatifs et les antiprogestatifs sur la prolifération cellulaire et la régulation de l'expression des gènes liés au processus clés de la carcinogénèse mammaire (l'apoptose, la migration cellulaire...). Dans le deuxième chapitre, nous apporterons une nouvelle approche expérimentale (Marangoni and Poupon, 2014; Marangoni et al., 2007) qui consiste à xéno greffer directement une tumeur mammaire humaine œstrogéno-dépendante dérivée d'une patiente dans des souris immunodéficientes pour

évaluer et tester les effets anti-tumoraux potentiels de deux antagonistes du récepteur de la progestérone, l'ulipristal acétate (UPA, CDB-2914), un modulateur sélectif du récepteur de la progestérone, actuellement commercialisé en contraception d'urgence et dans le traitement des fibromes utérins (Donnez et al., 2014; Glasier et al., 2010) ; et une nouvelle classe d'antagonistes sélectifs et passifs, synthétisée par notre équipe les APRns « Anti-Progesterone Receptor » (Khan et al., 2013). Ainsi, nous espérons apporter de nouvelles données sur la carcinogénèse mammaire hormono-dépendante, pour essayer de mieux comprendre ses mécanismes et envisager des thérapies potentielles.



# **Introduction**

## **Introduction**

Dans cette introduction nous rappellerons: le cancer du sein, ses formes histologiques et ses facteurs de risque, la progestérone, ses fonctions dans la physiologie et la morphogénèse et son récepteur (PR). Nous détaillerons aussi les rôles de la progestérone et de PR dans la tumorigénèse mammaire, pour finir par les modulateurs sélectifs du récepteur de la progestérone et les antiprogestatifs.

### **1. Le cancer du sein**

#### **1.1 Le cancer du sein est une maladie plurielle et hétérogène: Classifications histologiques, moléculaires, histo-pronostiques et les facteurs de risque**

Le cancer du sein constitue le cancer le plus fréquent chez les femmes en France, suivi par le cancer du poumon et le cancer colorectal. Son incidence augmente avec les années. En France, on estime que 53.000 nouveaux cas de cancer du sein et 11.500 décès par cancer sont survenus en 2011, représentant également la première cause de mortalité et de décès chez la femme (DeSantis et al., 2014; Ferlay et al., 2015; Knutson and Lange, 2014; Siegel et al., 2013; Siegel et al., 2015; Weigelt et al., 2010). Dans le monde entier, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent avec plus de 1. 300. 000 cas et 450.000 décès chaque année (2012). En 2015 aux Etats-Unis, il a été signalé 232.840 nouveaux cas de cancer de sein invasif et 40.290 décès.

Les pathologistes ont classé les tumeurs émanant du même tissu en sous-types avec des variations morphologiques (différents types cellulaires et différente composition du stroma). Le cancer de sein est une pathologie hétérogène tant au niveau moléculaire, histologique, qu'au niveau génétique (les techniques de profile d'expression génique et

du séquençage massif en parallèle). Les différences au niveau moléculaire varient en fonction des patientes (hétérogénéité inter-tumorale) ou au sein de la même patiente (hétérogénéité intra-tumorale). Cette dernière varie en fonction de la région tumorale et du temps de l'évolution moléculaire (Zardavas et al., 2015).

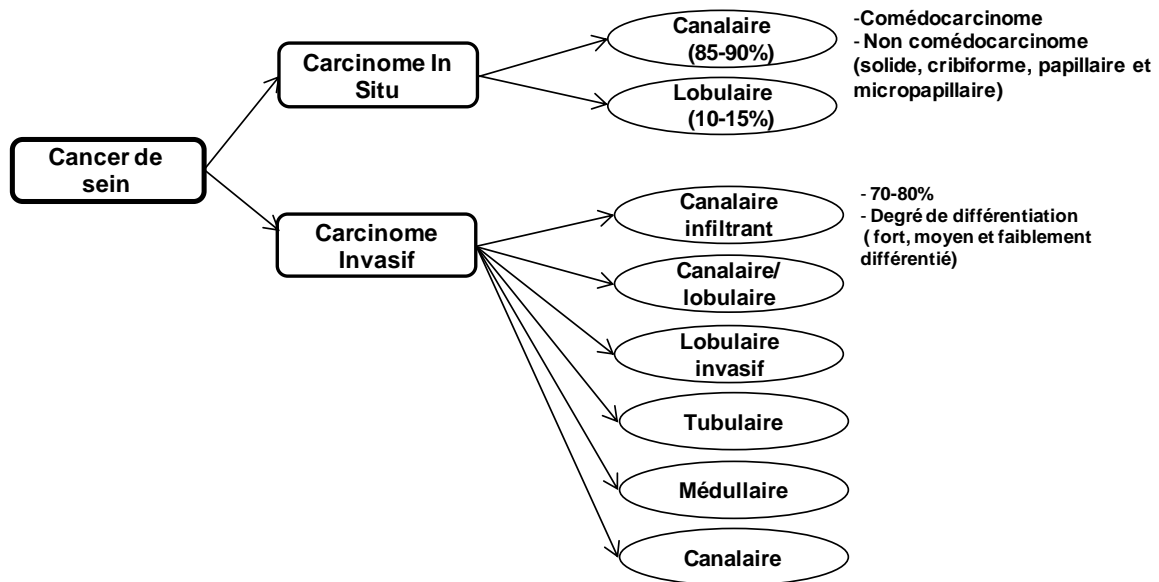
L'évaluation des traitements du cancer du sein et les progrès techniques ont permis de progresser dans la description et la classification des cancers du sein.

Les classifications pronostiques initiales étaient basées sur la clinique (taille tumorale et atteinte ganglionnaire). Actuellement, une évaluation histologique et moléculaire détaillée vient compléter de façon importante les critères de choix thérapeutiques.

## **1.2 Classification histologique**

Les cancers de sein se classent en plusieurs sous-groupes en fonction de leur grade et leur type histologique. Le grade de la tumeur est l'évaluation de son degré de différenciation (la formation des tubules, le pléomorphisme nucléaire), de son activité proliférative (l'index mitotique) et de son agressivité. Le type histologique se réfère à la croissance de la tumeur. Les cancers du sein les plus fréquents sont des adénocarcinomes (95 %), parmi lesquels on distingue les carcinomes *in situ* (non invasifs) et les carcinomes invasifs (infiltrants) (Figure 1). Les carcinomes *in situ* se répartissent entre carcinome canalaire et lobulaire. Le carcinome canalaire *in situ* est plus commun et plus fréquent que le carcinome lobulaire. C'est une forme de cancer très précoce. Il se développe à l'intérieur des canaux galactophores. En fonction de l'apparence et de l'architecture des cellules tumorales, il se classe en deux sous-types principaux, comédocarcinome (la nécrose), et non comédocarcinome. Le carcinome

lobulaire *in situ* (une néoplasie lobulaire), est, quant à lui, plus rare, et correspond au développement des cellules anormales dans les lobules.



**Figure 1: Classification histologique des adénocarcinomes mammaires en fonction du grade de la tumeur et son mode de croissance.** Ils se divisent en carcinome non invasifs (Canalaire /lobulaire) et invasifs (canalaire infiltrant, canalaire/lobulaire...). Plusieurs critères sont en jeu : la formation des tubules, le pléomorphisme nucléaire, l'activité proliférative et l'agressivité tumorale. Adapté de (Malhotra et al., 2010).

Il possède une faible variation histologique et il est considéré comme un facteur de risque de développement du cancer du sein. Le carcinome invasif se propage des lobules ou de l'unité terminale ducto-lobulaire (TDLU, terminal ductal lobular unit), indépendamment de leur type histologique (Malhotra et al., 2010; Weigelt et al., 2010).

### 1.3 Classification moléculaire

Au cours de cette dernière décennie, les profils d'expression génique basés sur des microarrays à haut débit ainsi que les études menées sur des carcinomes mammaires invasifs ont permis d'établir une classification moléculaire comprenant cinq sous-types moléculaires: Luminal A/B, basal-like, Her2+ (human epidermal growth factor receptor

2, her2/neu, ErbB2), Normal breast like et Claudin-low (Table 1) (Malhotra et al., 2010; Weigelt et al., 2010; Weigelt and Reis-Filho, 2009).

Sous-types	%	PR, ER, HER2	Marqueurs additionnels	Prolifération	Types histologiques spéciales	Traitements
Luminal A	~40%	ER ↑ PR HER2 ↓	Mutation: <i>GATA-3, FOXA1, PIK3CA, MAP3KI</i>	Lente	Apocrine, lobulaire, micropapillaire, mucineux, neuroendocrine, pléomorphe lobulaire, tubulaire	Thérapie endocrinienne ± chimiothérapie
Luminal B	~20%	ER ↑ PR ↓ HER2 ↓	Ki67, cycline D1, cycline B1,	Rapide (élevée)	Médullaire, métaplasique, pléomorphe lobulaire, sécrétoire	Chimiothérapie
Basal	15-20%	ER <sup>-</sup> PR <sup>-</sup> HER2 <sup>-</sup>	KRT5/6+ EGFR+ Laminine, P-cadhérine, Caveolines, Nestine,		Apocrine, lobulaire, pléomorphe lobulaire, micropapillaire	Anti-HER2 (trastuzumab) + Chimiothérapie
Her2	10-15%	ER <sup>-</sup> PR <sup>-</sup> HER2 <sup>+</sup>	KRT5/6+/-, EGFR+/-		Métaplasique	Chimiothérapie
Claudin-Low	12-14%	ER <sup>-</sup> PR <sup>-</sup> HER2 <sup>-</sup>	KRT5/6+/-, EGFR+/-, vimentine, interleukine, FGF, VEGF			

**Table 1: Les sous-types moléculaires du cancer de sein**

### a. Les tumeurs lumineales

Le type luminal se caractérise par l'expression des récepteurs des deux hormones stéroïdiennes clés PR+/ER+ (PR : le récepteur de la progestérone ; ER : le récepteur des œstrogènes) ainsi que de leurs gènes associés (Hammond et al., 2010). Il est associé à un pronostic favorable et à une réponse aux traitements anti-hormonaux et constitue 60 % des carcinomes mammaires (invasifs).



Parmi les lésions lumineales, on distingue le sous-type A, le plus hétérogène et le moins agressif. Il représente 40% des cancers de sein. Il se caractérise par une expression élevée de PR/ER et de leurs gènes cibles (*GATA-3*, *FOXA1*), par une faible expression des gènes liés à la prolifération cellulaire (*Ki67*) (Lavasani and Moinfar, 2012) et par une faible expression de Her2. Par ailleurs, 16 % de ce type présente une mutation pour *P53* (un gène suppresseur de tumeur).

Le cancer de type luminal B représente 20% des cancers du sein et constitue le phénotype le plus agressif avec un grade histologique élevé, un mauvais pronostic mais une meilleure réponse à la chimiothérapie. Il se caractérise par une faible expression de PR et une forte expression d'ER. Les gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (*Ki67*, *CCNB1* (Cyclin B1)) et des facteurs de croissance (HER2, EGFR (Epidermal growth factor receptor) sont fortement exprimés (Table 1). L'amplification et la forte expression de la cycline D1 caractérisent les tumeurs lumineales et plus particulièrement le sous-type luminal B qui présente 66 % de fréquence de mutation de *P53*.

#### **b. Les Tumeurs basales**

Le sous-type basal représente 15 à 20% des cancers du sein. L'une de ses caractéristiques est l'absence de l'expression des récepteurs ER, PR et Her2, ce qui lui confère la nomenclature de tumeur triple-négatif (TN). De plus, il ne répond pas à la thérapie endocrinienne. Il exprime fortement les cytokératines basales, les gènes épithéliaux basaux, *LAM*, *P-cadherin*, *CAVI*, *2*, *NES*, *CD44*, *EGFR* et les gènes liés à la prolifération (Table 1). Ce type présente une mutation de *P53* dans 82 % des cas et une altération du gène *BRCA1* (germinale, sporadique) qui est nécessaire à la réparation

des dommages à l'ADN, et son inactivation aboutit à l'instabilité génétique et favorise la croissance des tumeurs (Eroles et al., 2012).

### **c. Le sous-type Her2**

Ce type constitue 10 à 15 % des cancers du sein. Il se caractérise par une sur-expression élevée et une amplification de Her2, une réponse au trastuzumab (Herceptin®) (un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur HER2/neu) et une absence d'expression de PR/ER (Table 1). Les gènes liés à la prolifération sont fortement exprimés. La fréquence de mutation de *P53* est de 71 % (Schnitt, 2010).

### **d. Le sous-type normal like**

Il est constitué de tissus adipeux. Les gènes liés à la prolifération cellulaire sont faiblement exprimés, en revanche les gènes de la matrice mésenchymateuse extracellulaire sont fortement exprimés (*LAM*, *ITGβ7*) (Table 1). Il présente généralement un bon pronostic (Prat and Perou, 2011).

### **e. Les Tumeurs Claudin-low**

Finalement, le sous-type Claudin-low (Herschkowitz et al., 2007; Prat et al., 2010) constitue 12 à 14 % des cancers de sein. Il se caractérise par une expression incohérente des cytokératines basales (*KRT5*, *14*, *17*) et une faible expression de Her2 et des marqueurs luminaux (*PR*, *ER*, *GATA-3*, *KRT18*, *19*). Les gènes impliqués dans la prolifération et dans le cycle cellulaire sont faiblement exprimés (*Ki67*) (Table 1). Ce type exprime fortement les gènes impliqués dans la réponse immunitaire (*CD79b*, *CD14*, *VAV1*), la communication cellulaire (chimiokine (CXC) ligand 12), la matrice

extracellulaire (*VIM* (Vimentine), la différenciation cellulaire (*IL6*), la migration cellulaire (*ITGA5*, Intégrine alpha 5) et l'angiogenèse (*VEGF-C*, Vascular endothelial growth factor C), et les gènes *MMP9* (Matrix metallopeptidase 9) et *FGF7* (Fibroblast growth factor 7). En revanche, ce sous-type Claudin Low exprime faiblement les gènes liés à l'adhésion cellulaire épithéliale (*CLDN3, 4, 7, OCLN, CDH1*).

Aujourd'hui, il existe une classification simplifiée et hétérogène en clinique. Chaque sous-type est divisé en plusieurs sous-types de signature moléculaire différente, et plus particulièrement le sous-type triple négatif. Ce type de cancer du sein se divise en 6 sous types : Basal 1 et 2 (l'expression des gènes du cycle cellulaire et de la réponse au dommage de l'ADN), immuno-modulateur (richesse en cellules immunitaires), mésenchyme et mésenchyme stem-like (la transition épithéliale-mésenchymateuse, la mobilité et la différenciation cellulaire) et LAR (récepteur d'androgène luminal) (Lehmann et al., 2011; Toss and Cristofanilli, 2015).

L'expression d'ER $\alpha$ , PR, Her2 et le score histo-pronostique constituent des biomarqueurs primaires sur lesquels se basent les stratégies actuelles de traitement du cancer de sein. Certaines équipes utilisent également la mesure du marquage de l'antigène Ki67 corrélé au nombre de cellules en cycle cellulaire pour définir les indications de la chimiothérapie. Ces différents marqueurs sont actuellement évalués, associés à un grand nombre d'autres marqueurs, obtenus par les outils transcriptomiques, pour faciliter la décision thérapeutique (puces de type Oncotype DX, MammaPrint, MapQuant Dx, PAM50, et l'index de cancer de sein Theros) (Enewold et al., 2015; Toss and Cristofanilli, 2015). Les altérations génomiques et l'amplification des gènes, les voies de signalisation associées à l'activité transcriptionnelle des récepteurs hormonaux (PI3K/AKT/mTOR) et la compréhension des mécanismes de

résistance aux thérapies endocriniennes (l'amplification de la protéine Her2 par exemple) aident au développement des régimes thérapeutiques ciblés et adaptés à chaque type de cancer de sein. La thérapie adjuvante actuelle comprend la radiothérapie, la chimiothérapie, la thérapie hormonale, cette dernière varie en fonction du statut des récepteurs hormonaux et de la femme en pré-ménopause (l'ovariectomie) ou en post-ménopause (l'anti-œstrogène ou l'inhibiteur d'aromatase), le trastuzumab pour traiter le type Her2+, les inhibiteurs de PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) et de la voie PI3K/mTOR font partis des cibles thérapeutiques de cancer de sein triple négatif le plus agressif.

#### **1.4 Les facteurs de risque de cancer du sein**

Les facteurs de risque du cancer du sein sont avant tout l'âge, l'existence d'une anomalie génétique prédisposant au cancer, les facteurs environnementaux et les facteurs de risque hormonaux.

L'âge est le principal facteur de risque de cancer du sein. Le risque de cancer après 50 ans est multiplié par 5 par rapport à la population générale.

Dans plus de 90% des cas, il n'y a aucune prédisposition génétique au cancer du sein. Les facteurs génétiques peuvent expliquer 5 à 10% des cas de cancer du sein (Claus et al., 1991; Newman et al., 1988). Les mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont responsables de l'augmentation du risque de développer un cancer de sein (45 à 65%) et un cancer des ovaires (11 à 39%) (Antoniou et al., 2003). Les femmes mutées pour *BRCA1/2* possèdent des concentrations élevées de E2 (le 17 $\beta$ -oestradiol) et de P4 (circulantes) durant la phase lutéale du cycle menstruel (Widschwendter et al., 2013). Elles présentent aussi une expression marquée de PR dans leurs tissus mammaires. Les

gènes *BRCA1/2* sont des gènes cibles d'E2, et *BRCA1* inhibe l'expression d'ER $\alpha$  via des mécanismes post-traductionnelles (mono-ubiquitination). La perte de l'expression de *BRCA1* aboutit à la résistance au traitement anti-œstrogénique (le tamoxifène), (Manavathi et al., 2013).

Le cancer du sein est actuellement défini comme une pathologie à grande diversité génétique, depuis le séquençage du génome entier de centaines de carcinomes mammaires révélant la présence de 300 mutations dans la séquence codante de la tumeur (Briskin, 2013). Les mutations somatiques dans les cellules épithéliales mammaires peuvent aboutir au développement du carcinome mammaire ; des facteurs non génétiques déterminent également si ces modifications génétiques conduisent à une tumeur évolutive (Briskin, 2013). Les techniques de séquençage des exons codants ont permis d'identifier des mutations somatiques dans neuf nouveaux gènes *AKT2*, *ARID1B*, *CASP8*, *CDKN1B*, *MAP3K1*, *MAP3K13*, *NCOR1*, *SMARCD1* et *TBX3*, outre les gènes connus comme *AKT1*, *BRCA1 et 2*, *GATA3*, *CDH1*, *PTEN*, *P53* et *PIK3CA* (Stephens et al., 2012).

Les facteurs de risque environnementaux associés au développement du cancer du sein comprennent l'exposition aux radiations ionisantes (Martin and Weber, 2000), la consommation d'alcool de façon dose-dépendante, les régimes alimentaires riches en graisses, et le surpoids qui en résulte (Chen et al., 2011b; Sieri et al., 2014; Soldin et al., 2011).

Les données de la littérature ont établi, de longue date, le rôle tumorigène des œstrogènes au niveau mammaire. Les études épidémiologiques montrent que la puberté précoce, la survenue des premières règles avant l'âge de 11 ans (2012), l'âge tardif de la première grossesse (après 35 ans), l'absence de grossesse (Russo et al., 2005), la

survenue tardive de la ménopause, l'augmentation du nombre de cycles menstruels et les cycles menstruels courts favorisent une longue exposition de l'épithélium mammaire aux hormones ovariennes, notamment les œstrogènes et augmentent le risque du cancer du sein (Colditz et al., 2004; Kelsey et al., 1993). En revanche, la grossesse à un âge précoce (20 ans) et l'allaitement sont associés à une réduction de risque de cancer du sein (2002), potentiellement en relation avec une maturation de l'épithélium mammaire en cours de la grossesse sous l'effet de P4 et de la prolactine (PRL), puis à la période d'anovulation correspondant à la lactation qui contribue à la diminution de la durée d'exposition aux stéroïdes sexuels, notamment les œstrogènes (Faupel-Badger et al., 2013). Enfin, l'ovariectomie chez les femmes porteuses des mutations de *BRCA1/2* réduit le risque de survenue du cancer du sein (Domchek et al., 2010). Il semble donc exister une forte corrélation positive entre les facteurs de risque environnementaux ou génétiques, l'exposition aux œstrogènes et le cancer du sein.

La consommation d'alcool augmente le niveau plasmatique d'E2, et allonge sa demi-vie (Dorgan et al., 1996; Feigelson et al., 2001; Ginsburg et al., 1995). De même, l'association entre l'obésité, la prise de poids après la ménopause et le sur-risque de cancer du sein pourrait être lié au fait que l'obésité est associée à une augmentation de la production d'œstrogènes chez les femmes post-ménopausées *via* la conversion de l'androstènedione en estrone par le tissu adipeux, une augmentation de l'expression de l'aromatase (l'enzyme responsable de la biosynthèse des œstrogènes et donc une exposition prolongée aux œstrogènes (Hankinson et al., 1995; Key et al., 2011; McDonnell et al., 2014; Shah et al., 2014).

A ce jour, l'exposition aux œstrogènes constitue un facteur de risque pour le cancer de sein. Ils existent en trois formes : E1, ou l'estrone, E2 ou le 17  $\beta$ -œstradiol (la forme

active) et E3 ou l'œstriol. Ils prédominent respectivement pendant les périodes de la ménopause, la reproduction et la grossesse. E2 se lie à deux isotypes de ER codés par des gènes différents, localisés sur des différents chromosomes, ER $\alpha$  (66 kDa) et ER $\beta$  (55 kDa) (Evans, 1988; Mangelsdorf et al., 1995). Dans la glande mammaire, ER régule, suite à la liaison d'E2, la croissance cellulaire et la différenciation tout en contrôlant l'expression de ses gènes cibles. Cette liaison favorise le recrutement des corégulateurs, les coactivateurs/ les corépresseurs pour activer/ inhiber la transcription des gènes cibles. Le mécanisme classique génomique de ER implique sa liaison à l'ADN soit directement *via* un ERE (Elément de réponse aux œstrogènes, estrogen response element) localisé sur des régions régulatrices des gènes cibles, soit indirectement *via* des facteurs de transcription, AP-1 (activator protein-1), Sp1 (specificity protein 1), NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B), C/EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$ ) et STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) (Bjornstrom and Sjoberg, 2005; Thomas and Gustafsson, 2011, 2015). ER peut activer la transcription même en absence de E2 ; ceci *via* les récepteurs des facteurs de croissance EGFR (Epidermal growth factor recepteur) et IGFR (Insulin-like growth factor 1 receptor). Ces récepteurs stimulent les cascades des protéines kinases qui phosphorylent et activent ER (Britton et al., 2006). ER au niveau de la membrane et du cytoplasme peut également exercer un mécanisme d'action rapide dite « non génomique » *via* les voies de MAPK (Mitogen activated protein kinase) et PI3K (Phosphoinositide 3-kinase).

ER $\alpha$  est exprimé dans 70 % des cancers de sein à un niveau d'expression plus élevé qu'ER $\beta$ . Cette caractéristique permet de considérer ER comme une cible thérapeutique privilégiée dans le cancer du sein et la variation de son expression a un impact sur la

réponse au traitement. ER $\alpha$  régule l'expression des gènes liés au développement de la glande mammaire et toute altération de l'expression de ces gènes est associée à une progression de cancer de sein (Welboren et al., 2009). La dérégulation des gènes cibles de E2, comme *FOXM1*, *EFP*, *PELP1*, *CIZ1*, *GREB1* et *MTA3* contribue à la progression de cancer de sein (Manavathi et al., 2013). ER $\alpha$  stimule la prolifération et la survie des cellules cancéreuses mammaires tout en induisant l'expression des gènes *MYC* et *CCND1* (Giulianelli et al., 2012a).

Sur la base des données humaines, animales et *in vitro*, le cancer mammaire ER positif est systématiquement traité par les modulateurs sélectifs du récepteur des œstrogènes (SERMs) comme le tamoxifène ou par les inhibiteurs de l'aromatase comme l'anastrozole et le létrozole (inhibiteurs non-stéroïdiens sélectifs) pour bloquer la signalisation œstrogénique dans les cellules cancéreuses (Cazzaniga and Bonanni, 2012; Osborne and Schiff, 2005) et inhiber la prolifération cellulaire œstrogéno-dépendante (Hah and Kraus, 2014). Il existe aussi les inhibiteurs stéroïdiens irréversibles, tels que l'exémestane, qui forment un lien désactivant permanent avec l'aromatase.

## **2. Progestérone, progestatifs et cancer du sein**

La Progestérone (P4), une hormone stéroïdienne nécessaire pour la coordination de la physiologie de la reproduction chez la femme (Graham and Clarke, 1997; Lee et al., 2006; Lydon et al., 1995). P4 est synthétisée majoritairement par les ovaires, et par le placenta à partir du deuxième trimestre de la grossesse. Elle dérive de la molécule du



cholestérol. Elle est le précurseur de la synthèse des autres hormones stéroïdiennes (les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes et les androgènes).

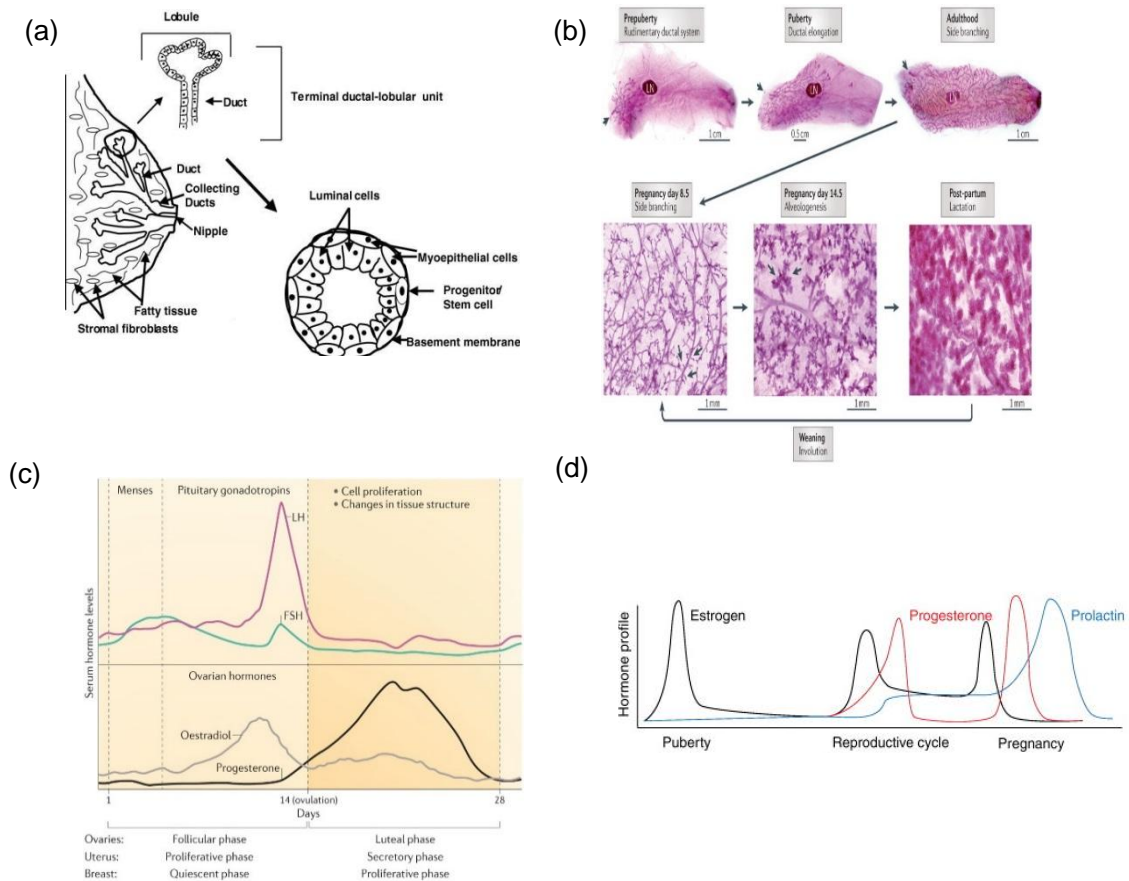
La progestérone contrôle la reproduction à des différents niveaux comme le ralentissement de la pulsativité de la GnRH en phase lutéale, l'inhibition des effets prolifératifs d'E2 au niveau de l'endomètre, la maturation de l'épithélium mammaire et endométriale préimplantatoire, l'expression des gènes impliqués dans l'implantation de l'embryon et le maintien de la quiescence myométriale pendant la grossesse. Elle a également des fonctions au niveau du système cardiovasculaire, du système nerveux central, du thymus et de l'os (Graham and Clarke, 1997; Li et al., 2004; Lu et al., 2006; Mote et al., 2007; Rocha and Soares, 2009; Schumacher et al., 2008). La progestérone stimule la prolifération cellulaire et l'activation des cellules progénitrices (Briskin, 2013).

## **2.1 Rôle physiologique de la progestérone au niveau des glandes**

### **mammaires**

La glande mammaire humaine est un organe qui se développe majoritairement après la naissance sous le contrôle des hormones ovariennes (P4 et œstrogènes) et subit des modifications pendant la puberté, la grossesse, la lactation et l'involution (Obr and Edwards, 2012). Sa structure chez la femme diffère de celle de la souris. Le sein humain, est plus complexe, 10 à 25 canaux primaires émanants de chaque mamelon, qui se ramifient en lobes se terminant par le TDLU. Le stroma humain est formé de tissu conjonctif lâche, richement vascularisé et séparé du stroma interstitiel par du tissu conjonctif fibreux (Briskin, 2013) (Figure 2a).

Les glandes mammaires murines servent de modèle d'étude privilégié. Elles sont constituées de deux compartiments: l'épithélium (les structures canales et alvéolaires) et le stroma (les cellules de soutien). L'épithélium dérive des cellules souches mammaires qui produisent les cellules précurseurs alvéolaires. Les alvéoles sont à l'origine des cellules épithéliales luminales productrices de lait durant la gestation et la lactation. Le stroma contient des cellules myoépithéliales, de la matrice extracellulaire, des fibroblastes, des cellules immunitaires et adipeuses. Jusqu'à la puberté, la glande mammaire est constituée d'un canal rudimentaire incorporé au stroma adipeux, lié par un canal unique aux mamelons (Figure 2b).



**Figure 2: Développement et structures des glandes mammaires humain (a) et murin (b).** Variation des niveaux sériques des gonadotrophines hypophysaires (FSH et LH) et des hormones ovariennes (progestérone et œstrogènes) lors du cycle menstruel chez la femme (c). Profil d'expression des hormones stéroïdiennes lors des étapes physiologiques de la vie reproductive chez la souris (d) (Brisken, 2013; Li et al., 2013).

A la puberté, les canaux galactophores se développent sous l'effet combiné du 17 $\beta$ -œstradiol (E2), de la progestérone, de la prolactine, du cortisol et de l'hormone de croissance (Brisken, 2013). A l'âge adulte, au fil des cycles œstraux successifs, le système canalaire devient plus complexe avec les ramifications qui augmenteront également au début de la gestation. La dernière semaine de la gestation se caractérise par la formation des alvéoles dédiées à la lactation. Chez la femme, cette dernière semaine se caractérise par une chute de production de P4 et E2 et un pic de production de hPL (Human placental lactogen). A la fin de cette période, la sécrétion de la prolactine de l'hypophyse débute (Figure 2d).

PR est exprimé dans la glande mammaire murine avant la puberté (Brisken and O'Malley, 2010; Grimm et al., 2002; Hovey et al., 2001; Stumpf et al., 1980) dans les compartiments stromal et épithélial (Aupperlee and Haslam, 2007; Aupperlee et al., 2005; Haslam, 1989; Haslam and Shyamala, 1981). Le PR épithélial est nécessaire à la ramification canalaire et l'alvéologénèse, alors que ER $\alpha$  exprimé aussi au niveau de l'épithélium est nécessaire à l'allongement canalaire, la ramification canalaire et l'alvéologénèse (Brisken and O'Malley, 2010). L'inactivation sélective de PR au niveau du stroma n'affecte pas le développement de la glande mammaire (Brisken et al., 1998; Lydon et al., 1995). Les souris invalidées pour le gène *PGR* (*PR*) présentent des anomalies pléiotropiques de la reproduction et une altération sévère du développement des glandes mammaires (Lydon et al., 1995).

Dans la glande mammaire de la souris femelle adulte, ER et PR sont absents dans les cellules myoépithéliales et basales et sont exprimés dans 30 à 50% des cellules luminales d'une façon hétérogène et non-uniforme. La plupart des cellules co-expriment les deux récepteurs (PR<sup>+</sup>/ER<sup>+</sup>) et sont non prolifératives. La signalisation de PR et ER $\alpha$  au niveau de l'épithélium mammaire est nécessaire aux étapes ultérieures de développement de la glande mammaire.

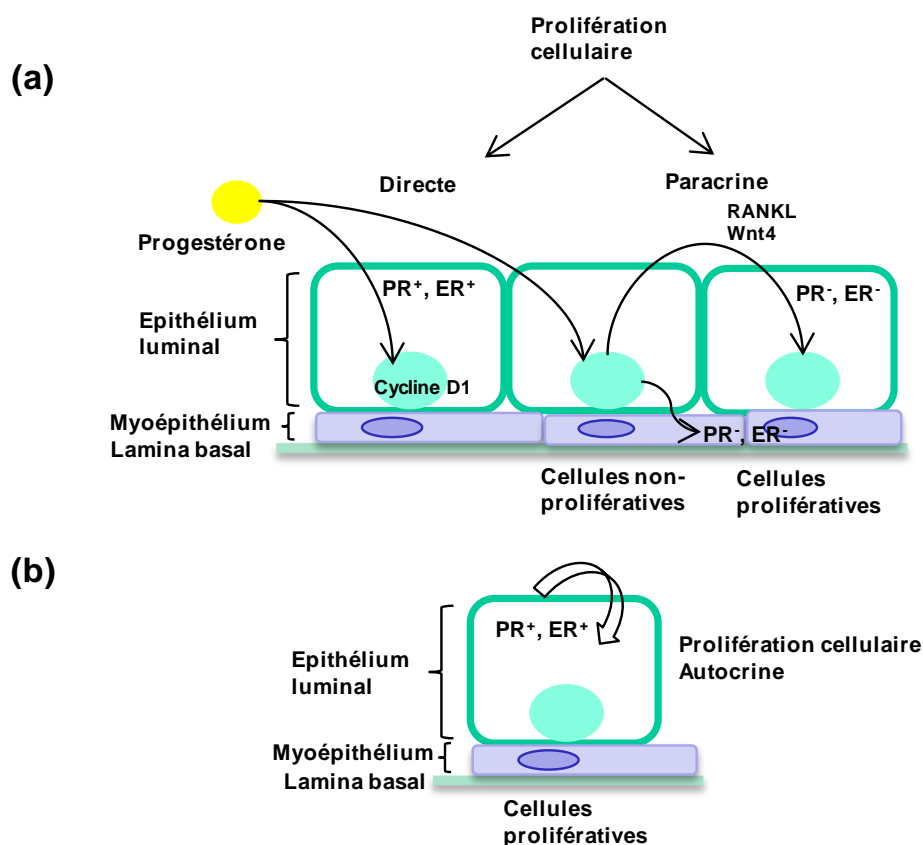
L'expression des récepteurs PR et ER dans l'espèce humaine suit la même évolution que le modèle murin. Dans l'épithélium mammaire humain normal, 98% des cellules prolifératives n'expriment ni PR et ni ER (ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>) (Clarke et al., 1997b). PR et ER sont colocalisés dans les cellules épithéliales luminales non-prolifératives à proximité des cellules prolifératives PR<sup>-</sup>/ER<sup>-</sup>, ce qui suggère que P4 agit par des voies de signalisation paracrine entre les cellules épithéliales *via* des facteurs sécrétés comme RANK, la famille WNTs, les facteurs de croissance fibroblastique et épidermique (FGF, EGF) et l'amphiréguline (Briskin, 2013; Diep et al., 2015; Hagan and Lange, 2014; Ismail et al., 2002; Jacobsen and Horwitz, 2012; Kim et al., 2013; Obr et al., 2013; Rajaram and Briskin, 2012; Rajaram et al., 2015; Seagroves et al., 2000; Tanos et al., 2013).

La voie de signalisation paracrine de P4 se traduit initialement chez les souris femelles par une prolifération autocrine, d'une petite vague de cellules PR<sup>+</sup> dans les 24 h suivant l'exposition à P4, selon un mécanisme cellulaire intrinsèque nécessitant la cycline D1 (Briskin, 2013). La deuxième phase de prolifération est constituée d'une large vague de cellules PR<sup>-</sup> et en coordination avec la synthèse et la sécrétion des facteurs paracrines (RANKL) et l'amplification du signal suite à la diffusion de ces facteurs aux cellules qui les entourent. Elle nécessite notamment RANKL (Receptor activator of nuclear

factor kappa-B ligand) (Beleut et al., 2010; Schramek et al., 2010; Tanos et al., 2013), une cytokine secrétée et un membre de la superfamille des facteurs de nécrose tumorale (TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor) (Figure 3a).

RANKL exerce ses actions *via* son récepteur transmembranaire RANK. Il est nécessaire à la prolifération cellulaire, la ramification latérale des glandes mammaires, la survie, l'alvéologénèse durant la grossesse et la lactation (Kong et al., 1999). RANKL est une cible directe de PRB (Mulac-Jericevic et al., 2003), agit en aval de la voie de signalisation de PR et régule positivement l'expression de la cycline D1, un le gène cible direct de NF- $\kappa$ B (Diep et al., 2015). RANKL, induit par P4, est secrété pour interagir avec son récepteur sur les cellules PR<sup>+</sup> ou sur les cellules PR<sup>-</sup> à proximité. Dans les cellules PR<sup>-</sup>, RANKL active la voie de signalisation I $\kappa$ K/I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B/Cyclin D1, cette activation n'existe pas dans les cellules PR<sup>+</sup> à cause de l'action répressive de TGF $\beta$  (Ewan et al., 2005). RANKL relaye donc la prolifération dépendante de progestérone au niveau du tissu mammaire humain. L'expression de RANKL dans les cellules luminales épithéliales est corrélée au taux plasmatique de P4 dans l'espèce humaine (Tanos et al., 2013). L'expression de la cycline D1 est également induite par P4 *via* PR (Asselin-Labat et al., 2010; Joshi et al., 2010). P4 contrôle l'expansion des cellules souches mammaires *via* la voie de signalisation relayée par RANKL (Rajaram and Brisken, 2012; Rajaram et al., 2015). En dehors de RANKL, un certain nombre d'effecteurs de P4 sont nécessaires à la prolifération cellulaire et la morphogénèse : Wnt4, amphireguline, calcitonine, Id4(inhibitor of DNA binding 4). La famille Wnt (Wingless-Type MMTV Integration Site Family) agit en aval de P4 et régule la différenciation cellulaire. Wnt4 est exprimé dans l'épithélium mammaire et son expression augmente au cours de la grossesse pour activer la prolifération canalaire et

la morphogénèse. Wnt4 régule la prolifération *via* l'activation des gènes du cycle cellulaire (*CCND1* et *P21*) (Nusse, 1999; Obr and Edwards, 2012). Le mécanisme d'action paracrine de P4 est conservé chez l'espèce humaine (Clarke et al., 1997b; Russo et al., 1999; Seagroves et al., 2000). Les modèles d'étude *in vivo* et *in vitro* retrouvés dans la littérature (le cancer de sein luminal plus particulièrement) ont largement montré que P4 (rôle clé dans le développement et l'auto-renouvellement de la glande mammaire) et les progestatifs, par l'intermédiaire de leur récepteur, contribuent à la survie, au développement et à la progression des cellules cancéreuses mammaires (Briskin, 2013; Daniel et al., 2011; Diep et al., 2015).



**Figure 3. Mécanismes de la prolifération cellulaire induite par la progestérone au niveau des cellules mammaires (a) et lors de la transformation néoplasique cancéreuse (b).** (a) La prolifération des cellules PR<sup>+</sup>/ER<sup>+</sup> induite par la progestérone s'effectue via un mécanisme cellulaire intrinsèque directe (la cycline

D1). La progestérone induit la sécrétion des facteurs paracrine (RANKL, Wnt4...) qui stimulent la prolifération des cellules adjacentes PR-/ER- via un mécanisme paracrine. (b) Au niveau des cellules cancéreuses, le mécanisme devient autocrine et les cellules PR+/ER+ deviennent des cellules prolifératives (Briskin, 2013; Knutson and Lange, 2014; Li et al., 2013; Tanos et al., 2013).

## **2.2 Progestatifs et cancer de sein**

Depuis une dizaine d'années et de grandes études cliniques ont mis en évidence un rôle tumorigène des progestatifs dans le contexte du traitement hormonal substitutif de la ménopause (THM, HRT, hormone replacement therapy). L'étude Women's Health Initiative (WHI) est une grande étude américaine de phase III dans laquelle une évaluation a été effectuée, en double aveugle randomisée, entre l'association d'œstrogènes d'origine équine (CEE, conjugated equine estrogens) et d'un progestatif de synthèse (le MPA, medroxyprogesterone acetate), ou le CEE seul chez les femmes ayant subi une hystérectomie, vs placebo. Cette étude a montré que l'association CEE-MPA augmente le risque de cancer du sein (luminal B en particulier) (Rossouw et al., 2002). Chez les femmes traitées par CEE seul, il n'est pas observé de sur-risque de cancer du sein (Anderson et al., 2012; LaCroix et al., 2011). L'étude Million Women Study (étude de cohorte anglaise très importante, MWS) montre également que l'association des œstrogènes et des progestatifs augmente le risque du cancer du sein chez les femmes ménopausées, ainsi que la mortalité, et que ce sur-risque n'est pas observé en cas de traitement œstrogénique seul (Beral, 2003; Chlebowski et al., 2010; Chlebowski et al., 2003; Rossouw et al., 2002; Santen, 2014). Les études de cohortes en France (Cohorte E3N) ont démontré que les femmes ménopausées utilisant la P4 naturelle en association avec l'œstradiol ne sont pas exposées à un sur-risque de cancer du sein comparées aux utilisatrices d'E2 et de progestatif de synthèse (Fournier et al.,

2005; Fournier et al., 2008). Le traitement par les œstrogènes seuls assurerait même une protection relative contre le cancer de sein (Chlebowski and Anderson, 2012; Diep et al., 2015). Récemment, une analyse rétrospective a démontré que les femmes sous traitement par le Levonorgestrel (un progestatif de synthèse) *via* un dispositif intra-utérin, comme moyen de contraception, présentent un risque élevé de cancer de sein (Diep et al., 2015; Soini et al., 2014). Le risque de cancer du sein induit par le traitement hormonal substitutif de la ménopause semble donc clairement dépendre du type de progestatif utilisé. Les progestatifs de synthèse ont une demi-vie plus longue que P4 (instable), et sont moins sélectifs, avec notamment une activité glucocorticoïde.

Des études cliniques montrent que les traitements par les progestatifs sont associés à un risque élevé de cancer du sein suggérant un effet prolifératif au niveau des glandes mammaires saines, et pouvant contribuer ainsi aux stades précoces de la tumorigénèse mammaire (Lydon and Edwards, 2009). Toutefois, l'expression de PR, dans les tumeurs mammaires, est un marqueur indépendant de bon pronostic et est associé à un phénotype tumoral plus différencié. Ainsi, P4 joue un rôle protecteur contre la progression et l'invasion tumorale (Bast et al., 2001; Creighton et al., 2009; Cui et al., 2005). Dans les lignées cellulaires cancéreuses mammaires PR<sup>+</sup>, les progestatifs induisent une prolifération transitoire suivie par un arrêt du cycle cellulaire (Groshong et al., 1997b).

Les mécanismes d'action de la progestérone et des progestatifs varient entre le tissu mammaire sain et cancéreux. Au niveau de l'épithélium mammaire humain, P4 peut inhiber ou stimuler la prolifération des cellules cancéreuses mammaires. Au contraire de l'activité paracrine de P4 dans les cellulaires mammaires épithéliales saines, la



transformation cellulaire néoplasique mammaire s'accompagne d'une augmentation de nombre des cellules prolifératives PR<sup>+</sup>/ER<sup>+</sup> aux alentours du tissu mammaire normal chez des patientes à risque de cancer de sein, en hyperplasie et dans le carcinome canalaire *in situ*; ce qui montre que le mécanisme paracrine de contrôle de la prolifération cellulaire devient un mécanisme autocrine sous le contrôle de P4 aboutissant au cancer de sein (Kim et al., 2013; Rajaram and Briskin, 2012) (Figure 3b). Chez la souris, les progestatifs (le MPA) ont un effet pro-tumorigénique. Ils stimulent la prolifération et la croissance tumorale induites préalablement par le carcinogène chimique (DMBA, 7,12-dimethylbenz-anthracene) (Kim et al., 2013). La délétion de *BRCA1* chez la souris favorise une action hyperproliférative de P4. La signalisation paracrine en aval de P4 est altérée lors de la tumorigénèse mammaire. Une expression ectopique de RANK et Wnt4 stimule la prolifération épithéliale mammaire tumorale (Briskin, 2013).

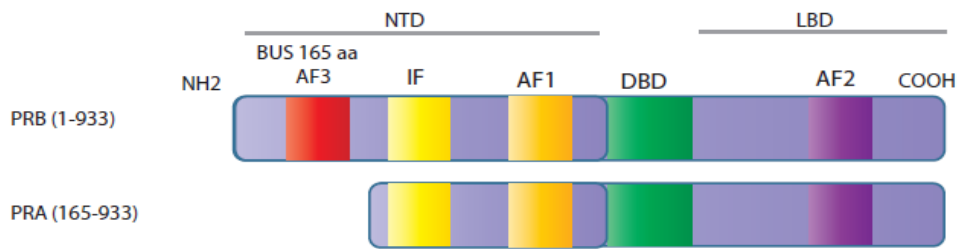
Une réponse biphasique à la progestérone dans les cellules cancéreuses mammaires, les T47D a été décrite (Groshong et al., 1997b). Etant donné le rôle de P4 et des progestatifs de synthèse de PR dans la prolifération et la progression tumorale mammaire, l'intérêt de développer des ligands antagonistes de PR et qui seront utilisés dans la thérapie du cancer de sein.

### **3. Récepteur nucléaire de la progestérone (PR)**

#### **3.1 Structure et mécanisme d'action**

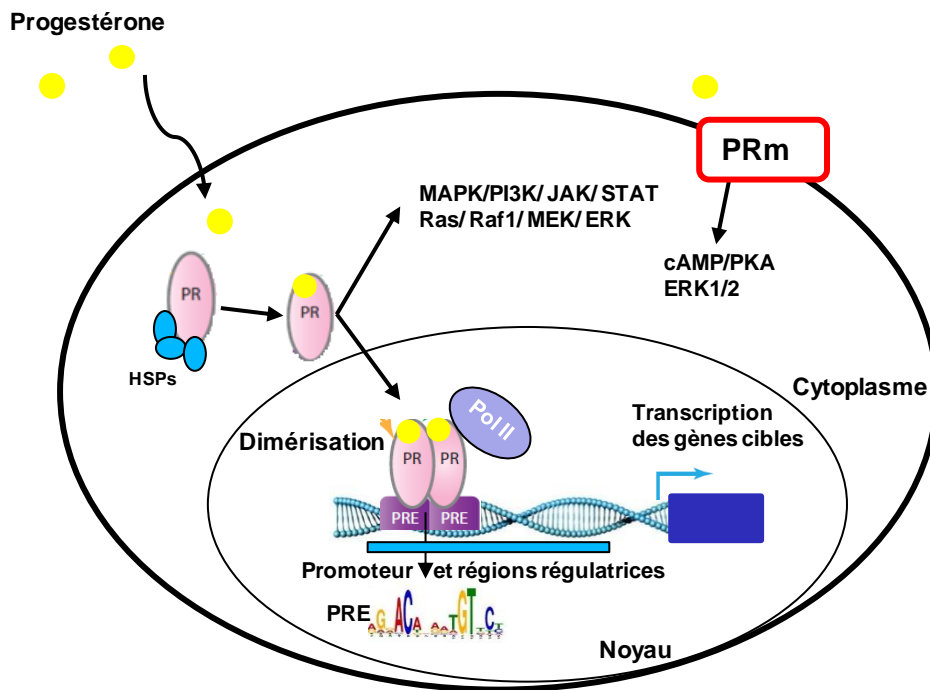
Les effets génomiques de la P4 sont relayés par son récepteur nucléaire (PR). PR est un facteur de transcription activé le ligand parmi une cinquantaine divisé en six familles. PR appartient au 3ème sous-groupe des récepteurs nucléaires, NR3C3, comprenant les récepteurs des androgènes (AR), des minéralocorticoïdes (MR) et des glucocorticoïdes

(GR), mais se distingue du récepteur des œstrogènes (ER) qui sont plus divergents (Evans, 1988; Mangelsdorf et al., 1995; McEwan, 2009). Le gène humain *PGR* (localisation chromosomique: 11q2.2) code pour deux isoformes principales, PRA (forme courte de 94 kDa, 780 aa) et PRB (forme longue 114 kDa, 933 aa). Cette différence résulte d'une transcription alternative à partir de deux promoteurs distincts (localisés à -711 à +31 et +464 à +1105 du site d'initiation de la transcription, respectivement) régulés en particulier par ER $\alpha$  et l'initiation de la traduction se fait à partir de deux codons AUG différents, respectivement AUG1 pour PRB et AUG2 (codon 165) pour PRA (Jacobsen and Horwitz, 2012; Kastner et al., 1990) (**Figure 4**). PR est organisé en plusieurs domaines fonctionnels, spécifiques et conservés, qui stimulent ou inhibent l'activation de la transcription suite à leur association à des corégulateurs transcriptionnels (Edwards, 2000; Huse et al., 1998; McKenna et al., 1999; McKenna and O'Malley, 2002; Sartorius et al., 1994b; Vegeto et al., 1993). Il est composé d'une région N-terminale non conservée (NTD : N-Terminal Domain), riche en proline et sérine, contenant la première fonction activatrice de la transcription (AF1), et une fonction d'auto-inhibition (IF) qui semble non fonctionnelle dans PRB; outre la région NTD, PR contient aussi un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé dans sa région centrale et composé de deux doigts de Zinc (DBD : DNA Binding Domain), et une région C-terminale (LBD : Ligand Binding Domain) contenant la deuxième fonction d'activation transcriptionnelle dépendante de l'hormone (AF2) et une autre fonction inhibitrice (IF) (Figure 4).



**Figure 4: Structure des isoformes PRA et PRB.** Ces deux isoformes partagent des séquences d'acides aminés sauf que PRA est tronqué au niveau de la région N-terminale et manque 165 acides aminés (BUS), cette région héberge AF3 (fonction activatrice 3), alors que PRB constitue l'isoforme le plus long. Les isoformes de PR, comme tous les récepteurs nucléaires, sont composés d'un domaine N terminale (NTD), d'un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison au ligand.

Les AFs et IFs peuvent stimuler ou inhiber l'activité transcriptionnelle en modulant l'interaction avec les corégulateurs. La délétion des régions auto-inhibitrices de PR augmente son activité transcriptionnelle. AF1 relaye les interactions protéines-protéines avec les facteurs de transcription et les corégulateurs. En revanche, AF2 fonctionne de façon dépendante du ligand (Bourguet et al., 2000; Lavery and McEwan, 2005). La liaison du ligand induit de plus une série de changements conformationnels qui vont activer les fonctions du DBD et des AFs. PRA et PRB possèdent 780 aa identiques à l'exception de PRB qui possède 164 aa en plus dans la région N-terminale un domaine appelé AF3 ou le domaine BUS (B-upstream segment) (Horwitz et al., 1995). Bien que PRA et PRB partagent les mêmes domaines structuraux dans leur séquence primaire en dehors d'AF3, elles ont des structures secondaires différentes qui leur confèrent des activités intrinsèques distinctes dans le contrôle de la transcription. Les mutations site-spécifiques de AF3 altèrent la régulation des gènes spécifiques de PRB sans le convertir en PRA (Tung et al., 2006).

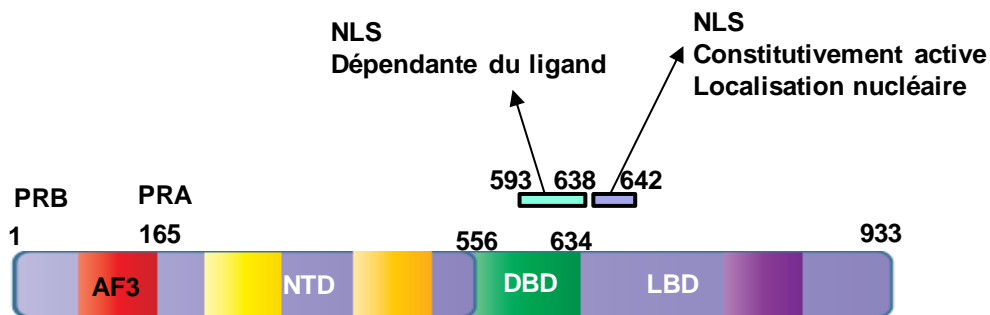


**Figure 5: Mécanisme d'action génomique classique et non génomique du récepteur de la progestérone nucléaire et membranaire.** PR (Récepteur de la progestérone), PRm (Récepteur membranaire de la progestérone), HSPs (Protéines de choc thermique), Pol II (ARN polymérase II), PRE (Eléments de réponse à la progestérone).

PR, en absence de ligand, est localisé dans le cytoplasme et est associé à un complexe inactif des protéines chaperonnes de choc thermique (Heat shock proteins: HSPs 70 et 90) (Smith et al., 1990) et d'autres protéines, le maintenant dans une conformation stable inactive et le protégeant de la dégradation par le protéasome (Catelli et al., 1985; Picard, 2006; Pratt et al., 2004a; Pratt et al., 2004b; Smith, 1993). Suite à la liaison du ligand, PR se dissocie des HSPs, se dimérise et se transfère dans le noyau (**Figure 5**).

L'existence d'une navette nucléo-cytoplasmique est due à la présence des signaux de localisation nucléaire NLS (Nuclear localization signals). PR possède deux séquences NLS, une NLS, située dans la région du doigt de zinc du DBD entre les acides aminés (aa) 593-638. Elle dépend du ligand et son absence aboutit à la localisation nucléaire de PR. Une autre NLS constitutive fortement conservée entre les aa 638-642 localisée dans

la région charnière et responsable de la localisation nucléaire hormono-indépendante de PR (**Figure 6**) (Baumann et al., 1999; Dauvois et al., 1993; DeFranco et al., 1991; Guiochon-Mantel et al., 1994a; Guiochon-Mantel et al., 1994b; Guiochon-Mantel et al., 1991; Guiochon-Mantel et al., 1989).



**Figure 6: Localisation des signaux de localisation nucléaire (NLS) du récepteur de la progestérone.** AF3 (Fonction activatrice 3), NTD (Domaine de liaison à l'ADN), DBD (Domaine de liaison à l'ADN), LBD (Domaine de liaison au ligand).

Le mécanisme d'action génomique classique de PR s'effectue par la liaison d'un dimère de PR à une séquence d'ADN génomique dite, PRE (Elément de réponse aux progestatifs, progesterone response elements) localisée dans la région promotrice des gènes cibles (Hard et al., 1990; Luisi et al., 1991; Picard and Yamamoto, 1987). Ces éléments de réponse correspondent à des séquences consensus, palindromiques, répétées, inversées, et séparées par trois nucléotides de type: AGAACAnnnTGTTCT. PR peut aussi se lier sous forme monomérique sur des demi-sites de PRE localisés dans la région promotrice des gènes régulés par PR (Giulianelli et al., 2013; Giulianelli et al., 2012a; Giulianelli et al., 2012b; Jacobsen and Horwitz, 2012). La plupart des sites de liaison génomique de PR ou PRbs (PR binding sites) sont localisés dans une région >

10 kb à partir du site d'initiation de la transcription (TSS, transcription start site) des gènes cibles, et moins de 35% des gènes régulés possèdent des PRbs situés aux alentours de 10 kb de TSS et seulement 4 % possèdent des PRbs situés à 1 kb à partir de TSS. Le nombre de PRbs (cistrome de PR) dépasse le nombre des gènes cibles, et uniquement 20 % des PRbs interviennent dans les mécanismes transcriptionnels (Clarke and Graham, 2012).

La liaison du récepteur à ces séquences consensus entraîne une cascade d'interactions protéines-protéines qui aboutit à l'activation du complexe de pré-initiation de la transcription ou PIC comprenant l'ARN polymérase de type II (Pol II). Ces interactions protéiques favorisent notamment le recrutement de corégulateurs transcriptionnels. (Sainsbury et al., 2015). La transcription chez les eucaryotes s'effectue par l'ARN polymérase I, II et III (Pol I, II et III). Pol I et Pol III induisent respectivement la transcription des précurseurs d'ARNr (ARN ribosomal) et des petites séquences d'ARN non codantes, ARNt (ARN de transfert). Pol II est responsable de la transcription des gènes codants pour des protéines en ARN pré-messager. Pol II s'associe avec les facteurs de transcription: TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIH (Transcription factor IIB, IID) sur le promoteur (ADN) pour former le complexe PIC; la synthèse d'ARN sera initiée et Pol II s'évade du promoteur. TFIID ou son TBP (TATA box-binding protein) et ses facteurs associés TAF (TBP associated factors) se lient à l'ADN et seront stabilisés par TFIIA et TFIIB. La formation de PIC sera traduite par l'interaction du complexe TFIIIF-Pol II avec le promoteur situé en amont. TFIIE et TFIIH se lient ultérieurement au complexe PIC. En présence d'ATP (Adenosine triphosphate), l'ADN (double brin) s'ouvre et la synthèse d'ARN s'initie. La dissociation des facteurs

d'initiation permet la formation du complexe d'élongation Pol II qui s'associe aux facteurs de transcription de l'élongation (Sainsbury et al., 2015).

Il a été également proposé que PR existe au niveau de la membrane (mPR ou PR<sub>m</sub>) et activerait certaines voies spécifiques de signalisation. Il s'agirait d'un récepteur à sept domaines transmembranaires, distinct du PR classique précédemment décrit, et s'apparenterait aux récepteurs couplés aux protéines G (GPCR, G-protein coupled receptor). Il est incapable de lier les progestatifs (Giulianelli et al., 2013; Thomas et al., 2007). Son rôle potentiel dans la carcinogenèse mammaire reste à démontrer.

La majorité des tissus cibles de P4 exprime PRA et PRB d'une façon équimolaire. Dans la glande mammaire de la souris, de même que chez la femme. PRA et PRB sont exprimés dans les compartiments épithéliaux et stroma (Aupperlee et al., 2005; Haslam, 1989; Haslam and Shyamala, 1981; Kastner et al., 1990). Les souris invalidées pour le gène *PGR* (*PR*) présentent des anomalies pléiotropiques de la reproduction, en particulier une incapacité à ovuler, une hyperplasie de l'utérus, et une altération sévère du développement des glandes mammaires (Lydon et al., 1995). Les souris invalidées sélectivement pour PRA ou PRB ont montré que seul PRB est important pour accomplir les effets prolifératifs de la progestérone dans les glandes mammaires (la ramification canalaire et le développement des glandes lobulo-alvéolaires pendant la grossesse), alors que PRA est crucial au niveau des ovaires et de l'utérus. PRA contrôle les œstrogènes induisant la prolifération endométriale (les effets de la progestérone sur l'ovulation LH-dépendante, la décidualisation des cellules stromales dans l'endomètre et l'inhibition des effets prolifératifs des œstrogènes dans l'endomètre). Les souris transgéniques qui surexpriment PRA au niveau du tissu mammaire présentent une hyperplasie et une ramification anormale des canaux latéraux. En revanche, les souris

transgéniques qui surexpriment PRB présentent une inhibition de l'élongation et du développement lobulo-alvéolaire (Conneely and Lydon, 2000; Conneely et al., 2001; Jacobsen and Horwitz, 2012; Leonhardt et al., 2003; Mulac-Jericevic et al., 2003; Richer et al., 2002; Shyamala et al., 2000; Shyamala et al., 1998).

Une troisième isoforme a été décrite, PRC, dont l'existence est controversée, mais qui ne joue pas de rôle dans la glande mammaire (Wei et al., 1996).

### **3.2 Les modifications post-traductionnelles**

PR subit des modifications post-traductionnelles, comme les autres facteurs de transcription, la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation et l'acétylation, notamment. Ces modifications sont fortement régulées par les voies de signalisation cellulaire et influencent largement l'activité de PR (la sensibilité hormonale, la stabilité et la localisation nucléaire du récepteur).

#### **a. La phosphorylation**

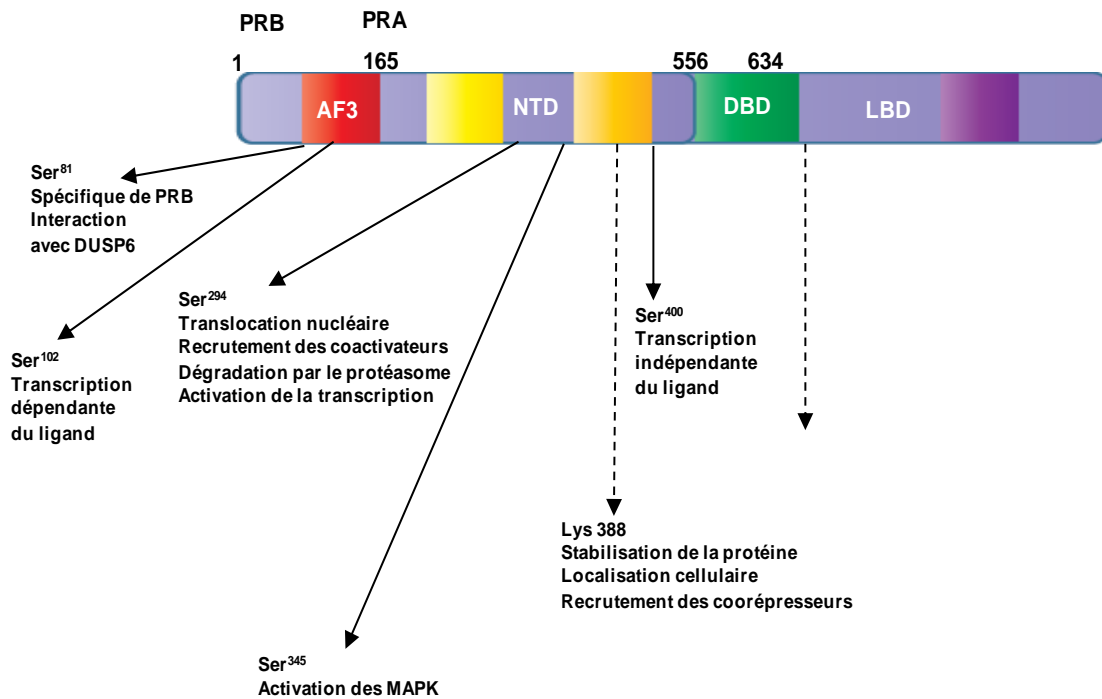
La phosphorylation stimulée par les facteurs de croissance régule positivement la signalisation de l'hormone et l'activité transcriptionnelle de son récepteur (la dimérisation, la translocation nucléaire, la liaison à l'ADN et le recrutement des corégulateurs). PRB possède 14 sites potentiels de phosphorylation, la plupart sur des résidus sérine localisés dans la région N-terminale. Les sérines Ser<sup>81</sup>, Ser<sup>162</sup>, Ser<sup>190</sup>, Ser<sup>400</sup> sont phosphorylées à l'état basal, en absence du ligand, par exemple la Ser<sup>81</sup> est phosphorylée par la caséine kinase II et la Ser<sup>162</sup> par la MAPK (Figure 7). Suite à la liaison du ligand, les sérines Ser<sup>102</sup>, Ser<sup>294</sup>, Ser<sup>345</sup> sont phosphorylées par les kinases



dépendantes du ligand: la CDK2 (Cyclin-dependent kinase 2), la MAPK et la PKA (Protein kinase A) (Abdel-Hafiz and Horwitz, 2014; Knutson and Lange, 2014).

### b. L'ubiquitination

L'ubiquitine est un peptide de 76 aa qui se lie d'une façon covalente sur un résidu Lysine (K) par l'intermédiaire d'une cascade d'enzymes E1, E2, E3-ligases. L'ubiquitination cible PR, de façon dépendante du ligand, pour sa dégradation et son recyclage par le complexe ubiquitine-protéasome. La dégradation de PR est indispensable à son activité transcriptionnelle (Abdel-Hafiz and Horwitz, 2014; Knutson and Lange, 2014).



**Figure 7: Modifications post-traductionnelles du récepteur de la progestérone. (Phosphorylation des Sérines et acétylation des Lysine).** AF3 (Fonction activatrice 3), NTD

(Domaine de liaison à l'ADN), DBD (Domaine de liaison à l'ADN), LBD (Domaine de liaison au ligand). Ser (Sérine), Lys (Lysine). Adapté de (Abdel-Hafiz and Horwitz, 2014).

### **c. La sumoylation**

La sumoylation est un mécanisme régulateur majeur de la transcription qui module la sélectivité des gènes cibles activant ou inhibant ainsi leur expression. La protéine SUMO (Small ubiquitin-related modifier) se lie d'une façon covalente sur la lysine K388 (Lys<sup>388</sup>) située dans la région N-terminale de PR de façon dépendante du ligand. Une balance réciproque existe entre la phosphorylation de PR sur Ser<sup>294</sup> et la sumoylation de la Lys<sup>388</sup> et influence l'activité transcriptionnelle de PR (Abdel-Hafiz and Horwitz, 2014; Dennis et al., 2005; Kim et al., 2013; Lange et al., 2000; Weigel and Moore, 2007). La sumoylation de la protéine SRC1 sur les Lys<sup>732</sup> et Lys<sup>774</sup> facilite son interaction avec PR et son maintien au niveau du noyau (Chauchereau et al., 2003).

### **d. L'acétylation**

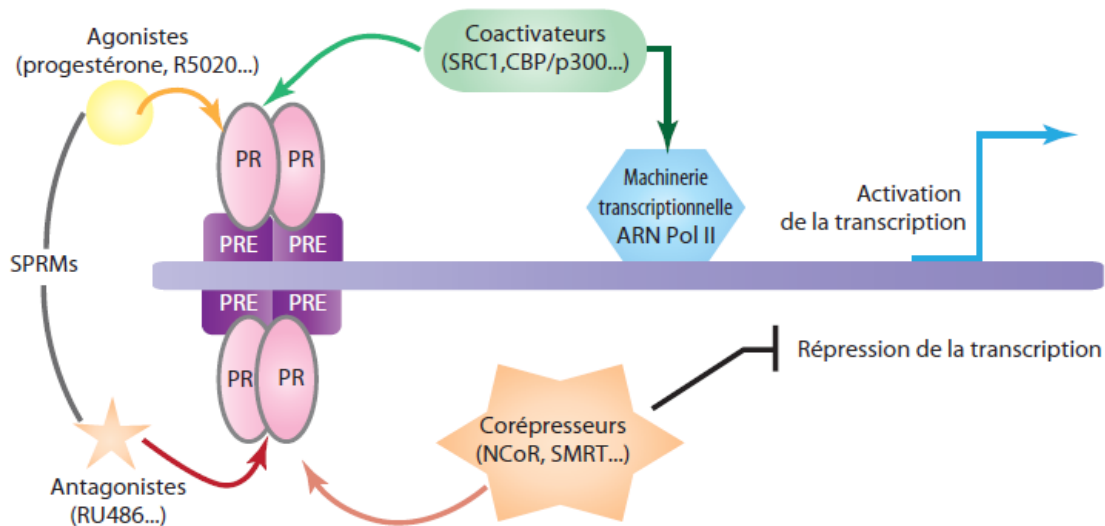
L'acétylation de PR, suite à la liaison du ligand, s'effectue sur les résidus Lysine situés dans la région charnière sur un motif d'acétylation conservé, KxKK (638-641 aa) (Daniel et al., 2010). L'acétylation stimule la phosphorylation de PR, sa localisation nucléaire et ses propriétés transcriptionnelles en fonction du type cellulaire (Fu et al., 2003; Kim et al., 2006; Wang et al., 2001). De façon intéressante, ce motif correspond également à un signal de localisation nucléaire, suggérant un lien fonctionnel potentiel entre la localisation subcellulaire et l'acétylation.

## **3.3 Les corégulateurs**

### **a. Les coactivateurs**

La régulation de la transcription des gènes cibles comporte le recrutement séquentiel des corégulateurs primaires et secondaires essentiels pour accomplir cette régulation (Lonard et al., 2007; Lonard and O'Malley B, 2007; Wolf et al., 2008). Ce recrutement varie en fonction de leur abondance tissulaire (Giangrande et al., 2000; Han et al., 2005; Lonard et al., 2007), de la nature du ligand, de l'environnement du promoteur et de l'activation/l'inhibition des voies de signalisation associées (Hermanson et al., 2002). Plus de 400 corégulateurs (coactivateurs, corépresseurs) sont connus. La réponse cellulaire à une hormone dépend fortement du rapport coactivateur/corépresseur (Han et al., 2006; Molenda-Figueira et al., 2008; Tung et al., 2006). Parmi les coactivateurs identifiés, on peut citer les coactivateurs de la famille p160 qui contient trois membres homologues (SRC-1/NCοA-1, SRC-2/GRIP1/TIF2, SRC-3/AIB1/ACTR/TRAM1/pCIP) (Han et al., 2006; Han et al., 2005; McKenna et al., 1998; Onate et al., 1995). On trouve également les histones acétylases (CBP/p300) (McKenna et al., 1998), le RIP140 (receptor-interacting protein 140), les méthylases (CARM1) (Lonard and O'Malley B, 2007), les ADN hélicases (complexe SWI/SNF) (Vicent et al., 2004), les ubiquitines ligases (E6-AP) (Nawaz et al., 1999) et le SRA (steroid receptor-specific RNA activator) (Lanz et al., 1999). Les ligands agonistes recrutent les coactivateurs et les ligands antagonistes inhibent leur recrutement (Figure 8). Ces coactivateurs facilitent l'initiation de la transcription *via* le remodelage de la chromatine, l'association de Pol II avec la machinerie transcriptionnelle sur les régions régulatrices et les promoteurs des gènes cibles. Les coactivateurs associés au récepteur nucléaire possèdent une activité enzymatique intrinsèque pour l'acétylation (HAT: activité histone acétyltransférase) ou pour la méthylation des histones, et facilitent l'activation de l'ARN polymérase II et la

transcription des gènes cibles (Lonard and O'Malley B, 2007; O'Malley and Means, 1974).



**Figure 8: Le modèle classique d'action PR lié aux ligands (agonistes et antagonistes) classés sous le terme de SPRM.** Les effets agonistes des SPRMs sont transmis par le recrutement des coactivateurs activant la transcription par leur activité histone acétylase notamment. En revanche, le recrutement des corépresseurs conduit à l'arrêt de la transcription par une activité histone désacétylase. Toutefois, les niveaux d'expression des corégulateurs de la machinerie transcriptionnelle (coactivateurs et corépresseurs) sont très variables selon le type cellulaire, et influencent le caractère agoniste/antagoniste des SPRMs. Les propriétés agonistes partielles des antagonistes SPRMs augmentent avec l'élévation des niveaux d'expression des coactivateurs. De même, le caractère agoniste d'un SPRM est inversement proportionnel aux niveaux d'expression des corépresseurs.

Les études *in vitro* suggèrent que les isoformes de PR présentent des différentes affinités pour certains corégulateurs, ce qui conduit à des activités transcriptionnelles différentes spécifiques du type cellulaire. L'association de PRB à SRC1 et SRC2 est due à la présence d'AF3 qui masque le domaine inhibiteur de la région N-terminale (Dong et al., 2004; Tung et al., 2006). PRA liée à un ligand recrute des coactivateurs, mais elle n'interagit pas directement et avec une grande affinité comme PRB (Heneghan et al., 2007; Molenda-Figueira et al., 2008; Tung et al., 2006).

SRC1 est le premier coactivateur cloné et identifié (Onate et al., 1995). La protéine SRC1 a une masse moléculaire de 160 kDa et partage 50-55% de similarité avec les domaines structuraux conservés (Johnson and O'Malley, 2012). L'expression de SRC1, *via* sa phosphorylation sur la thréonine<sup>1179</sup> et la sérine<sup>1185</sup> par MAPK, stimule l'activation de la transcription induite par les récepteurs nucléaires (PR, ER $\alpha$ , AR...) liés à leurs ligands (Rowan et al., 2000; Wu et al., 2005). La liaison du ligand à PR est suivi par la dégradation de PR/SRC1 par le complexe ubiquitine/protéasome nécessaire à l'activation transcriptionnelle de PR (Amazit et al., 2011). La perte de l'expression du gène *SRIC1* réduit la croissance de l'utérus, de la prostate et des glandes mammaires. Les souris invalidées pour *SCR1* sont prédisposées à l'obésité due à la diminution de leur dépense énergétique (Dasgupta et al., 2014). L'expression de SRC1 dans les cancers de sein corrèle positivement avec la tumorigénèse mammaire et présente un mauvais pronostic. SRC1 est associé à l'expression de Her2 et c-Myc. SRC1 stimule la migration, l'invasion, la transition épithélio-mésenchymateuse et la métastase tumorale mammaire-pulmonaire. Une expression élevée est associée à un mécanisme de résistance au tamoxifène et aux inhibiteurs d'aromatase et à une réduction du taux de survie (Dasgupta et al., 2014; Fleming et al., 2004; Johnson and O'Malley, 2012; Walsh et al., 2012; Wang et al., 2009; Xu et al., 2009; Xu et al., 2014).

#### **b. Les corépresseurs**

Deux corépresseurs largement étudiés sont le corépresseur du récepteur nucléaire (NCoR, NCoR1) et le médiateur silencieux des récepteurs de l'acide rétinoïque et de l'hormone thyroïdienne (SMRT, NCoR2). NCoR et SMRT ont été clonés simultanément en 1995 par les laboratoires de M. Rosenfeld (Horlein et al., 1995) et de R. Evans (Chen and Evans, 1995) respectivement. SMRT interagit préférentiellement

avec PRA une fois lié à un antagoniste (Giangrande et al., 2000). Les corépresseurs se lient aussi à d'autres facteurs de transcription (TFIIB, AP1 et NF- $\kappa$ B) (Battaglia et al., 2010). Les modifications de leur expression et de leur localisation sont observées dans le cancer du sein, de la prostate et de la vessie (Abedin et al., 2009; Banwell et al., 2006; Girault et al., 2003; Khanim et al., 2004; Kim et al., 2009; Zhang et al., 2006). L'absence du ligand et la liaison des ligands antagonistes facilitent leur recrutement. Les coactivateurs peuvent remplacer les corépresseurs (la liaison du ligand agoniste induit un changement conformationnel de PR: le repositionnement de l'hélice H12 du LBD) (Madauss et al., 2007a). D'autres corépresseurs ont été identifiés et stimulent la répression de la transcription comme la C-terminal binding protein (CtBP) et les histone désacétylases (HDACs) (Augereau et al., 2006; Epping et al., 2005; Fernandes et al., 2003; Montano et al., 1999; Palijan et al., 2009a; Palijan et al., 2009b; Wei et al., 2000). Récemment, il a été démontré que certains corépresseurs comme L-CoR sont spécifiquement recrutés par des ligands qui activent des facteurs de transcription aboutissant à la répression de la transcription de gène cible. L-CoR est recruté, suite à la liaison de l'hormone, par PR et ER $\alpha$  sur les promoteurs des gènes réprimés (Palijan et al., 2009a; Palijan et al., 2009b). Les corépresseurs comme les coactivateurs ciblent non seulement des récepteurs nucléaires mais aussi des facteurs de transcription (TFIIB, AP1), confirmant le rôle physiopathologique majeur de ces corépresseurs (Figure 6).

PR est un facteur de transcription activé par un ligand, donc l'activité est modulée notamment par la structure spatiale induite par ce ligand, l'isoforme de PR exprimée, le type de corégulateur recruté et le type de modifications post-traductionnelles. Ces différentes modulations de l'activité sont gène-, cellule- et tissu-spécifiques.

### 3.4 Signalisation PR et cellules cancéreuses mammaires

Dans les cellules cancéreuses mammaires, la régulation de la transcription des gènes cibles de PR est altérée. PR active les voies de signalisation des kinases et les programmes génétiques via une régulation directe avec des cofacteurs ou indirecte avec les composantes des voies de signalisation. L'expression de l'oncogène *MYC* et *CCND1* est induite par les progestatifs par l'intermédiaire de la liaison de PR sur une séquence PRE-like (Giulianelli et al., 2013). *MYC* joue un rôle dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Dans les cellules cancéreuses mammaires luminales (PR<sup>+</sup>/ER<sup>+</sup>) T47D, la surexpression de *BRCA1* inhibe l'expression de *MYC* induite par les progestatifs en recrutant le corépresseur HDAC1 et inhibant le recrutement des coactivateurs (SRC1 et SRC3 (AIB1)). La MPA (Medroxyprogestérone acetate) ou FGF2 (Facteur de croissance des fibroblastes, fibroblast growth factor) stimule aussi l'expression de *MYC* par l'intermédiaire d'une interaction entre PR, ER $\alpha$  et STAT5 sur le promoteur de *MYC* (Giulianelli et al., 2013). PR, par ses voies de signalisation non génomiques rapides (Src/p21Ras/Erk, PI3K/Akt, et JAK/STAT), stimule la prolifération des cellules cancéreuses mammaires (Kim et al., 2013). La phosphorylation de PRB (l'isoforme proliférative dans les tumeurs mammaires) sur la Ser<sup>294</sup> augmente sa sensibilité aux progestatifs et son ubiquitination (nécessaire pour sa dégradation par le protéasome); ceci s'accompagne d'une diminution de sa sumoylation sur la Lys<sup>388</sup>, d'une stimulation de son activité transcriptionnelle (indépendamment du ligand) et de sa sélectivité altérée du promoteur (Daniel and Lange, 2009; Daniel et al., 2007; Diep et al., 2015; Knutson et al., 2012; Lange et al., 2000). Ce mécanisme altère l'expression équimolaire de PRA et PRB présente dans les cellules mammaires saines. Lors de la progression dans le cycle cellulaire (la mitose),

l'activation des kinases MAPK et CDK2 aboutit à la phosphorylation de PR sur les Ser<sup>294</sup> et Ser<sup>400</sup>, ce qui augmente l'expression de la cycline D1 induite par les progestatifs (Diep et al., 2015; Dressing et al., 2014). La cycline D1 coopère avec PR phosphorylé sur la Ser<sup>345</sup> pour recruter le complexe transcriptionnel contenant Sp1 (Dressing et al., 2014) et pour induire l'expression des gènes cibles de PR: *P21* et *EGFR* (EGF receptor) (Kim et al., 2013).

#### **4. Les antagonistes et les modulateurs sélectifs de PR**

Le traitement de cancer de sein hormono-dépendant a commencé à partir des années 1960 par la castration chirurgicale puis par les médicaments par les traitements anti-hormonaux. Le développement des stratégies visant à bloquer les effets de ces hormones, des œstrogènes et des progestatifs, dans la carcinogénèse mammaire a été et reste une voie de recherche très active. Plusieurs antagonistes de ER et PR ont été synthétisés dans ce but (Cole et al., 1971; Ward, 1973). Le développement de ces antagonistes a connu ses débuts par les modulateurs sélectifs des œstrogènes (SERMs, selective estrogen receptor modulator), le tamoxifène et le raloxifène. Le tamoxifène, a été développé en 1970 pour son effet antiœstrogénique et est devenu l'archétype du modulateur sélectif des récepteurs nucléaires après la mise en évidence de ses activités mixtes antagonistes dans le sein mais aussi agonistes, dans l'endomètre responsable d'une sur-incidence de cancer de l'endomètre (Jordan and Dowse, 1976; Silfen et al., 1999). Plusieurs études, y compris des études cliniques, ont montré que l'utilisation à long terme du tamoxifène comme traitement adjuvant, diminue le risque de cancer de sein. Il bloque l'activité transcriptionnelle de ER, en revanche 40% des patientes ont présenté une rechute après le traitement et deviennent résistantes au tamoxifène, d'où



l'intérêt des antagonistes purs de ER comme le fulvestrant qui induit, en plus de l'inhibition de la transcription de ER, sa dégradation. Les inhibiteurs de l'aromatase s'ajoutent aussi non seulement pour bloquer l'activité transcriptionnelle de ER, mais pour inhiber surtout la synthèse d'E2 et diminuer ses niveaux plasmatiques dans les tissus mammaires (Knutson and Lange, 2014). En dehors des antagonistes de ER et d'après des études précliniques et cliniques, les antiprogestatifs semblent être efficaces pour bloquer l'activité transcriptionnelle de PR dans le traitement de cancer de sein.

Plusieurs ligands stéroïdiens de PR, à activités agonistes et/ou antagonistes et dénommés modulateurs sélectifs du récepteur de la progestérone (SPRM, selective progesterone receptor modulator) ont été développés par analogie avec les SERMs. De nouveaux antagonistes non stéroïdiens sont en cours de développement (Allan and Sui, 2005). Les effets des SPRMs dépendent du ratio PRA/PRB au niveau des tissus. Le test de McPhail est utilisé comme un test standard pour déterminer l'activité agoniste/antagoniste des ligands de PR. Il consiste à tester l'activité progestationnelle de ces ligands dans des lapins immatures dépourvus des œstrogènes. Certes, il n'est pas capable de distinguer les différences minimales entre les antagonistes de PR. La plupart des SPRMs bloquent l'ovulation et la croissance des fibromes. Il existe trois types de modulateurs de PR. Ils sont classés en fonction des caractéristiques *in vitro* telles que la liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle de l'antagoniste occupant PR en présence des activateurs de la protéine kinase A (AMP cyclique). On trouve le type I qui présente une activité antagoniste pure, et inhibe la liaison de l'antagoniste-PR à l'ADN comme l'Onapristone (ONA ; ZK 98299) (Leonhardt et al., 2003). Le type II comme le RU486 et l'Ulipristal acétate (UPA) permet la liaison du ligand-PR à l'ADN et exerce des fonctions agonistes partielles. Les antagonistes de type III permettent la

liaison de PR à l'ADN et possèdent des activités antagonistes pures, et sans activités agonistes potentielles comme le lonaprisan (ZK 230211) (Afhuppe et al., 2010).

Les structures cristallographiques de PR associées à des ligands agonistes ont montré que ces molécules se lient sur une poche hydrophobe induisant un changement conformationnel de la structure conservée de l'hélice  $\alpha$  (H12). Les antagonistes de PR sont caractérisés par la présence d'un groupement encombrant  $\beta$ -aryl (substitué 11  $\beta$ -diméthylaminophényl) au niveau du carbone C11 responsable de leurs propriétés d'antagonistes. Une interaction spécifique avec le récepteur empêche sa configuration active et la fermeture partielle de la poche de liaison au ligand favorisant ainsi le recrutement des corépresseurs, comme le SMRT en position H3-H4 du LBD. La structure cristallographique de PR-LBD lié à l'UPA a permis de mettre en évidence une liaison entre le groupement  $17\alpha$  et les hélices H3, H6, H7 (Knutson and Lange, 2014; Madauss et al., 2007a; Madauss et al., 2007b; Petit-Topin et al., 2014; Raaijmakers et al., 2009).

La conformation du LBD induite par ces molécules permettrait aussi l'interaction avec des coactivateurs si ceux-ci sont exprimés en excès dans la cellule et sont responsables alors d'un effet agoniste partiel. Une nouvelle classe de SPRMs appelée « les progestatifs au profil mixte » a été décrite. Cette classe possède une activité agoniste plus importante que les autres SPRMs (Rewinkel et al., 2008).

Les SPRMs agissent au niveau des tissus mammaires sains et cancéreux. L'exposition des glandes mammaires chez la souris vierge dépourvue de P4 au ZK114043 aboutit à la réduction de la prolifération cellulaire épithéliale (Li et al., 1995).

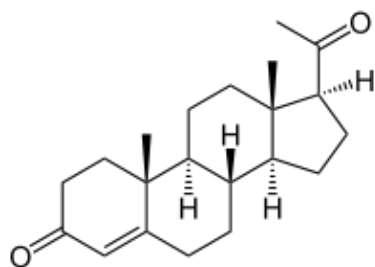
Deux antiprogestatifs sont actuellement commercialisés: la mifépristone (initialement RU486) utilisée dans l'interruption de grossesse, et l'ulipristal acétate utilisé en

ontraception d'urgence (Glasier et al., 2010) et dans le traitement des fibromes utérins (Chabbert-Buffet et al., 2014; Donnez et al., 2015; Donnez et al., 2014).

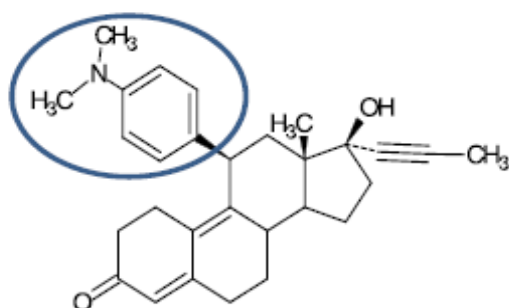
#### **4.1 La mifépristone (RU486)**

Le RU486 a été évalué dans de nombreux modèles cellulaires et animaux de cancer du sein hormono-dépendant (Figure 9). Il a une activité antitumorale synergique avec les antiœstrogènes (Lanari et al., 2012). En fonction du contexte cellulaire et du promoteur, il inhibe ou stimule la transcription des gènes cibles de PR. Le RU486 lié à PR stimule sa dissociation de la protéine chaperonne, sa dimérisation et induit les modifications transcriptionnelles de PR, la sumoylation et la phosphorylation de PRB sur la Ser<sup>294</sup> et sa stabilisation. En revanche, il réduit sa dégradation par le protéasome bloquant ainsi son activité transcriptionnelle (Khan et al., 2011). Le RU486 altère aussi la dégradation de SRC1 dépendante de PRB induite par le ligand agoniste le R5020 (Amazit et al., 2011). A faibles concentrations (10 nM), il agit comme un agoniste en activant la voie de signalisation non génomique ERK dans un modèle cancéreux mammaire murin (C4-HD). C4-HD est une tumeur mammaire canalaire transplantée chez des souris BALB/c traitées par MPA. Le RU486 à  $10^{-11}$  M (10 pico-Molaire) stimule la prolifération cellulaire *in vitro* des cellules cancéreuses mammaires humaines T47D *via* des sites de liaison membranaires actifs des progestatifs ressemblant à PR (Bottino et al., 2011; Lanari et al., 2012). En association ou non avec des inhibiteurs de l'aromatase, le RU486 administré essentiellement secondairement permet de contrôler l'évolution des cancers du sein métastatiques (Klijn et al., 2000; Vanzulli et al., 2005). Dans le sein

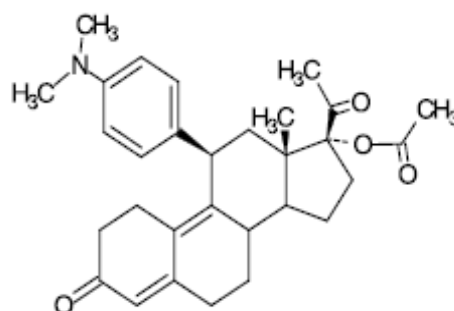
humain normal, une réduction de la prolifération cellulaire a été mise en évidence après un traitement à court terme (3 mois) par le RU486 (Engman et al., 2008).



**Progesterone (P4)**



**Mifépristone (RU486)**



**Ulipristal acétate (UPA,  
CDB-2914, VA2914)**

**Figure 9: Structure chimiques de la progestérone et des SPRMs (la Mifépristone et l'Ulipristal acétate) (Chabbert-Buffet et al., 2012).**

Le RU486 pourrait être utilisé également dans la prévention des cancers d'origine génétique, notamment chez les femmes porteuses de la mutation de *BRCA1*. Poole et al ont démontré, dans un modèle murin mammaire invalidé conditionnellement des *BRCA1* et *P53*, que la tumorigenèse mammaire est inhibée par le RU486 (Poole et al., 2006). Le lien fonctionnel entre PR et *BRCA1* est dû au fait que les deux protéines interagissent directement selon un mécanisme aboutissant à la dégradation de PR par le protéasome. En absence de *BRCA1*, PR serait donc stabilisé, en particulier PRA,

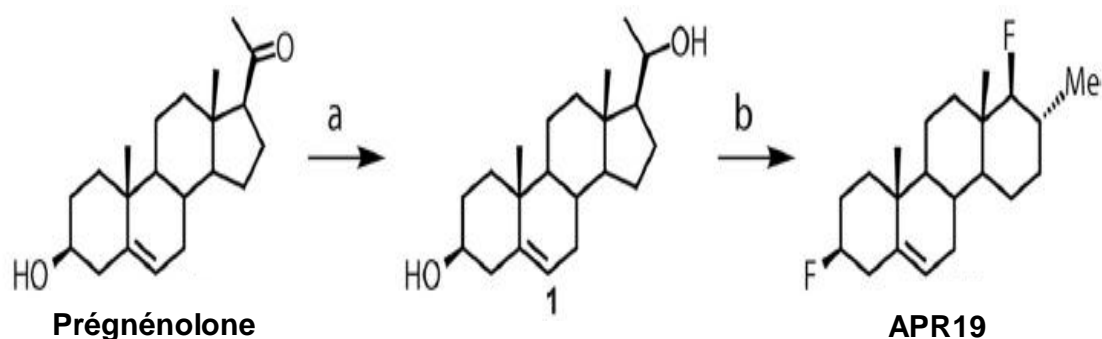
favorisant ainsi la tumorigénèse mammaire (Bagheri-Yarmand et al., 2004; Poole et al., 2006).

#### **4.2 L'Ulipristal acétate (UPA, CDB – 2914)**

L'UPA est un dérivé de la 19-norprogestérone, qui conserve ainsi les fonctions cétone et le radical méthyl respectivement en position C3 et C11 de la progestérone (Figure 9). Les fonctions substituées en position C17 augmentent sa demi-vie et son activité biologique. UPA est métabolisé par la CYP3A4 de la famille des cytochromes P450, ce métabolisme aboutit à un composé mono-déméthylé majoritaire et pharmacologiquement actif (CDB-3877), et à une forme minoritaire di-déméthylée sans action clinique notable (CDB-3963) ; à noter qu'il existe d'autres métabolites à l'exemple de son dérivé aromatique, mais qui sont faiblement représentés par rapport au CDB-3877 (Gainer and Ulmann, 2003). L'UPA présente une affinité élevée pour PR et GR. Il a une activité antagoniste puissante de PR superposable à celle du RU486 dans tous les modèles testés *in vivo* et *in vitro*. Cependant, l'UPA ne présente pas d'effet agoniste. Toutefois, dans la lignée tumorale mammaire MDA-MB-231 transfectée par les isoformes PRA et PRB, l'UPA induit la transcription de certains gènes cibles de PR (Leo and Lin, 2008). Les effets de l'UPA au niveau du tissu mammaire ont été peu évalués. Dans un modèle de cellules mammaires normales, il n'a pas été noté un rôle de l'UPA dans la prolifération cellulaire (Communal et al., 2012). Les données de toxicologie animale n'ont pas mis en évidence de tumorigénèse mammaire.

#### **4.3 Les antagonistes passifs de PR : les APRns**

La plupart des SPRMs développés jusqu'à présent interagissent non seulement avec PR mais aussi avec d'autres récepteurs stéroïdiens. Par exemple, le RU486 se lie au récepteur des glucocorticoïdes (GR) avec une affinité trois à quatre fois plus élevée que la dexaméthasone (une hormone glucocorticoïde de synthèse utilisée dans le traitement du syndrome de Cushing).



**Figure 10: Synthèse de l'APR19 à partir du prégnénolone (Khan et al., 2013).**

Le Tanaproget est le premier ligand agoniste de PR non stéroïdien. Il est très sélectif de PR et possède une efficacité et une affinité élevées. Actuellement de nouvelles classes des ligands antagonistes non stéroïdiens sélectifs de PR sont en cours de développement. Ces ligands sont à base des noyaux de pyrazole, thiophène, indole (Allan and Sui, 2005; Winneker et al., 2008). La conception de ces composés se fonde sur l'étude des relations structure-activité contrôlant les fonctions agonistes et antagonistes des récepteurs. Ces antagonistes non stéroïdiens ont une bonne sélectivité pour PR. Ils sont qualifiés d'antagonistes passifs. Ils déplacent P4 de son récepteur, et empêchent la fixation des corégulateurs transcriptionnels tout en induisant une structure instable du récepteur. Ces antagonistes regroupent des molécules dépourvues du groupement encombrant en C11 qui caractérise les antagonistes classiques. Parmi eux, le WAY-255348 (Fensome et al., 2008; Yudt et al., 2011). Ce dernier inhibe la

localisation nucléaire de PR, la phosphorylation et les interactions de PR avec l'ADN sur la région promotrice des gènes cible, avec les facteurs de transcription et les coactivateurs tout en agissant comme un antagoniste à de faibles concentrations (<300 nM), en revanche il agit comme un agoniste partiel à des concentrations plus élevées (> 300 nM). Notre équipe, en collaboration étroite avec ME Rafestin-Oblin (INSERM U773, Bichat), M Alami et JD Brion, (CNRS, BioCIS, Faculté de Pharmacie, Châtenay Malabry), a produit une nouvelle classe d'antagonistes dit « passifs » de la progestérone (Khan et al., 2013) : Les APRns (Anti-progesterone receptor). Ils constituent une nouvelle classe d'antagonistes de PR. Sur la base des études comparatives de cristallographie des LBD de PR et MR, il a été possible de concevoir une nouvelle stratégie pour synthétiser des antagonistes ayant des propriétés tout à fait différentes de celles des SPRMs connus. Plusieurs molécules chefs de file ont été caractérisées parmi une soixantaine de molécules synthétisées. Elles inhibent la transcription régulée par la progestérone, bloquent toute interaction de PR avec les corégulateurs transcriptionnels, diminuent la liaison à l'ADN, et ont des propriétés antagonistes de la progestérone *in vivo* sur l'utérus de la souris (Khan et al., 2013). Parmi elles, l'APR19, est un homostéroïde caractérisé par un cycle D à 6 carbones et 2 atomes de fluor en position C3 et C17 (Figure 10). D'après la modélisation de la liaison réalisée par docking, si l'APR19 occupe bien le même espace que la progestérone au sein du LBD de PR, les modifications introduites dans la molécule font disparaître les liaisons d'hydrogène que la progestérone établit normalement et qui sont responsables de ses effets agonistes.

De tels antagonistes spécifiques et sélectifs de PR apporteraient de nouvelles perspectives thérapeutiques, en particulier dans les cancers du sein hormono-

dépendants. Actuellement, plusieurs sociétés pharmaceutiques et laboratoires de recherche se concentrent sur le développement d'antagonistes ayant des propriétés anti-tumorales (Wiehle et al., 2011).







# **Objectifs**

## Objectifs

Depuis plus de 20 ans, le rôle crucial de la progestérone, des progestatifs et de leur récepteur PR dans le développement des cancers mammaires hormono-dépendants et de l'évolution des métastases a été mis en évidence, ce qui suggère l'efficacité potentielle des antagonistes pour inhiber sélectivement les voies de signalisation affectées dans les cancers du sein.

Les modulateurs sélectifs de PR (SPRMs) sont des composés stéroïdiens ayant des activités mixtes agoniste/antagoniste dépendants du type cellulaire, de leur dose et du contexte hormonal. L'Ulipristal acétate (UPA) fait parti des antagonistes actuels de PR. L'UPA est un SPRM commercialisé depuis peu de temps en contraception d'urgence et en traitement des fibromes utérins à moyen et long terme. Les perspectives d'utilisation dans cette dernière indication amènent à se questionner sur l'impact mammaire. L'utilisation au long cours de la mifépristone est quant à elle limitée en raison d'effets secondaires liés à son activité antiglucocorticoïde importante.

Pour s'affranchir au problème de sélectivité et d'activité mixte de ces antagonistes ; une nouvelle classe d'antagonistes stéroïdiens « les APRns » a été récemment conçue au sein de l'unité. Les APRns se diffèrent des autres antagonistes notamment par leur sélectivité pour PR, et leur activité antagoniste pure et passive.

L'objectif principal de ma thèse est d'évaluer les effets de ces deux antagonistes (UPA et les APRns) dans deux modèles d'études complémentaires de cancer mammaire humain.

Nous avons utilisé comme premier modèle *in vitro*, le modèle de lignées cellulaires cancéreuses mammaires humaines MDA-iPRAB. Cette lignée, d'origine mammaire humaine basale MDA-MB 231 (PR<sup>-</sup>/ER<sup>-</sup>), a été modifiée pour exprimer, d'une façon bi-inductible et conditionnelle, l'expression des isoformes de PR, PRA et/ou PRB. Ce modèle nous a permis notamment de screener par une approche transcriptomique les cibles transcriptionnelles spécifiques de ces deux

isoformes. Nos objectifs étaient de déterminer quels sont les effets de l'antagoniste UPA sur les facteurs de la prolifération cellulaire et d'apoptose et son mécanisme d'action dans l'inhibition de la signalisation progestative au niveau transcriptionnel et protéique. Pour ce faire, dans un premier temps, nous avons voulu déceler les effets des isoformes de PR et leurs ligands (P4, UPA) sur la prolifération de cette lignée basale œstrogéno-indépendante. Dans un second temps, nous avons analysé l'impact de P4 et de l'UPA sur la régulation de l'expression de certains gènes cibles sélectionnés du transcriptome et jouant un rôle important dans l'angiogenèse, l'apoptose, la prolifération et l'invasivité cellulaire : *TGFβ2*, *WNT*, *RANK*, *BCL2-L1*....

Le deuxième modèle d'étude préclinique utilisé est le modèle *in vivo* de xéno greffe de la tumeur humaine mammaire œstrogéno-dépendante dérivée d'une patiente (HBCx-34) dans des souris immunodéficientes. Sous un apport quotidien œstrogénique, ces souris ont été traitées par les deux antagonistes UPA et APRn. Nos objectifs dans ce modèle étaient de savoir quelles sont les actions de l'UPA et des APRns sur la croissance tumorale (variation du volume et poids tumoraux) d'une part, et d'autre par leurs effets sur la régulation des marqueurs de la tumorigénèse mammaire l'apoptose (caspase, *BCL2-L1*), la prolifération cellulaire (*Ki67*, *Cycline D1*), l'angiogenèse (*VEGF*...).

Les résultats obtenus nous permettront de mieux comprendre l'impact des isoformes de PR et leurs ligands agonistes et antagonistes sur la tumorigénèse mammaire *in vitro* et *in vivo*. Ils nous aideront à identifier de nouvelles pistes thérapeutiques dans le cadre de la prise en charge de cancer du sein hormono-dépendant.



# Résultats







**Chapitre 1 : l'Ulipristal acétate inhibe la prolifération cellulaire et l'expression de BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> dans la lignée cancéreuse mammaire humaine via l'isoforme PRA de récepteur de la progestérone.**



## Introduction

Depuis plusieurs années et des études *in vitro*, *in vivo* et cliniques s'intéressaient aux actions de la progestérone (P4), des progestatifs et de leur récepteur (PR) dans le cancer du sein (Briskin, 2013; Diep et al., 2015; Hagan and Lange, 2014; Knutson and Lange, 2014). Cependant leur rôle sur la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses mammaires dans les modèles d'études *in vitro* reste contradictoire. Quelques études ont montré que les progestatifs inhibent la prolifération (Horwitz and Freidenberg, 1985; Poulin et al., 1989), d'autres n'ont pas d'effets (Vignon et al., 1983), ou ils la stimulent pour un seul cycle cellulaire puis ils l'inhibent après (Groshong et al., 1997a; Musgrove et al., 1991a).

Les modèles d'étude *in vitro* sur les effets de P4 dans la tumorigénèse mammaire ont débuté par les cultures primaires de tumeurs mammaires de rats et de souris (Giulianelli et al., 2013). La P4 participe à l'alvéologénèse des glandes mammaires isolées des rats adultes en culture organotypique (Koyama et al., 1972), à la prolifération des organoïdes des glandes mammaires mises en culture sur une matrice en collagène (Edery et al., 1984) et à l'augmentation de la taille des colonies de tumeurs mammaires de rats induites par des agents alkylants, comme le MNU (MNU: N-Methyl-N-nitrosourea; carcinogène, mutagène et tératogène) (Edery et al., 1984). Dans des modèles murins, la P4 peut agir en synergie avec EGF (Epidermal growth factor) ou avec la prolactine pour stimuler la prolifération cellulaire mammaire (Imagawa et al., 1985; Richards et al., 1986). La P4 et le MPA stimulent la prolifération cellulaire des carcinomes mammaires murins en culture primaire (Dran et al., 1995). La croissance de l'adénocarcinome mammaire PR<sup>+</sup>/ER<sup>+</sup> dans des souris BALB/C nécessite des doses continues des progestatifs.

Les lignées cellulaires cancéreuses mammaires T47D et MCF-7 (PR<sup>+</sup>/ER<sup>+</sup>) ont été les plus utilisées pour analyser les effets de P4, les progestatifs, leur récepteur et leurs antagonistes sur la prolifération cellulaire, les voies de signalisation et l'expression génique *in vitro* (Table 2). Le premier rapport en 1987 (Hissom and Moore, 1987; Moore et al., 2006) a démontré que les progestatifs (R5020) stimulent la prolifération cellulaire de la lignée T47D et le RU486 l'inhibe (Hissom et al., 1989). Cette étude a été confirmée par la suite (Moore et al., 2000; Moore et al., 1991; Moore et al., 1997). P4 induit la croissance des colonies de la lignée MCF-7. Le MPA peut stimuler ou inhiber la croissance cellulaire dans deux clones de MCF-7. Les progestatifs stimulent les cultures primaires des cellules épithéliales mammaires malignes (Braunsberg et al., 1987; Longman and Buehring, 1987; Manni et al., 1991). Outre les lignées T47D et MCF-7, les progestatifs stimulent aussi la prolifération d'autres lignées cellulaires comme les IBH-6, IBH-7 et IBH-4 (Vazquez et al., 2004).

La lignée cellulaire cancéreuse mammaire T47D a une réponse biphasique à la progestérone et les progestatifs de synthèse (R5020...). Une pulse unique de P4 stimule un seul cycle de la division cellulaire. Cette phase proliférative induit l'expression des gènes du cycle cellulaire: *CCND1*, *D3*, *E*, *A* et *B*, la phosphorylation de la RB (retinoblastoma), l'activation des cyclin-CDKs et l'expression des gènes *FOS* et *MYC* et des inhibiteurs-CDKs p21 et p27. Cette croissance s'arrête à la fin de la phase G1 du second cycle 24-48 h après le traitement par P4 (Groshong et al., 1997b; Lange, 2008a, b; Musgrove et al., 1991b; Musgrove et al., 1998), Ceci s'accompagne d'une diminution de toutes ces expressions géniques sauf l'expression de *P21* et *P27*. P4 accélère la progression des cellules T47D-YB, qui expriment uniquement l'isoforme PRB, durant le premier cycle mitotique, et induit ultérieurement leur arrêt à la fin de la

phase G1 du deuxième cycle cellulaire. Des doses transitoires de P4 ont un effet stimulateur, en revanche les doses continues de P4 inhibent la croissance. La progestérone inhibe la progression des cellules dans le cycle cellulaire en phase G1 (Chen et al., 2011a; Gizard et al., 2005; Gizard et al., 2006; Owen et al., 1998; Swarbrick et al., 2000). Cet effet biphasique a été décrit par d'autres études (Boonyaratanakornkit et al., 2007; Quiles et al., 2009).

Les progestatifs à de faibles concentrations (10 pM) activent les voies de signalisation non génomiques de PR (Bardou et al., 2003; Bottino et al., 2011; Skildum et al., 2005). A des concentrations proches de kd de PR, les effets prolifératifs de P4 sont plus forts et relayés par la voie génomique classique de P4 en se liant à PRE (Bottino et al., 2011). Ces effets sont inhibés par les antiprogestatifs ou asPR (Antisense oligonucleotides targeting PR) (Lamb et al., 1999; Lamb et al., 2005), ce qui indique que PR a un rôle crucial dans la prolifération cellulaire *in vitro*. Le MPA stimule la prolifération cellulaire d'un carcinome mammaire sur-exprimant PRA en culture 3D (Polo et al., 2010). Les carcinomes lobulaires qui n'expriment ni ER $\alpha$  ni PR ne répondent pas aux progestatifs.

PR inhibe la prolifération cellulaire en induisant l'expression de DUSP1 (MAPK phosphatase; MKP-1/DUSP1), qui déphosphoryle et inactive la voie MAPK (Chen et al., 2011a). Le traitement des T47D par P4 induit l'expression de MKP-1 dépendamment de PR, ceci s'accompagne d'une diminution de ERK1/2 phosphorylée. La stimulation de la prolifération par les progestatifs (MPA) est associée à une interaction nucléaire entre PR et ER $\alpha$  sur les promoteurs des gènes *CCND1* et le proto-oncogène *MYC* (Giulianelli et al., 2012a). La prolifération peut être relayée également

par les voies de signalisation non génomique de PR activées par P4 (Src/p21Ras/Erk, PI3K/Akt et JAK/STAT).

Les progestatifs non seulement stimulent la prolifération cellulaire mais ils inhibent aussi la mort cellulaire (apoptose) en induisant l'expression protéique du facteur anti-apoptotique BCL-xL (Moore et al., 2000) peut être via MPA dans les cellules T47D, MCF-7 et H466-B (Ory et al., 2001). Outre leur rôle dans la prolifération cellulaire et l'apoptose, les progestatifs augmentent la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires aux mitogènes (IGF-2, WNT-1, PDGFA, FGF4), induisent l'expression des récepteurs des facteurs de croissance (IGFR, EGFR, FGFR2, ERBB2). Les progestatifs induisent aussi la synthèse de VEGF (vascular endothelial growth factor), impliquant leur rôle dans l'angiogénèse tumorale (Hyder et al., 1998). Cet effet est bloqué par le RU486 dans les cellules mutées pour *P53* (T47D, BT474) et non pas dans les MCF-7 où *P53* n'est pas muté (Liang and Hyder, 2005; Liang et al., 2005). Le RU486 a un effet cytotoxique, cytostatique, et apoptotique. Il inhibe la prolifération des cellules E2-dépendantes (T47D, MCF-7) (Frech et al., 2005; Klijn et al., 2000). L'association du RU486 et du tamoxifène inhibe la croissance des T47D. RU486 induit l'expression de TGFβ1 dans les MCF-7, inhibe l'expression de BCL2, augmente la fragmentation de l'ADN et induit la translocation de PKC. Le RU486 inhibe la prolifération cellulaire induite par P4 dans les MCF-7 à des concentrations en nanomolaire (Lavasani and Moinfar, 2012).

La plupart des études sur les progestatifs et les antiprogestatifs étaient observées dans les lignées cancéreuses mammaires PR<sup>+</sup> et E2-dépendantes ; or nos travaux se sont basés sur une nouvelle lignée bi-inductible la lignée MDA-iPRAB indépendante de E2, où les isoformes de PR (PRA et PRB) sont induites d'une façon bi-conditionnelle

(Khan et al., 2012). Ces deux isoformes ont une expression équimolaire dans le tissu mammaire sain et les lésions bénignes. Or, la carcinogénèse mammaire altère leur expression et la voie de signalisation P4/PR (Graham et al., 2009). Des manipulations expérimentales du rapport PRA/PRB altèrent la réponse à P4 dans les cellules cancéreuses mammaires (Graham et al., 2005; Jacobsen et al., 2002; McGowan and Clarke, 1999; McGowan et al., 2004). L'isoforme PRA, plus stable que l'isoforme PRB, est fréquemment exprimée dans le cancer du sein dû à une diminution de l'expression de PRB (augmentation de son activité transcriptionnelle). Toute altération de ce rapport, en faveur d'une expression élevée de PRA, est associée à un mauvais pronostic chez les patientes sous hormonothérapie (tamoxifen) (Bamberger et al., 2000; Faivre and Lange, 2007; Graham et al., 2005; Graham et al., 1995b; Hopp et al., 2004; Mote et al., 2002; Mote et al., 2007), et une réponse aux antiprogestatifs (Wargon et al., 2009). La Perte de l'expression de PR est associée à la méthylation du promoteur (Lapidus et al., 1996; Pathiraja et al., 2011; Pathiraja et al., 2010). Seul la méthylation de PRA joue un rôle dans le cancer de sein résistant au tamoxifen. Des mécanismes autre que la méthylation de PR sont responsables de sa perte d'expression (Briskin, 2013; Lanari et al., 2012) .

Nous avons réussi à démontrer dans la lignée MDA-iPRAB que P4 stimule la prolifération cellulaire quand PRA est induite. Il a été démontré que RU486 inhibe la prolifération de cette lignée. Nous avons voulu étudier l'effet de l'UPA sur la prolifération et la régulation de l'expression du facteur anti-apoptotique BCL<sub>2</sub>L<sub>1</sub>. Nous nous sommes aussi intéressés aussi au mécanisme moléculaire de cette régulation via le mécanisme génomique classique de PR dans la lignée MDA-iPRA.



<b>Nom de la lignée cellulaire</b>	<b>Sous-types</b>	<b>Récepteurs</b>
<b>T47D</b>	<b>Luminal A</b>	<b>ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>, HER2<sup>-</sup></b>
<b>MCF7</b>	<b>Luminal A</b>	<b>ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>, HER2<sup>-</sup></b>
<b>MDA-MB-231</b>	<b>Basal (claudin low)</b>	<b>ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>, EGF<sup>+</sup> TGF<math>\alpha</math><sup>+</sup></b>

**Table 2: Types des lignées cellulaires mammaires humaines et leurs caractéristiques moléculaires**

## **Matériels et Méthodes**

### **Culture cellulaire et traitement**

La lignée cellulaire bi-inductible MDA-iPRAB, dérive de la lignée cellulaire cancéreuse basale mammaire humaine MDA-MB-231 (PR<sup>-</sup>, ERα<sup>-</sup>) (American Type Culture Collection, Manassas, VA) comme précédemment a été décrit (Khan et al., 2012). Brièvement, l'expression de PRA et/ou PRB est induite par l'ajout des inducteurs non-stéroïdiens RSL1 (0.5 μM) (Exclusive Chemistry Ltd, Obninsk, Russia) et /ou Dox (2 μM) (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) respectivement. Les cellules sont mises en culture dans un milieu de culture DMEM High Glucose avec L-glutamine (Life Technologies, Saint-Aubin, France), supplémenté par 10% sérum de sérum de veau fœtal (Biowest, Nuaille, France) et 100 UI/mL pénicilline, et 100 μg/mL streptomycine (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France). 24 heures avant le traitement hormonal, les cellules sont préincubées dans un milieu DMEM sans rouge de phénol (déstéroïdé) contenant 2.5 % de sérum déstéroïdé traité au dextran-coated charcoal (DCC) (avec DMSO ou inducteurs). Progestérone (P4) et la mifépristone (RU486) sont de chez Sigma-Aldrich, et Ulipristal acetate (UPA) de chez HRA Pharma (Paris, France).

### **Test de la prolifération cellulaire**

Les cellules parentales "clone 250" et les cellules MDA-iPRAB (iPRAB clone 38) (4,000 cellules)/par puit) ont été mises en culture dans des plaques de 96 puits pour 24 h toujours dans un milieu déstéroïdé. A J0 (jour 0), 2, 4, le milieu a été remplacé par un milieu DMEM (sans rouge de phénol) frais contenant les inducteurs RSL1 (0.5 μM) et/ou

Dox (2  $\mu$ M) pour induire respectivement l'expression de PRA et/ou PRB. En même temps les cellules ont été traitées par vehicle, P4 (1 nM) et/ou RU486 ou UPA (1  $\mu$ M) pour 24 h. Le test de prolifération a été réalisé le jour 1, 3, 5 par l'ajout de 20  $\mu$ L de la solution Cell Titer96 AqueousOne (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France) dans chaque puit contenant 100  $\mu$ L de milieu de culture sans rouge de phénol (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Les plaques ont été incubées à 37°C pour 1 h, et l'absorbance a été mesurée par un photomètre à 490 nm (A490) (Victor 378, Perkin Elmer, Courtabœuf, France).

### **La PCR en temps réel (quantitative)- qPCR**

L'ARN a été extrait des cellules par le réactif TRI (TRI Reagent; Applied Biosystem) selon les recommandations du fabricant. Un  $\mu$ g de l'ARN total a été servi pour la retro-transcription-qPCR (transcription inverse- qPCR ; RT- reverse-transcribed-qPCR). Brièvement, l'ARN a été traité par la DNase I (Biolabs, Evry, France), puis retro-transcrit par le kit de la transcription inverse High-Capacity cDNA (Life Technologies). L'ADNc résultant a été analysé ensuite par RT-qPCR par le système StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies) en utilisant les amorces correspondants (300 nM, concentration finale) dans le master mix Power SYBR Green PCR (Life Technologies). L'expression relative des gènes en attomoles est calculée en attomoles par le rapport du gène correspondant normalisé par l'expression en femtomoles de 18s (ribosomal rRNA) ou l'expression en attomoles de GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate-dehydrogénase).

### **Western Blot**

Les cellules ont été lysées, pour 30 min en rotation à 4°C, par un tampon de lyse (150 mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 30 mM Na pyrophosphate, 50 mM

Na fluoride, 1 % Triton X-100) et des cocktails des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Sigma), suivi par une centrifugation de 12,000 x g pour 15 min à 4° C. La migration des échantillons a eu lieu par électrophorèse sur un gel de 7,5 % de dodécylsulfate de sodium (SDS) suivi par un transfert sur des membranes de nitrocellulose. Les anticorps primaires utilisés sont anti-PR (NCL-L-PGR-312/2, Novocastra Laboratories, île Saint Martin, Nanterre, France), dilution 1:10,000; anti-Bcl-XL (E18, ab32370, Abcam, France), dilution 1:1,000. Les anticorps de contrôle sont : anti- $\alpha$ -tubulin antibody (Sigma) et anti-GAPDH (Sigma). Les anticorps secondaires sont : Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross Adsorbed Secondary Antibody (DyLight 800 conjugated, 680 conjugated) et Goat anti-Rabbit IgG (H+L) DyLight 800 conjugated, dilution 1:10,000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Les membranes ont été incubées pour 1 h à température ambiante ou pendant la nuit à 4°C, dans le tampon phosphate salin (PBS; Phosphate Buffered Saline) contenant 5% de lait écrémé, 0.1% Tween 20 et les anticorps primaires, suivi par une incubation de 1 h par les anticorps secondaires correspondants. Les protéines ont été détectées par fluorescence par Odyssey® Fc, Dual-Mode Western Imaging (Li-Cor, Lincoln, NE, USA) et quantifiées par la suite.

### **Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)**

Les cellules MDA-iPRA ont été mises en culture pour 36-48 h dans un milieu DMEM sans rouge de phénol/DCC suivi par 1 h de traitement par P4 (10 nM) et/ou UPA (1  $\mu$ M). Les tests de ChIP ont été réalisés comme décrit précédemment (Le Billan et al., 2015) (#HighCellChIP kit, Diagenode, Seraing, Belgium) avec 5  $\mu$ g de l'anticorps approprié: Human anti-PR (Anti-PR, sc-7208, Santa Cruz Biotechnology, CA); l'anticorps rabbit anti-SRC1 (M-341, sc-8995, Santa Cruz Biotechnology), l'anticorps

rabbit anti-Polymerase II (H-224, sc-9001, Santa Cruz Biotechnology) et l'anticorps de contrôle du kit #HighCellChIP (Diagenode).

### **Les tests statistiques**

Toutes les données sont exprimées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM. Les analyses ont été réalisées par le logiciel Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA). Les différences significatives du test non paramétrique Mann Whitney sont indiquées par \* ou x (1-3 symboles correspondant au  $P < 0.05$  ou  $< 0.01$  ou  $< 0.001$ , respectivement).

**Article 1: Ulipristal Acetate inhibits Progesterone  
Receptor Isoform A-mediated Human Breast Cancer  
Proliferation and BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> Expression  
PLoSOne, 2015**



RESEARCH ARTICLE

# Ulipristal Acetate Inhibits Progesterone Receptor Isoform A-Mediated Human Breast Cancer Proliferation and BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> Expression

Nathalie Esber<sup>1,2,3</sup>, Florian Le Billan<sup>1,2</sup>, Michèle Resche-Rigon<sup>3</sup>, Hugues Loosfelt<sup>1,2</sup>, Marc Lombès<sup>1,2,4</sup>, Nathalie Chabbert-Buffet<sup>5,6\*</sup>

**1** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche-Scientifique 1185, Faculté de Médecine Paris Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France, **2** Université Paris-Sud, Faculté de Médecine Paris Sud, Unité Mixte de Recherche-Scientifique 1185, Le Kremlin-Bicêtre, France, **3** HRA-Pharma, Paris, France, **4** Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France, **5** Service de Gynécologie Obstétrique Médecine de la Reproduction, Hôpitaux Universitaires Est Parisien site Tenon, AP-HP, Paris, France, **6** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche-Scientifique 938, Centre de Recherche Saint Antoine, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

\* [nathalie.chabbert-buffet@tnn.aphp.fr](mailto:nathalie.chabbert-buffet@tnn.aphp.fr)



OPEN ACCESS

**Citation:** Esber N, Le Billan F, Resche-Rigon M, Loosfelt H, Lombès M, Chabbert-Buffet N (2015) Ulipristal Acetate Inhibits Progesterone Receptor Isoform A-Mediated Human Breast Cancer Proliferation and BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> Expression. PLoS ONE 10 (10): e0140795. doi:10.1371/journal.pone.0140795

**Editor:** Wei Xu, University of Wisconsin—Madison, UNITED STATES

**Received:** August 20, 2015

**Accepted:** September 30, 2015

**Published:** October 16, 2015

**Copyright:** © 2015 Esber et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The funder HRA Pharma provided support in the form of salary for one author [MRR], joint grant together with the national agency for Research (ANRT/HRA pharma CIFRE i.e. Conventions Industrielles de Formation par la Recherche, in English Research Training Industrial Grant Contract) [NE] but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, or preparation of the manuscript. Data from the paper have been discussed twice a year with MRR, as required in the

## Abstract

The progesterone receptor (PR) with its isoforms and ligands are involved in breast tumorigenesis and prognosis. We aimed at analyzing the respective contribution of PR isoforms, PRA and PRB, in breast cancer cell proliferation in a new estrogen-independent cell based-model, allowing independent PR isoforms analysis. We used the bi-inducible human breast cancer cell system MDA-iPRAB. We studied the effects and molecular mechanisms of action of progesterone (P4) and ulipristal acetate (UPA), a new selective progesterone receptor modulator, alone or in combination. P4 significantly stimulated MDA-iPRA expressing cells proliferation. This was associated with P4-stimulated expression of the anti-apoptotic factor BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> and enhanced recruitment of PRA, SRC-1 and RNA Pol II onto the +58 kb PR binding motif of the *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* gene. UPA decreased cell proliferation and repressed BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> expression in the presence of PRA, correlating with PRA and SRC1 but not RNA Pol II recruitment. These results bring new information on the mechanism of action of PR ligands in controlling breast cancer cell proliferation through PRA in an estrogen independent model. Evaluation of PR isoforms ratio, as well as molecular signature studies based on PRA target genes could be proposed to facilitate personalized breast cancer therapy. In this context, UPA could be of interest in endocrine therapy. Further confirmation in the clinical setting is required.

## Introduction

Breast cancer, the most frequent cancer in women, is a hormone-dependent disease, with over 70% of sporadic breast tumors expressing estrogen and/or progesterone receptors (PR) [1]. Systemic anti-hormonal treatments used in clinical practice target the estrogen signaling



joint ANRT /HRAPharma CIFRE. The final MS has been approved by all coauthors before submission. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section

**Competing Interests:** MRR is an employee of HRA Pharma. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

**Abbreviations:** P4, progesterone; PR, progesterone receptor; UPA, ulipristal acetate.

pathway [2]. However, in the last decades, significant progress has been made in the understanding of the role of PR and its ligands in breast carcinogenesis [3–5].

Progesterone and progestins actions are mediated through their specific nuclear PR, with its two main isoforms PRA and PRB, in a tissue-specific, isoform-selective and ligand-dependent manner [3, 6]. Transcriptional activities of PRA and PRB isoforms are not similar, and both PR isoforms differentially regulate expression of a subset of target genes [7]. PRB functions as a strong transactivator and its transcriptional activity is down-regulated by the trans-dominant repressor PRA [8–9]. Progesterin-induced cell spreading in ER-positive T47D cells expressing PR-A and PR-B isoforms was observed in cells overexpressing PRA by affecting cytoskeleton pathways and cell morphology [10]. Data obtained in MDA-MB 231 cells devoid of ER expression showed that PRA-transfected cells exhibited distinct morphological changes under antiprogestin ligands exposure as compared to PRB-transfected cells [11]. In this model co-transfection of ER $\alpha$  did not modify PRA vs PRB isoforms differences, suggesting an ER $\alpha$ -independent mechanism.

PR isoforms have an equimolar and coordinated expression in mammary epithelial cells under normal physiological conditions [12–13]. Dysregulation of the PRA/PRB ratio with high PRA expression levels in tumors leads to an impaired PR and ER signaling [12, 14]. Unbalanced PRA/B ratio has also been associated with tumor aggressiveness and poorer disease-free survival, and is observed in pre-neoplastic lesions from patients with breast cancer [3, 7, 12]. PRA is overexpressed as compared to PRB in 40% of ductal *in situ* carcinoma and invasive breast lesions [12]. Mutations in *BRCA1/2* genes are associated with PRA overexpression in tumor tissue [15–16] as well as in peritumoral normal breast tissue. Finally, recent data demonstrated in a large cohort that PRA overexpression is related to a shorter disease free survival in tamoxifen treated breast cancer patients [17]. These data suggest a direct role of PR in breast carcinogenesis with a differential contribution of PR isoforms.

New insights into the role of PR ligands in breast carcinogenesis have been highlighted in the past 20 years. Two large clinical studies have shown an increased risk of breast cancer in postmenopausal women treated with synthetic progestins combined to estrogens [18–19] as compared to women receiving estrogen-only treatment, suggesting a tumorigenic role of synthetic progestins.

Furthermore, clinical trials conducted in patients with metastatic, antiestrogen-resistant breast cancer, showed some efficacy of the antiprogestin mifepristone. In a preliminary study, administration of mifepristone decreased normal breast cell proliferation in women [20]. Finally, in a *BRCA1/P53* conditional breast knock-out mouse model, mifepristone was shown to prevent mammary tumorigenesis [15]. These data suggested that PR antagonists may contribute to control breast cancer development.

Ulipristal acetate is a recently released selective progesterone receptor modulator routinely used for emergency contraception [21] and mid to long term leiomyoma treatment [22–23]. This compound exerts mixed agonist/antagonist activities depending on the cellular context and has been shown to induce apoptosis in cultured leiomyoma cells [24] and in leiomyoma *in vivo* [25].

In a model of normal human breast cell culture, the selective progesterone receptor modulator (SPRM), ulipristal acetate (UPA), did not induce cell proliferation [26].

We used the newly established bi-inducible, basal breast cancer cell model, MDA-iPRAB, where ER expression is absent and PR is expressed independently of estrogens action [6, 27] to further evaluate the role of PR isoforms in breast carcinogenesis as well as the effects and mechanism of action of ulipristal acetate in breast cancer cells. We evaluated the effects of progesterone and UPA on cell proliferation, and the regulation of the anti-apoptotic marker BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>, as well as the molecular mechanisms involved. Overall, our findings propose that UPA induces a

PRA mediated anti-proliferative effect and could be of interest in the management of human breast cancer patients.

## Materials and Methods

### Cell cultures and treatments

Bi-inducible MDA-iPRAB cell line was derived from human basal breast cancer MDA-MB-231 cell line (PR<sup>-</sup>, ER $\alpha$ <sup>-</sup>) (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) as previously described [6]. Briefly, PRA and/or PRB expression could be induced at will by RSL1 (0.5  $\mu$ M) (Exclusive Chemistry Ltd, Obninsk, Russia) and/or Dox (2  $\mu$ M) (SigmaAldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), respectively. Cells were grown in DMEM High Glucose with L-glutamine medium (Life Technologies, Saint-Aubin, France), 100 UI/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France) supplemented with 10% fetal calf serum (Biowest, Nuaille, France). For each experiment, cells were preincubated in steroid-free medium containing 2.5% dextran-coated charcoal treated serum (with DMSO or inducers) for at least 24 h before hormonal treatment. Ulipristal acetate (UPA) was from HRA Pharma (Paris, France). Progesterone and mifepristone (RU486) were from Sigma-Aldrich.

### Proliferation assays

Parental cells “clone 250” and MDA-iPRAB cells (iPRAB clone 38) (4,000 cells/ per well) were cultured in 96-well plates in steroid-free medium for 24 h. On day 0, 2, 4, RSL1 (0.5  $\mu$ M) and/or Dox (2  $\mu$ M) were added to fresh steroid-free medium to induce PRA and/or PRB expression, respectively. Cells were treated at the same time by Vehicle, P4 (1 nM) and/or UPA (1  $\mu$ M) for 24 h. Cell proliferation assays were performed at day 1, 3, 5 by adding 20  $\mu$ L of Cell Titer96 AqueousOne solution (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France) into each well containing 100  $\mu$ L of phenol red free culture medium (Life Technologies, Saint-Aubin, France). The plates were incubated at 37°C for 1 h and absorbance values were measured at 490 nm (A490) using a photometer (Victor 378, Perkin Elmer, Courtabœuf, France).

### Quantitative Real Time PCR

Total RNA was extracted from cells with TRI Reagent (Applied Biosystem) according to the manufacturer's recommendations. One  $\mu$ g of total RNA was processed for reverse-transcribed-qPCR. Briefly, total RNA was treated with DNase I (Biolabs, Evry, France), then reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). cDNA were analyzed by quantitative RT-PCR using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) with the indicated primers (300 nM, final concentration) (S1 Table) and a StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies). Relative gene expression was calculated as a ratio of attomoles normalized by ribosomal rRNA 18S expression in femtomoles or by glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) in attomoles.

### Immunoblotting

Cells were lysed in lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 30 mM Na pyrophosphate, 50 mM Na fluoride, 1% Triton X-100, protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma) for 30 min on rotation at 4°C, followed by a centrifugation at 12,000 x g for 15 min at 4°C to clear debris. Samples were resolved by 7.5% sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes. Antibodies used were anti-PR (NCL-L-PGR-312/2, Novocastra Laboratories, île Saint Martin, Nanterre, France), dilution 1:10,000; anti-Bcl-XL antibody (E18, ab32370, Abcam, France), dilution 1:1,000.

Control antibodies: anti- $\alpha$ -tubulin antibody (Sigma) and anti-GAPDH (Sigma). Secondary antibodies: Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross Adsorbed Secondary Antibody (DyLight 800 conjugated, 680 conjugated) and Goat anti-Rabbit IgG (H+L) DyLight 800 conjugated, dilution 1:10,000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). These antibodies were diluted in Phosphate Buffered Saline and 0.1% Tween 20 buffer supplemented with 5% nonfat milk and added to the membranes for 1 h at room temperature or overnight at 4°C followed by incubation with the indicated secondary antibody for 1 h at room temperature. Target proteins were detected using Odyssey® Fc, Dual-Mode Western Imaging (Li-Cor, Lincoln, NE, USA) by Fluorescence and quantified.

## Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

MDA-iPRA cells were cultured for 36–48 h in DMEM/charcoal-stripped fetal bovine serum followed by 1 h treatment with P4 (10 nM) and/or UPA (1  $\mu$ M). ChIP assays were performed as previously described [28] (#HighCellChIP kit, Diagenode, Seraing, Belgium) with 5  $\mu$ g of the appropriate ChIP grade antibodies: Human anti-PR (Anti-PR, sc-7208, Santa Cruz Biotechnology, CA); Rabbit anti-SRC1 antibody (M-341, sc-8995, Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-Polymerase II antibody (H-224, sc-9001, Santa Cruz Biotechnology) and control unrelated antibody from the #HighCellChIP kit (Diagenode).

## Primer design for genomic amplification assays

Design of primer pairs containing PRbs (Progesterone receptor binding sites) was achieved with the NCBI software Primer BLAST. Human genome was used as database (hg19). Amplicon length was kept between 80 and 150 bp. Primers were from Eurogentec (Angers, France).

## Statistical Analysis

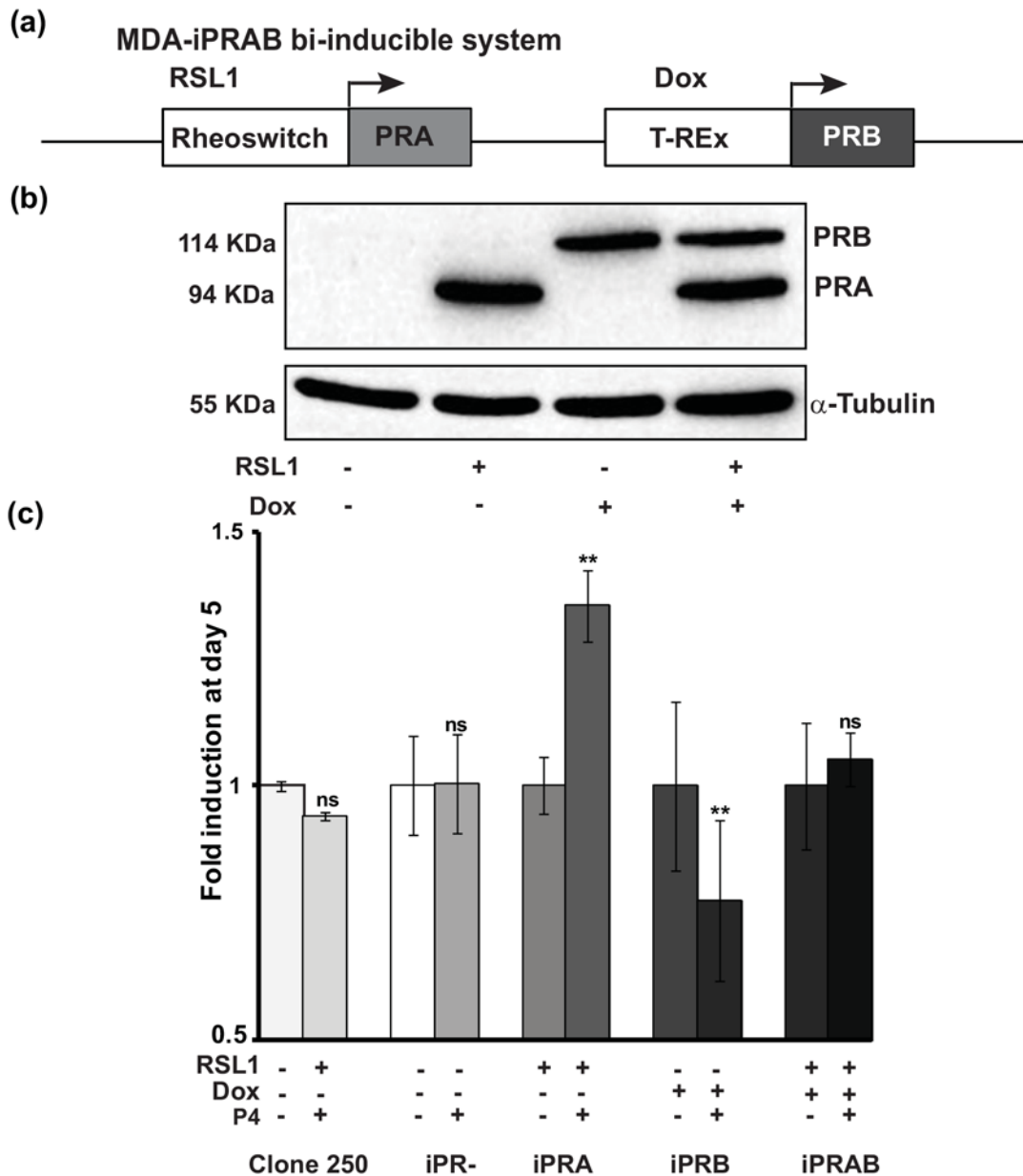
All data are mean  $\pm$  SEM. Non-parametric Mann-Whitney statistical U-tests and ANOVA test (Kruskal-Wallis) were applied to determine all significant differences between experimental conditions, using the software Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical significances are indicated by \* or x (1–3 symbols corresponding to  $P < 0.05$  or  $< 0.01$  or  $< 0.001$ , respectively).

## Results

### PRA mediated MDA-iPRAB Cell Proliferation

We used the recently established bi-inducible MDA-iPRAB cell model to study the impact of PR isoform on human breast cancer cell proliferation [6]. This model results from genetically modified MDA-MB-231 human breast cancer cell line (PR<sup>-</sup>), generating various stable cell lines, MDA-iPR<sup>-</sup>, iPRA and/or iPRB cells. Two non-steroidal inducible systems, Rheoswitch and T-Rex were inserted into the same plasmid pZX-TR [6] (S1A Fig) and transfected into MDA-MB-231 cells generating parental and stable “clone 250” cell line. Subsequently, clone 250 cells were stably transfected with the bi-inducible system, pRheoswitch-PRA and pTRex-PRB, as schematically depicted on Fig 1A and S1B Fig. This bi-inducible system allows a bi-conditional expression of both PR isoforms, PRA at 94 kDa and/or PRB at 114 kDa, upon addition of RSL1 and/or Doxycycline (Dox) for 24 h, respectively (Fig 1B), while in the non-induced DMSO vehicle condition, no PR isoform expression was detected.

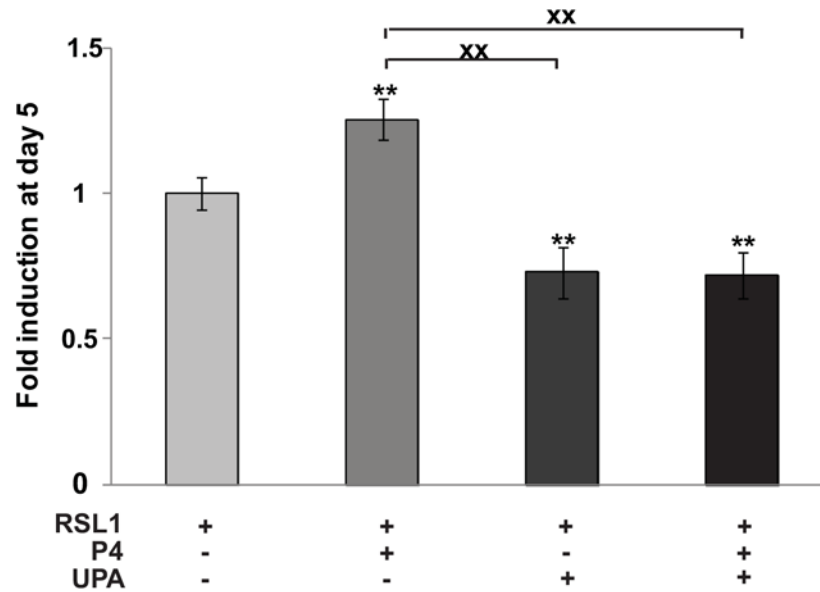
Given that the impact of P4 on cell proliferation was reported to be highly dependent on the cellular context [5, 29], we examined the influence of P4 on MDA-iPRAB cell proliferation. Unexpectedly, and unlike what we had published before with P4 at 10 nM, here we showed



**Fig 1. Progesterone-dependent activation of MDA-iPRA cell proliferation.** (a) Schematic representation of the bi-inducible system inserted into the MDA-iPRAB cell line in which RSL1 and Dox selectively trigger expression of PRA and PRB isoform respectively, as previously described [6]. (b) PRA and/or PRB expression in MDA-iPRAB cell lines. MDA-iPRAB cells were incubated with DMSO or inducers, RheoSwitch Ligand (RSL1, 0.5  $\mu$ M) and/or doxycycline (Dox, 2  $\mu$ M) during 24 h. Western blot analysis of whole cell extracts was performed using anti-PR antibody recognizing both PR isoforms (Novocastra) or anti-tubulin antibody for sample loading control. (c) MDA-iPRAB cell proliferation assays were analyzed on day 1, 3 and 5. Data are expressed as fold induction compared to vehicle condition arbitrarily set at 1, and are means  $\pm$  SEM from five independent cell cultures (n = 6 for each experiment. \*\* indicates p < 0.01 compared to the vehicle-treated cells for each MDA-iPRAB cell line (non-parametric Mann Whitney t-tests).

doi:10.1371/journal.pone.0140795.g001

through repeated cell proliferation tests that P4 (1 nM) significantly increased MDA-iPRA cell proliferation at Day 5 (Fig 1C, S2A Fig). Of note, no effect of RSL1 and P4 was observed on cell proliferation of the parental clone 250, excluding a potential non-specific effect of these compounds (Fig 1C, left histograms). Moreover, P4 did not induce cell proliferation when none of the PR isoform was induced. In contrast, MDA-iPRB cell proliferation was significantly



**Fig 2. Ulipristal acetate (UPA) inhibits P4-dependent MDA-iPRA cell proliferation.** MDA-iPRA cultured on 96-well plates, were treated with vehicle or P4 (1 nM) and/or UPA (1 μM) in fresh steroid-free medium containing DMSO or RSL1 (0.5 μM) on day 0, 2 and 4. Cell proliferation assays were performed using CellTiter96H AqueousOne Solution as described in Materials and Methods. The 490 nm absorbance was determined on day 1, 3 and 5. Data are expressed as fold induction compared to vehicle condition arbitrarily set at 1, and are means ± SEM from five independent cell cultures (n = 6 for each experiment). \*\* indicates p<0.01 compared to the vehicle-treated cells for each MDA-iPRA cell line while xx indicates p<0.01 compared to the P4-treated cells (non-parametric Mann Whitney t-tests).

doi:10.1371/journal.pone.0140795.g002

reduced in the presence of P4 (Fig 1C, right histograms), demonstrating that PRA specifically mediated cell proliferation in this model. Interestingly, co-expression of both PRA and PRB isoforms impeded P4-dependent MDA-iPRAB cell proliferation. These results are consistent with a PRA-mediated proliferative effect and PRB-mediated antiproliferative effect of P4 (Fig 1C).

### Anti-proliferative effect of UPA on MDA-iPRA cells

We next examined the effect of the SPRM, UPA, on MDA-iPRA cell proliferation (Fig 2) and found that UPA at 1 μM alone or in association with P4 significantly inhibited cell proliferation as early as Day 3 (see also S2A Fig). This was consistent with our previous report showing that RU486 (Mifepristone) inhibits MDA-iPRA cell proliferation [6]. Of note, in the absence of PR, UPA has no effect, while UPA inhibited PRB-expressing cells and PRAB-expressing cells proliferation (S2B and S2C Fig). UPA has synergistic effects with P4 in MDA-iPRB cells.

Taken together, we reported the first cellular model in which P4 triggers PRA mediated human breast cancer cell proliferation *in vitro*. In this model, we unambiguously demonstrated that PRA isoform mediated P4-induced cell proliferation that was antagonized by UPA, highlighting the anti-proliferative role of UPA on human breast cancer cells.

### Key PRA target genes involved in human breast cancer cell proliferation: Effects of P4 and UPA

We have previously identified by microarray analysis on the same MDA-iPRAB cell model, a subset of potential target gene candidates regulated in a P4-dependent and/or PR isoform specific manner [6]. Given the importance of PRA isoform, its impact on P4 signaling in

**Table 1. Up-regulated PRA–target genes in the presence of P4.**

Class	Gene	Name	FC	FI	Function
A+&AB+	<i>DUSP6</i>	<i>Dual specificity phosphatase 6</i>	2	1.5	Transcriptional target of P53 Interaction with PRB: proliferative transcriptional programs
A+&AB+	<i>BCL2-L1</i>	<i>Bcl-2-like protein 1</i>	1.5	1.2	Overexpression of Bcl-xL: loss of apoptosis
A+&AB+	<i>TNFRSF11A</i>	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK)</i>	1.9	1.6	Mammary cell proliferation, migration, cell invasion.
A+&AB+	<i>WNT5A</i>	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 5A</i>	1.8	1.3	Tumor suppressor gene Proliferation, differentiation, migration, adhesion, polarity
A+&AB+	<i>LGR4</i>	<i>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4 (GPR48)</i>	1.8	1.6	Promoting cancer cell proliferation (Wnt signaling), Invasiveness and metastasis
A+&AB+	<i>FOSB</i>	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B</i>	1.8	1.5	Reduced FosB expression: dedifferentiation (breast tumorigenesis)
A+&AB+	<i>TFPI2</i>	<i>Tissue factor pathway inhibitor 2</i>	2.2	2.6	Low expression: breast cancer progression and poor outcome
A+&B+ & AB+	<i>DUSP1</i>	<i>Dual specificity phosphatase 1</i>	1.6	1.6	Cell cycle, dephosphorylation of MAP kinase. Antiproliferative actions of PR

MDA-iPRAB cells were cultured during 24 h in steroid-free medium containing RSL1 (0.5 μM) and/or Dox (2 μM) to induce expression of PRA and/or PRB. Cells were treated by vehicle or P4 (1 nM) for 6 hours and a genome wide transcriptomic studies was performed as described in [6]. A total of 999 genes were affected by PR expression. These genes were separated into three groups: A and B and AB (co-expressed at similar levels relative to physiological conditions) regrouping genes that are regulated by either by PRA, PRB or PRAB. Tables above represent class A+ genes regulated by PRA in the presence of the ligand; Class A+&AB+, genes responsive to liganded PRA and their expression may or may not be influenced by PRB co-expression; Class A±&AB± genes responsive to both liganded and unliganded PRA, and their expression may be influenced by PRB co-expression; Class A+&B+ & AB+, genes that are commonly regulated by liganded PRA, PRB and PRAB. FC calculated either by microarray studies or by RT-qPCR analysis and their function in the cancer. FC: Transcriptional Fold Change calculated by microarray studies (FC\*) and by RT-qPCR (FI, Fold Induction).

doi:10.1371/journal.pone.0140795.t001

mammary tumorigenesis processes such as cell growth, death and migration, and taking into account its role in mediating cell proliferation, we chose to focus our attention on some PRA-dependent upregulated (Table 1) or downregulated genes (Table 2) in the presence of P4. It would be thus possible to correlate P4-stimulated MDA-iPRA cell proliferation to the corresponding gene expression and to further evaluate the activity of the antiprogesterone UPA in these processes. Among PRA-targeted genes transcriptionally stimulated (Fig 3) or inhibited by P4 (Fig 4), we examined the expression of few genes (*BCL2-L1*, *DUSP6*, *WNT5A*, *LGR4*, *TGFβ2*, *EREG*, *F3*, *F2RL1*), owing to their role in apoptosis, cell proliferation, metastasis, invasiveness, angiogenesis (Tables 1 and 2). We first validated the regulated expression of these genes by RT-qPCR analysis, after a 6 hr treatment by P4 following the same experimental duration as previously described [6]. We found that P4 significantly enhanced expression of *BCL2-L1* by 25% (Fig 3A), that of *DUSP6* by 50% (Fig 3B), that of *WNT5A* by 30% (Fig 3C) while *LGR4* expression was increased by 60% (Fig 3D). Interestingly, we demonstrated that the expression of these P4-upregulated genes was repressed by UPA alone or in combination with P4, confirming the antagonistic activity of UPA (Fig 3).

In contrast, P4 treatment significantly reduced the expression of *TGFβ2* by 60% (Fig 4A), and that of *EREG*, *F3* and *F2RL1* by 70% (Fig 4B, 4C and 4D) in MDA-iPRA cells, as revealed RT-qPCR analysis. Unexpectedly, UPA alone also inhibited the expression of *TGFβ2*, *F3* and *F2RL1* (Fig 4A, 4C and 4D) but not that of *EREG* (Fig 4B). However, the P4-dependent down-regulation of *EREG* expression was completely prevented by UPA (Fig 4B), consistent with a full PR antagonist activity of UPA. Of note, a strict correlation was observed between gene expression in transcriptomic and RT-qPCR analysis (Tables 1 and 2).

The expression of PRA-regulated genes was also analyzed in MDA-iPRB expressing cells. As shown in S3 and S4 Figs, expression of these genes did not vary in the presence of P4 and/or UPA treatment. Thus, we confirmed that *BCL2-L1*, *DUSP6*, *WNT5A*, *LGR4*, *TGFβ2*, *EREG*, *F3*, *F2RL1* are indeed PRA specific genes and that UPA exerts an inhibitory effect by down regulating their expression only when PRA is expressed (MDA-iPRA).

Collectively, we demonstrated that the selected genes were specifically regulated by PRA isoform in the presence of its natural ligand P4. In addition, we also showed that UPA generally displayed PRA antagonist properties while, in some cases, UPA exerted a partial progesterone agonist activity consistent with the SPRM feature of his compound [11, 30].

### Regulation of BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> protein expression by P4 and UPA in MDA-iPRA cells

Since P4 stimulated *BCL2-L1* mRNA levels (Fig 3A), we next examined the hormone regulation of the anti-apoptotic factor BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>, at the protein level. As illustrated in Fig 5A, the 26 kDa band corresponding to BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> protein was significantly increased by 23% in MDA-iPRA cells upon 24 h exposure to P4 as revealed to quantification of band intensities relative to GAPDH (36 kDa) (Fig 5B). We also found that P4-stimulated BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> expression was antagonized by UPA treatment which, when applied alone, significantly reduced by 2 fold factor the basal BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> expression (Fig 5B). PRA expression was also quantified relative to loading control GAPDH (Fig 5C). As anticipated, PRA was significantly downregulated upon P4 exposure while UPA alone was ineffective in modulating PRA expression in MDA-iPRA cells. Taken together, we provide direct evidence of P4-stimulated MDA-iPRA cell proliferation, associated with BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> expression, both being fully antagonized by UPA.

### PRA recruitment on *BCL2-L1* gene

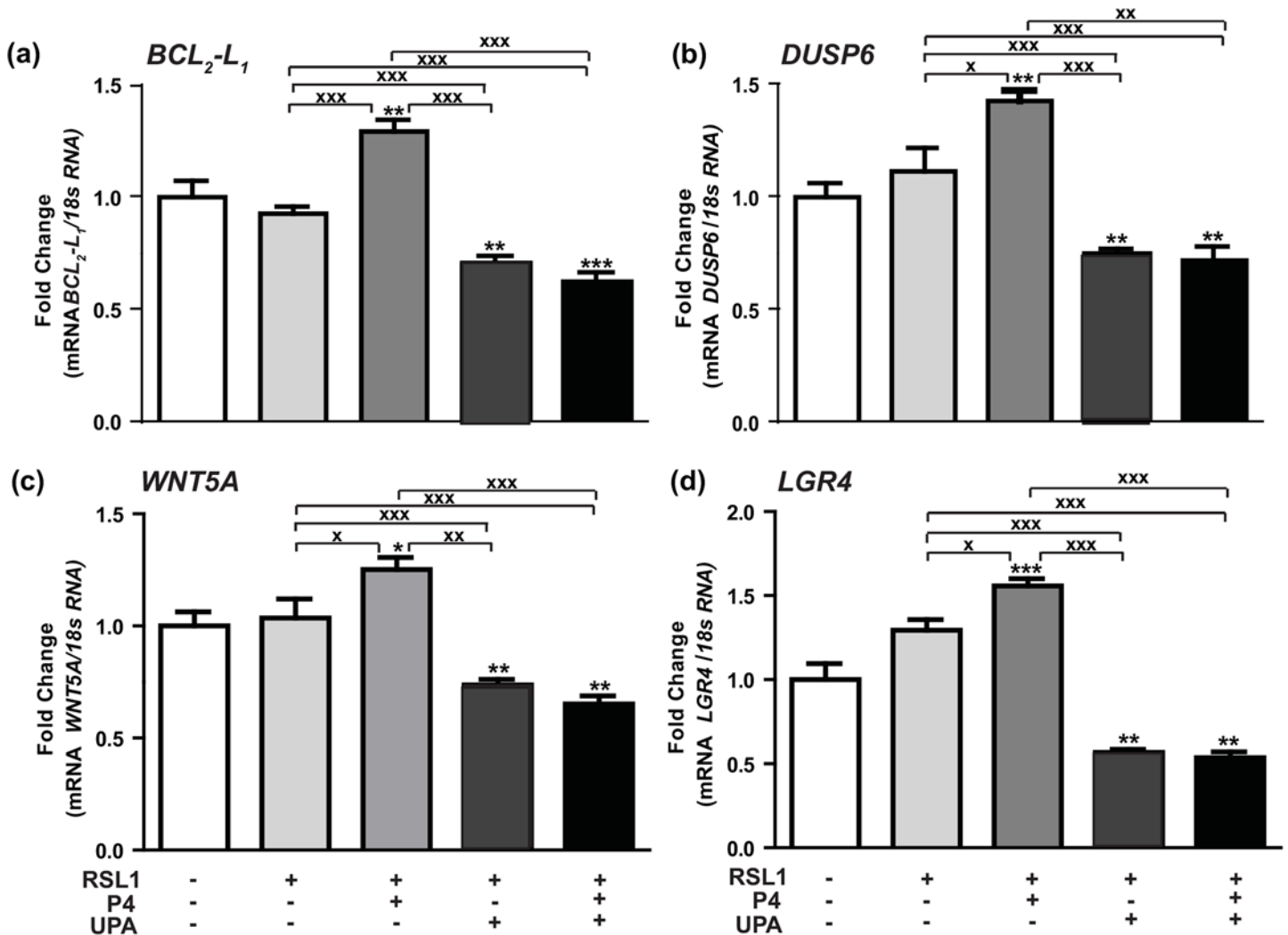
To better elucidate the molecular mechanisms by which P4-activated PRA regulated *BCL2-L1* gene expression in MDA-iPRA cells and based on previous studies performed in T47D cells

**Table 2. Down-regulated PRA–target genes in the presence of P4.**

Class	Gene	Name	FC	FI	Function
A+	<i>F2RL1</i>	<i>Coagulation factor II receptor-like 1</i>	-1.9	0.7	Constitutive migration of MDA MB-231 Up regulation of VEGF
A+&AB+	<i>EREG</i>	<i>Epiregulin</i>	-1.7	0.7	Breast tumor progression (paracrine mechanism)
A+&AB+	<i>F3</i>	<i>Coagulation factor III (tissue factor)</i>	-2.4	0.7	Promigratory, invasive, proangiogenic phenotype
A+&AB+	<i>TGFB2</i>	<i>Transforming growth factor-beta 2</i>	-1.8	0.6	Breast cancer invasion Tumor suppressive (early stages) Malignant conversion and progression (later stages)
A+&AB+	<i>ADRB2</i>	<i>Beta-2 adrenergic receptor</i>	-1.7	0.6	Genetic variation and polymorphism: risk for breast cancer
A+&AB+	<i>GJB2</i>	<i>Gap junction beta-2 protein, connexin 26</i>	-1.8	0.5	Invasion of ductal breast carcinomas

MDA-iPRAB cells were cultured during 24 h in steroid-free medium containing RSL1 (0.5 μM) and/or Dox (2 μM) to induce expression of PRA and/or PRB. Cells were treated by vehicle or P4 (1 nM) for 6 hours and a genome wide transcriptomic studies was performed as described in [6]. A total of 999 genes were affected by PR expression. These genes were separated into three groups: A and B and AB (co-expressed at similar levels relative to physiological conditions) regrouping genes that are regulated by either by PRA, PRB or PRAB. Tables above represent class A+ genes regulated by PRA in the presence of the ligand; Class A+&AB+, genes responsive to liganded PRA and their expression may or may not be influenced by PRB co-expression; Class A±&AB± genes responsive to both liganded and unliganded PRA, and their expression may be influenced by PRB co-expression; Class A+&B+&AB+, genes that are commonly regulated by liganded PRA, PRB and PRAB. FC calculated either by microarray studies or by RT-qPCR analysis and their function in the cancer. FC: Transcriptional Fold Change calculated by microarray studies (FC\*) and by RT-qPCR (FI, Fold Induction).

doi:10.1371/journal.pone.0140795.t002

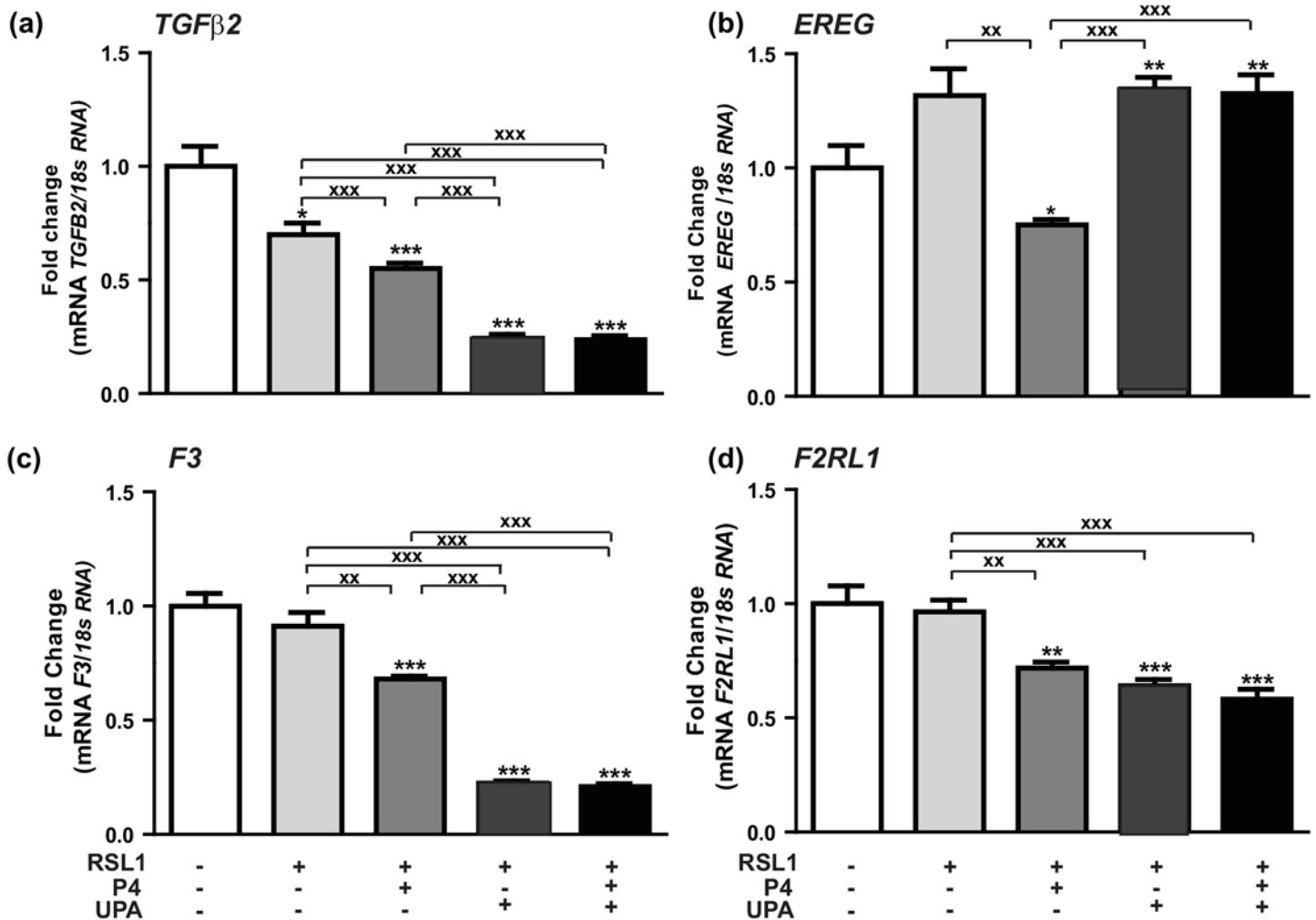


**Fig 3. Hormonal regulation of P4-PRA-upregulated genes.** (a) *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>*, (b) *DUSP6*, (c) *WNT5A*, (d) *LGR4* mRNA expression levels were determined in MDA-iPRA cells. Cells were treated for 6 h with vehicle, P4 (1 nM) and/or UPA (1 μM) in steroid-free medium, following 24 h induction of PRA expression using RSL1 (0.5 μM). RT-qPCR analyses were performed as described in Materials and Methods. Data are expressed as fold induction compared to vehicle condition arbitrarily set at 1, and are means ± SEM from three independent cell cultures measured in duplicate. \*, \*\*, \*\*\* symbols indicate p<0.05, 0.01 and 0.001 respectively compared to the vehicle-treated MDA-iPRA cells while x, xx, xxx symbols indicate p<0.05, 0.01 and 0.001 respectively compared to the V or P4-treated MDA-iPRA cells (non-parametric Mann Whitney t-tests).

doi:10.1371/journal.pone.0140795.g003

[27], ChIP assays were performed to examine PRA recruitment on one genomic target motif, already established on *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* gene [31]. We chose the intragenic PR-binding sequence located at +58 kb downstream Transcription Start Site (TSS) of *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* gene as schematically depicted in the genomic structure of the human *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* gene (Fig 6A). P4 treatment induced a significant 40-fold increase in PRA recruitment on the well-documented +58 kb response element of the *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* gene, in comparison to the vehicle condition. Furthermore, UPA in combination with P4 markedly reduced P4-stimulated PRA enrichment on this PR-binding site (P< 0.001). Interesting enough, UPA alone was able to stimulate PRA recruitment by a 10-fold factor (Fig 6) as well as a substantial recruitment of the well-known SRC1 coactivator however to a lesser extent than that induced by P4 (2 vs 8 Fold) (S5A Fig). However, under these experimental conditions, as opposed to P4, UPA was unable to promote RNA Polymerase type II





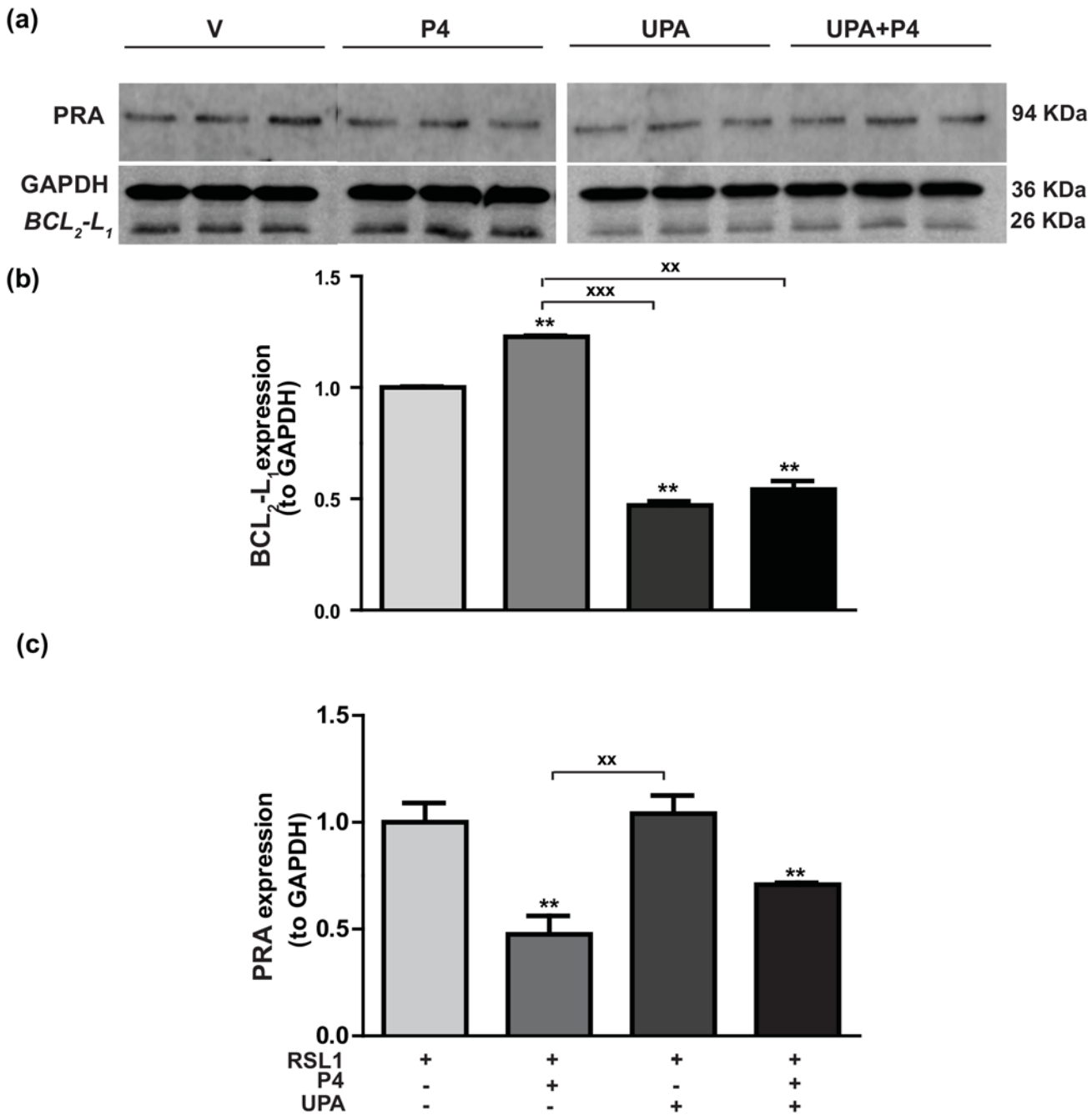
**Fig 4. Hormonal regulation of P4-PRA-downregulated genes.** (a) *TGFβ2*, (b) *EREG*, (c) *F3*, (d) *F2RL1* mRNA expression levels were in MDA-iPRA cells. Cells were treated for 6 h with vehicle, P4 (1 nM) and/or UPA (1 μM) in steroid-free medium, following 24 h induction of PRA expression using RSL1 (0.5 μM). RT-qPCR analyses were performed as described in Materials and Methods. Data are expressed as fold induction compared to vehicle condition arbitrarily set at 1, and are means ± SEM from three independent cell cultures measured in duplicate. \*, \*\*, \*\*\* symbols indicate p<0.05, 0.01 and 0.001 respectively compared to the vehicle-treated MDA-iPR<sup>-</sup> cells while x, xx, xxx symbols indicate p<0.05, 0.01 and 0.001 respectively compared to the V or P4-treated MDA-iPRA cells (non-parametric Mann Whitney t-tests).

doi:10.1371/journal.pone.0140795.g004

recruitment into the pre-initiation complex assembly (S5B Fig), required for transcriptional regulation. This finding is consistent with the UPA-dependent repression of *BCL2-L1* expression (see Figs 3 and 5).

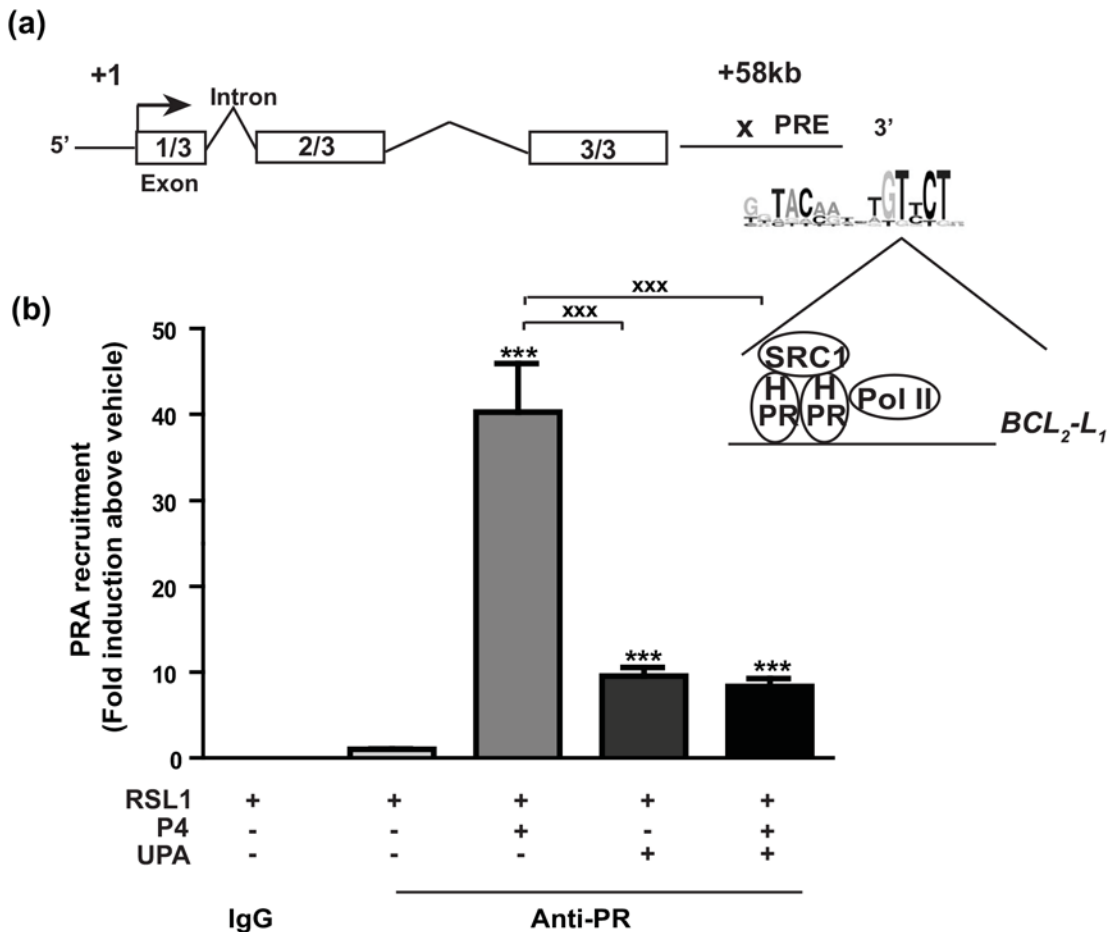
### Discussion

We have exploited an original human breast cancer cell-based system in which cell proliferation is stimulated by progesterone through PR, using the recently established bi-inducible, ER negative, MDA-iPRAB cell line [6]. Several breast cancer cell models have been generated to study steroid effects, mostly focusing on the impact of estrogens and anti-estrogens [32–34]. The effects of progesterone and progestins on breast cancer cell proliferation *in vitro* drew contradictory results [35], although proliferative effects of progesterone have been reported in the ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup> T47D and MCF-7 breast cancer cells, without distinction between PR isoforms



**Fig 5. Hormonal regulation of BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> protein expression in MDA-iPRA cells.** Following 24 h induction of PRA expression using RSL1 (0.5 μM), MDA-iPRA cells were incubated in the presence or absence of P4 (1 nM) and/or UPA(1 μM) in steroid-free medium for 24 h. **(a)** Western blot analysis of whole cell extracts (35 μg Protein) loaded on a 12% acrylamide gel, membranes were incubated overnight with a 1:1,000 dilution of anti-BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> antibody (anti-Bcl-XL antibody, E18, ab32370, Abcam, France), and an anti-PR antibody recognizing both PR isoforms (Novocastra) or anti-GAPDH antibody (G9545—anti-GAPDH antibody produced in rabbit). **(b)** Band intensities of BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> (26 kDa) and GAPDH (36 kDa) used as a sample loading control were quantified and BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>/GAPDH ratio were determined and expressed in arbitrary units and normalized to vehicle. Relative BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> protein expression is presented. **(c)** Band intensities of PRA (94 kDa) and GAPDH (36 kDa) used as a sample loading control were quantified and PRA/GAPDH ratio were determined and expressed in arbitrary units and normalized to vehicle. Relative PRA expression is presented as well. Histograms are means ± SEM of three independent experiments. \*\* Symbol indicates p<0.01 compared to the vehicle-treated MDA-iPRA cells while xx symbol indicates p<0.01 compared to the P4-treated MDA-iPRA cells (non-parametric Mann Whitney t-tests).

doi:10.1371/journal.pone.0140795.g005



**Fig 6. Progesterone enhances PRA recruitment on the intragenic region of *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* gene.** (a) Schematic representation of *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* gene structure. It contains 3 exons. The genomic PR target motif previously identified [31] is located downstream the 3' end at position +58 kb of the transcription start site of *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* gene. The proposed PR response element (PRE) is illustrated on which the pre-initiation complex containing PR isoform, steroid receptor coactivator 1 (SRC1) as well as the RNA polymerase type 2 (Pol II) binds. (b) MDA-iPRA cells treated for 1 h with P4 (10 nM) and/or UPA (1 μM), were fixed and lysed and chromatin extracts subjected to ChIP assays using PR antibody (Anti-PR, sc-7208, Santa Cruz Biotechnology, CA) or unrelated rabbit IgG antibodies used as negative control. Immunoprecipitated and eluted DNA fragments were analyzed by real-time qPCR using primer pair encompassing genomic sequence of the +58 kb site of the *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* gene. Histograms represent the fold induction of PRA enrichment compared to vehicle condition arbitrary set at 1 and are means ± SEM of four independent experiments performed in triplicates. Statistical difference is indicated as compared to vehicle condition for PRA-induced cells treated by V (\*\*\*, p<0.001), or by P4 (xxx, p<0.001) (Non-parametric Mann Whitney t-tests).

doi:10.1371/journal.pone.0140795.g006

(review in [36]). Cell proliferation was evaluated in ER negative MDA-MB 231 cells transfected with each PR isoforms and cell proliferation inhibition by progesterone was observed in both cases [11]. In this report, progesterone was used at 0.1 μM and cells cultured in red phenol free DMEM supplemented with 5% charcoal treated fetal calf serum, while we used 2.5% FCS and 1 nM progesterone [11]. Progestin-stimulated cell proliferation has been reported to depend on progesterone concentration, mode of administration (continuous vs discontinuous) and may involve cross-talks with growth factors [36]. This may explain the discrepancy between our results and this study. We previously published that unliganded MDA-iPRA cells proliferate to a lesser extent than MDA-iPRB cells [6], in this study, we confirmed these findings (data not shown). We repeatedly and reproducibly observed that progesterone stimulated MDA-iPRA cell proliferation in 6 independent experiments (n = 6 per experiment). This is in accordance with PRA cells expressing increased responsiveness to stimulatory effects of progestins, as compared to cells expressing PRB reported by others [36–37].

One major advantage of our cell-based system is that one might selectively evaluate the effects of PR, its isoforms and ligands independently of estrogenic effects, since proliferation of this ER<sup>-</sup> cell line is estrogen-independent. Moreover, the bi-inducible PR expression by non-steroid inducers is genomically stable, the non-induced cell line constituting a reliable negative control [6]. We cannot exclude that the absence of ER $\alpha$  (and estrogens) might modify the expression of co-regulators required for PR signaling and thus influencing transcriptional responses to PR isoforms. However data from previous reports did not show any influence of ER $\alpha$  transfection on PR ligands induced morphological changes in PR transfected MDA-MB 231 cells [11]. Taking into account these limitations, our studies provide new insights into the understanding of the functional consequences of imbalanced PRA/PRB ratio in the context of human breast cancer cells.

Interestingly, as opposed to the already known P4-biphasic regulation of cell proliferation observed in estrogen dependent T47D-YB cell line constitutively expressing PR-B [38], we report that P4 stimulates cell proliferation of bi-inducible MDA-iPRAB cells only when PRA isoform is expressed, while P4 exerts an anti-proliferative effect in PRB-expressing cells, without any biphasic effect. This underlines intrinsic differences in cell lines, in particular the MDA MB cell line is derived from a basal breast cancer [39] while the T47D cell line is derived from a luminal breast cancer [40].

In this model as well, PRA and PRB exhibit distinct transcriptional activities and regulate specific gene transcription. We have previously shown that PRA coexpression potentiated PRB-mediated cancer cell migration and that PR isoforms differentially regulated expression of major players of cell migration [41] such as urokinase plasminogen activator (uPA), its inhibitor plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), uPA receptor (uPAR), and  $\beta$ 1-integrin, which affect focal adhesion kinase (FAK) signaling. PRA, as well as PRB, interacted with FAK complexes, whose degradation was coupled to a progestin-dependent turnover of PRA and PRB.

Our previous transcriptomic data allowed us to select PRA specific target genes [6]. Among PRA-modulated genes involved in breast tumorigenesis (Tables 1 and 2), we more specifically evaluated by quantitative RT-PCR and confirmed that *BCL2-L1*, *DUSP6*, *WNT5A*, *LGR4* expression were upregulated in the presence of progesterone, and that *TGF $\beta$ 2*, *EREG*, *F3*, *F2RL1* were down regulated in the presence of progesterone.

*BCL2-L1* is one of the most important regulators of programmed cell death. Deregulation of *BCL2-L1* expression contributes to oncogenic transformation of normal cells [42–43]. In our MDA-iPRA model, P4 stimulates *BCL2-L1* transcript and protein expression, while *BCL2-L1* expression was not regulated by P4 in the MDA-iPRB cell line. Induction of anti-apoptotic factors of the Bcl family by progestins has been reported in endogenously PR-expressing T47D cells [35, 44], however the specific role of PR isoforms has not been directly evaluated.

*WNT5A* and *LGR4* regulate cell polarity, proliferation, survival and aberrant regulation often leads to pathological conditions including cancer [45]. In T47D cells, it has been demonstrated that PRB-induced transcriptional up-regulation of *WNT1* leading to activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-Src and Erk1/2 [46]. Here, we report that PRA mediates the P4-induction and UPA-inhibition of the expression of both *WNT5A* and *LGR4*, suggesting an essential function of PRA-mediated, P4 triggered- breast cancer cell proliferation.

*DUSP6* (the dual specificity phosphatase 6, MKP3) is a negative regulator of the MAPK pathway [47]. Previous studies demonstrated a direct interaction between PRB and *DUSP6* [47], our study confirms that *DUSP6* is a PRA-target gene up-regulated by P4 in MDA cells.

*TGF $\beta$ 2* and *EREG* (Epiregulin) were shown to be down regulated by progesterone in the presence of PRA in our model [48–49]. This is in accordance with previous data suggesting

that PR isoforms expression correlated negatively with other members of the same gene family associated with tumor aggressiveness such as *EREG* and *TGF alpha* [50].

Our results thus suggest a specific role of PRA in breast carcinogenesis, including modulation of regulatory factors of cell proliferation, invasion, apoptosis, and angiogenesis. This may constitute a trail for further molecular characterization of breast tumors, where the evaluation of a panel of specific PRA target genes could be used to further identify poor prognosis tumors. Indeed, breast cancer is now considered as a plural disease whose molecular signature analysis is routinely used to define personalized therapeutic schemes [51].

In addition, our data bring new insights in the isoform specific molecular mechanisms of action of PR and its ligands. It has been shown that over 60% of PR binding sites are located more than 10 kb from the transcription start site [52]. Here we showed that PRA is recruited to an intragenic PR-binding site (PRBs) located at +58 Kb downstream transcription start site of *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* and close to the 3'-end of the gene. This PRB was previously reported to serve as a highly active hormone-dependent binding site [31]. The canonical coactivator SRC1 and the Pol II were also recruited to this +58 Kb site, in a P4 enhanced way. To our knowledge, this is the first report of a direct evaluation of PRA interaction with molecular partners in PR<sup>+</sup> basal breast cancer cells, while almost all previous PR microarrays studies were performed on luminal breast cancer cells [53]. This issue has been only addressed once [54], functional analyses were conducted in estrogen-dependent T47D cells, however ChIP experiments were conducted in non mammary HeLa cells and did not specifically evaluate PRA recruitment.

To evaluate the potential activity of PR antagonists on PRA-mediated cell proliferation, we used the recently marketed selective progesterone receptor modulator (SPRM), ulipristal acetate (UPA), a specific, highly selective PR antagonist with no agonist activity towards other steroid receptors [55], with mixed PR agonist/antagonist properties depending on the tissue [56]. Of interest, we showed that UPA inhibited MDA-iPRA cell proliferation. The anti-proliferative effect of UPA was restricted to PRA-expressing cells, independently of the presence of P4 while it exerts partial agonist activity on MDA-iPRB cells. ChIP experiments demonstrated that UPA partially inhibited PRA, SRC1 and Pol II recruitment on *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* PR-binding site in the presence of P4, while UPA alone weakly enhanced PRA and SRC1 recruitment only. This absence of Pol II recruitment in the presence of UPA correlated with the lack of UPA-induced PRA-mediated *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* expression, and is consistent with UPA inhibitory effect on both P4-induced *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* transcript and protein. This may be correlated as well to the inhibition of cell proliferation in the presence of UPA, as already observed for other tumor types *in vivo* [24]. PRB interaction with SRC1 in the presence of a non-commercially available SPRM (asoprisnil) has been reported using transactivation assays in T47D cells [57]. To our knowledge this is the first report on the molecular mechanism of action of UPA.

Our data suggest that PRA expression is associated with increased human breast cancer cell proliferation, further stimulated by P4. We also show that UPA is able to decrease cell proliferation in this PRA expressing model. This effect of UPA includes basal as well as progesterone stimulated cell proliferation. Thus, our findings suggest that UPA might be of interest in the adjuvant treatment of breast cancer, more specifically in ER- PR+ tumors.

In sum, we propose that future characterization of breast cancer should include PR isoforms evaluation to better specify tumor phenotype, and/or its molecular signature independently of estrogen signaling. Most notably, this should evaluate PRA target genes to identify poor prognosis tumors, and potential candidates for SPRM adjuvant therapy. This obviously requires prior confirmation in the clinical setting.

## Supporting Information

**S1 Fig. Schematic representation of stably transfected plasmids inserted into the parental clone 250 and the bi-inducible system applied to generate MDA-iPRAB cells for the conditional PR isoform expression in MDA-MB-231 cells [6]. (a)** The two regulatory proteins systems RheoSwitch and T-Rex were inserted in the same plasmid pZX-TR besides the zeocin resistance gene. **(b)** PRA and/or PRB expression was induced under the control of two promoters used to establish the secondary stable MDA-iPRAB cell line. Addition of RSL1 and/or Dox selectively induces PRA or PRB isoform, respectively. In their absence, no PR expression is induced.

(EPS)

**S2 Fig. P4 and UPA regulation of MDA-iPRA cell proliferation (a), MDA-iPRB cell proliferation (b) and MDA-iPRAB cell proliferation (c).** Following 24 h induction of PRA expression using RSL1 (0.5  $\mu$ M), and PRB expression using Dox (2  $\mu$ M) cultured MDA-iPRA in 96-well plates, were treated with vehicle, P4 (1 nM) and/or UPA (1  $\mu$ M) for 5 d. Cell proliferation assays were performed on day 0, 3 and 5 using CellTiter 96H AqueousOne Solution as described in Materials and Methods. Data are expressed as fold induction (a) and absorbances (b, c) compared to vehicle-treated MDA-iPRA cells (a) and vehicle-treated MDA-iPRB cells (b) and vehicle treated MDA-iPRAB cells (c) and are mean of 6 independent determinations. \*, \*\*, \*\*\* symbols indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively compared to the vehicle-treated MDA cells (non-parametric ANOVA test (Kruskal-Wallis)).

(EPS)

**S3 Fig. Regulation of P4-dependent and PRA-selective upregulated genes (a) *BCL2-L1*, (b) *DUSP6*, (c) *WNT5A*, (d) *LGR4* mRNA expression levels were determined in MDA-iPRB cells.** Cells were treated for 6 h with vehicle, P4 (1 nM) and/or UPA (1  $\mu$ M) in steroid-free medium, following 24 h induction of PRB expression using Dox (2  $\mu$ M). RT-qPCR analyses were performed as described in Materials and Methods. Data are expressed as fold induction compared to vehicle condition arbitrarily set at 1, and are means  $\pm$  SEM from three independent cell cultures measured in duplicate. \*, symbol indicates  $p < 0.05$  compared to the vehicle-treated MDA-iPRB cells while x, xx, xxx symbols indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively compared to the V or P4-treated MDA-iPRB cells (non-parametric Mann Whitney t-tests).

(EPS)

**S4 Fig. Regulation of P4-dependent and PRA-selective downregulated genes (a) *TGF $\beta$ 2*, (b) *EREG*, (c) *F3*, (d) *F2RL1* mRNA expression levels were determined in MDA-iPRB cells.**

Cells were treated for 6 h with vehicle, P4 (1 nM) and/or UPA (1  $\mu$ M) in steroid-free medium, following 24 h induction of PRB expression using Dox (2  $\mu$ M). RT-qPCR analyses were performed as described in Materials and Methods. Data are expressed as fold induction compared to vehicle condition arbitrarily set at 1, and are means  $\pm$  SEM from three independent cell cultures measured in duplicate. No statistical difference was detected.

(EPS)

**S5 Fig. SRC1 and Pol II recruitment to the *BCL2-L1* gene.** MDA-iPRA cells treated for 1 h with P4 (10 nM) or UPA (1  $\mu$ M), were fixed and lysed and chromatin extracts subjected to ChIP assays using SRC1 antibody (Rabbit anti-SRC1 antibody, M-341, sc-8995, Santa Cruz Biotechnology) or Pol II antibody (Rabbit anti-Polymerase II antibody, H-224, sc-9001, Santa Cruz Biotechnology). Immunoprecipitated and eluted DNA fragments were analyzed by real-time qPCR using primer pair encompassing genomic sequence of the +58 kb site of the *BCL2-L1* gene. Histograms represent the fold induction of SRC1 (a) or Pol II (b) enrichment compared

to vehicle condition arbitrary set at 1 and are means  $\pm$  SEM of three independent determinations.

(EPS)

**S6 Fig. Regulation of *FKBP5*, a PRB-dependent gene.** mRNA expression levels were determined in MDA-iPRB cells. Cells were treated for 6 h with vehicle, P4 (1 nM) and/or UPA (1  $\mu$ M) in steroid-free medium, following 24 h induction of PRB expression using Dox (2 $\mu$ M). RT-qPCR analyses were performed as described in Materials and Methods. Data are expressed as fold change compared to vehicle condition arbitrarily set at 1, and are means  $\pm$  SEM from three independent cell cultures measured in duplicate. \*, \*\*, \*\*\* symbols indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively compared to the vehicle-treated MDA-iPRB<sup>+</sup> cells, while x, xx, xxx symbols indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively compared to the V or P4-treated MDA-iPRB cells (non-parametric ANOVA test (Kruskal-Wallis).

(EPS)

**S1 Table. List of Primer sequences of genes.**

(DOCX)

## Acknowledgments

We thank Dr Junaid A Khan (present address Institute of Pharmacy, Physiology & Pharmacology, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan) for his help in the initial part of this work.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NE FLB HL ML NCB. Performed the experiments: NE FLB HL. Analyzed the data: NE FLB HL ML NCB. Contributed reagents/materials/analysis tools: NE FLB MRR HL ML NCB. Wrote the paper: NE FLB HL ML NCB.

## References

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013; 63(1):11–30. Epub 2013/01/22. doi: [10.3322/caac.21166](https://doi.org/10.3322/caac.21166) PMID: [23335087](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23335087/)
2. Shah R, Rosso K, Nathanson SD. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014; 5(3):283–98. Epub 2014/08/13. doi: [10.5306/wjco.v5.i3.283](https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.283) PMID: [25114845](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25114845/)
3. Hagan CR, Lange CA. Molecular determinants of context-dependent progesterone receptor action in breast cancer. *BMC Med*. 2014; 12:32. Epub 2014/02/21. doi: [10.1186/1741-7015-12-32](https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-32) PMID: [24552158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24552158/)
4. Knutson TP, Lange CA. Tracking progesterone receptor-mediated actions in breast cancer. *Pharmacol Ther*. 2014; 142(1):114–25. Epub 2013/12/03. doi: [10.1016/j.pharmthera.2013.11.010](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.11.010) PMID: [24291072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24291072/)
5. Brisken C. Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(6):385–96. Epub 2013/05/25. doi: [10.1038/nrc3518](https://doi.org/10.1038/nrc3518) PMID: [23702927](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23702927/)
6. Khan JA, Bellance C, Guiochon-Mantel A, Lombes M, Loosfelt H. Differential regulation of breast cancer-associated genes by progesterone receptor isoforms PRA and PRB in a new bi-inducible breast cancer cell line. *PLoS ONE*. 2012; 7(9):e45993. Epub 2012/10/03. doi: [10.1371/journal.pone.0045993](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045993) PMID: [23029355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23029355/)
7. Diep CH, Daniel AR, Mauro LJ, Knutson TP, Lange CA. Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *J Mol Endocrinol*. 2015; 54(2):R31–53. Epub 2015/01/15. doi: [10.1530/JME-14-0252](https://doi.org/10.1530/JME-14-0252) PMID: [25587053](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25587053/)
8. Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol*. 1993; 7(10):1244–55. PMID: [8264658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8264658/)

9. Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB. A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol*. 1994; 8(10):1347–60. PMID: [7854352](#)
10. McGowan EM, Weinberger RP, Graham JD, Hill HD, Hughes JA, O'Neill GM, et al. Cytoskeletal responsiveness to progestins is dependent on progesterone receptor A levels. *J Mol Endocrinol*. 2003; 31(2):241–53. Epub 2003/10/02. PMID: [14519093](#)
11. Leo JC, Lin VC. The activities of progesterone receptor isoform A and B are differentially modulated by their ligands in a gene-selective manner. *Int J Cancer*. 2008; 122(1):230–43. Epub 2007/09/26. PMID: [17893877](#)
12. Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 2002; 72(2):163–72. PMID: [12038707](#)
13. Mote PA, Graham JD, Clarke CL. Progesterone receptor isoforms in normal and malignant breast. *Ernst Schering Found Symp Proc*. 2007(1:):77–107. PMID: [18540569](#)
14. McGowan EM, Clarke CL. Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoints in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 1999; 13(10):1657–71. PMID: [10517668](#)
15. Poole AJ, Li Y, Kim Y, Lin SC, Lee WH, Lee EY. Prevention of Brca1-mediated mammary tumorigenesis in mice by a progesterone antagonist. *Science (New York, NY)*. 2006; 314(5804):1467–70.
16. Mote PA, Leary JA, Avery KA, Sandelin K, Chenevix-Trench G, Kirk JA, et al. Germ-line mutations in BRCA1 or BRCA2 in the normal breast are associated with altered expression of estrogen-responsive proteins and the predominance of progesterone receptor A. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004; 39(3):236–48. PMID: [14732925](#)
17. Mote PA, Gompel A, Howe C, Hilton HN, Sestak I, Cuzick J, et al. Progesterone receptor A predominance is a discriminator of benefit from endocrine therapy in the ATAC trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2015; 151(2):309–18. Epub 2015/04/29. doi: [10.1007/s10549-015-3397-0](#) PMID: [25917868](#)
18. Chlebowski RT, Kuller LH, Prentice RL, Stefanick ML, Manson JE, Gass M, et al. Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women. *The New England journal of medicine*. 2009; 360(6):573–87. Epub 2009/02/07. doi: [10.1056/NEJMoa0807684](#) PMID: [19196674](#)
19. Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet (London, England)*. 2003; 362(9382):419–27.
20. Engman M, Skoog L, Soderqvist G, Gemzell-Danielsson K. The effect of mifepristone on breast cell proliferation in premenopausal women evaluated through fine needle aspiration cytology. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2008; 23(9):2072–9. Epub 2008/06/27.
21. Glasier AF, Cameron ST, Fine PM, Logan SJ, Casale W, Van Horn J, et al. Ulipristal acetate versus levonorgestrel for emergency contraception: a randomised non-inferiority trial and meta-analysis. *Lancet (London, England)*. 2010; 375(9714):555–62. Epub 2010/02/02.
22. Donnez J, Tomaszewski J, Vazquez F, Bouchard P, Lemieszczuk B, Baro F, et al. Ulipristal acetate versus leuprolide acetate for uterine fibroids. *The New England journal of medicine*. 2012; 366(5):421–32. Epub 2012/02/03. doi: [10.1056/NEJMoa1103180](#) PMID: [22296076](#)
23. Donnez J, Vazquez F, Tomaszewski J, Nouri K, Bouchard P, Fauser BC, et al. Long-term treatment of uterine fibroids with ulipristal acetate. *Fertil Steril*. 2014; 101(6):1565–73 e1-18. Epub 2014/03/19. doi: [10.1016/j.fertnstert.2014.02.008](#) PMID: [24630081](#)
24. Xu Q, Takekida S, Ohara N, Chen W, Sitruk-Ware R, Johansson ED, et al. Progesterone receptor modulator CDB-2914 down-regulates proliferative cell nuclear antigen and Bcl-2 protein expression and up-regulates caspase-3 and poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase expression in cultured human uterine leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(2):953–61. Epub 2004/12/02. PMID: [15572421](#)
25. Yun BS, Seong SJ, Cha DH, Kim JY, Kim ML, Shim JY, et al. Changes in proliferating and apoptotic markers of leiomyoma following treatment with a selective progesterone receptor modulator or gonadotropin-releasing hormone agonist. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015; 191:62–7. Epub 2015/06/21. doi: [10.1016/j.ejogrb.2015.05.022](#) PMID: [26093349](#)
26. Communal L, Vilasco M, Hugon-Rodin J, Courtin A, Mourra N, Lahlou N, et al. Ulipristal acetate does not impact human normal breast tissue. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2012; 27(9):2785–98. Epub 2012/06/29.
27. Alvarez LD, Dansey MV, Marti MA, Bertucci PY, Di Chenna PH, Pecci A, et al. Biological activity and ligand binding mode to the progesterone receptor of A-homo analogues of progesterone. *Bioorg Med Chem*. 2011; 19(5):1683–91. Epub 2011/02/15. doi: [10.1016/j.bmc.2011.01.033](#) PMID: [21315613](#)
28. Le Billan F, Khan JA, Lamribet K, Viengchareun S, Bouligand J, Fagart J, et al. Cistrome of the aldosterone-activated mineralocorticoid receptor in human renal cells. *FASEB J*. 2015.



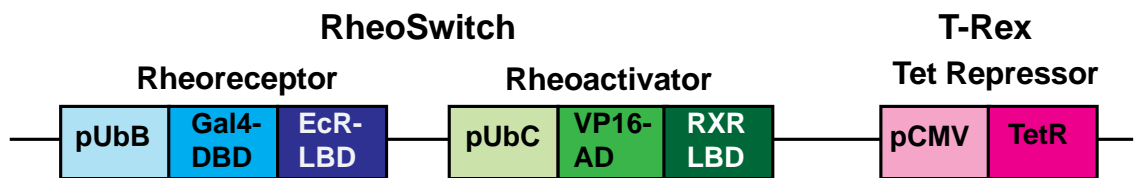
29. Horwitz KB, Sartorius CA. Progestins in hormone replacement therapies reactivate cancer stem cells in women with preexisting breast cancers: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(9):3295–8. doi: [10.1210/jc.2008-0938](https://doi.org/10.1210/jc.2008-0938) PMID: [18647813](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18647813/)
30. Wargon V, Helguero LA, Bolado J, Rojas P, Novaro V, Molinolo A, et al. Reversal of antiprogestin resistance and progesterone receptor isoform ratio in acquired resistant mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 116(3):449–60. doi: [10.1007/s10549-008-0150-y](https://doi.org/10.1007/s10549-008-0150-y) PMID: [18677559](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18677559/)
31. Bertucci PY, Nacht AS, Allo M, Rocha-Viegas L, Ballare C, Soronellas D, et al. Progesterone receptor induces bcl-x expression through intragenic binding sites favoring RNA polymerase II elongation. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(12):6072–86. Epub 2013/05/04. doi: [10.1093/nar/gkt327](https://doi.org/10.1093/nar/gkt327) PMID: [23640331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23640331/)
32. Darbre PD, Daly RJ. Transition of human breast cancer cells from an oestrogen responsive to unresponsive state. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 1990; 37(6):753–63. Epub 1990/12/20. PMID: [2285587](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2285587/)
33. Whittle JR, Lewis MT, Lindeman GJ, Visvader JE. Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. *Breast Cancer Res.* 2015; 17:17. Epub 2015/04/08. doi: [10.1186/s13058-015-0523-1](https://doi.org/10.1186/s13058-015-0523-1) PMID: [25849559](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25849559/)
34. Comsa S, Cimpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res.* 2015; 35(6):3147–54. Epub 2015/05/31. PMID: [26026074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26026074/)
35. Moore MR, Conover JL, Franks KM. Progestin effects on long-term growth, death, and Bcl-xL in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 277(3):650–4. Epub 2000/11/04. PMID: [11062008](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11062008/)
36. Giulianelli S, Molinolo A, Lanari C. Targeting progesterone receptors in breast cancer. *Vitamins and hormones.* 2013; 93:161–84. Epub 2013/07/03. doi: [10.1016/B978-0-12-416673-8.00009-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416673-8.00009-5) PMID: [23810006](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23810006/)
37. Wargon V, Riggio M, Giulianelli S, Sequeira GR, Rojas P, May M, et al. Progestin and antiprogestin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters. *Int J Cancer.* 2015; 136(11):2680–92. Epub 2014/11/05. doi: [10.1002/ijc.29304](https://doi.org/10.1002/ijc.29304) PMID: [25363551](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25363551/)
38. Groshong SD, Owen GI, Grimison B, Schauer IE, Todd MC, Langan TA, et al. Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27 (Kip1). *Mol Endocrinol.* 1997; 11(11):1593–607. PMID: [9328342](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9328342/)
39. Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.* 1974; 53(3):661–74. Epub 1974/09/01. PMID: [4412247](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4412247/)
40. Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, et al. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990).* 1979; 15(5):659–70. Epub 1979/05/01.
41. Bellance C, Khan JA, Meduri G, Guiochon-Mantel A, Lombes M, Loosfelt H. Progesterone receptor isoforms PRA and PRB differentially contribute to breast cancer cell migration through interaction with focal adhesion kinase complexes. *Mol Biol Cell.* 2013; 24(9):1363–74. Epub 2013/03/15. doi: [10.1091/mbc.E12-11-0807](https://doi.org/10.1091/mbc.E12-11-0807) PMID: [23485561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23485561/)
42. Leibowitz B, Yu J. Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther.* 2010; 9(6):417–22. Epub 2010/03/02. PMID: [20190564](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20190564/)
43. Kirkin V, Joos S, Zornig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1644(2–3):229–49. Epub 2004/03/05. PMID: [14996506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14996506/)
44. Yin P, Roqueiro D, Huang L, Owen JK, Xie A, Navarro A, et al. Genome-wide progesterone receptor binding: cell type-specific and shared mechanisms in T47D breast cancer cells and primary leiomyoma cells. *PLoS ONE.* 2012; 7(1):e29021. Epub 2012/01/25. doi: [10.1371/journal.pone.0029021](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029021) PMID: [22272226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22272226/)
45. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 2006; 127(3):469–80. Epub 2006/11/04. PMID: [17081971](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17081971/)
46. Faivre EJ, Lange CA. Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2007; 27(2):466–80. Epub 2006/11/01. PMID: [17074804](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17074804/)
47. Hagan CR, Knutson TP, Lange CA. A Common Docking Domain in Progesterone Receptor-B links DUSP6 and CK2 signaling to proliferative transcriptional programs in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(19):8926–42. Epub 2013/08/08. doi: [10.1093/nar/gkt706](https://doi.org/10.1093/nar/gkt706) PMID: [23921636](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23921636/)
48. Derynck R, Akhurst RJ. Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(9):1000–4. Epub 2007/09/01. PMID: [17762890](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17762890/)
49. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell.* 2008; 134(2):215–30. Epub 2008/07/30. doi: [10.1016/j.cell.2008.07.001](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001) PMID: [18662538](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18662538/)

50. Lindet C, Revillion F, Lhotellier V, Hornez L, Peyrat JP, Bonneterre J. Relationships between progesterone receptor isoforms and the HER/ErbB receptors and ligands network in 299 primary breast cancers. *Int J Biol Markers*. 2012; 27(2):e111–7. Epub 2012/04/17. doi: [10.5301/JBM.2012.9198](https://doi.org/10.5301/JBM.2012.9198) PMID: [22505232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22505232/)
51. Jackson SE, Chester JD. Personalised cancer medicine. *Int J Cancer*. 2015; 137(2):262–6. Epub 2014/05/03. doi: [10.1002/ijc.28940](https://doi.org/10.1002/ijc.28940) PMID: [24789362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24789362/)
52. Clarke CL, Graham JD. Non-overlapping progesterone receptor cistromes contribute to cell-specific transcriptional outcomes. *PLoS ONE*. 2012; 7(4):e35859. Epub 2012/05/01. doi: [10.1371/journal.pone.0035859](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035859) PMID: [22545144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22545144/)
53. Ballare C, Castellano G, Gaveglia L, Althammer S, Gonzalez-Vallinas J, Eyraes E, et al. Nucleosome-driven transcription factor binding and gene regulation. *Mol Cell*. 2013; 49(1):67–79. Epub 2012/11/28. doi: [10.1016/j.molcel.2012.10.019](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.019) PMID: [23177737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23177737/)
54. Tung L, Abdel-Hafiz H, Shen T, Harvell DM, Nitao LK, Richer JK, et al. Progesterone receptors (PR)-B and -A regulate transcription by different mechanisms: AF-3 exerts regulatory control over coactivator binding to PR-B. *Mol Endocrinol*. 2006; 20(11):2656–70. PMID: [16762974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16762974/)
55. Attardi BJ, Burgenson J, Hild SA, Reel JR, Blye RP. CDB-4124 and its putative monodemethylated metabolite, CDB-4453, are potent antiprogestins with reduced antigluco-corticoid activity: in vitro comparison to mifepristone and CDB-2914. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 188(1–2):111–23. PMID: [11911951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11911951/)
56. Chabbert-Buffet N, Meduri G, Bouchard P, Spitz IM. Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications. *Hum Reprod Update*. 2005; 11(3):293–307. PMID: [15790602](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15790602/)
57. Madauss KP, Grygielko ET, Deng SJ, Sulpizio AC, Stanley TB, Wu C, et al. A structural and in vitro characterization of asoprisnil: a selective progesterone receptor modulator. *Mol Endocrinol*. 2007; 21(5):1066–81. PMID: [17356170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17356170/)

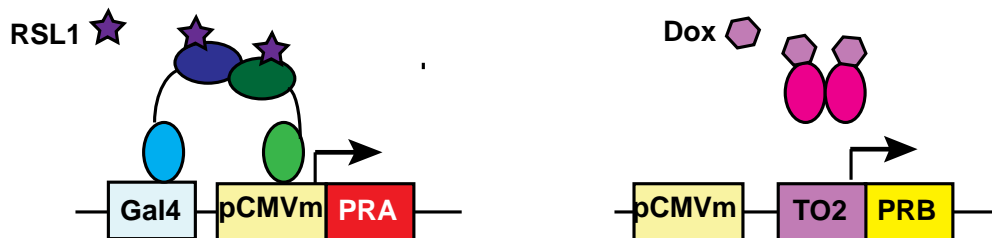
## Additional supplemental figures legends

**S1 Fig:** Schematic representation of stably transfected plasmids inserted into the parental clone 250 and the bi-inducible system applied to generate MDA-iPRAB cells for the conditional PR isoform expression in MDA-MB-231 cells (Khan et al., 2012). (a) The two regulatory proteins systems RheoSwitch and T-Rex were inserted in the same plasmid pZX-TR besides the zeocin resistance gene. (b) PRA and/or PRB expression was induced under the control of two promoters used to establish the secondary stable MDA-iPRAB cell line. Addition of RSL1 and/or Dox selectively induces PRA or PRB isoform, respectively. In their absence, no PR expression is induced.

### (a) Clone 250 - pZX-TR

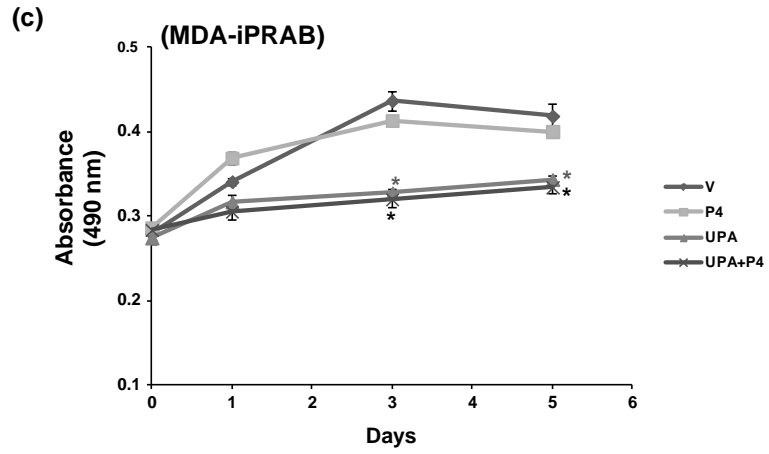
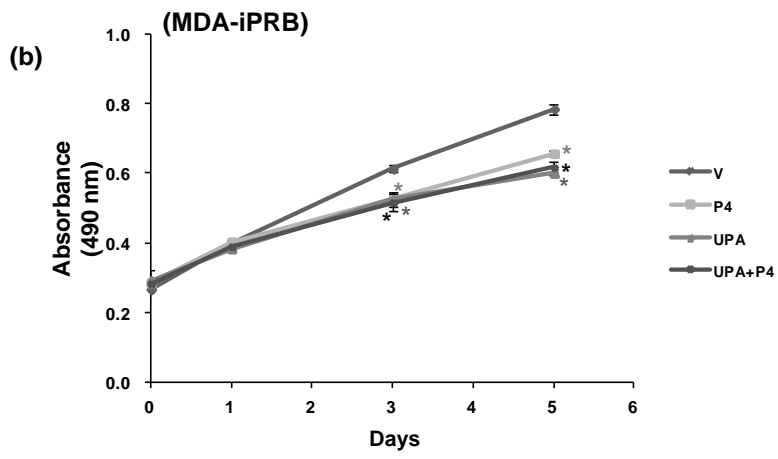
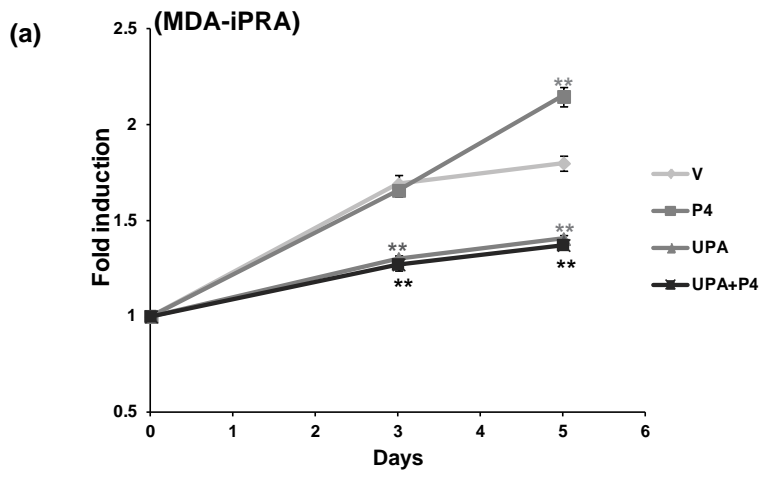


### (b) MDA-iPRAB stable cell line



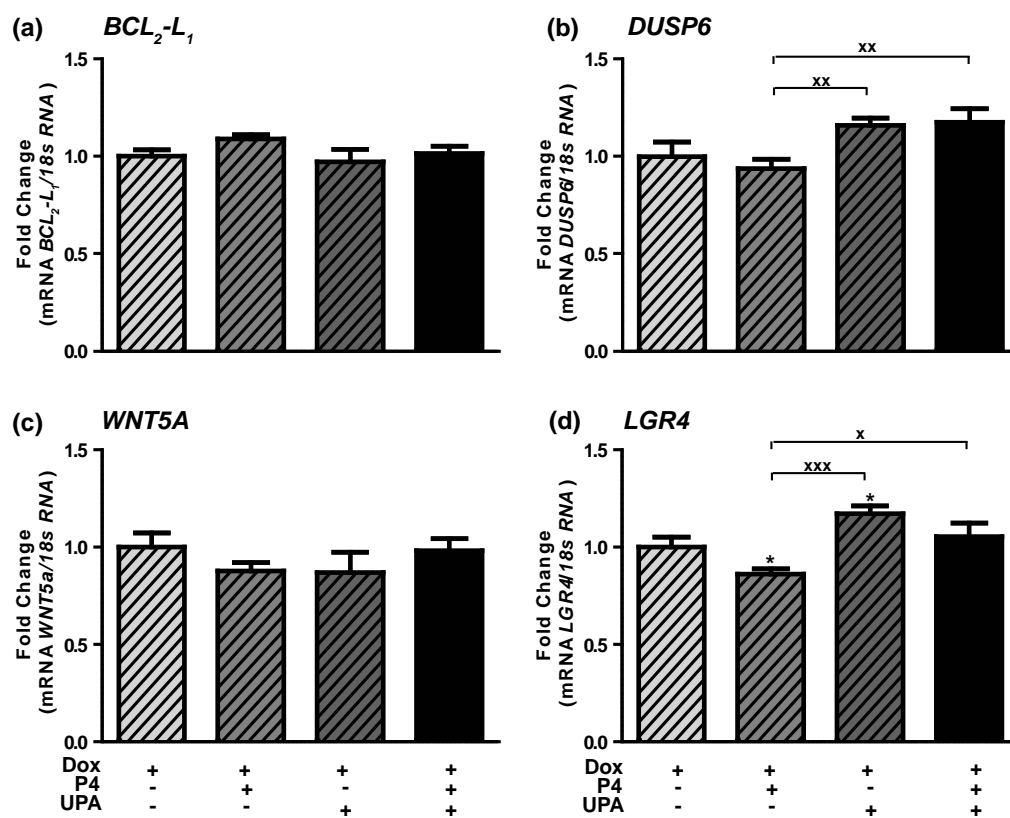
**S1 Fig**

**S2 Fig: P4 and UPA regulation of MDA-iPRA cell proliferation (a), MDA-iPRB cell proliferation (b) and MDA-iPRAB cell proliferation (c).** Following 24 h induction of PRA expression using RSL1 (0.5  $\mu$ M), and PRB expression using Dox (2  $\mu$ M) cultured MDA-iPRA in 96-well plates, were treated with vehicle, P4 (1 nM) and/or UPA (1  $\mu$ M) for 5 d. Cell proliferation assays were performed on day 0, 3 and 5 using CellTiter 96H AqueousOne Solution as described in Materials and Methods. Data are expressed as fold induction (a) and absorbances (b, c) compared to vehicle-treated MDA-iPRA cells (a) and vehicle-treated MDA-iPRB cells (b) and vehicle treated MDA-iPRAB cells (c) and are mean of 6 independent determinations. \*, \*\*, \*\*\* symbols indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively compared to the vehicle-treated MDA cells (non-parametric ANOVA test (Kruskal-Wallis)).



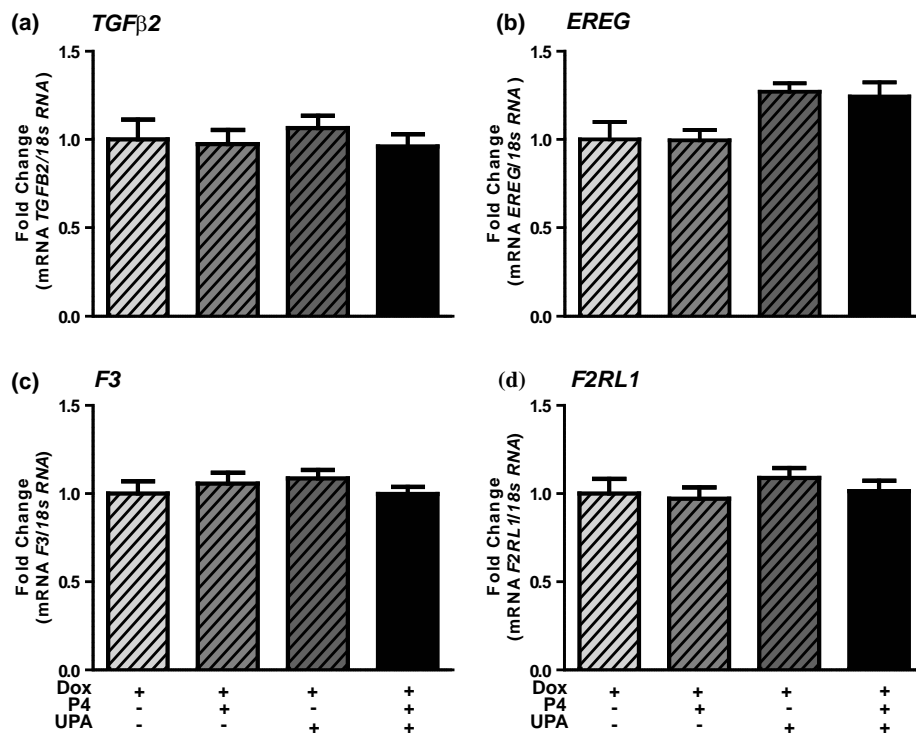
S2 Fig

**S3 Fig: Regulation of P4-dependent and PRA-selective upregulated genes (a) *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>*, (b) *DUSP6*, (c) *WNT5A*, (d) *LGR4* mRNA expression levels were determined in MDA-iPRB cells.** Cells were treated for 6 h with vehicle, P4 (1 nM) and/or UPA (1  $\mu$ M) in steroid-free medium, following 24 h induction of PRB expression using Dox (2  $\mu$ M). RT-qPCR analyses were performed as described in Materials and Methods. Data are expressed as fold induction compared to vehicle condition arbitrarily set at 1, and are means  $\pm$  SEM from three independent cell cultures measured in duplicate. \*, symbol indicates  $p < 0.05$  compared to the vehicle-treated MDA-iPRB cells while x, xx, xxx symbols indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively compared to the V or P4-treated MDA-iPRB cells (non-parametric Mann Whitney t-tests).



S3 Fig

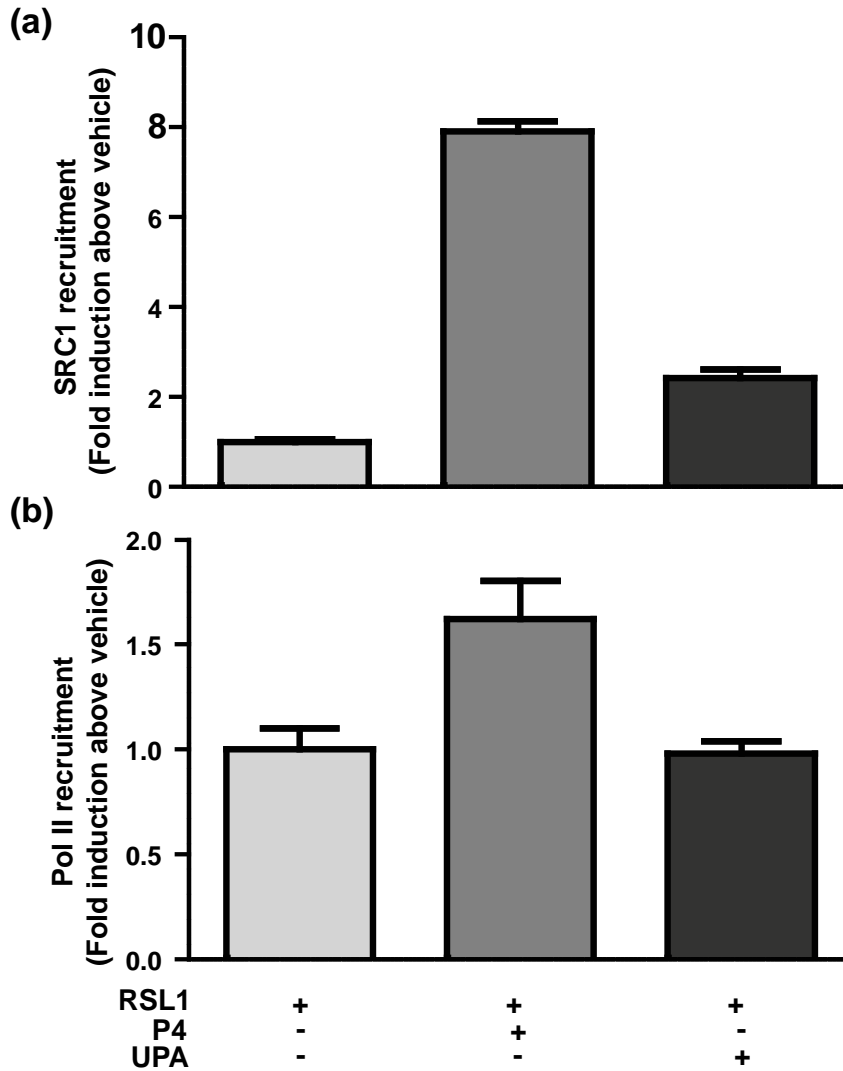
**S4 Fig: Regulation of P4-dependent and PRA-selective downregulated genes (a) *TGFβ2*, (b) *EREG*, (c) *F3*, (d) *F2RL1* mRNA expression levels were determined in MDA-iPRB cells. Cells were treated for 6 h with vehicle, P4 (1 nM) and/or UPA (1 μM) in steroid-free medium, following 24 h induction of PRB expression using Dox (2μM). RT-qPCR analyses were performed as described in Materials and Methods. Data are expressed as fold induction compared to vehicle condition arbitrarily set at 1, and are means ± SEM from three independent cell cultures measured in duplicate. No statistical difference was detected.**



S4 Fig

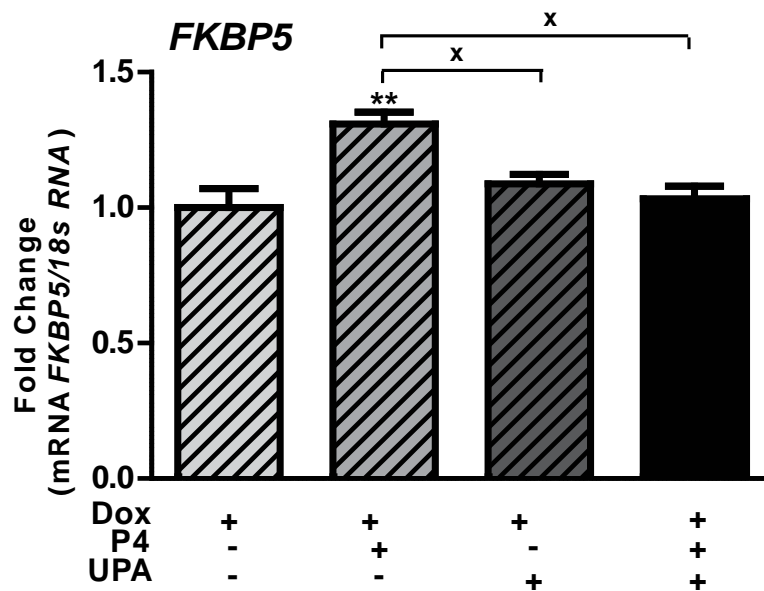
**S5 Fig: SRC1 and Pol II recruitment to the *BCL2-L1* gene.**

MDA-iPRA cells treated for 1 h with P4 (10 nM) or UPA (1  $\mu$ M), were fixed and lysed and chromatin extracts subjected to ChIP assays using SRC1 antibody (Rabbit anti-SRC1 antibody, M-341, sc-8995, Santa Cruz Biotechnology) or Pol II antibody (Rabbit anti-Polymerase II antibody, H-224, sc-9001, Santa Cruz Biotechnology). Immunoprecipitated and eluted DNA fragments were analyzed by real-time qPCR using primer pair encompassing genomic sequence of the +58 kb site of the *BCL2L1* gene. Histograms represent the fold induction of SRC1 (a) or Pol II (b) enrichment compared to vehicle condition arbitrary set at 1 and are means  $\pm$  SEM of three independent determinations.



**S5 Fig**

**S6 Fig: Regulation of *FKBP5*, a PRB-dependent gene.** mRNA expression levels were determined in MDA-iPRB cells. Cells were treated for 6 h with vehicle, P4 (1 nM) and/or UPA (1  $\mu$ M) in steroid-free medium, following 24 h induction of PRB expression using Dox (2 $\mu$ M). RT-qPCR analyses were performed as described in Materials and Methods. Data are expressed as fold change compared to vehicle condition arbitrarily set at 1, and are means  $\pm$  SEM from three independent cell cultures measured in duplicate. \*, \*\*, \*\*\* symbols indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively compared to the vehicle-treated MDA-iPRB<sup>-</sup> cells, while x, xx, xxx symbols indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively compared to the V or P4-treated MDA-iPRB cells (non-parametric ANOVA test (Kruskal-Wallis)).



**S6 Fig**



Gene	Accession Number	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (3'→5')
<i>ADRB2</i>	NM_000024.5	<i>ATTGAGACCCTGTGCGTGAT</i>	<i>AAGGCCTGACACAATCCACA</i>
<i>BCL2L1</i>	NM_138578.1	<i>CTGGGTTCCCTTTCCTTCCA</i>	<i>CCTGGTCCTTGCATCTTTATC C</i>
<i>BCL2L1 (ChIP)</i>	NC_000020.11	<i>GACAGGGTTTACTGGGTA</i>	<i>GTGTAGAGCAGAGCTCAGTA</i>
<i>DUSP1</i>	NM_004417.3	<i>GTGAAGCAGAGGCGAAGCAT</i>	<i>GGGATGGAGACGGGGAAAGTT</i>
<i>DUSP6</i>	NM_001946.2	<i>TCACCCCAATTGCGCAA</i>	<i>TTCTTGCCCCGGGCTTCAT</i>
<i>EREG</i>	NM_001432.2	<i>TGCCTGGGTTCCATCTTCT</i>	<i>TTGAGCCACACGTGGATTGT</i>
<i>F2RL1</i>	NM_005242.4	<i>ATGGGGCACTCCAGGAAGAA</i>	<i>AGAGCTGCTCAGGCAAAACA</i>
<i>F3</i>	NM_001993.4	<i>GCAGTGATCCCTCCCAGAACA</i>	<i>TGACCACAAATACCACAGCT CCA</i>
<i>FOSB</i>	NM_006732.2	<i>GAAGAGGAGAAGCGAAGGGT</i>	<i>CCACCAGCACAAACTCCAGA</i>
<i>GJB2</i>	NM_004004.5	<i>ACTGAGACCCCAGGCTGTTA</i>	<i>CCTCTGTGGAACCTGGCTTT</i>
<i>LGR4</i>	NM_018490.2	<i>TGAAGCCATTCGAGGGCTGA</i>	<i>GCTGTTGTCATCCAGCCACA</i>
<i>TFPI2</i>	NM_006528.3	<i>GCTCAGGAGCCAAACAGGAAA</i>	<i>CAGCTCTGCGTGTACCTGTC</i>
<i>TGFB2</i>	NM_001135599.2	<i>CGAGAGGAGCGACGAAGAGT</i>	<i>GGACTGTCTGGAGCACAAAGC</i>
<i>TNFRSF11A</i>	NM_003839.3	<i>TCAGTACACACCGCAAACCTTT</i>	<i>GGGTAGCATATCTTCTGG AAATG</i>
<i>WNT5A</i>	NM_003392.4	<i>GCACCAGAGCAGACAACCTATT</i>	<i>AAACGTGGCCAGCATCACAT</i>

**S1 Table: List of primer sequences.**

**Table 1: Up-regulated PRA – target genes in the presence of progesterone**

Class	Gene	Name	FC	FI	Function
A+&AB+	<i>DUSP6</i>	<i>Dual specificity phosphatase 6</i>	2	1.5	Transcriptional target of P53 Interaction with PRB: proliferative transcriptional programs
A+&AB+	<i>BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub></i>	<i>Bcl-2-like protein 1</i>	1.5	1.2	Overexpression of Bcl-xL: loss of apoptosis
A+&AB+	<i>TNFRSF11A</i>	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK)</i>	1.9	1.6	Mammary cell proliferation, migration, cell invasion.
A+&AB+	<i>WNT5A</i>	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 5A</i>	1.8	1.3	Tumor suppressor gene Proliferation, differentiation, migration, adhesion , polarity
A+&AB+	<i>LGR4</i>	<i>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4 (GPR48)</i>	1.8	1.6	Promoting cancer cell proliferation (Wnt signaling), Invasiveness and metastasis
A+&AB+	<i>FOSB</i>	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B</i>	1.8	1.5	Reduced FosB expression: dedifferentiation (breast tumorigenesis)
A+&AB+	<i>TFPI2</i>	<i>Tissue factor pathway inhibitor 2</i>	2.2	2.6	Low expression: breast cancer progression and poor outcome
A+&B+ & AB+	<i>DUSP1</i>	<i>Dual specificity phosphatase 1</i>	1.6	1.6	Cell cycle, dephosphorylation of MAP kinase. Antiproliferative actions of PR

**Table 1: Upregulated PRA-target genes in the presence of P4:** MDA-iPRAB cells were cultured during 24 h in steroid-free medium containing RSL1 (0.5  $\mu$ M) and/or Dox (2  $\mu$ M) to induce expression of PRA and/or PRB. Cells were treated by vehicle or P4 (1 nM) for 6 hours and a genome wide transcriptomic studies was performed as described in (Khan et al., 2012). A total of 999 genes were affected by PR expression. These genes were separated into three groups: A and B and AB (co-expressed at similar levels relative to physiological conditions) regrouping genes that are regulated by either by PRA, PRB or PRAB. Tables above represent class A+ genes regulated by PRA in the presence of the ligand; Class A+&AB+, genes responsive to liganded PRA and their expression may or may not be influenced by PRB co-expression; Class A $\pm$ &AB $\pm$  genes responsive to both liganded and unliganded PRA, and their expression may be influenced by PRB co-expression; Class A+&B+& AB+, genes that are commonly regulated by liganded PRA, PRB and PRAB. FC calculated either by microarray studies or by RT-qPCR analysis and their function in the cancer. FC: Transcriptional Fold Change calculated by microarray studies (FC\*) and by RT-qPCR (FI, Fold Induction).

**Table 2: Down-regulated PRA – target genes in the presence of progesterone**

<i>Class</i>	<i>Gene</i>	<i>Name</i>	FC	FI	Function
A+	<i>F2RL1</i>	<i>Coagulation factor II receptor-like 1</i>	-1.9	0.7	Constitutive migration of MDA MB-231 Up regulation of VEGF
A+&AB+	<i>EREG</i>	<i>Epregrulin</i>	-1.7	0.7	Breast tumor progression (paracrine mechanism)
A+&AB+	<i>F3</i>	<i>Coagulation factor III (tissue factor)</i>	-2.4	0.7	Promigratory, invasive, proangiogenic phenotype
A+&AB+	<i>TGFB2</i>	<i>Transforming growth factor-beta 2</i>	-1.8	0.6	Breast cancer invasion Tumor suppressive (early stages) Malignant conversion and progression (later stages)
A+&AB+	<i>ADRB2</i>	<i>Beta-2 adrenergic receptor</i>	-1.7	0.6	Genetic variation and polymorphism: risk for breast cancer
A+&AB+	<i>GJB2</i>	<i>Gap junction beta-2 protein, connexin 26</i>	-1.8	0.5	Invasion of ductal breast carcinomas

**Table 2: Downregulated PRA-target genes in the presence of P4.** MDA-iPRAB cells were cultured during 24 h in steroid-free medium containing RSL1 (0.5  $\mu$ M) and/or Dox (2  $\mu$ M) to induce expression of PRA and/or PRB. Cells were treated by vehicle or P4 (1 nM) for 6 hours and a genome wide transcriptomic studies was performed as described in (Khan et al., 2012). A total of 999 genes were affected by PR expression. These genes were separated into three groups: A and B and AB (co-expressed at similar levels relative to physiological conditions) regrouping genes that are regulated by either by PRA, PRB or PRAB. Tables above represent class A+ genes

regulated by PRA in the presence of the ligand; Class  $A+ \& AB+$ , genes responsive to liganded PRA and their expression may or may not be influenced by PRB co-expression; Class  $A\pm \& AB\pm$  genes responsive to both liganded and unliganded PRA, and their expression may be influenced by PRB co-expression; Class  $A+ \& B+ \& AB+$ , genes that are commonly regulated by liganded PRA, PRB and PRAB. FC calculated either by microarray studies or by RT-qPCR analysis and their function in the cancer. FC: Transcriptional Fold Change calculated by microarray studies (FC\*) and by RT-qPCR (FI, Fold Induction).

## Discussion

Dans cette partie nous avons exploité un modèle de lignée cancéreuse mammaire, la lignée MDA-iPRAB. La prolifération cellulaire de cette lignée est stimulée par P4 *via* l'isoforme PRA. En revanche, lors de l'induction de l'expression de l'isoforme PRB, P4 exerce une action antiproliférative. La lignée MDA-iPRAB provient de la lignée cellulaire mammaire de type basale (Claudin-low), la lignée MDA-MB231. Cette lignée n'exprime ni PR, ni ER et ni HER2. Elle présente une mutation du gène *P53*, une absence de mutations des gènes *BRCA1/2*, une expression de EGFR et/ou les cytokératines 5/6, une expression élevée de Ki67 et une absence de réponse aux traitements endocriniens (Grigoriadis et al., 2012; Holliday and Speirs, 2011; Kao et al., 2009).

Préalablement, dans notre recherche d'un modèle de prolifération de cellules mammaires induite par un ligand agoniste de PR, nous avons évalué les deux lignées T47D et BT474 (Chalbos et al., 1982; Liang et al., 2010; Liang et al., 2007; Liang et al., 2005). Ces deux lignées diffèrent de la lignée MDA-iPRAB, par leur type et leurs profils moléculaire. La lignée T47D est d'origine mammaire épithéliale luminal A (carcinome canalaire). Elle exprime ER et PR. Elle présente une mutation du gène *P53*, une absence de mutations des gènes *BRCA1/2* et *P53*, une expression faible de Ki67, une absence d'expression de HER2 et une réponse aux traitements endocriniens. (Grigoriadis et al., 2012; Holliday and Speirs, 2011; Kao et al., 2009).

La lignée BT 474, de type luminal B (carcinome canalaire), exprime PR et ER d'une façon endogène. Elle se caractérise par une surexpression de HER2, une mutation faux-

sens du gène *P53*, une absence de mutation du gène *BRCA1* (par contre le gène *BRCA2* est muté), une expression élevée de Ki67 et une réponse aux traitements endocriniens (trastuzumab) (Grigoriadis et al., 2012; Holliday and Speirs, 2011; Kao et al., 2009).

Après avoir effectué des tests de la prolifération cellulaire, nous avons démontré que les œstrogènes (E2) (1 nM) stimulent, seuls ou en association avec P4 (1 nM), la prolifération cellulaire de ces deux. Dans ces deux lignées, nous n'avons pas pu établir de conditions expérimentales simples et reproductibles dans lesquelles soit observée une prolifération cellulaire induite par la progestérone.

Dans la lignée MDA-iPRA, nous avons observé, de façon reproductible, une prolifération cellulaire induite par la progestérone dans les conditions spécifiques détaillées 2.5% de sérum de veau foetal déplété en stéroïdes (DMEM déstéroïdé) et progestérone (1 nM). Cette prolifération est relativement peu active ce qui est cohérent avec le phénotype moins agressif des tumeurs hormono-dépendantes en clinique. Elle permet toutefois de conduire les expériences de façon satisfaisante. Dans ce même modèle cellulaire l'expression isolée de PRB s'accompagne de l'induction de la prolifération par la progestérone.

La stimulation de la prolifération cellulaire par les progestatifs dépend des ligands, naturels ou de synthèse, de leur dose, de leur mode d'administration et des voies de signalisation avec les facteurs de croissance (Giulianelli et al., 2013), ainsi que de leur récepteur PR. Les actions de PR dépendent du tissu, mammaire ou reproductif, normal ou néoplasique. Elles sont spécifiques des isoformes, indépendantes ou non des ligands et de leur mode d'administration (continu ou cyclique). Elles dépendent aussi des œstrogènes (E2) et de ses récepteurs ER. Les données cliniques et précliniques concernant l'impact de l'expression relative des isoformes de PR sont limitées (Hagan

and Lange, 2014; Lanari et al., 2012; Mote et al., 2015). Or, la lignée MDA-iPRAB, (Khan et al., 2012), permet d'évaluer la sélectivité et la spécificité des isoformes de PR, de leur ligands, indépendamment de E2 et ER, ER n'étant pas exprimé et la prolifération de la lignée étant indépendante de E2.

PRA et PRB ont des activités transcriptionnelles distinctes. Elles régulent la transcription de gènes qui se chevauchent, ou sont spécifiques de chaque isoforme, elles diffèrent aussi dans la reconnaissance des séquences et/ou leur interaction avec les facteurs de croissance (Giulianelli et al., 2013; Hagan and Lange, 2014; Khan et al., 2012; Knutson and Lange, 2014; Richer et al., 2002). Une étude transcriptomique a identifié plus de 300 gènes régulés par P4, 25 via PRAB, 229 via PRB et 83 via PRA (Tung et al., 2006). La plupart des études ont démontré que PRB en présence de P4 est un transactivateur plus fort que PRA, qui en absence de P4, s'est avérée un transactivateur plus efficace que PRB (Jacobsen et al., 2005). Une analyse transcription a été effectuée sur la lignée MDA-iPRAB, et a identifié 1014 gènes régulés par PRA et/ou PRB en présence ou non de P4 (Khan et al., 2012). Cette étude nous a donc permis d'évaluer l'impact du rapport PRA/PRB sur la régulation différentielle de gènes et les conséquences fonctionnelles de l'altération du rapport PRA/PRB, en faveur de PRA, surexprimée précocement dans la tumorigénèse mammaire. L'expression différentielle de PRA et PRB dans le cancer de sein invasif primaire est une caractéristique intrinsèque de la tumeur, non altérée par les facteurs hormonaux endogènes et de la reproduction, et non associée à la taille de la tumeur (Mote et al., 2015). En revanche le traitement hormonal de la ménopause favorise l'expression de PRB. La prédominance de l'isoforme PRA distingue les femmes qui présentent une

rechute après le traitement, due à des mécanismes de résistance, induites par exemple par une mutation d'ER (Li et al., 2013).

En se basant sur la prolifération cellulaire stimulée par P4 dans la lignée MDA-iPRA, et la surexpression de PRA dans les tumeurs agressives, résistantes aux anti-œstrogènes et répondent aux antiprogestatifs, nous nous sommes intéressés à un panel de gènes issus du transcriptome (Khan et al., 2012), sélectionnés parce qu'ils sont régulés par PRA en présence de P4, et impliqués dans la tumorigenèse mammaire. Parmi ces gènes cibles de PRA, le gène *BCL2-L1*, un des régulateurs essentiels de la mort cellulaire programmée, la prolifération cellulaire et l'apoptose étant impliqués dans l'homéostasie tissulaire et tumorale. La dérégulation de l'expression de *BCL2-L1* contribue à la transformation cellulaire oncogénique (Kirkin et al., 2004; Leibowitz and Yu, 2010). Dans la lignée T47D, les progestatifs régulent l'expression de *BCL2-L1* (Moore et al., 2000) et dans la lignée MDA-iPRA, P4 stimule l'expression de ce gène en transcrit et en protéine, alors que cette expression n'est pas régulée par P4 dans la lignée MDA-iPRB. Nous avons sélectionnés gènes cibles de PRA en présence de P4, comme les gènes *WNT5A* et *LGR4*. L'expression de ces deux gènes permet d'établir un lien entre PRA, l'invasion et la métastase de cancer de sein. Les ligands Wnts activent deux voies de signalisation, dépendantes ou non de la  $\beta$ -caténine (Angers and Moon, 2009; He et al., 2004; Kikuchi et al., 2011; Kohn and Moon, 2005; Veeman et al., 2003). Les membres de la famille Wnt régulent la polarité, la prolifération et la survie cellulaire, régulation aberrante de Wnts est observée en situation pathologique notamment tumorale (Clevers, 2006). *WNT5A* est un membre de la voie de signalisation non canonique, associée aux molécules d'adhésion, aux protéases et aux facteurs angiogéniques durant le développement du cancer mammaire et de la métastase

(Valkenburg et al., 2013; Zerlin et al., 2008). *WNT5A* stimule l'invasion, la prolifération et la progression tumorigénique des cellules cancéreuses (Shojima et al., 2015). Il fonctionne comme un suppresseur de tumeur (Leek and Harris, 2002; Nishita et al., 2010).

*LGR4* est un récepteur de R-spondin, relayant la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine *via* son interaction avec le récepteur Frizzled (FZD) (Glinka et al., 2011). P4 stimule la voie de signalisation de Wnt/  $\beta$ -caténine, contrôlant ainsi la prolifération cellulaire utérine et la décidualisation. Nous décrivons ici un rôle stimulateur de P4 dans la régulation de l'expression de *WNT5A* et *LGR4* dans la lignée MDA-iPRA.

*DUSP6* (the dual specificity phosphatase 6, MKP3), est un autre gène stimulé par P4 corrélant de nouveau un rôle de PRA dans la prolifération cellulaire stimulée par P4 dans la tumorigénèse mammaire. Une interaction a été étudiée entre PRB et *DUSP6* (Hagan et al., 2013). Cette interaction est nécessaire pour la phosphorylation de PR sur la sérine Ser<sup>81</sup>, activant ainsi le programme transcriptionnel de la prolifération dans les cellules cancéreuses mammaires. Ces gènes sont spécifiquement régulés par l'isoforme PRA, ce qui établit un lien avec les processus d'invasion et de métastase. Ceci permet la caractérisation moléculaire des tumeurs mammaires, où l'évaluation d'un panel de gènes cibles de PRA est utilisée pour identifier les tumeurs mammaire de mauvais pronostic.

Outre les gènes stimulés par P4 dans la lignée MDA-iPRA, nous avons sélectionné quelques gènes dont l'expression est réprimée par P4. Parmi ces gènes, le *TGF $\beta$ 2* qui possède deux rôles dans le cancer de sein. Il agit comme un suppresseur de tumeur au début de la tumorigénèse mammaire, et il stimule la croissance dans les stades avancés du cancer mammaire (Derynck and Akhurst, 2007; Massague, 2008). *TGF $\beta$ 2* présente



un rôle dans la migration, la progression et la prolifération cellulaire et dans l'angiogenèse (Nagaraj and Datta, 2010; Ouhtit et al., 2013). Une cible thérapeutique prometteuse de cancer de sein est le gène *F2RL1* ou *PAR2* (Kakarala et al., 2014). Son expression est stimulée dans la lignée MA-MB 231, et dans d'autres cellules tumorales mammaires. Il induit l'expression de VEGF (Kakarala et al., 2014), jouant ainsi un rôle dans l'angiogenèse. Le facteur de coagulation F3 ou TF (Tissu facteur) est parmi les gènes inhibés par PRA en présence de P4. *F3* est surexprimé dans les tissus cancéreuses mammaires (Koizume and Miyagi, 2014). L'épiréguline ou EREG, un membre de la famille EGF (Epidermal Growth Factor), figure parmi ces gènes. C'est un ligand d'EGFR et d'ERBB (v-erb-b2 oncogene homolog). Les isoformes de PR corrént négativement avec l'expression des gènes liés à l'agressivité (EREG) (Lindet et al., 2012).

Le mécanisme classique génomique de l'induction de l'expression des gènes par PR se manifeste par la liaison du complexe ligand-PR à l'élément de réponse PRE localisé au niveau de la région promotrice/enhancer des gènes cibles. Les études de localisation de génome entier ont permis d'identifier des sites cis-régulatrice dans des régions non exploitées du génome, par exemple au niveau de la région 3' des gènes cibles, nommées régions intragéniques. Le gène *Bcl-x*, composé de trois promoteurs distincts et deux exons codants séparés par un long intron de 55 kb, code par épissage alternatif pour *BCL-xL* (facteur anti-apoptotique), et *Bcl-xS* (inducteur de l'apoptose) (Bertucci et al., 2013). Le gène *BCL-x* contient dans ses régions intragéniques des sites de liaison à PR (PRbs ; PR binding sites). PRbs régulent l'induction de la transcription dépendante de l'hormone dans les cellules cancéreuses mammaires. Nous avons sélectionné le PRbs situé à +58 kb en aval du site d'initiation de la transcription vers la région 3', un

site de liaison actif et dépend de l'hormone. Les progestatifs renforcent l'enrichissement du recrutement de PR sur ce site, en revanche il n'existe pas des études sur la spécificité de recrutement des deux isoformes (Tung et al., 2006). Le coactivateur SRC1 et Pol II (ARN polymérase) sont recrutés au niveau de ce site, et les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) montrent que P4 stimule le recrutement de l'isoforme PRA, SRC1 et Pol II.

Pour évaluer l'activité des antagonistes de PR sur la prolifération cellulaire de la lignée MDA-iPRA stimulée par P4, et la régulation de l'expression du facteur anti-apoptotique *BCL2-L1*. Les antiprogestatifs inhibent l'expression de PR, bloquent AR, bloquent le cycle cellulaire en phase G0/G1, induisent la différenciation terminale et l'apoptose, down-régulent l'expression de Bcl-2, induisent l'expression de TGFβ, bloquent la sécrétion de VEGF induite par P4, et stimulent la translocation de PKC (Klijn et al., 2000).

Etant donné que dans les lignées cellulaires cancéreuses mammaires, les antiprogestatifs exercent un effet apoptotique via l'arrêt de la croissance et l'activation des caspases (Engman et al., 2008; Gaddy et al., 2004), nous avons utilisé le modulateur sélectif de PR, l'Ulipristal acétate (UPA) commercialisé récemment dans le traitement des myomes utérins avec un projet d'utilisation au long cours. Nous avons donc souhaité mener une première évaluation de l'impact potentiel sur des cellules malignes préexistantes non diagnostiquées d'un tel traitement. Le RU486 (ou mifépristone) qui est le chef de file de la famille, doté d'activités antiprogestatives et antigluco-corticoides marquées, a été évalué dans des modèles cellulaires animaux et cliniques de cancer du sein (Klijn et al., 1989; Klijn et al., 1994; Klijn et al., 2000). Le RU 486 inhibe globalement la prolifération des cellules cancéreuses mammaires dans

l'ensemble de ces modèles, et n'a pas d'effet prolifératif sur le tissu mammaire humain (Engman et al., 2008) (ref Gemzell).

L'UPA inhibe la prolifération des cellules leiomyomateuses utérines et y induit l'apoptose, de façon spécifique par rapport au tissu sain adjacent (refs maruo). Il se lie à PR avec une forte affinité et à GR à une faible affinité (Attardi et al., 2002; Donnez et al., 2015; Donnez et al., 2012a; Donnez et al., 2012b; Donnez et al., 2014; Xu et al., 2005). L'UPA agit comme un antiprogestatif à activités mixtes agonistes/antagonistes. Enfin l'UPA n'a pas d'effet prolifératif sur les cellules mammaires saines (Communal et al., 2012).

D'une façon intéressante, nous avons démontré que l'UPA inhibe la prolifération cellulaire de la lignée MDA-iPRAB, spécifique de PRA et indépendante de la présence de P4, décrivant ainsi un rôle antiprolifératif d'UPA dans cette lignée. Les expériences de CHIP menées sur la lignée MDA-iPRA montrent qu'UPA inhibe partiellement le recrutement de PRA, SRC1 et Pol II sur le PRbs du gène *BCL2-L1* en présence de P4, par contre UPA seul stimule un faible recrutement de PRA et SRC1. A noter que UPA a un effet inhibiteur sur la régulation de l'expression de *BCL2-L1* (protéine et messenger), ceci corrèle avec l'inhibition de la prolifération cellulaire de la lignée MDA-iPRA comme a été déjà décrit dans d'autres modèles de tumeurs *in vivo* (Xu et al., 2005). P4 *via* l'expression de PRA est associée à une stimulation de la prolifération cellulaire. UPA est capable d'antagoniser l'effet de PRA, suggérant un rôle potentiel dans le traitement thérapeutique adjuvant antihormonal de cancer de sein et plus particulièrement dans les tumeurs PR<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup>.

Notre étude a donc permis de mettre au point un modèle de prolifération cellulaire mammaire induit pas la progestérone, indépendant de l'œstradiol et spécifique de l'isoforme A du récepteur de la progestérone.

Dans ce modèle nous avons montré que l'UPA un modulateur du récepteur de la progestérone sélectif et utilisé en routine clinique pour le traitement des fibromes n'induisait pas de prolifération cellulaire. Au contraire celle-ci est réduite et l'expression de gènes de la cascade apoptotique est induite. Enfin nous avons contribué à élucider le mécanisme moléculaire de la régulation d'expression du gène anti-apoptotique *BCL2-L1* par l'UPA en présence de PRA et mis en évidence qu'en dépit du recrutement de PRA et de son corégulateur SRC1, le recrutement de la RNA polymérase n'a pas lieu.

Pour aller plus loin dans l'exploration de l'impact des molécules antiprogestatives dans le tissu mammaire tumoral, nous avons utilisé un modèle de xénogreffe de tumeur mammaire humaine dit modèle préclinique, plus proche de la réalité clinique, mis au point dans un but de screening thérapeutique



## **Chapitre 2: Etude in vivo: modèle de xénogreffe de tumeur humaine mammaire chez des souris nude**



## Introduction

Le traitement de cancer de sein actuel par la thérapie adjuvante actuelle (la chimiothérapie, hormonothérapie (les antiœstrogènes..), le trastuzumab...), n'est pas efficace suite à une rechute précoce après le traitement. Il est nécessaire donc de concevoir de nouveaux modèles d'études précliniques ciblant le cancer de sein dépendant des progestatifs et des œstrogènes et de développer de nouvelles molécules antiprogestatifs ayant des activités antitumorales.

Une des premières étapes dans ce long processus est d'évaluer les antiprogestatifs dans des modèles expérimentaux chez les animaux. Les études ont commencé chez les rats par deux modèles de carcinogénèse mammaire induits par les carcinogènes le DMBA et le MNU (*N*-methyl nitrosourea). La progestérone (P4) stimule la carcinogénèse induite par le DMBA (Wiehle et al., 2007), et le RU486 retarde le développement tumoral et inhibe la croissance tumorale (Bakker et al., 1987) tout en réduisant d'une façon significative l'incidence tumorale, la multiplicité et la taille des tumeurs (Chatterton et al., 2002; Michna et al., 1989). Le RU486 est plus efficace que les fortes doses du progestatif l'acétate mégestrol et faiblement plus efficace que le tamoxifène. D'autres antagonistes de P4 ont été déjà testés comme l'ORG 31710, l'onapristone et le CDB 4124. L'ORG 31710 a un effet anti-tumoral dépendant de la dose et il est plus efficace que le RU486. Des recherches précliniques ont démontré que le traitement anti-progestationnel avec l'onapristone s'est avéré présentant une puissante activité anti-tumoral plus forte que le tamoxifène ou l'ovariectomie dans les tumeurs mammaires murines MXT (le méthotrexate est un agent cytostatique utilisé en thérapie chimique adjuvante) et les tumeurs mammaires induites par le DMBA et le MNU chez le rat. La



capacité de la réduction tumorale de l'onapristone est renforcée par l'antioestrogène ICI 164384 dans le modèle tumoral murin induit par le MXT (Nishino et al., 1994). Le traitement par le CDB 4124 (Wiehle et al., 2007) réduit le nombre des tumeurs induites par le DMBA en empêchant la formation de nouvelles tumeurs induites par P4 qui stimule la prolifération cellulaire (Ki67) et diminue l'apoptose dans ce modèle. Le CDB 4124 est plus efficace que le RU486 aux mêmes doses dans la régression tumorale. Il diminue la proportion des cellules PR+ et empêche la croissance des cellules T47D (ER+, PR+) tout en induisant l'apoptose et inhibant leur prolifération (Wiehle et al., 2011). Le CDB 4124 testé dans le deuxième modèle MNU inhibe d'une façon dose dépendante la carcinogénèse mammaire (Christov et al., 2007; Christov et al., 2003; Wiehle et al., 2011). Chez la souris, dans le modèle MXT de tumeur mammaire, le traitement par l'onapristone ou le RU486 le jour 1 qui suit la transplantation, inhibe la greffe tumorale et les effets stimulateurs de E2 et du MPA.

La monothérapie par tamoxifène ou RU486 présente un effet anti-tumoral et une diminution de la croissance tumorale, cet effet est additif lors de l'association antiprogestative-anti-œstrogénique (le RU486 et le tamoxifène) et la régression tumorale est de 50%. L'efficacité antitumorale accrue de la thérapie combinée s'explique par l'augmentation de l'expression de PR induite par le tamoxifène. Ce dernier annule les effets des niveaux élevés d'E2 induits par le RU486. Cet effet additif est plus important et plus efficace lors de la combinaison de l'ORG 31710 et le tamoxifène avec une régression tumorale de 64%. Cette régression tumorale atteint 75% lorsque le RU486 est associé avec l'analogue de la GnRH. La combinaison de l'onapristone et du tamoxifène s'accompagne d'une diminution des niveaux de P4 circulants. L'Onapristone ou le RU486 seuls ou en association avec le tamoxifène

inhibent la croissance de la lignée MCF7 *in vivo*. Le traitement antiprogestatif active l'apoptose et bloque les cellules tumorales en phase G0-G1 du cycle cellulaire. La régression tumorale s'accompagne de nécrose, de cytolyse.

L'expression des récepteurs hormonaux ER et PR est inhibée durant le traitement par les antagonistes de la progestérone/ les modulateurs du récepteur de la progestérone associés au tamoxifène. Le tamoxifène stimule l'expression de PR, par contre le RU486 seul induit une downrégulation de l'expression de PR, et son association avec le tamoxifène inhibe l'expression de PR et ER.

Une autre approche pour évaluer les progestatifs et leurs antagonistes dans la prolifération tumorale mammaire consiste à xéno greffer les lignées cellulaires tumorales mammaires (T47D, BT474) dans des souris nude. Ces tumeurs stimulées par P4 ou MPA, étaient sensibles au RU486 et induisent l'expression de VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Liang et al., 2010; Liang et al., 2007; Liang and Hyder, 2005; Liang et al., 2005). Le RU486 provoque l'arrêt de la progression cellulaire tumorale dépendante des progestatifs, démontrant l'implication de PR.

Les modèles d'études actuels du cancer du sein utilisés en routine, comme les cultures primaires *in vitro* et les xéno greffes de lignées cellulaires dans des souris nude, n'arrivent pas à reproduire le microenvironnement de la tumeur et les interactions cellulaires tumorales avec le système immunitaire (divergence des lignées cellulaires, réduction du profil d'expression génétique, perte irréversible des propriétés biologiques et perte de l'hétérogénéité de la tumeur..). Ainsi ils sont faiblement prédictifs de l'activité des drogues testés dans les essais cliniques. Récemment, une nouvelle méthode de xéno greffe de tumeurs consiste à transférer les tumeurs primaires directement de la patiente dans des souris immunodéficientes après une digestion

(mécanique ou enzymatique) pour l'ablation des zones nécrotiques. Les xénogreffes de tumeurs dérivées des patientes subissent de multiples passages successifs d'une souris à une autre. Ces xénogreffes multiples préservent la variabilité intrinsèque de la tumeur et son hétérogénéité. Ce modèle appelé aussi modèle préclinique permet de maintenir et de conserver l'hétérogénéité moléculaire et histologique, les profils d'expression génétique, les polymorphismes nucléotidiques et les mutations ainsi que la capacité métastatique de la tumeur d'origine. Les modèles de cancer de sein sont difficiles à créer à cause des multiples sites possibles de transplantation (coussinets adipeux mammaire, interscapulaire.....) et le statut des récepteurs hormonaux. La prise de la greffe de cancer de sein est faible (10 à 20%) dû à l'expression d'ER dans la tumeur et aux niveaux d'E2 circulants dans l'hôte. Elle varie en fonction du grade et des sous type tumoraux. La capacité de la prise de la tumeur et sa croissance chez la souris dépend de la nature et la biologie intrinsèque de la tumeur d'origine. Ces tumeurs montrent une augmentation de l'expression des gènes humains liés à la prolifération et à l'angiogénèse et une diminution de l'expression des gènes du stroma, du système immunitaire et de la matrice extracellulaire humains. Les altérations de nombre de copies des gènes des xénogreffes résultent de la progression tumorale et non pas des artefacts de transplantation. Ce modèle de xénogreffe est efficace dans le cadre de développement des médicaments, l'identification de nouveaux cibles et de nouveaux biomarqueurs, l'optimisation d'un programme de traitement, l'évaluation de la réponse et des mécanismes de la résistance; en revanche, il possède des limites y compris le coût, la longue période de latence, sa disponibilité..... (Landis et al., 2013; Marangoni and Poupon, 2014; Siolas and Hannon, 2013).

**Article 2: Anti-tumoral effects of antiprogestins in a patient derived breast cancer xenograft model**

## **Anti-tumoral effects of antiprogestins in a patient-derived breast cancer xenograft model**

Nathalie Esber<sup>1,2,3</sup>, Clément Cherbonnier<sup>4</sup>, Michèle Resche-Rigon<sup>3</sup>, Jean-Daniel Brion<sup>5</sup>, Mouad Alami<sup>5</sup>, Jérôme Fagart<sup>1,2</sup>, Hugues Loosfelt<sup>1,2</sup>, Marc Lombès<sup>1,2,6</sup>, Nathalie Chabbert-Buffet<sup>7,8\*</sup>

**Abbreviated title:** Antiprogestins and breast cancer xenograft

<sup>1</sup>Inserm UMR-S 1185, Fac Med Paris Sud, Université Paris-Saclay, 63 rue Gabriel Péri, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France;

<sup>2</sup>Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, UMR-S1185, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France;

<sup>3</sup>HRA-Pharma, 15 rue Béranger, 75003 Paris, France;

<sup>4</sup>Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Hôpitaux Universitaires Est Parisien site Tenon, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 4 Rue de la Chine, 75020 Paris, France;

<sup>5</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, BioCIS, Faculté de Pharmacie, 92296 Châtenay-Malabry, France ;

<sup>6</sup>Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France;

<sup>7</sup>Service de Gynécologie Obstétrique Médecine de la Reproduction, Hôpitaux Universitaires Est Parisien site Tenon, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 4 Rue de la Chine, 75020 Paris, France;

<sup>8</sup>InsermUMR-S 938, Centre de Recherche Saint Antoine, Université Pierre et Marie Curie, 75012 Paris, France.

**\*Corresponding author:** To whom correspondence should be addressed:

Pr Nathalie Chabbert-Buffet, E-mail: [nathalie.chabbert-buffet@tnn.aphp.fr](mailto:nathalie.chabbert-buffet@tnn.aphp.fr).

Phone:+33-1-56 01 77 48, Fax:+33-1-56 01 67 15,

**Keywords:** Progesterone, antiprogestins; ulipristal acetate; APR19; human breast cancer xenograft; proliferation.

**Abbreviations:** P4, progesterone; PR, progesterone receptor; UPA, ulipristal acetate ; PR Antagonists, APRn.

## **Abstract**

Breast cancer is a hormone-dependent disease in which estrogen signaling targeting drugs fail in about 10% due to resistance. Strong evidences highlighted the mitogen role of progesterone, its ligands and the corresponding progesterone receptor (PR) isoforms in mammary carcinoma. Several PR antagonists have been synthesized, however some of them are non-selective, and led to side or toxic effects. Herein, we evaluated the anti-tumor activity of commercially available PR modulator, Ulipristal acetate (UPA), and a new selective and passive PR antagonist “APR19” in a novel preclinical approach based on patient derived breast tumor (HBCx-34) xenografted in nude mice. UPA and APR19 treatment for 42 days led to a significant 30% reduction in tumor weight, accompanied by 40% retardation in tumor growth upon UPA exposure while a 1.5 fold increase in necrotic areas was observed in APR19 treated tumors. Interestingly, PR expression was upregulated by a 2.5 fold factor in UPA treated tumors while APR19 significantly reduced expression of both PR and estrogen receptor  $\alpha$ , indicating a potential distinct molecular mechanism among PR antagonists. Cell proliferation was clearly reduced in UPA group compared to vehicle conditions, as revealed by the significant reduction in Ki-67, Cyclin D1 and PCNA expression. Likewise, an increase in activated, cleaved PARP expression and a decrease of the anti-apoptotic factor BCL2-L1 were demonstrated upon UPA exposure. Collectively, our findings provide direct *in vivo* evidence for antiprogestin-mediated control of human breast cancer growth, given their anti-proliferative and pro-apoptotic activities, supporting a potential in breast cancer therapy.

## Introduction

Over years, breast cancer care has evolved towards personalized treatment, including adapted chemotherapy, anti-hormone and HER2 targeted drugs, since heterogeneity of the disease has been highlighted by large clinical trial results (Kamangar et al., 2006). Earlier detection of breast cancer and currently available therapies led to a decrease in mortality rate. However, more than 10% of patients will relapse within 60 months after treatment (Brewster et al., 2008). Among patients with hormone dependent disease, recurrence is in part linked to early, or secondary acquired, anti-estrogen drug resistance (Clarke et al., 2003), the mechanism of which still remains unclear.

The progesterone receptor (PR), progesterone and progestins have been shown to be involved in breast carcinogenesis, in clinical studies as well as *in vitro* and animal models (Brisken, 2013; Giulianelli et al., 2013; Hagan and Lange, 2014; Knutson and Lange, 2014).

Pharmacological strategies based on PR antagonists were thus developed to inhibit PR-mediated tumorigenesis. Data from preclinical and clinical studies using different PR antagonists or selective modulators (SPRM) suggested potential applications in breast cancer prevention and treatment (Han et al., 2007; Klijn et al., 2000; Knutson and Lange, 2014; Lanari et al., 2012; Madauss et al., 2007a; Wiehle et al., 2011). However, the relationship between altered PR signaling and anti-tumor properties of these molecules remains to be clearly established. Most of steroid PR antagonists contain bulky side chains favoring corepressor recruitment leading to PR transcriptional inhibition by blocking induced conformational change in alpha-helix 12 of the ligand binding domain of PR (Petit-Topin et al., 2014). Other chemical modifications of PR ligands such 17-fluorination leading to EC304 compound was shown to block PR transcriptional activity and to inhibit breast cancer cell proliferation (Nickisch et al., 2013). Nevertheless, these molecules could not be used on long term either because they are non-selective drugs (anti-glucocorticoid activity) and/or because they are not approved for clinical use.

In order to circumvent these limitations, we decided to examine the effects of two new PR antagonists: ulipristal acetate (UPA) and a newly synthesized homosteroid 3, 17-fluorinated compound (APR19) in a preclinical breast cancer model. UPA is a recently released SPRM, used for emergency contraception and long-term treatment of leiomyoma, a benign hormone dependent

uterine tumor (Donnez et al., 2012b; Glasier et al., 2010), while APR19 belongs to a new class of highly selective and passive PR antagonists (APRn) (Khan et al., 2013).

Most currently available *in vivo* models, such as DMBA/MNU-induced mammary carcinogenesis in rats (Bakker et al., 1987; Lanari et al., 2012; Nishino et al., 2009; Wiehle et al., 2011; Wiehle et al., 2007), MXT-mouse models (Lanari et al., 2012; Michna et al., 1989), or breast cancer cell line xenografts (T47D, MCF-7) (reviewed in (Lanari et al., 2012)), failed to mimic and reflect the phenotypic, genetic and molecular profiling of the primary tumors and thus did not allow a relevant preclinical screening.

Recently, a new preclinical model of human breast tumor xenograft was established directly from patient biopsies without intermediary cell culture and aimed at preserving the histological and molecular characteristics of the original patient's tumors (Cottu et al., 2012). Well characterized human breast tumor samples were grafted in immuno-deficient mice (Marangoni and Poupon, 2014; Marangoni et al., 2007; Nemati et al., 2000). These xenograft models are used for pharmaceutical preclinical drug screening (Aparicio et al., 2015). In order to evaluate the impact of antiprogestins' treatment in breast cancer, we used the HBCx-34 patient-derived breast cancer xenograft model. This model is derived from an invasive mammary ductal carcinoma expressing progesterone and estrogen receptors (PR and ER $\alpha$ ), wild type p53 and no HER2 overexpression (Cottu et al., 2014; Cottu et al., 2012).

Herein, we used this xenograft model to test anti-tumor properties of UPA and APR19. Both antagonists exhibited different mechanisms in regulating gene expression. For instance, APR19 inhibited PR and ER expression while UPA stimulated PR expression without affecting ER expression. APR19 was shown to increase necrotic surfaces, while UPA exerted pro-apoptotic actions and inhibited cell proliferation. While reducing expression of Ki-67, Cyclin D1 and PCNA expression, UPA also stimulated apoptosis by upregulating PARP expression and downregulating BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>. Our results bring additional support for the potential use of antiprogestin compounds during breast cancer therapy.



## **Materials and Methods**

### **Animal models**

Six to nine week-old outbred athymic (*nu/nu*) female mice (20 g) (Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu) (Harlan Laboratories, Gannat, France) were maintained in specific pathogen free animal housing at the CERFE animal facility (Center for exploration and experimental functional research, Evry, France), authorized by the Direction des services vétérinaires, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (agreement No. B-91-228-107). Mice were housed in individually ventilated cages, with sterilized food, water and dust-free bedding cobs, under controlled light-dark cycle, room temperature and humidity in accordance with French regulatory legislation concerning the protection of laboratory animals (Xentech, Evry, France).

### **Tumor xenograft induction**

Human breast cancer HBCx-34 tumor tissues of the same passage (n-1) were xenografted subcutaneously in donor mice (5-10 mice) (Cottu et al., 2012). Mice were sacrificed by cervical dislocation once tumors reached  $1-2 \times 10^3 \text{ mm}^3$ . Mammary tumors were aseptically excised, dissected and cut into fragments measuring approximately  $20 \text{ mm}^3$  after removing necrotic areas. Recipient mice were anaesthetized with ketamine/xylazine, and skin was incised after application of a chlorhexidine solution, at the level of the interscapular region where tumor fragments were subcutaneously transplanted. Mice with homogenous tumor volume were allocated into different groups of treatment.

### **Study groups and treatment**

Nude mice grafted subcutaneously with HBCx-34 tumor fragments were distributed into 4 different experimental groups as reported in Table 1 when their initial tumor volumes were  $62.5 - 196 \text{ mm}^3$ . Human breast-tumor bearing mice kept drinking water containing  $\beta$ -oestradiol (8.5 mg/L) during the whole study. Plasma samples were collected at D0 and D42 or at day of sacrifice (due to ethical criteria), in the UPA treated group (group 3). Serum and tumor samples were collected in the four experimental groups at the end point (i.e. D42 or ethical sacrifice). Tumors were first weighed

immediately after sacrifice. One half of each tumor was snap frozen in liquid nitrogen, and then transferred to -80°C for storage. The other half of each tumor was fixed in 10% formalin for 24 h at 4°C, and then stored at room temperature (RT) in 70% ethanol until paraffin embedding.

#### **Tumor measurement and criteria for ethical sacrifice**

All animals were weighted twice a week during the treatment period. Tumor volume was evaluated by measuring tumor diameters, using a calliper, bi-weekly during the treatment period. The formula  $TV \text{ (mm}^3\text{)} = [\text{length (mm)} \times \text{width (mm)}^2] / 2$  was used, where the length and the width are the longest and the shortest diameters of the tumor, respectively. Animals were sacrificed, following ethical criteria, according to their body loss ( $BWL \geq 20\%$  as compared to the first day of treatment) and tumor volume ( $\geq 2 \times 10^3 \text{ mm}^3$ ). At D28, almost all the tumors were collected for the four groups.

#### **Immunohistochemistry**

Immunohistochemistry was performed on paraffin embedded samples of mammary tumor tissues, using the Benchmark XT Roche Ventana automate Ki-67 immunohistochemistry, and manually for other markers' immunohistochemistry. After microwave antigen retrieval in pH 6.0 citrate buffer for PR and for 30 min at 98°C in an EDTA alkaline buffer for Ki-67, sections were then incubated either overnight with mouse monoclonal antibody anti-PR (NCL-L-PGR-312 Novocastra laboratories, île Saint Martin, Nanterre, France), dilution 1:50, at 4°C in a humid chamber or for 32 min at 37 °C with anti-Ki-67 antibody (clone MIB 1, DAKO, Les Ulis, France), dilution 1:150. After primary antibody incubation, endogenous peroxidases were quenched with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS (pH 7.4) for 10 min and bound Igs were revealed with a commercial peroxidase immunolabeling kit (immPRESS anti-Mouse Ig reagent kit; Vector Laboratories, Burlingame, California). Finally, Dako AEC+ High sensitivity substrate was used as a chromogen for PR and multimer Kit (UltraView Universal DAB detection Kit, Roche, Ventana, Boulogne Billancourt, France). Immunolabeled sections were examined by a observer in a blinded manner using 6 high-power fields (40 x) with a conventional optical microscope (Provis; Olympus, Tokyo, Japan).

### **Quantitative Real Time PCR**

Total RNA was extracted from frozen mammary tumors fragments with TRI Reagent (Applied Biosystem) according to the manufacturer's recommendations. One  $\mu\text{g}$  of total RNA was processed for reverse-transcribed-qPCR. Briefly, total RNA was treated with DNase I (Biolabs, Evry, France), then reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). cDNA were analyzed by quantitative RT-PCR using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) with the indicated primers (300 nM, final concentration) (Supplemental Table S1) and a StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies). Relative gene expression was calculated as a ratio of attomoles normalized by ribosomal rRNA 18S expression in femtomoles.

### **Immunoblotting**

Mammary tissues were lysed using TissueLyser LT (Qiagen) in lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 30 mM Na pyrophosphate, 50 mM Na fluoride, 1% Triton X-100, protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma) for 30 min on rotation at 4°C, followed by a centrifugation at 12,000 x g for 15 min at 4°C to clear debris. Samples were resolved by 7.5% sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes. Primary antibodies used were anti-PR (PR Antibody (C-19) (sc-538, Santa Cruz Biotechnology, California, USA), dilution 1:200; anti-PRB-specific mouse monoclonal antibody (Let 126) (Lorenzo et al., 1988), dilution 1:500; anti-Bcl-XL antibody (E18, ab32370, Abcam, France), dilution 1:1,000; anti-PCNA (FL-261, sc-7907, Santa Cruz Biotechnology), dilution 1:200; anti-PARP antibody (#9542, Cell Signaling Technology), dilution 1:200; anti- $\alpha$ -tubulin, dilution 1:10,000; anti- $\beta$ -actin, dilution 1:1,000; anti-GAPDH, dilution 1:5,000 (Sigma). Secondary antibodies were Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross Adsorbed Secondary Antibody (DyLight 800 conjugated, 680 conjugated) and Goat anti-Rabbit IgG (H+L) DyLight 800 conjugated, dilution 1:10,000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Antibodies were diluted in Phosphate Buffered Saline (PBS) and 0.1% Tween 20 buffer supplemented with 5% nonfat milk and added to the membranes for 1 h at RT or overnight at 4°C, followed by incubation with the indicated secondary antibody for 1 h at RT. Target proteins

were detected using Odyssey® Fc, Dual-Mode Western Imaging (Li-Cor, Lincoln, NE, USA) by Fluorescence and quantified.

### Statistical Analysis

All data are mean ± SEM. Non-parametric Mann-Whitney statistical U-tests were applied to determine all significant differences between experimental conditions, using the Prism 5 software (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical significances are indicated by \* or x (1-3 symbols corresponding to P<0.05 or <0.01 or <0.001, respectively).

**Table 1: Drug doses, routes of administration and schedules in this study.**

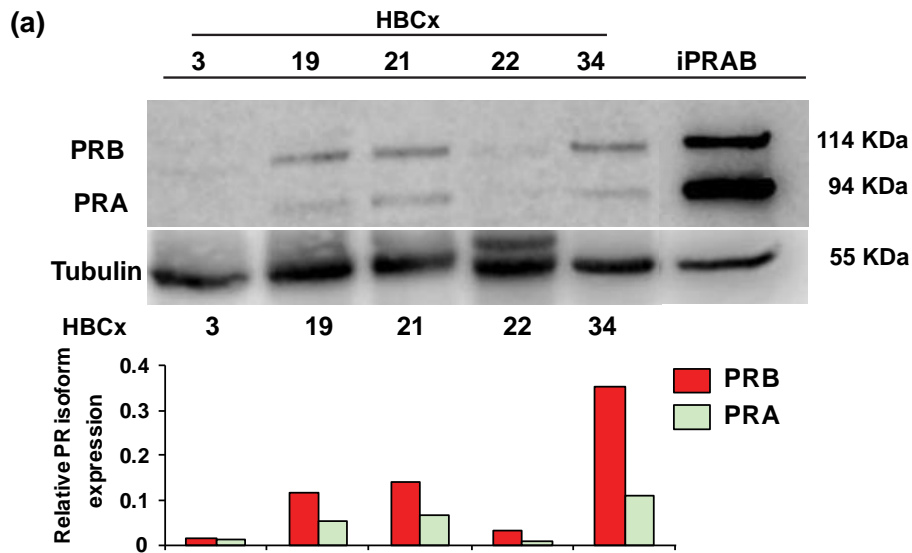
Group	N	Compound	mg/kg	Route	Schedule
1	10	Control #	-	SC	5 qwk x 6##
2	10	Progesterone	50	SC	
3	10	UPA	130	PO	
4	10	APRns19	20	IP	q2d x 43###

# Control: vehicle corresponding to group 2 (10% benzyl alcohol / 90% sesame oil). ## 5 qwk x 6: dosed five days on, two days off for 6 weeks. ### q2d x 43: Every other day during 43 days.

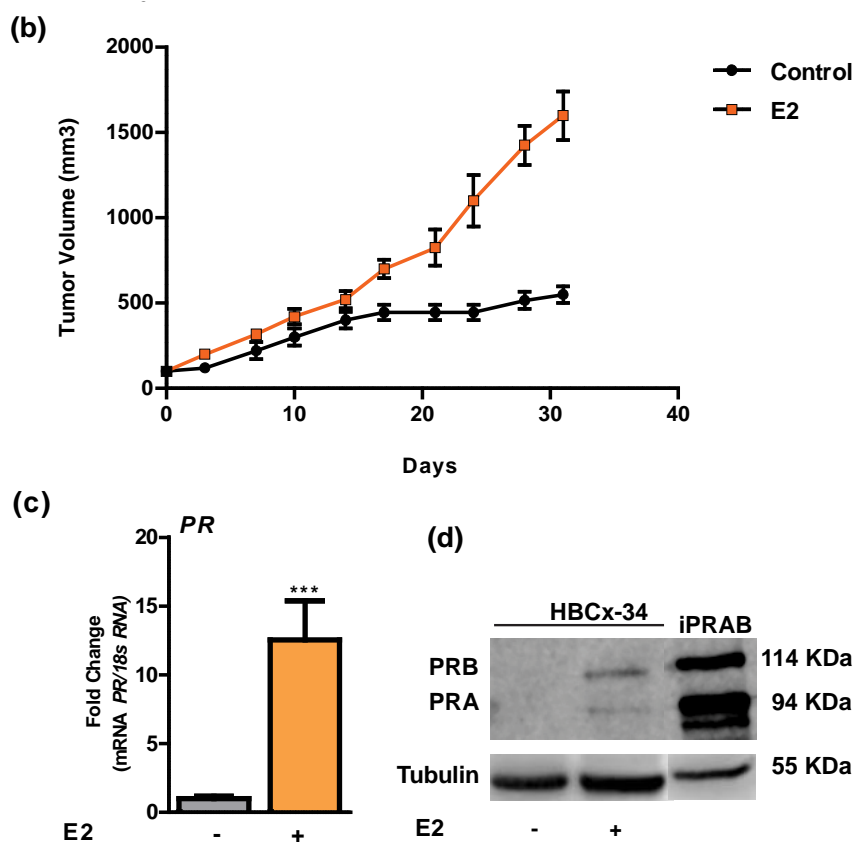
## Results

### *Characterization of human xenograft HBCx-34 model*

In order to evaluate anti-tumor effects of antiprogestins, it was necessary to choose human breast cancer tumor that do express substantial amounts of PR. Thus, different human-derived, breast tumor samples, derived from primary ER and PR expressing tumors, were obtained from Xentech (HBCx-3, 19, 21, 22, 34). After analyzing PR and ER expression by Western blot and RT-qPCR studies and proliferation rates (provided by Xentech company), we selected the HBCx-34 tumor for its sustained PR expression throughout grafting processes, as compared to HBCx-3, 19, 21 and 22 or to human bi-inducible MDA iPRAB cell model used as positive control (Esber et al., 2015; Khan et al., 2012) (Fig. 1a). Of note, both PRA and PRB isoforms were expressed and identified as 94 kDa and 114 kDa bands, respectively, PRB being more expressed than PRA (Fig.1a). HBCx-34 is a primary mammary infiltrating ductal carcinoma expressing not only PR but also ER $\alpha$  (data not shown). HBCx-34 has a wild type p53 and no HER2 overexpression. Proliferation rate of the HBCx-34 tumor was considered as relatively slow yet with growth rate higher than other tumor sample growth and an estimated doubling time around 17 days (Cottu et al., 2012). More importantly tumor proliferation rate was estrogen-dependent since, in the absence of estrogen in drinking water, tumor volume failed to increase after 15 days, never reaching more than 500 mm<sup>3</sup> (Fig. 1b). We also demonstrated that both PR isoforms are-expressed in HBCx-34 tumor and presumably functional upon E2 exposure in terms of transcript (12.5 x higher than in the group not exposed to E2) and protein (Fig. 1c and 1d). This finding is consistent with the notion that PR is an estrogen-regulated gene and its synthesis requires E2 and its receptor (Chabbert-Buffet et al., 2005).



**Fig. 1: Characterization of human xenograft tumor models.** (a) PR isoform protein expression by western blot analysis of tumor tissues extracts performed using anti-PR rabbit polyclonal antibody recognizing both PR isoforms (PR, C-19); and relative PR expression normalized to tubulin in HBCx xenograft tumor models (HBCx-3, 19, 21, 22 and 34) compared to the breast cancer cell line MDA-iPRAB (Esber, 2015; Khan et al., 2012). Data are expressed as fold induction compared to control condition, arbitrarily set at 1, and are means  $\pm$  SEM. \*\*\* indicates  $p < 0.001$  compared to the control group (non-parametric Mann Whitney U-tests).



**Fig. 1**

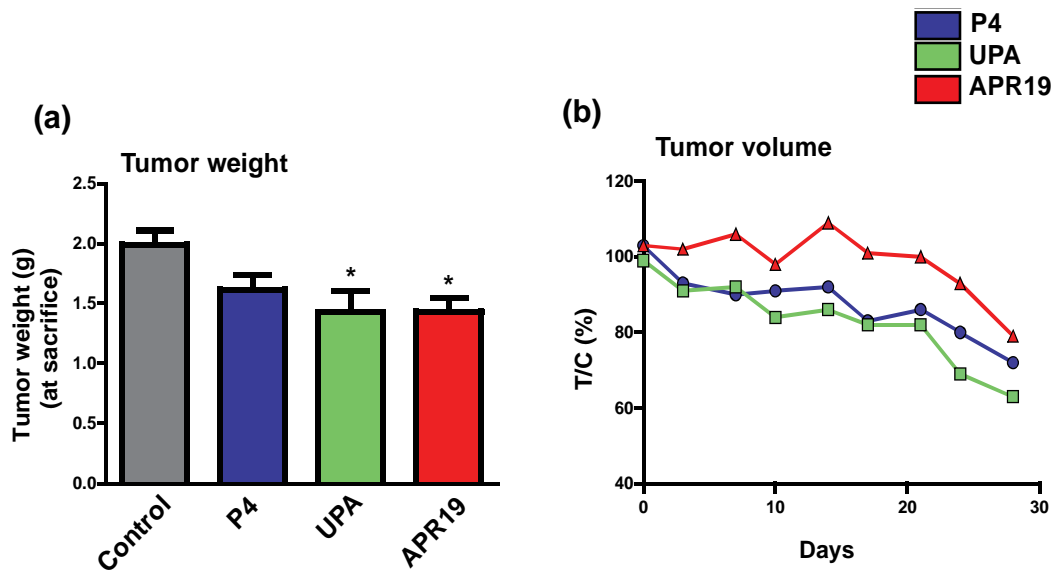
**Fig. 1: Characterization of human xenograft tumor models.** (b) Evolution of tumor volume of both control and estrogen treated group, measured biweekly with a calliper, during the treatment period. The formula  $TV \text{ (mm}^3\text{)} = [\text{length (mm)} \times \text{width (mm)}]^2 / 2$  was used, where the length and the width are the longest and the shortest diameters of the tumor, respectively. (c) Western blot analysis of estrogen-dependent PR isoform expression in HBC-34 tumor xenograft carried out with anti-PR (C-19). (d) mRNA expression levels of *PR* gene determined by RT-qPCR in HBCx-34 tumors collected from mice receiving E2 supplemented drinking water vs control mice. Data are expressed as fold induction compared to control condition, arbitrarily set at 1, and are means  $\pm$  SEM. \*\*\* indicates  $p < 0.001$  compared to the control group (non-parametric Mann Whitney U-tests).

***Impact of antiprogestins UPA and APR19 on HBCx-34 tumor growth.***

We next examined the effects of UPA and APR19 on HBCx-34 tumor growth. After transplanting HBCx-34 tumor (see Materials and Methods section), mice were treated for 42 days with Progesterone (P4), UPA and APR19 as detailed in Table 1. Tumor growth was analyzed during the whole procedure and tumor weight was compared at day 42 or at sacrifice (due to ethical criteria)

between treated groups and control group. A significant 30% reduction of tumor weight was found in both antiprogestin treated groups as compared to control group ( $1.4 \pm 0.40$  vs  $2.0 \pm 0.37$  g, respectively,  $p < 0.05$ ), (Fig. 2a), while no significant difference was observed between the P4 treated group and control group. Fig. 2b illustrates the T/C ratio (%) between the mean tumor volume of the treated group (T) and the mean tumor volume of the control group (C), calculated biweekly during the treatment period. The T/C ratio generally constitutes a reliable index of anti-tumor activity according to NCI criteria (Bissery and Chabot, 1991). This ratio was calculated until D28 where almost all mice for each group were still alive (see Materials and Methods section). T/C (%) at D28 demonstrates an approximately 30%, 40% and 20% decrease in tumor volume of P4, UPA and APR19 treated group, respectively (Fig. 2b). As anticipated, a positive linear correlation was observed between tumor weight and volume (data not shown). We next analyzed the macroscopic and histo-pathologic parameters of the collected tumors. Fig. 2c shows four representative tissue sections of mammary tumors after hematoxylin-eosin staining, indicating that the tumor surface was smaller in anti-progestin treated groups in accordance with the reduction in tumor growth and tumor weight of the corresponding groups. Moreover, necrosis is a well-regulated process activated in tumor cells; large necrotic areas are considered as a good sign of therapeutic efficiency (Lanari et al., 2012; Proskuryakov and Gabai, 2010). As shown in Fig. 2d (left panel), two mammary tumor sections belonging to control and APR19 groups are presented. Mean necrotic surface (%) was calculated and normalized to the total tumor surface. Interestingly, we found a 1.5 fold increase in necrotic index in APR19 treated groups as compared to the control group (30% vs 20%, Fig. 2d, right panel,  $p < 0.05$ ) while there was no significant difference in P4 and UPA groups. Collectively, both antiprogestins significantly reduce human breast cancer tumor growth whereas, in addition, APR19 drastically increases necrotic areas.

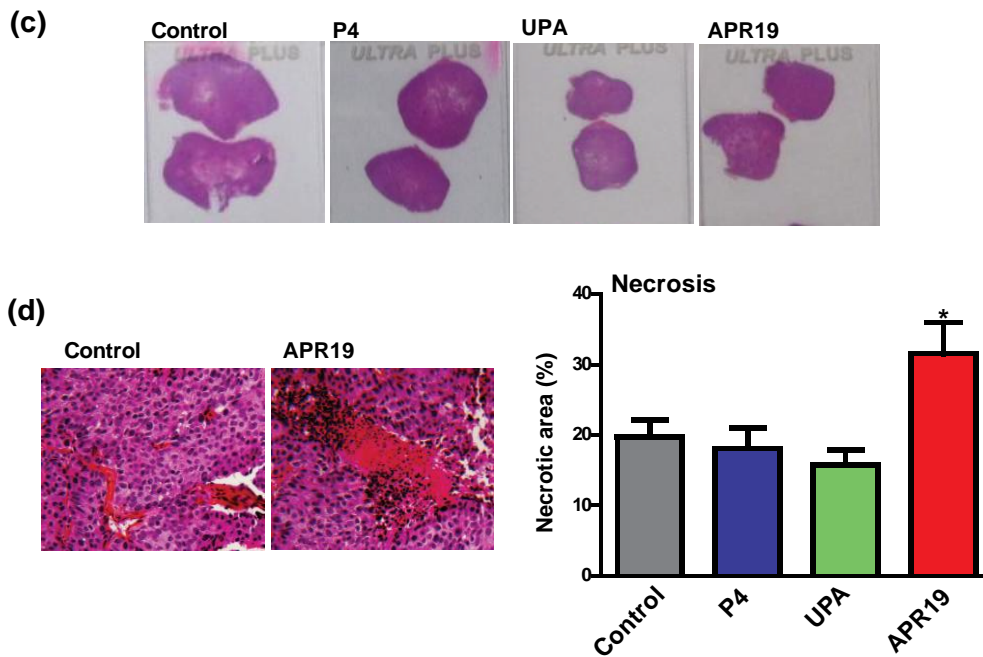




**Fig. 2: UPA retards tumor growth in HBCx-34 xenograft model (tumor weight and volume) and APR19 increases necrosis.** (a) HBCx-34 mammary tumors were weighted (g) at D42 or ethical sacrifice according to ethical criteria (Body weight loss (BWL)  $\geq$  20% compared to the 1st day of treatment for 48 consecutive hours (3 measurements); General alteration of behavior or clinical signs and tumor volume  $\geq$  2000 mm<sup>3</sup>). (b) % T/C ratio represents the ratio of tumor volume in treated mice vs control at a specified time until D28 of the treatment duration where almost all tumors were collected. Data are means  $\pm$  SEM. \* indicates  $p < 0.05$  compared to the control condition (non-parametric Mann Whitney U-tests).

#### *UPA Plasma levels*

In order to confirm that UPA treatment (130 mg/kg) was adequately administrated, mean plasma levels of UPA were measured at the day of sacrifice by LC-MS/MS (Liquid chromatography–mass spectrometry) and reached  $6919 \pm 2820$  ng/mL. These pharmacological doses of UPA in mice led to extremely high levels of circulating antiprogestin that are not comparable to what is clinically used for women. Interestingly enough, these values did not lead to neither any undesirable side effects nor any overt toxicity in the UPA treated animals.



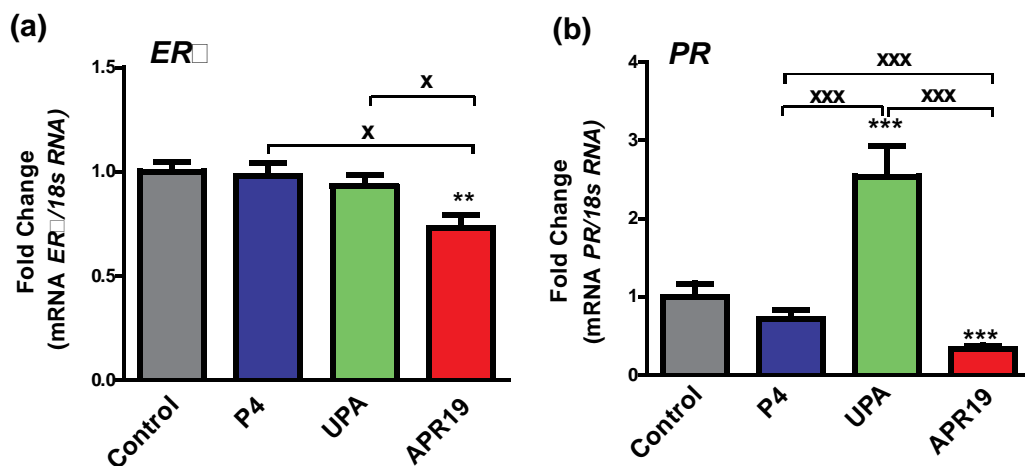
**Fig. 2**

**Fig. 2: UPA retards tumor growth in HBCx-34 xenograft model (tumor weight and volume) and APR19 increases necrosis.** (c) Images of representative xenograft tissues tumors by hematoxylin-eosin staining of the four group of the study. (d) Images of necrotic zones of xenograft tumors of the four groups colored by hematoxylin-eosin staining. In the right panel, analysis of the % of necrotic zones calculated by calopix software reported to the tumor total surface. Data are means  $\pm$  SEM. \* indicates  $p < 0.05$  compared to the control condition (non-parametric Mann Whitney U-tests).

***Progesterone receptor analysis: opposite action of UPA and APR19***

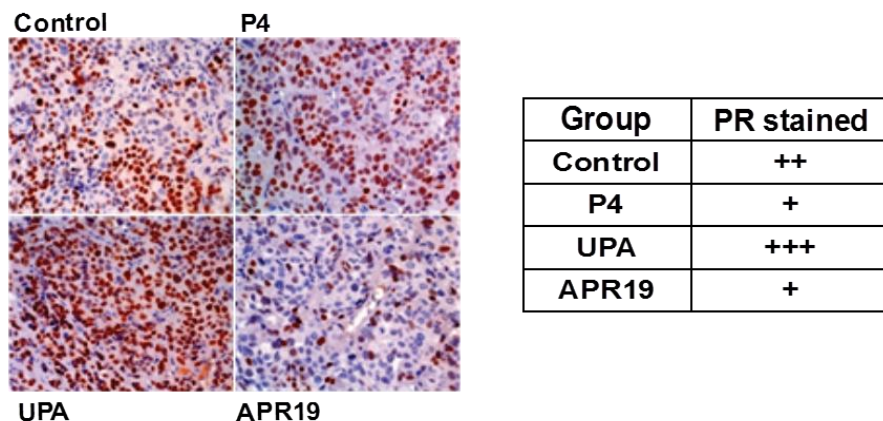
We next evaluated whether  $ER\alpha$  and PR expression was modified during the treatment procedure in the 4 groups. By means of RT-qPCR analysis, we showed that  $ER\alpha$  transcript levels were significantly reduced only in the APR19 treated group while PR expression was markedly decreased by 70% in this group as compared to control group (Fig. 3a). In sharp contrast,  $PR$  mRNA expression was increased by 2.5 fold in the UPA treated group compared with control group. No significant variation was found in the P4 group (Fig. 3b). PR protein expression was also investigated using immunohistochemical PR staining (Fig. 3c), and quantified by measuring

positively stained cells normalized to the total cell number. Semi-quantitative results for PR expression in collected tumors of the four groups are summarized in Fig. 3c, right panel, and classified from + for moderate staining (10-29% PR positive cells), ++ for strong staining (30-69 %) to +++ representing a very high PR positively stained cells (> 70%). Consistent with the mRNA expression levels, PR protein expression was slightly decreased by P4 and dramatically increased in UPA treated tumors while it was markedly reduced by APR19 treatment. PR isoforms protein expression was also evaluated by Western blot analyses (Supplemental Fig. S1). Using two different anti-PR antibodies recognizing either both PR isoforms (Santa Cruz antibody) (Fig. S1a), or specific to PRB isoform (Let 126) (Lorenzo et al., 1988) (Fig. S1b), we found, as anticipated, that PRB expression was significantly downregulated by 70% in P4 treated group as compared to vehicle treated group. In contrast, PRA expression was unaffected whatever the experimental condition used.



**Fig. 3: Effects of antagonists on ER $\alpha$  and PR expression.** mRNA transcript levels of ER $\alpha$  (a) and PR (b) genes analyzed by RT-qPCR in HBCx-34 xenograft tumors treated with control, P4, UPA and APR19. Data are expressed as fold induction compared to control condition arbitrarily set at 1 (a and b), and are means  $\pm$  SEM. \*, \*\*, \*\*\* indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively compared to the control condition and x, xx, xxx symbols indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively and represent the comparison between the three treated groups (P4, UPA, APR19) (non-parametric Mann Whitney U-tests).

(c)



**Fig. 3**

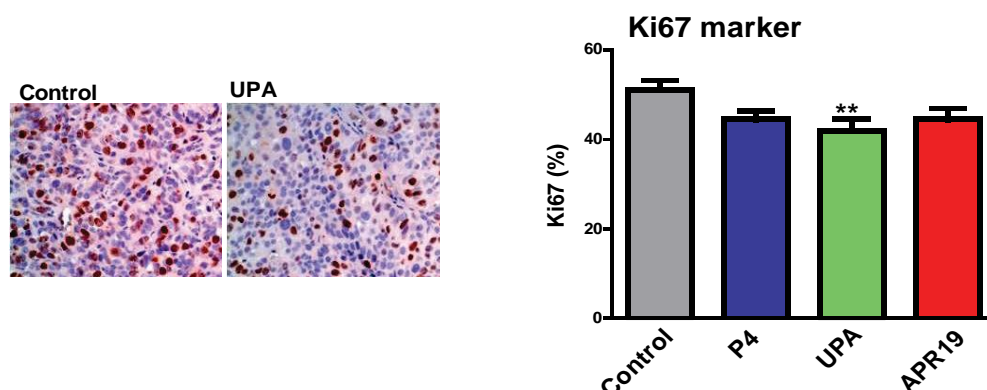
**Fig. 3: Effects of antagonists on ER $\alpha$  and PR expression.** (c) Images of tissues sections obtained by immunohistochemical analysis of PR expression from xenografted tumors (40x) (left panel). A semi-quantitative evaluation of PR expression is presented on the right panel and is classified from + for moderate staining (around 15 %), ++ for strong staining (around 45 % PR positive cells), to +++ representing a very high PR positively stained cells (> 70 %). Data are expressed as fold induction compared to control condition arbitrarily set at 1 (a and b), and are means  $\pm$  SEM. \*, \*\*, \*\*\* indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively compared to the control condition and x, xx, xxx symbols indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively and represent the comparison between the three treated groups (P4, UPA, APR19) (non-parametric Mann Whitney U-tests).

#### *UPA exerts anti-proliferative effects*

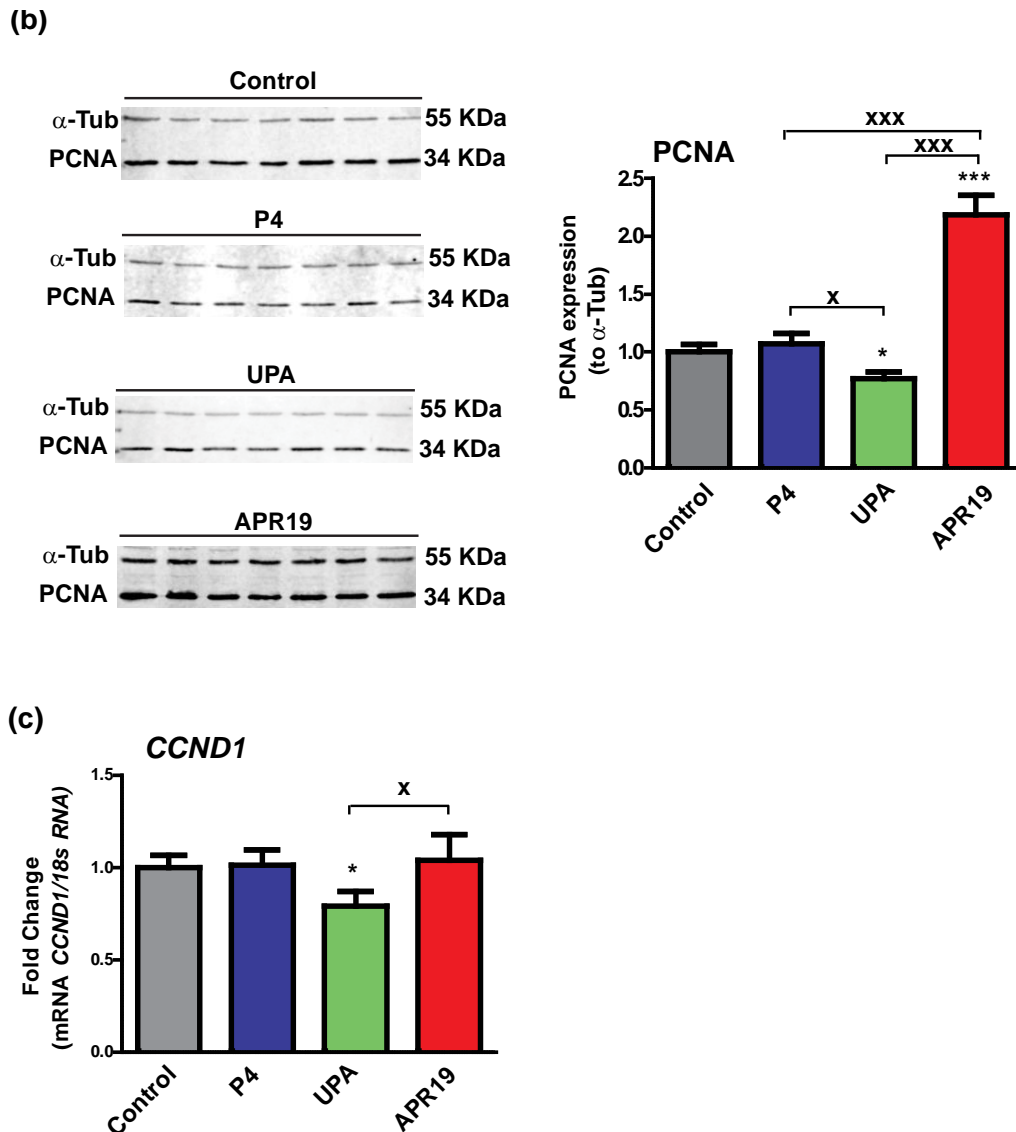
Cell proliferation is a hallmark when evaluating an anti-tumor activity of any given compound. To investigate the antiprogestin effects, several proliferation markers (Ki-67, PCNA, Cyclin D1) were evaluated in collected tumors of each group by either immunohistochemical studies, Western blot experiments or by RT-qPCR analyses. The immunohistochemical staining of the nuclear marker Ki-67 is illustrated for one representative control and UPA treated tumor (Fig. 4a, left panel). The resulting Ki-67 index, as defined in the Materiel and Methods section, was significantly decreased by 20% in the UPA group vs control group while no significant difference was found for the two other groups (Fig. 4a, right panel). PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) is a cell related nuclear protein, highly expressed in proliferating cells during DNA synthesis phase of the cell cycle. PCNA protein expression was quantified by Western blot (Fig. 4b, left panel), and normalized to the tubulin

loading control (Fig. 4b, right panel). PCNA expression was significantly reduced by 25% in the UPA treated group, but increased by a 2-fold factor in APR19 treated groups compared to control group. In the P4 treated group, no variation in PCNA expression was observed (Fig. 4b, right panel). Finally, cyclin D1, required for progression through G1 phase of the cell cycle, is another important proliferative index. *Cyclin D1* expression analyses revealed a 25% decrease in the UPA treated group (Fig. 4c), consistent with the already observed reduction of Ki-67 and PCNA expression upon UPA exposure.

(a)



**Fig. 4: Antiproliferative activity of UPA.** (a) Immunohistochemical analysis of nuclear Ki67 expression as depicted in left panel by images of tissue sections from xenograft tumors. In the right panel, analysis of the % of Ki67 calculated by counting the marked cells (nuclei) compared to the total number of cells (40 x). Data are expressed as % according to the total cell number. Data are expressed as fold induction compared to control condition arbitrarily set at 1, and are mean  $\pm$  SEM. \*, \*\*, \*\*\* indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively compared to the control condition and **x**, **xx**, **xxx** symbols indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively and represent the comparison between the three treated groups (P4, UPA, APR19) (non-parametric Mann Whitney U-tests).



**Fig. 4**

**Fig. 4: Antiproliferative activity of UPA.** (b) Western blot analysis of xenografted tumor protein extracts (50  $\mu$ g) was performed using anti-PCNA and anti- $\alpha$ -tubulin for sample loading control (left panel). PCNA protein expression (34 kDa) was quantified relative to  $\alpha$ -tubulin loading control (55 kDa). (c) mRNA transcript levels of *CCND1* (*CYCLIN D1*) gene analyzed by RT-qPCR in HBCx-34 xenograft tumors treated with control, P4, UPA and APR19. Data are expressed as fold induction compared to control condition arbitrarily set at 1, and are mean  $\pm$  SEM. \*, \*\*, \*\*\* indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively compared to the control condition and x, xx, xxx symbols indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 respectively and represent the comparison between the three treated groups (P4, UPA, APR19) (non-parametric Mann Whitney U-tests).

### ***Pro-apoptotic effects of UPA***

Apoptosis may also constitute another important hallmark of an anti-tumor activity of an antiprogestin. Several apoptotic markers exerting either an anti-apoptotic effect (Clusterin (*CLU*), *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>*) or a pro-apoptotic action (PARP) were also examined in the collected tumors of each group. Indeed, clusterin is an anti-apoptotic intracellular marker that binds to the pro-apoptotic marker Bax and inhibits apoptosis (Ranney et al., 2007). *CLU* transcript levels were quantified by RT-qPCR analysis in the four treated groups. A significant increase of 35% in *CLU* expression was observed in the APR19 group. However, neither progesterone, nor UPA seemed to affect the *CLU* gene expression as compared to the control group (Fig. 5a). Another well-known anti-apoptotic marker *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* was also investigated in terms of transcript (Fig. 5b) and protein (Fig. 5c) expression in the four groups. *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* mRNA was increased by 50% in the APR19 treated group vs control group (Fig. 5b). Interestingly, *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* protein expression analysis by Western blot shows a 50% decrease in the UPA treated group compared to vehicle (Fig. 5c), while no significant difference is observed in the other groups. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is a protein involved in programmed cell death, and DNA repair. During apoptosis, the full length PARP (116 kDa) is cleaved into an 89 kDa fragment. Western blot analysis of cleaved-PARP expression (Fig. 5d, left panel), demonstrated a 30% decrease in P4 treated groups, and a 41% and 300% increase in UPA and APR19 treated groups, respectively (Fig. 5d). Collectively, these findings indicate that antiprogestins exert various anti-apoptotic as well as pro-apoptotic effects associated with remarkable anti-tumor growth effects.

**Fig. 5: Apoptotic markers analysis of HBCx-34 xenograft tumor model.** mRNA transcript levels of *CLU* (*CLUSTERIN*) (a), *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* (b), genes analyzed by RT-qPCR in HBCx-34 xenograft tumors treated with control, P4, UPA and APR19. (c) Western blot analysis of xenografted tumor protein extracts (50 µg) was performed using anti- Bcl-XL antibody and anti-GAPDH antibody for sample loading control (left panel). *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* protein expression was quantified relatively to GAPDH loading control (right panel). (d) Western blot analysis of xenografted tumor protein extracts (50 µg) was performed using anti-PARP and anti- $\alpha$ -tubulin for sample loading control (left panel). Cleaved-PARP (89 kDa) protein expression was quantified relatively to  $\alpha$ -tubulin loading control. Data are expressed as fold induction compared to control condition arbitrarily set at 1, and are means  $\pm$  SEM. \*, \*\*, \*\*\* indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001, respectively, compared to the control condition and **x**, **xx**, **xxx** symbols indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001, respectively, and represent the comparison between the three treated groups (P4, UPA, APR19) (non-parametric Mann Whitney U-tests).

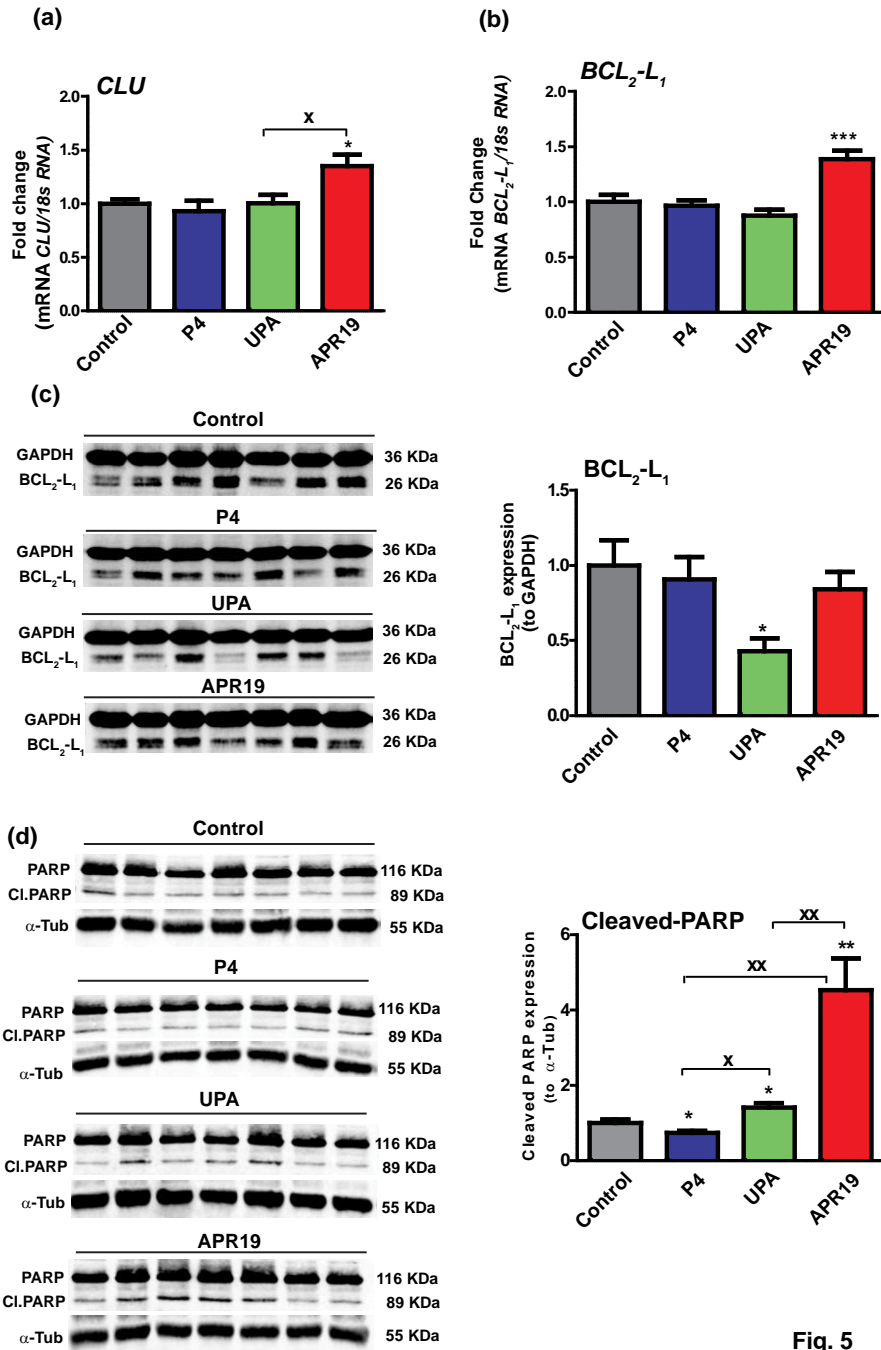


Fig. 5



## Discussion

In this study, we evaluated the effects of two PR antagonists, Ulipristal acetate (UPA) and APR19 (Khan et al., 2013), in an estrogen-dependent, patient-derived breast tumor tissue, HBCx-34, xenografted in nude mice. PDX (patient-derived xenograft) is a reliable preclinical model to test the efficacy of a drug treatment, due to the preservation of genome, tumor behavior, heterogeneity, histologic and metastatic features of the original tumor (Marangoni and Poupon, 2014; Marangoni et al., 2007; Whittle et al., 2015).

Analyses of cell proliferation markers, necrotic areas, apoptosis markers are the hallmarks of an anti-tumor activity following an antiprogestin treatment. In the present study, we found that UPA exerted mammary tumor growth retardation, associated with a reduction in tumor weight and volume. This is in agreement with what has been demonstrated in *in vivo* studies, in which antiprogestin treatment inhibited estrogen-induced mammary tumor growth. Mifepristone (RU486), a PR modulator (PRM), alone or combined with the antiestrogen tamoxifen, induced tumor regression and reduction in tumor volume in several experimental animal models, including DMBA-, MNU-induced mammary rat carcinogenesis models (reviewed in (Klijn et al., 2000; Lanari et al., 2012)). Another antiprogestin CDB-4124 exerted a similar inhibitory action on DMBA-, MNU- induced mammary carcinogenesis (Wiehle et al., 2011). Antiprogestin-induced tumor regression is accompanied by an increase in cytostasis, apoptosis, and differentiation (reviewed in (Lanari et al., 2012)). In this study, UPA treatment increased apoptosis by upregulating and activating PARP into cleaved PARP protein expression and downregulating the anti-apoptotic marker BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> protein expression. PARP is known as a key DNA repair enzyme, PARP inhibitors being used as therapeutic target either in patient-derived triple negative breast cancer xenograft model, or combined with radiotherapy in treating triple negative breast cancer (Schreiber et al., 2015; Weil and Chen, 2011). On the other hand, APR19 highly upregulated cleaved PARP protein expression and only affected BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> transcript expression. Previously, it has been demonstrated that BCL-X is overexpressed in invasive breast cancer (Olopade et al., 1997) and is associated with ER expression (Martin and Dowsett, 2013). In *in vitro* models, progesterone upregulated the anti-apoptotic factor BCL-X<sub>L</sub>, thus inhibiting apoptosis in T47D human breast cancer cell line (Richer et al., 2002), and in cultured leiomyoma cells while promoting their growth by up-regulating epidermal growth factor (Xu et al., 2005). In

this latter study, a pro-apoptotic activity of UPA through a decrease in Bcl-2 protein expression, an increase in cleaved caspase 3 and PARP protein expression has been observed in cultured leiomyoma cells (Xu et al., 2005). *In vivo* studies reported similar results (Horak et al., 2012; Yun et al., 2015). Apoptosis has also been shown to be induced by RU486 in cancer cells, including breast and endometrial cells (El Etreby et al., 1998; Liang et al., 2003; Schneider et al., 1998).

In our study, the increase in apoptosis following UPA treatment highlights an anti-proliferative effect of UPA combined with a decrease in *Cyclin D1* expression. Cyclin D1 is a P4-regulated target gene correlating with ER expression. In our model, progesterone does not seem to affect *Cyclin D1* expression. The amplification of cyclin D1 is observed in 15% of breast cancer and is associated with tamoxifen resistance (Rudas et al., 2008). PCNA, proliferating cell nuclear antigen, is a cell cycle related nuclear protein whose expression is elevated in late G1 and S phases of proliferating cells (Oue et al., 1995). Herein, PCNA expression was downregulated in the UPA-treated group, while it was upregulated in the APR19 group, suggesting a different mechanism of action of both antagonists. A previous study demonstrated an increase in PCNA expression following treatment with the CDB-4124 SPRM in cultured leiomyoma cells (Luo et al., 2010), while in another study, PCNA expression was downregulated after UPA treatment of cultured leiomyoma cells, reversing the stimulatory effect of P4. P4-induced PCNA expression was not observed in our study in the P4-treated group. Ki-67 positive cells (breast epithelial proliferating cells) are significantly reduced in RU486-treated patients (Engman et al., 2008), the same inhibitory effect was observed when treating leiomyoma cells with CDB-4124 (Wiehle et al., 2011). Treatment of endometriosis, a benign hormone dependent invasive disease, in rat models by UPA led to an increase in Bax/Bcl2 ratio, and in cytochrome c expression, in addition to a decrease in Ki-67 expression (Huniadi et al., 2013).

In the present study, APR19 inhibited ER expression, as well as PR expression. This is consistent with the regulation of PR expression by ER, although PR downregulation was not proportional in tumors treated with UPA; ER expression was not affected while PR expression was strongly upregulated. In previous studies, after CDB-4124 treatment (a steroid SPRM), ER alpha expression was decreased in T47D cells but PR expression was not affected (Wiehle et al., 2011). This finding contrasts with the effect of CDB-4124 that decreases PR positive cells in MNU-induced mammary carcinogenesis (Cui et al., 2005), with the effect of RU486 that inhibits PR expression in BT474

luminal human breast cancer cell line xenografted in nude mice (Liang et al., 2010; Liang et al., 2007), and with the inhibition of PR activation by its antagonists (Leonhardt and Edwards, 2002). In the present study, although PR expression was differentially affected by UPA and APR19, we could not precisely evaluate the relative contribution of PR isoforms given the lack of available specific anti-PRA antibody. However, we have been able to examine PRB expression by using the Let126 that specifically recognizes PRB isoform (Lorenzo et al., 1988). We found that PRB expression was downregulated by P4 but not affected by both antagonists, suggesting an important role of PRA isoform in mediating antiprogestin responsiveness in tumor tissues. PR isoforms, PRA and PRB, are co-expressed in equal amounts in normal human breast cells. However, an alteration in PRA/PRB ratio with a predominant expression of PRA isoform has been reported to constitute an early event of breast carcinogenesis, accompanied by a poorer disease-free survival rates, tamoxifen resistance (Hopp et al., 2004; Mote et al., 2002), and progestins and antiprogestins responsiveness (Mote et al., 2015; Wargon et al., 2015). An increase in PRA expression is observed in *BRCA1* or *BRCA2* mutation carriers (Mote et al., 2004). Along the same line, RU486 was shown to prevent mammary carcinogenesis in double transgenic mice carrying *BRCA1/P53* mutations (Kariagina et al., 2008; Poole et al., 2006), which suggests that antiprogestin treatment in breast cancer prevention may lead to beneficial effect for patients presenting a mutation *BRCA1*.

In conclusion, we have evaluated the effects of two different PR antagonists in a preclinical breast cancer model. Our results revealed anti-proliferative and pro-apoptotic activities for UPA in breast cancer, however, defining the main role and properties of the selective and passive APR19 needs further investigation. Our data suggest that UPA could be of interest as an adjuvant endocrine therapeutic drug or in the prevention of hormone-dependent breast cancer. However, confirmation in the clinical setting is required.

## References

1. Bakker, G. H., B. Setyono-Han, M. S. Henkelman, F. H. de Jong, S. W. Lamberts, P. van der Schoot, and J. G. Klijn. 1987. Comparison of the actions of the antiprogesterin mifepristone (RU486), the progestin megestrol acetate, the LHRH analog busserelin, and ovariectomy in treatment of rat mammary tumors. *Cancer Treatment Reports* 71 (11):1021-1027.
2. Bissery, M. C., and G. G. Chabot. 1991. [History and new development of screening and evaluation methods of anticancer drugs used in vivo and in vitro]. *Bull Cancer* 78 (7):587-602.
3. Brewster, A. M., G. N. Hortobagyi, K. R. Broglio, S. W. Kau, C. A. Santa-Maria, B. Arun, A. U. Buzdar et al. . 2008. Residual risk of breast cancer recurrence 5 years after adjuvant therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 100 (16):1179-1183. doi:10.1093/jnci/djn233.
4. Brisken, C. 2013. Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight. *Nature Reviews. Cancer* 13 (6):385-396. doi:10.1038/nrc3518.
5. Chabbert-Buffet, N., G. Meduri, P. Bouchard, and I. M. Spitz. 2005. Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications. *Human Reproduction Update* 11 (3):293-307.
6. Chou, Y. C., N. Uehara, J. R. Lowry, and G. Shyamala. 2003. Mammary epithelial cells of PR-A transgenic mice exhibit distinct alterations in gene expression and growth potential associated with transformation. *Carcinogenesis* 24 (3):403-409.
7. Clarke, R., M. C. Liu, K. B. Bouker, Z. Gu, R. Y. Lee, Y. Zhu, T. C. Skaar et al. . 2003. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene* 22 (47):7316-7339. doi:10.1038/sj.onc.1206937.
8. Cottu, P., I. Bieche, F. Assayag, R. El Botty, S. Chateau-Joubert, A. Thuleau, T. Bagarre et al. . 2014. Acquired resistance to endocrine treatments is associated with tumor-specific molecular changes in patient-derived luminal breast cancer xenografts. *Clinical Cancer Research* 20 (16):4314-4325. doi:10.1158/1078-0432.ccr-13-3230.
9. Cottu, P., E. Marangoni, F. Assayag, P. de Cremoux, A. Vincent-Salomon, Ch Guyader, L. de Plater et al. . 2012. Modeling of response to endocrine therapy in a panel of human luminal breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res Treat* 133 (2):595-606. doi:10.1007/s10549-011-1815-5.
10. Cui, X., R. Schiff, G. Arpino, C. K. Osborne, and A. V. Lee. 2005. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol* 23 (30):7721-7735.
11. Donnez, J., J. Tomaszewski, F. Vazquez, P. Bouchard, B. Lemieszczuk, F. Baro, K. Nouri et al. . 2012. Ulipristal acetate versus leuprolide acetate for uterine fibroids. *N Engl J Med* 366 (5):421-432. doi:10.1056/NEJMoa1103180.
12. El Etreby, M. F., Y. Liang, R. W. Wrenn, and P. V. Schoenlein. 1998. Additive effect of mifepristone and tamoxifen on apoptotic pathways in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 51 (2):149-168.
13. Engman, M., L. Skoog, G. Soderqvist, and K. Gemzell-Danielsson. 2008. The effect of mifepristone on breast cell proliferation in premenopausal women evaluated through fine needle aspiration cytology. *Hum Reprod* 23 (9):2072-2079. doi:10.1093/humrep/den228.
14. Esber, N.; Le Billan, F.; Resche-Rigon, M.; Loosfelt, H.; Lombes, M.; Chabbert-Buffet, N. 2015. Ulipristal Acetate inhibits Progesterone Receptor Isoform A-mediated Human Breast Cancer Proliferation and BC12-L1 Expression. *PLoS ONE* In Press.
15. Giulianelli, S., A. Molinolo, and C. Lanari. 2013. Targeting progesterone receptors in breast cancer. *Vitam Horm* 93:161-184. doi:10.1016/b978-0-12-416673-8.00009-5.
16. Glasier, A. F., S. T. Cameron, P. M. Fine, S. J. Logan, W. Casale, J. Van Horn, L. Sogor et al. . 2010. Ulipristal acetate versus levonorgestrel for emergency contraception: a randomised non-inferiority trial and meta-analysis. *Lancet* 375 (9714):555-562. doi:10.1016/s0140-6736(10)60101-8.
17. Hagan, C. R., and C. A. Lange. 2014. Molecular determinants of context-dependent progesterone receptor action in breast cancer. *BMC Medicine* 12:32. doi:10.1186/1741-7015-12-32.
18. Han, S. J., S. Y. Tsai, M. J. Tsai, and B. W. O'Malley. 2007. Distinct temporal and spatial activities of RU486 on progesterone receptor function in reproductive organs of ovariectomized mice. *Endocrinology* 148 (5):2471-2486.

19. Hopp, T. A., H. L. Weiss, S. G. Hilsenbeck, Y. Cui, D. C. Allred, K. B. Horwitz, and S. A. Fuqua. 2004. Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clinical Cancer Research* 10 (8):2751-2760.
20. Horak, P., M. Mara, P. Dunder, K. Kubinova, D. Kuzel, R. Hudecek, and R. Chmel. 2012. Effect of a selective progesterone receptor modulator on induction of apoptosis in uterine fibroids in vivo. *Int J Endocrinol* 2012:436174. doi:10.1155/2012/436174.
21. Huniadi, C. A., O. L. Pop, T. A. Antal, and F. Stamatian. 2013. The effects of ulipristal on Bax/Bcl-2, cytochrome c, Ki-67 and cyclooxygenase-2 expression in a rat model with surgically induced endometriosis. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 169 (2):360-365. doi:10.1016/j.ejogrb.2013.03.022.
22. Kamangar, F., G. M. Dores, and W. F. Anderson. 2006. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 24 (14):2137-2150. doi:10.1200/jco.2005.05.2308.
23. Kariagina, A., M. D. Upperelee, and S. Z. Haslam. 2008. Progesterone receptor isoform functions in normal breast development and breast cancer. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 18 (1):11-33.
24. Khan, J. A., C. Bellance, A. Guiochon-Mantel, M. Lombes, and H. Loosfelt. 2012. Differential regulation of breast cancer-associated genes by progesterone receptor isoforms PRA and PRB in a new bi-inducible breast cancer cell line. *PLoS ONE* 7 (9):e45993. doi:10.1371/journal.pone.0045993.
25. Khan, J. A., A. Tikad, M. Fay, A. Hamze, J. Fagart, N. Chabbert-Buffet, G. Meduri et al. . 2013. A new strategy for selective targeting of progesterone receptor with passive antagonists. *Molecular Endocrinology* 27 (6):909-924. doi:10.1210/me.2012-1328.
26. Klijn, J. G., B. Setyono Han, and J. A. Foekens. 2000. Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids* 65 (10-11):825-830.
27. Knutson, T. P., and C. A. Lange. 2014. Tracking progesterone receptor-mediated actions in breast cancer. *Pharmacology and Therapeutics* 142 (1):114-125. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.11.010.
28. Lanari, C., V. Wargon, P. Rojas, and A. A. Molinolo. 2012. Antiprogestins in breast cancer treatment: are we ready? *Endocrine-Related Cancer* 19 (3):R35-50. doi:10.1530/erc-11-0378.
29. Leonhardt, S. A., and D. P. Edwards. 2002. Mechanism of action of progesterone antagonists. *Exp Biol Med (Maywood)* 227 (11):969-980.
30. Liang, Y., I. Benakanakere, C. Besch-Williford, R. S. Hyder, M. R. Ellersieck, and S. M. Hyder. 2010. Synthetic progestins induce growth and metastasis of BT-474 human breast cancer xenografts in nude mice. *Menopause* 17 (5):1040-1047. doi:10.1097/gme.0b013e3181d3dd0c.
31. Liang, Y., C. Besch-Williford, R. A. Brekken, and S. M. Hyder. 2007. Progestin-dependent progression of human breast tumor xenografts: a novel model for evaluating antitumor therapeutics. *Cancer Res* 67 (20):9929-9936. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1103.
32. Liang, Y., M. Hou, A. M. Kallab, J. T. Barrett, F. El Etreby, and P. V. Schoenlein. 2003. Induction of antiproliferation and apoptosis in estrogen receptor negative MDA-231 human breast cancer cells by mifepristone and 4-hydroxytamoxifen combination therapy: a role for TGFbeta1. *International Journal of Oncology* 23 (2):369-380.
33. Lorenzo, F., A. Jolivet, H. Loosfelt, M. Thu vu Hai, S. Brailly, M. Perrot-Appianat, and E. Milgrom. 1988. A rapid method of epitope mapping. Application to the study of immunogenic domains and to the characterization of various forms of rabbit progesterone receptor. *European Journal of Biochemistry* 176 (1):53-60.
34. Luo, X., P. Yin, V. Js Coon, Y. H. Cheng, R. D. Wiehle, and S. E. Bulun. 2010. The selective progesterone receptor modulator CDB4124 inhibits proliferation and induces apoptosis in uterine leiomyoma cells. *Fertility and Sterility* 93 (8):2668-2673.
35. Madauss, K. P., E. T. Grygielko, S. J. Deng, A. C. Sulpizio, T. B. Stanley, C. Wu, S. A. Short et al. . 2007. A structural and in vitro characterization of asoprisnil: a selective progesterone receptor modulator. *Molecular Endocrinology* 21 (5):1066-1081.
36. Marangoni, E., and M. F. Poupon. 2014. Patient-derived tumour xenografts as models for breast cancer drug development. *Current Opinion in Oncology* 26 (6):556-561. doi:10.1097/cco.000000000000133.
37. Marangoni, E., A. Vincent-Salomon, N. Auger, A. Degeorges, F. Assayag, P. de Cremoux, L. de Plater et al. . 2007. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clinical Cancer Research* 13 (13):3989-3998.

38. Michna, H., M. R. Schneider, Y. Nishino, and M. F. el Etreby. 1989. Antitumor activity of the antiprogestins ZK 98.299 and RU 38.486 in hormone dependent rat and mouse mammary tumors: mechanistic studies. *Breast Cancer Res Treat* 14 (3):275-288.
39. Mote, P. A., S. Bartow, N. Tran, and C. L. Clarke. 2002. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 72 (2):163-172.
40. Mote, P. A., A. Gompel, C. Howe, H. N. Hilton, I. Sestak, J. Cuzick, M. Dowsett et al. . 2015. Progesterone receptor A predominance is a discriminator of benefit from endocrine therapy in the ATAC trial. *Breast Cancer Res Treat* 151 (2):309-318. doi:10.1007/s10549-015-3397-0.
41. Mote, P. A., J. A. Leary, K. A. Avery, K. Sandelin, G. Chenevix-Trench, J. A. Kirk, and C. L. Clarke. 2004. Germ-line mutations in BRCA1 or BRCA2 in the normal breast are associated with altered expression of estrogen-responsive proteins and the predominance of progesterone receptor A. *Genes, Chromosomes and Cancer* 39 (3):236-248.
42. Nemati, F., A. Livartowski, P. De Cremoux, Y. Bourgeois, F. Arvelo, P. Pouillart, and M. F. Poupon. 2000. Distinctive potentiating effects of cisplatin and/or ifosfamide combined with etoposide in human small cell lung carcinoma xenografts. *Clinical Cancer Research* 6 (5):2075-2086.
43. Nickisch, K., H. B. Nair, N. Kesavaram, B. Das, R. Garfield, S. Q. Shi, S. S. Bhaskaran, S. L. Grimm, and D. P. Edwards. 2013. Synthesis and antiprogesterone properties of novel 17-fluorinated steroids. *Steroids* 78 (9):909-919. doi:10.1016/j.steroids.2013.04.003.
44. Nishino, T., K. Ishibashi, C. Hirtreiter, and Y. Nishino. 2009. Potentiation of the antitumor effect of tamoxifen by combination with the antiprogestin onapristone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 116 (3-5):187-190. doi:10.1016/j.jsbmb.2009.05.013.
45. Oue, T., M. Fukuzawa, S. Kamata, and A. Okada. 1995. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen expression in human neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery* 30 (4):528-532.
46. Poole, A. J., Y. Li, Y. Kim, S. C. Lin, W. H. Lee, and E. Y. Lee. 2006. Prevention of Brca1-mediated mammary tumorigenesis in mice by a progesterone antagonist. *Science* 314 (5804):1467-1470.
47. Proskuryakov, S. Y., and V. L. Gabai. 2010. Mechanisms of tumor cell necrosis. *Current Pharmaceutical Design* 16 (1):56-68.
48. Ranney, M. K., I. S. Ahmed, K. R. Potts, and R. J. Craven. 2007. Multiple pathways regulating the anti-apoptotic protein clusterin in breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1772 (9):1103-1111. doi:10.1016/j.bbadis.2007.06.004.
49. Reed, J. C., J. M. Jurgensmeier, and S. Matsuyama. 1998. Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1366 (1-2):127-137.
50. Richer, J. K., B. M. Jacobsen, N. G. Manning, M. G. Abel, D. M. Wolf, and K. B. Horwitz. 2002. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 277 (7):5209-5218.
51. Schneider, C. C., R. K. Gibb, D. D. Taylor, T. Wan, and C. Gercel-Taylor. 1998. Inhibition of endometrial cancer cell lines by mifepristone (RU 486). *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 5 (6):334-338.
52. Wargon, V., M. Riggio, S. Giulianelli, G. R. Sequeira, P. Rojas, M. May, M. L. Polo et al. . 2015. Progestin and antiprogestin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters. *International Journal of Cancer* 136 (11):2680-2692. doi:10.1002/ijc.29304.
53. Whittle, J. R., M. T. Lewis, G. J. Lindeman, and J. E. Visvader. 2015. Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. *Breast Cancer Research* 17:17. doi:10.1186/s13058-015-0523-1.
54. Wiehle, R. D., K. Christov, and R. Mehta. 2007. Anti-progestins suppress the growth of established tumors induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene: comparison between RU486 and a new 21-substituted-19-nor-progestin. *Oncology Reports* 18 (1):167-174.
55. Wiehle, R., D. Lantvit, T. Yamada, and K. Christov. 2011. CDB-4124, a progesterone receptor modulator, inhibits mammary carcinogenesis by suppressing cell proliferation and inducing apoptosis. *Cancer Prev Res* 4 (3):414-424.
56. Xu, Q., S. Takekida, N. Ohara, W. Chen, R. Sitruk-Ware, E. D. Johansson, and T. Maruo. 2005. Progesterone receptor modulator CDB-2914 down-regulates proliferative cell nuclear antigen and Bcl-2 protein expression and up-regulates caspase-3 and poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose)

polymerase expression in cultured human uterine leiomyoma cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 (2):953-961. doi:10.1210/jc.2004-1569.

57. Yun, B. S., S. J. Seong, D. H. Cha, J. Y. Kim, M. L. Kim, J. Y. Shim, and J. E. Park. 2015. Changes in proliferating and apoptotic markers of leiomyoma following treatment with a selective progesterone receptor modulator or gonadotropin-releasing hormone agonist. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 191:62-67. doi:10.1016/j.ejogrb.2015.05.022.

Table S1: List of primer sequences

Gene	Name	Accession Number	Forward primers (5'→3')	Reverse primer (3'→5')
<i>PR</i>	<i>Progesterone Receptor (PGR)</i>	NM_000926.4	<i>ATTCAGAAGCCAGCCAGAG</i> <i>C</i>	<i>ACCTTACAGCTCCCACAGGT</i>
<i>BCL2L1</i>	<i>Bcl-2-like protein 1</i>	NM_138578.1	<i>CTGGGTTCCCTTTCCTTCCA</i>	<i>CCTGGTCCTTGCATCTTTATC</i> <i>C</i>
<i>TGFβ2</i>	<i>Transforming growth factor-beta 2</i>	NM_001135599.2	<i>CGAGAGGAGCGACGAAGAG</i> <i>T</i>	<i>GGACTGTCTGGAGCACAAGC</i>
<i>ERα</i>	<i>Estrogen Receptor 1 (ESR1)</i>	NM_000125.3	<i>GGCAGACAGGGAGCTGGTT</i> <i>CA</i>	<i>GGAGCGCCAGACGAGACCA</i> <i>AT</i>
<i>Cyclin D1</i>	<i>Cyclin D1 (CCND1)</i>	NM_053056.2	<i>ACAGATCATCCGCAAACAC</i> <i>G</i>	<i>TCTGGAGAGGAAGCGTGTGA</i>
<i>18S</i>	<i>18S ribosomal 5</i>	NR_003286.2	<i>GTGCATGGCCGTTCTTAGTT</i> <i>G</i>	<i>CATGCCAGAGTCTCGTTCGT</i> <i>T</i>

**Supplemental Fig. S1: PR protein expression in treated groups.** (a) Western blot analysis of xenografted tumor protein extracts (50  $\mu$ g) was performed using anti-PR antibody recognizing both PR isoforms (Santa Cruz) and anti-GAPDH antibody for sample loading control (left panel). PRB and PRA protein expression were quantified relatively to GAPDH loading control. (b) Western blot analysis of xenografted tumor protein extracts (50  $\mu$ g) was performed using Let126 antibody recognizing specifically PRB isoform (N-terminal domain) (Lorenzo et al., 1988) and anti- $\beta$ -actin antibody for sample loading control (left panel). PRB protein expression was quantified relatively to  $\beta$ -actin loading control. Data are expressed as fold induction compared to control condition arbitrarily set at 1, and are means  $\pm$  SEM. \*, \*\*, \*\*\* indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001, respectively, compared to the control condition and **x**, **xx**, **xxx** symbols indicate  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001, respectively, and represent the comparison between the three treated groups (P4, UPA, APR19) (non-parametric Mann Whitney U-tests).

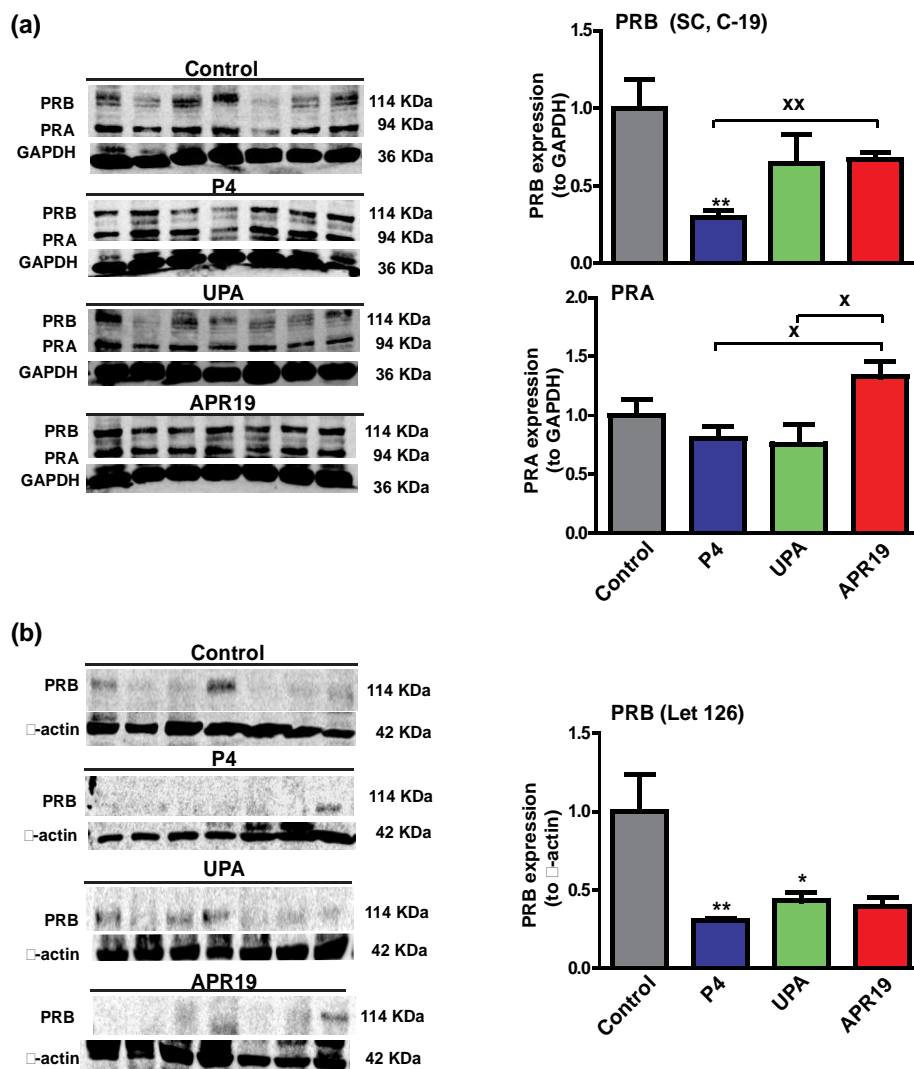


Fig. S1



# **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

## **Discussion générale et perspectives**

Le cancer de sein est une pathologie hétérogène dont les causes sont multiples et varient avec l'âge, la prédisposition génétique, la mode de vie, les antécédents personnels et familiaux (Shah et al., 2014). Les profils d'expression génique et les études de microarrays ont permis de classer le cancer de sein en plusieurs sous-types moléculaires (Malhotra et al., 2010; Vuong et al., 2014; Weigelt et al., 2010; Weigelt and Reis-Filho, 2009). Outre la présence des marqueurs spécifiques (les cytokératines de types basales ou luminales) et l'expression des gènes spécifiques qui caractérisent et distinguent les deux sous-types luminal et basal, ces sous-types diffèrent aussi par l'expression des récepteurs aux hormones stéroïdiennes, la progestérone et les œstrogènes, les récepteurs de la progestérone et des œstrogènes (PR, ER), au niveau des cellules épithéliales luminales mammaires, et leur absence au niveau basal. PR et ER sont des facteurs de faible pronostic chez les patientes atteintes de cancer de sein, par contre ils sont des facteurs prédictifs forts de la réponse aux traitements endocriniens (Shah et al., 2014). Soixante à 65% de la totalité de cancer de sein expriment PR et 70% expriment ER.

Il est depuis longtemps établi que les œstrogènes sont les mitogènes principaux du cancer de sein, et des thérapies visant à inhiber la signalisation œstrogénique ont été conçues comme le développement des anti-œstrogènes (le tamoxifène) et des inhibiteurs de l'aromatase (Hah and Kraus, 2014; Shah et al., 2014; Thomas and Gustafsson, 2015). L'exposition aux progestatifs contribue aussi au cancer de sein, notamment deux grandes études cliniques indépendantes ont établi un lien entre les traitements hormonaux substitutifs chez les femmes post-ménopausées, et un risque accru du cancer de sein (1997; Lahmann et al., 2004). Elles ont montré que l'association des progestatifs de synthèse (MPA) aux œstrogènes augmente le risque de cancer de sein, retarde sa détection et son diagnostic et augmente la mortalité. Ce risque varie en fonction du temps et de la durée du traitement, l'initiation du traitement chez les femmes en début de ménopause

augmente ce risque (Anderson et al., 2003; Beral, 2003; Beral et al., 2011; Chlebowski and Anderson, 2012; Chlebowski et al., 2010; Chlebowski et al., 2013). Plusieurs études s'ajoutent pour renforcer le rôle des progestatifs dans la stimulation de la prolifération cellulaire au niveau des lésions précoces (Hofseth et al., 1999; Horwitz et al., 2008; Horwitz and Sartorius, 2008; Joshi et al., 2010; Lanari et al., 2009; Santen, 2003, 2014).

La progestérone et les progestatifs de synthèse exercent leurs actions *via* leur récepteur nucléaire, le récepteur de la progestérone (PR). PR est un facteur de transcription activé par les ligands, il agit en aval de la signalisation d'ER, et son expression nécessite la présence des œstrogènes. Il se lie à l'ADN, soit directement *via* les éléments de réponse à la progestérone (PRE) présents sur les régions promotrices de ses gènes cibles, soit indirectement par l'interaction avec des facteurs de transcription (AP-1, STAT5..), pour recruter finalement les corégulateurs et activer la transcription de gènes associés à la physiopathologie du cancer du sein (la prolifération des cellules mammaires, par exemple). Le gène *PGR* code pour deux isoformes PRA et PRB issus de la transcription alternative à partir de deux promoteurs différents d'un même gène (Kastner et al., 1990). Ces deux isoformes partagent une similarité dans leurs domaines à l'exception d'une séquence de 164 aa située dans la région N-terminal de l'isoforme PRB hébergeant la troisième fonction activatrice (AF3) de PRB (Sartorius et al., 1994b) qui lui confère des propriétés transcriptionnelles distinctes de PRA (Giangrande and McDonnell, 1999). PRA et PRB possèdent des fonctions physiologiques différentes et spécifiques sur leurs tissus cibles. Les modèles d'inactivation sélective de l'un ou l'autre isoforme de *PR* dans des souris ont montré que PRA et PRB accomplissent un rôle crucial au niveau de l'utérus et les glandes mammaires respectivement (Conneely et al., 2003; Conneely et al., 2001; Mani et al., 2006; Mulac-Jericevic et al., 2003; Mulac-Jericevic et al., 2000). PRA et PRB sont co-exprimés d'une façon équimolaire dans la majorité des cellules épithéliales mammaires positives pour PR (Hagan et al., 2013;

Knutson et al., 2012; Owen et al., 1998), et l'altération de leurs niveaux d'expression avec une prédominance de l'expression de PRA est associée à une carcinogénèse mammaire (McGowan et al., 2004; Mote et al., 1999; Mote et al., 2002; Mote et al., 2015; Mote et al., 2007). L'altération de ce rapport s'explique soit par la phosphorylation de PRB sur la Ser<sup>294</sup>, soit par la méthylation de PRA (Hagan and Lange, 2014). Lors du traitement hormonal substitutif, les œstrogènes stimulent et maintiennent l'expression de PRB dans les cellules cancéreuses (Graham et al., 1995a; Lind et al., 1978; Mangal et al., 1997; Mote et al., 2015). L'isoforme PRA contribue aussi à une résistance aux thérapies endocrinienne et une réponse aux traitements par les antiprogestatifs (Mote et al., 2015; Wargon et al., 2009; Wargon et al., 2015).

PR est considéré comme une cible pharmacologique thérapeutique possiblement utilisable dans la prise en charge de certains désordres physiopathologiques, en contraception et dans le traitement du cancer de sein hormono-dépendant et le cancer de l'utérus d'où l'intérêt des antagonistes de PR ou les antiprogestatifs.

Les études cliniques basées sur l'application des antagonistes de PR (l'Onapristone, le Lonaprisan) (Jonat et al., 2013; Klijn et al., 1989; Perraut et al., 1996; Robertson et al., 1999; Romieu et al., 1987) n'étaient pas efficaces et ont échoué dû à des problèmes de toxicité hépatique et ou de l'absence de la réponse au traitement. En revanche en 2006, Poole et ses collaborateurs ont réussi à inhiber complètement la tumorigénèse mammaire murine induite chez des souris invalidées conditionnellement pour *BRCA1* et *P53* par l'utilisation de la mifépristone (RU486) (un antagoniste de PR utilisé en contraception) (Poole et al., 2006). Les modèles d'études *in vitro*, *in vivo* et précliniques sont appliquées pour mieux comprendre le rôle contradictoire de la progestérone, des progestatifs, des antiprogestatifs et de leur récepteur dans la carcinogénèse mammaire. Au cours de cette thèse, nous avons évalué les effets de deux antagonistes de PR, l'Ulipristal acétate (UPA), un modulateur sélectif de PR actuellement

commercialisé en contraception d'urgence et dans le traitement des fibromes utérins (Donnez et al., 2015; Donnez et al., 2012a; Donnez et al., 2012b; Donnez et al., 2014; Glasier et al., 2010) et de nouveaux antagonistes passifs et sélectifs de PR, les APRns (Khan et al., 2013). Pour ce faire, nous avons utilisé deux modèles expérimentaux complémentaires : un modèle d'étude *in vitro* de lignées cellulaires mammaires humaines et un modèle préclinique de xénogreffe de tumeur humaine mammaire chez des souris nude (Khan et al., 2012; Marangoni and Poupon, 2014; Marangoni et al., 2007).

### **UPA inhibe la prolifération cellulaire progestérone-PRA-dépendante et inhibe l'expression de BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>**

Les données de la littérature sur l'activité de la progestérone, des progestatifs et des antiprogestatifs dans la prolifération des lignées cellulaires humaines mammaires sont contradictoires et varient entre la stimulation ou l'inhibition de la prolifération, en fonction du type cellulaire, du contexte tissulaire et du modèle d'étude (Giulianelli et al., 2013; Lanari et al., 2012). La plupart des modèles d'études *in vitro* utilisent des lignées cellulaires mammaires luminales qui expriment PR et ER comme la lignée T47D où l'une ou l'autre isoforme de PR sont invalidées mais toujours de façon dépendante des œstrogènes et de ER (Sartorius et al., 1994a; Wargon et al., 2015). Dans cette partie, nous avons utilisé une lignée cancéreuse mammaire humaine basale, MDA-iPRAB, dans laquelle l'expression de PRA et/ou PRB est induite d'une façon bi-inductible, conditionnelle et indépendamment de ER et des œstrogènes (Khan et al., 2012). Cette lignée nous a permis aussi d'étudier la contribution de chaque isoforme séparément dans les processus de la tumorigénèse mammaire et les profils d'expression génique, vu que les deux isoformes exercent des activités transcriptionnelles en partie différentes (Clarke and Graham,

2012; Giulianelli et al., 2013; Hagan and Lange, 2014; Khan et al., 2012; Knutson and Lange, 2014; Richer et al., 2002; Tung et al., 2006).

Nous avons testé les effets de la progestérone sur la prolifération de la lignée MDA-iPRA et/ou PRB. D'une façon intéressante, nous avons démontré après nombreuses séries de tests que la progestérone stimule la prolifération cellulaire uniquement dans la lignée MDA-iPRA et pour la première fois nous avons pu détecter un effet prolifératif de la progestérone dans un modèle de lignée cellulaire mammaire basale ER-indépendant. Ce résultat est à l'opposé des précédentes études qui ont démontrées que la progestérone exerce un effet antiprolifératif ou non prolifératif (Clarke et al., 1997a; Groshong et al., 1997b; Leo and Lin, 2008; Tanos et al., 2013), à l'exception des travaux du laboratoire de Briskin où la progestérone stimule la prolifération cellulaire uniquement dans des microstructures isolées de tissu humain mammaire normal (Briskin, 2013; Tanos et al., 2013). L'isoforme PRA s'avère importante non seulement à cause de sa surexpression établie dans la tumorigénèse mammaire et son rôle dans la réponse aux antiprogestatifs et la résistance aux traitements, mais aussi comme nous l'avons montré dans la prolifération cellulaire du modèle utilisé dans ce travail (Mote et al., 2002; Mote et al., 2015; Mote et al., 2007; Wargon et al., 2015). D'autres tests de la prolifération cellulaire seront intéressants pour mieux mettre en évidence l'activité de la progestérone dans la stimulation de la prolifération de cette lignée via PRA.

Pour mieux appréhender la signature moléculaire et l'activité transcriptionnelle de PRA dans les processus clés du cancer de sein (l'apoptose, la métastase..), nous nous sommes basés sur une analyse transcriptomique menée précédemment (Khan et al., 2012) pour sélectionner quelques gènes spécifiques de PRA en présence de la progestérone. Parmi ces gènes, nous nous sommes intéressés à *BCL2-L1*, un marqueur anti-apoptotique connu. *BCL2-L1* appartient à la famille de Bcl2, Bcl2 est un important facteur de pronostic indépendant du cancer de sein triple négatif, et de

cancer de sein (PR+, ER+, Her2-) (Abdel-Fatah et al., 2013; Seong et al., 2015). Quelques études ont montré que la surexpression de Bcl2 active et stimule la tumorigénèse et les processus métastatiques de la migration et d'invasion cellulaire *in vitro* (Amundson et al., 2000; Divito et al., 2004). Il a été déjà démontré que PR stimule l'expression de BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> dans la lignée T47D (Moore et al., 2000; Yin et al., 2012), et que le recrutement de PR s'effectue sur des sites de liaison génomique sur le gène *BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>* mais sans spécifier l'isoforme (Bertucci et al., 2013; Clarke and Graham, 2012). Nous avons validé et confirmé que l'expression de BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> (transcrit et protéine) est stimulée par PRA en présence de la progestérone dans la lignée MDA-iPRA (ER-). Nous avons aussi démontré par des analyses d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) que PRA sous l'action de la progestérone, est recruté sur un site de liaison à PR situé à +58 kb, et s'accompagne d'un recrutement de l'ARN polymérase II et du coactivateur SRC1 aboutissant à l'activation de la transcription. Nous avons apporté ainsi des nouveaux éléments sur le mécanisme d'action de l'isoforme PRA. PRA induite dans une lignée cancéreuse mammaire basale, indépendamment d'ER et des œstrogènes, est capable de stimuler ou inhiber l'expression d'un certain nombre de gènes (*BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>*), de participer à la régulation de la machinerie transcriptionnelle de ces gènes (recrutement des coactivateurs....). Le rôle de BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> dans le processus anti-apoptotique est bien connu, il serait indispensable d'étudier l'expression d'autres gènes et protéines clés de l'apoptose (caspase 3, PARP, Bax, Bad...).

Dans le deuxième volet de cette partie, nous avons étudié les effets de l'antagoniste de PR, l'Ulipristal acétate (UPA) sur la prolifération cellulaire progestérone-PRA-dépendante et la régulation de l'expression des gènes sélectionnés. L'UPA est un antagoniste de PR avec une faible activité anti-glucocorticoïde (Attardi et al., 2004; Attardi et al., 2002; Chabbert-Buffet et al., 2007; Hild et al., 2000; Richardson and Maltz, 2012; Xu et al., 2006; Xu et al., 2005; Yun et al., 2015). Au niveau de la prolifération cellulaire, UPA, comme la mifépristone (Khan et al., 2012),

inhibe la prolifération de la MDA-iPRA. Il agit ainsi comme un anti-progestatif à activité antiproliférative. Sur le plan de la régulation de l'expression du gène BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>, UPA inhibe son expression (transcrit et protéine) dans la lignée MDA-iPRA. Nous avons conclu que l'UPA s'oppose à l'effet de la progestérone sur la prolifération cellulaire et sur l'expression de BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>. Cette molécule peut induire une activité apoptotique. Dans ce chapitre, nous avons utilisé un modèle de lignée cellulaire mammaire basale humaine hormono-indépendante. Une fois que l'expression de PR est induite, ce modèle demeure hormono-isoforme-dépendant tout en maintenant son indépendance des œstrogènes. Nous avons mis en évidence d'une part plusieurs fonctions de l'isoforme PRA impliquées dans la prolifération cellulaire et la régulation de l'expression de gènes et la machinerie transcriptionnelle, et d'autre part, nous avons apporté de nouvelles données sur l'antagoniste UPA dans un modèle de lignée cellulaire humaine mammaire basale (activité antiproliférative et pro-apoptotique).

### **Effets des antiprogestatifs UPA et APR19 dans un modèle de xénogreffe de tumeur humaine mammaire chez des souris nude**

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons évalué outre l'UPA, les effets d'une nouvelle classe d'antagonistes de PR, « les APRns » et plus particulièrement l'APR19 (Khan et al., 2013). L'APR19 diffère des antagonistes actuels par l'absence de groupement encombrant le 11β-aryl en position C11. C'est un antagoniste sélectif pur de PR sans activité mixte (antagoniste/agoniste) (Khan et al., 2013). A l'opposé des antagonistes actuels de PR comme la mifépristone (RU486) ou l'asoprisnil ... (Madauss et al., 2007a; Madauss et al., 2007b), APR19 est qualifié d'antagoniste passif dû à son incapacité à recruter des corégulateurs (Khan et al., 2013). Nous avons voulu tester les propriétés anti-tumorales de l'UPA et l'APR19 dans un modèle d'étude *in vivo*. Dans ce but, nous avons envisagé une nouvelle approche qui consiste à xénogreffer de tissus



tumoraux mammaires obtenus directement de la patiente chez des souris nude. Les modèles d'études précliniques actuels de xéno greffes de lignées cellulaires humaines cancéreuses et les souris génétiquement modifiées ne sont pas forcément adaptés pour développer un nouveau traitement et évaluer son efficacité (les manipulations génétiques in vitro, la perte d'hétérogénéité de la tumeur d'origine..). En revanche, les xéno greffes de tumeurs dérivées des patientes constituent un modèle pertinent malgré ses inconvénients (la lourdeur de la méthodologie appliquée, la disponibilité des tumeurs, le temps de la prise tumorale, etc.....). Ils préservent l'identité de la tumeur d'origine, son hétérogénéité, ses profils d'expression génique et ses mutations ainsi que les altérations au niveau des gènes et des chromosomes. Les processus d'angiogenèse et de prolifération tumorale d'origine humaine sont maintenus chez la souris hôte, par contre les protéines du stroma et de la matrice extracellulaire humaine sont réprimées et substituées par celles de la souris nude hôte (Marangoni and Poupon, 2014; Marangoni et al., 2007; Whittle et al., 2015).

En partenariat avec Xentech, nous avons effectué plusieurs séries d'études de xéno greffes de la tumeur humaine mammaire HBCx-34 dans des souris immuno-déficientes dans le but de tester par la suite par les antagonistes. La tumeur HBCx-34 est d'origine carcinome canalaire invasif, le gène suppresseur de tumeur *P53* n'est pas muté et Her2 n'est pas surexprimé. Dans un premier temps, nous avons confirmé l'expression de PR dans la tumeur HBCx-34 en transcrit et protéine. Lors des deux premières séries, nous avons constaté une perte d'expression de la cible PR à la fin du traitement ce qui ce qui excluait l'étude de l'activité d'UPA et APR19. La disparition de PR était due à l'arrêt de l'apport quotidien en œstrogènes (E2-  $\beta$ -œstradiol), vu que l'expression de PR nécessite ER et les œstrogènes. Une troisième série a été effectuée par la suite tout en maintenant cette fois l'apport quotidien en  $\beta$ -œstradiol (8.5 mg/L), mais sans introduire les antagonistes. Dans cette série, nous avons mis en évidence d'une part la prolifération et la

croissance œstrogéno-dépendante de la tumeur HBCx-34, et confirmé, d'autre part, le maintien de l'expression de PR. Après avoir mis au point le modèle de xénogreffe et déterminer les caractéristiques de la tumeur HBCx-34, nous avons effectué une quatrième série dans laquelle nous avons étudié les antagonistes UPA et APR19. Après les différentes procédures de xénogreffes, toujours en maintenant l'apport quotidien en E2, les souris ont été divisées en quatre groupes : Contrôle, progestérone (P4) (50 mg/kg), UPA et APR19. L'UPA a été utilisé à une dose de 130 mg/kg pour une période de 42 jours (5 jours par semaine). Nous avons testé également une faible dose de 45 mg/kg mais les résultats n'étaient pas concluants. Cette dose de 130 mg/kg dépasse largement la dose administrée chez la femme qui peut atteindre 50 mg/jour sans avoir un effet toxique. En parallèle, l'APR19 a été administré à une dose de 20 mg/kg pour 42 jours (1 jour sur 2). L'APR19 est un antagoniste non commercialisé et synthétisé récemment en collaboration avec un groupe de chimistes de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry. Nous ne disposons pas de grande quantité de cette molécule, et nous n'avons pas des données sur sa pharmacologie, ni sur sa demi-vie, ni encore sur son métabolisme chez la souris. Nos résultats préliminaires sont encourageants. Nous avons pu démontrer suite aux analyses de la masse et des volumes tumoraux que l'UPA réduit significativement la masse tumorale et induit une régression tumorale. Cette régression a été déterminée par le calcul du rapport T/C (%) qui montre une diminution du volume tumoral par rapport au groupe contrôle jusqu'au jour 28 de traitement (lorsque la totalité des groupes de souris est conservée). Une hétérogénéité tumorale a été bien détectée macroscopiquement entre les différents groupes de traitement et au sein du même groupe. L'analyse de l'expression de PR a été une de nos priorités. Nous avons bien confirmé l'expression de PR à la fin du traitement dans le groupe contrôle. Dans les deux groupes UPA et APR19, nous avons démontré que UPA stimule fortement l'expression de PR, probablement avec les fortes doses utilisées. Alors que l'APR19 se comporte comme le RU486 (Liang et al.,

2010; Liang and Hyder, 2005; Liang et al., 2005) et inhibe l'expression de PR. L'augmentation de la nécrose et de l'apoptose caractérisent l'efficacité anti-tumorale des antiprogestatifs (Lanari et al., 2012). Dans ce cadre-là, nous avons mesuré les surfaces nécrotiques qui ont une tendance à augmenter dans le groupe de traitement par l'APR19. En ce qui concerne l'apoptose, les études sur les antiprogestatifs (RU486....) montrent qu'ils induisent une augmentation précoce de l'expression des gènes *P21*, *P27* et *P53*, suivie par une diminution tardive de l'expression des récepteurs hormonaux (Vanzulli et al., 2002; Vanzulli et al., 2005). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés dans un premier temps, au marqueur anti-apoptotique BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>, nous avons montré que APR19 stimule son expression de son transcrite alors que UPA inhibe son expression protéique. Pour mieux évaluer les effets d'UPA et APR19 au niveau du processus apoptotique, le marqueur BCL<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> ne suffit pas. Actuellement, nous sommes en train d'étudier l'expression d'autres marqueurs clés de l'apoptose comme la caspase-3 clivée, PARP clivé, le complexe Bax/Bad. L'analyse de la prolifération cellulaire tumorale est un des paramètres clés pour évaluer l'efficacité anti-tumorale des antagonistes. Dans ce but, nous avons analysé l'expression de deux marqueurs connus le Ki67 et la Cycline D1. Nous avons démontré que seul l'UPA diminue leurs expressions. D'autres marqueurs de la prolifération cellulaire comme le PCNA sont en cours d'étude pour mieux établir le rôle de ces antagonistes sur la prolifération cellulaire. Le modèle d'étude de lignée cellulaire cancéreuse mammaire bi-inductible et le modèle de xéno greffe de la tumeur mammaire humaine œstrogéno-dépendante possèdent des limites et ne suffisent pas à évaluer les effets anti-tumoraux des antagonistes. Néanmoins, nous avons pu apporter de nouvelles données intéressantes et originales sur l'UPA.

L'ensemble de ces résultats obtenus jusqu'à présent nous amène à conclure qu'il peut être utilisé comme anti-progestatif de PR à activité antiproliférative et pro-apoptotique au niveau du tissu mammaire tumoral. Ces résultats suggèrent qu'il pourrait aussi être proposé comme un

traitement potentiel de cancer de sein hormono-dépendant. Les analyses ne sont pas encore achevées, et plusieurs marqueurs sont en cours d'étude pour élargir le plus possible les pistes d'investigation de l'activité de ces deux antagonistes.

## Références bibliographiques

- (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* (London, England) *350*, 1047-1059.
- (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* (London, England) *360*, 187-195.
- (2012). Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol* *13*, 1141-1151.
- Abdel-Fatah, T.M., Perry, C., Dickinson, P., Ball, G., Moseley, P., Madhusudan, S., Ellis, I.O., and Chan, S.Y. (2013). Bcl2 is an independent prognostic marker of triple negative breast cancer (TNBC) and predicts response to anthracycline combination (ATC) chemotherapy (CT) in adjuvant and neoadjuvant settings. *Ann Oncol* *24*, 2801-2807.
- Abdel-Hafiz, H.A., and Horwitz, K.B. (2014). Post-translational modifications of the progesterone receptors. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *140*, 80-89.
- Abedin, S.A., Thome, J.L., Battaglia, S., Maguire, O., Homung, L.B., Doherty, A.P., Mills, I.G., and Campbell, M.J. (2009). Elevated NCOR1 disrupts a network of dietary-sensing nuclear receptors in bladder cancer cells. *Carcinogenesis* *30*, 449-456.
- Afhuppe, W., Beekman, J.M., Otto, C., Korr, D., Hoffmann, J., Fuhrmann, U., and Moller, C. (2010). In vitro characterization of ZK 230211-A type III progesterone receptor antagonist with enhanced antiproliferative properties. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *119*, 45-55.
- Allan, G.F., and Sui, Z. (2005). Non-steroidal progesterone receptor specific ligands. *Mini Rev Med Chem* *5*, 701-708.
- Amazit, L., Roseau, A., Khan, J.A., Chauchereau, A., Tyagi, R.K., Loosfelt, H., Leclerc, P., Lombes, M., and Guiochon-Mantel, A. (2011). Ligand-dependent degradation of SRC-1 is pivotal for progesterone receptor transcriptional activity. *Mol Endocrinol* *25*, 394-408.
- Amundson, S.A., Myers, T.G., Scudiero, D., Kitada, S., Reed, J.C., and Fornace, A.J., Jr. (2000). An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer research* *60*, 6101-6110.
- Anderson, G.L., Chlebowski, R.T., Aragaki, A.K., Kuller, L.H., Manson, J.E., Gass, M., Bluhm, E., Connelly, S., Hubbell, F.A., Lane, D., *et al.* (2012). Conjugated equine oestrogen and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women with hysterectomy: extended follow-up of the Women's Health Initiative randomised placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* *13*, 476-486.
- Anderson, G.L., Manson, J., Wallace, R., Lund, B., Hall, D., Davis, S., Shumaker, S., Wang, C.Y., Stein, E., and Prentice, R.L. (2003). Implementation of the Women's Health Initiative study design. *Ann Epidemiol* *13*, S5-17.
- Angers, S., and Moon, R.T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 468-477.
- Antoniou, A., Pharoah, P.D., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., *et al.* (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* *72*, 1117-1130.
- Aparicio, S., Hidalgo, M., and Kung, A.L. (2015). Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. *Nat Rev Cancer* *15*, 311-316.
- Asselin-Labat, M.L., Vaillant, F., Sheridan, J.M., Pal, B., Wu, D., Simpson, E.R., Yasuda, H., Smyth, G.K., Martin, T.J., Lindeman, G.J., *et al.* (2010). Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* *465*, 798-802.
- Attardi, B.J., Burgenson, J., Hild, S.A., and Reel, J.R. (2004). In vitro antiprogesterone/antiglucocorticoid activity and progesterone and glucocorticoid receptor binding of the putative metabolites and synthetic derivatives of CDB-2914, CDB-4124, and mifepristone. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *88*, 277-288.
- Attardi, B.J., Burgenson, J., Hild, S.A., Reel, J.R., and Blye, R.P. (2002). CDB-4124 and its putative monodemethylated metabolite, CDB-4453, are potent antiprogesterone with reduced antiglucocorticoid activity: in vitro comparison to mifepristone and CDB-2914. *Mol Cell Endocrinol* *188*, 111-123.
- Augereau, P., Badia, E., Balaguer, P., Carascossa, S., Castet, A., Jalaguier, S., and Cavailles, V. (2006). Negative regulation of hormone signaling by RIP140. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *102*, 51-59.
- Aupperlee, M.D., and Haslam, S.Z. (2007). Differential hormonal regulation and function of progesterone receptor isoforms in normal adult mouse mammary gland. *Endocrinology* *148*, 2290-2300.

- Aupperlee, M.D., Smith, K.T., Kariagina, A., and Haslam, S.Z. (2005). Progesterone receptor isoforms A and B: temporal and spatial differences in expression during murine mammary gland development. *Endocrinology* *146*, 3577-3588.
- Bagheri-Yarmand, R., Talukder, A.H., Wang, R.A., Vadlamudi, R.K., and Kumar, R. (2004). Metastasis-associated protein 1 deregulation causes inappropriate mammary gland development and tumorigenesis. *Development* *131*, 3469-3479.
- Bakker, G.H., Setyono-Han, B., Henkelman, M.S., de Jong, F.H., Lamberts, S.W., van der Schoot, P., and Klijn, J.G. (1987). Comparison of the actions of the antiprogestin mifepristone (RU486), the progestin megestrol acetate, the LHRH analog buserelin, and ovariectomy in treatment of rat mammary tumors. *Cancer Treat Rep* *71*, 1021-1027.
- Bamberger, A.M., Milde-Langosch, K., Schulte, H.M., and Loning, T. (2000). Progesterone receptor isoforms, PR-B and PR-A, in breast cancer: correlations with clinicopathologic tumor parameters and expression of AP-1 factors. *Horm Res* *54*, 32-37.
- Banwell, C.M., MacCartney, D.P., Guy, M., Miles, A.E., Uskokovic, M.R., Mansi, J., Stewart, P.M., O'Neill, L.P., Turner, B.M., Colston, K.W., *et al.* (2006). Altered nuclear receptor corepressor expression attenuates vitamin D receptor signaling in breast cancer cells. *Clin Cancer Res* *12*, 2004-2013.
- Bardou, V.J., Arpino, G., Elledge, R.M., Osborne, C.K., and Clark, G.M. (2003). Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *21*, 1973-1979.
- Bast, R.C., Jr., Ravdin, P., Hayes, D.F., Bates, S., Fritsche, H., Jr., Jessup, J.M., Kemeny, N., Locker, G.Y., Menell, R.G., and Somerfield, M.R. (2001). 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *19*, 1865-1878.
- Battaglia, S., Maguire, O., and Campbell, M.J. (2010). Transcription factor co-repressors in cancer biology: roles and targeting. *Int J Cancer* *126*, 2511-2519.
- Baumann, C.T., Lim, C.S., and Hager, G.L. (1999). Intracellular localization and trafficking of steroid receptors. *Cell Biochem Biophys* *31*, 119-127.
- Beleut, M., Rajaram, R.D., Caikovski, M., Ayyanan, A., Germano, D., Choi, Y., Schneider, P., and Briskin, C. (2010). Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 2989-2994.
- Beral, V. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet (London, England)* *362*, 419-427.
- Beral, V., Reeves, G., Bull, D., and Green, J. (2011). Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy. *J Natl Cancer Inst* *103*, 296-305.
- Bertucci, P.Y., Nacht, A.S., Allo, M., Rocha-Viegas, L., Ballare, C., Soronellas, D., Castellano, G., Zaurin, R., Komblitt, A.R., Beato, M., *et al.* (2013). Progesterone receptor induces bcl-x expression through intragenic binding sites favoring RNA polymerase II elongation. *Nucleic Acids Res* *41*, 6072-6086.
- Bissery, M.C., and Chabot, G.G. (1991). [History and new development of screening and evaluation methods of anticancer drugs used in vivo and in vitro]. *Bull Cancer* *78*, 587-602.
- 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.
- Boonyaratankomkit, V., McGowan, E., Sherman, L., Mancini, M.A., Cheskis, B.J., and Edwards, D.P. (2007). The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Mol Endocrinol* *21*, 359-375.
- Bottino, M.C., Cerliani, J.P., Rojas, P., Giulianelli, S., Soldati, R., Mondillo, C., Gorostiaga, M.A., Pignataro, O.P., Calvo, J.C., Gutkind, J.S., *et al.* (2011). Classical membrane progesterone receptors in murine mammary carcinomas: agonistic effects of progestins and RU-486 mediating rapid non-genomic effects. *Breast Cancer Res Treat* *126*, 621-636.
- Bourguet, W., Germain, P., and Gronemeyer, H. (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in pharmacological sciences* *21*, 381-388.
- Braunsberg, H., Coldham, N.G., Leake, R.E., Cowan, S.K., and Wong, W. (1987). Actions of a progestogen on human breast cancer cells: mechanisms of growth stimulation and inhibition. *Eur J Cancer Clin Oncol* *23*, 563-571.
- Brewster, A.M., Hortobagyi, G.N., Broglio, K.R., Kau, S.W., Santa-Maria, C.A., Arun, B., Buzdar, A.U., Booser, D.J., Valero, V., Bondy, M., *et al.* (2008). Residual risk of breast cancer recurrence 5 years after adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst* *100*, 1179-1183.
- Briskin, C. (2013). Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight. *Nat Rev Cancer* *13*, 385-396.
- Briskin, C., and O'Malley, B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a003178.
- Briskin, C., Park, S., Vass, T., Lydon, J.P., O'Malley, B.W., and Weinberg, R.A. (1998). A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 5076-5081.
- Britton, D.J., Hutcheson, I.R., Knowlden, J.M., Barrow, D., Giles, M., McClelland, R.A., Gee, J.M., and Nicholson, R.I. (2006). Bidirectional cross talk between ERalpha and EGFR signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. *Breast Cancer Res Treat* *96*, 131-146.

- Catelli, M.G., Binart, N., Feramisco, J.R., and Helfman, D.M. (1985). Cloning of the chick hsp 90 cDNA in expression vector. *Nucleic Acids Res* *13*, 6035-6047.
- Cazzaniga, M., and Bonanni, B. (2012). Breast cancer chemoprevention: old and new approaches. *J Biomed Biotechnol* *2012*, 985620.
- Chabbert-Buffet, N., Esber, N., and Bouchard, P. (2014). Fibroid growth and medical options for treatment. *Fertil Steril* *102*, 630-639.
- Chabbert-Buffet, N., Meduri, G., Bouchard, P., and Spitz, I.M. (2005). Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications. *Hum Reprod Update* *11*, 293-307.
- Chabbert-Buffet, N., Pintiaux-Kairis, A., and Bouchard, P. (2007). Effects of the progesterone receptor modulator VA2914 in a continuous low dose on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and endometrium in normal women: a prospective, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* *92*, 3582-3589.
- Chabbert-Buffet, N., Pintiaux, A., and Bouchard, P. (2012). The imminent dawn of SPRMs in obstetrics and gynecology. *Mol Cell Endocrinol* *358*, 232-243.
- Chalbos, D., Vignon, F., Keydar, I., and Rochefort, H. (1982). Estrogens stimulate cell proliferation and induce secretory proteins in a human breast cancer cell line (T47D). *J Clin Endocrinol Metab* *55*, 276-283.
- Chatterton, R.T., Jr., Lydon, J.P., Mehta, R.G., Mateo, E.T., Pletz, A., and Jordan, V.C. (2002). Role of the progesterone receptor (PR) in susceptibility of mouse mammary gland to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hormone-independent preneoplastic lesions in vitro. *Cancer Lett* *188*, 47-52.
- Chauchereau, A., Amazit, L., Quesne, M., Guiochon-Mantel, A., and Milgrom, E. (2003). Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1. *The Journal of biological chemistry* *278*, 12335-12343.
- Chen, C.C., Hardy, D.B., and Mendelson, C.R. (2011a). Progesterone receptor inhibits proliferation of human breast cancer cells via induction of MAPK phosphatase 1 (MKP-1/DUSP1). *The Journal of biological chemistry* *286*, 43091-43102.
- Chen, J.D., and Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* *377*, 454-457.
- Chen, W.Y., Rosner, B., Hankinson, S.E., Colditz, G.A., and Willett, W.C. (2011b). Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *Jama* *306*, 1884-1890.
- Chlebowski, R.T., and Anderson, G.L. (2012). Changing concepts: Menopausal hormone therapy and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* *104*, 517-527.
- Chlebowski, R.T., Anderson, G.L., Gass, M., Lane, D.S., Aragaki, A.K., Kuller, L.H., Manson, J.E., Stefanick, M.L., Ockene, J., Sarto, G.E., *et al.* (2010). Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. *Jama* *304*, 1684-1692.
- Chlebowski, R.T., Hendrix, S.L., Langer, R.D., Stefanick, M.L., Gass, M., Lane, D., Rodabough, R.J., Gilligan, M.A., Cyr, M.G., Thomson, C.A., *et al.* (2003). Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *Jama* *289*, 3243-3253.
- Chlebowski, R.T., Kuller, L.H., Prentice, R.L., Stefanick, M.L., Manson, J.E., Gass, M., Aragaki, A.K., Ockene, J.K., Lane, D.S., Sarto, G.E., *et al.* (2009). Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women. *The New England journal of medicine* *360*, 573-587.
- Chlebowski, R.T., Manson, J.E., Anderson, G.L., Cauley, J.A., Aragaki, A.K., Stefanick, M.L., Lane, D.S., Johnson, K.C., Wactawski-Wende, J., Chen, C., *et al.* (2013). Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *J Natl Cancer Inst* *105*, 526-535.
- Christov, K., Grubbs, C.J., Shilkaitis, A., Juliana, M.M., and Lubet, R.A. (2007). Short-term modulation of cell proliferation and apoptosis and preventive/therapeutic efficacy of various agents in a mammary cancer model. *Clin Cancer Res* *13*, 5488-5496.
- Christov, K., Ikui, A., Shilkaitis, A., Green, A., Yao, R., You, M., Grubbs, C., Steele, V., Lubet, R., and Weinstein, I.B. (2003). Cell proliferation, apoptosis, and expression of cyclin D1 and cyclin E as potential biomarkers in tamoxifen-treated mammary tumors. *Breast Cancer Res Treat* *77*, 253-264.
- Clarke, C.L., and Graham, J.D. (2012). Non-overlapping progesterone receptor cisomes contribute to cell-specific transcriptional outcomes. *PLoS ONE* *7*, e35859.
- Clarke, R., Liu, M.C., Bouker, K.B., Gu, Z., Lee, R.Y., Zhu, Y., Skaar, T.C., Gomez, B., O'Brien, K., Wang, Y., *et al.* (2003). Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene* *22*, 7316-7339.
- Clarke, R.B., Howell, A., and Anderson, E. (1997a). Estrogen sensitivity of normal human breast tissue in vivo and implanted into athymic nude mice: analysis of the relationship between estrogen-induced proliferation and progesterone receptor expression. *Breast Cancer Res Treat* *45*, 121-133.
- Clarke, R.B., Howell, A., Potten, C.S., and Anderson, E. (1997b). Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer research* *57*, 4987-4991.
- Claus, E.B., Risch, N., and Thompson, W.D. (1991). Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet* *48*, 232-242.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* *127*, 469-480.
- Colditz, G.A., Rosner, B.A., Chen, W.Y., Holmes, M.D., and Hankinson, S.E. (2004). Risk factors for breast cancer according to estrogen and progesterone receptor status. *J Natl Cancer Inst* *96*, 218-228.

- Cole, M.P., Jones, C.T., and Todd, I.D. (1971). A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *British journal of cancer* 25, 270-275.
- Communal, L., Vilasco, M., Hugon-Rodin, J., Courtin, A., Mourra, N., Lahlou, N., Dumont, S., Chaouat, M., Forgez, P., and Gompel, A. (2012). Ulipristal acetate does not impact human normal breast tissue. *Human reproduction (Oxford, England)* 27, 2785-2798.
- Conneely, O.M., and Lydon, J.P. (2000). Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* 65, 571-577.
- Conneely, O.M., Mulac-Jericevic, B., and Lydon, J.P. (2003). Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 68, 771-778.
- Conneely, O.M., Mulac-Jericevic, B., Lydon, J.P., and De Mayo, F.J. (2001). Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol Cell Endocrinol* 179, 97-103.
- Cottu, P., Bieche, I., Assayag, F., El Botty, R., Chateau-Joubert, S., Thuleau, A., Bagarre, T., Albaud, B., Rapinat, A., Gentien, D., *et al.* (2014). Acquired resistance to endocrine treatments is associated with tumor-specific molecular changes in patient-derived luminal breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 20, 4314-4325.
- Cottu, P., Marangoni, E., Assayag, F., de Cremoux, P., Vincent-Salomon, A., Guyader, C., de Plater, L., Elbaz, C., Karboul, N., Fontaine, J.J., *et al.* (2012). Modeling of response to endocrine therapy in a panel of human luminal breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res Treat* 133, 595-606.
- Creighton, C.J., Kent Osborne, C., van de Vijver, M.J., Foekens, J.A., Klijn, J.G., Horlings, H.M., Nuyten, D., Wang, Y., Zhang, Y., Chamness, G.C., *et al.* (2009). Molecular profiles of progesterone receptor loss in human breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 114, 287-299.
- Cui, X., Schiff, R., Arpino, G., Osborne, C.K., and Lee, A.V. (2005). Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 7721-7735.
- Daniel, A.R., Gaviglio, A.L., Czaplicki, L.M., Hillard, C.J., Housa, D., and Lange, C.A. (2010). The progesterone receptor hinge region regulates the kinetics of transcriptional responses through acetylation, phosphorylation, and nuclear retention. *Mol Endocrinol* 24, 2126-2138.
- Daniel, A.R., Hagan, C.R., and Lange, C.A. (2011). Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab* 6, 359-369.
- Daniel, A.R., and Lange, C.A. (2009). Protein kinases mediate ligand-independent derepression of sumoylated progesterone receptors in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14287-14292.
- Daniel, A.R., Qiu, M., Faivre, E.J., Ostrander, J.H., Skildum, A., and Lange, C.A. (2007). Linkage of progestin and epidermal growth factor signaling: phosphorylation of progesterone receptors mediates transcriptional hypersensitivity and increased ligand-independent breast cancer cell growth. *Steroids* 72, 188-201.
- Dasgupta, S., Lonard, D.M., and O'Malley, B.W. (2014). Nuclear receptor coactivators: master regulators of human health and disease. *Annu Rev Med* 65, 279-292.
- Dauvois, S., White, R., and Parker, M.G. (1993). The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* 106 ( Pt 4), 1377-1388.
- DeFranco, D.B., Qi, M., Borror, K.C., Garabedian, M.J., and Brautigan, D.L. (1991). Protein phosphatase types 1 and/or 2A regulate nucleocytoplasmic shuttling of glucocorticoid receptors. *Mol Endocrinol* 5, 1215-1228.
- Dennis, A.P., Lonard, D.M., Nawaz, Z., and O'Malley, B.W. (2005). Inhibition of the 26S proteasome blocks progesterone receptor-dependent transcription through failed recruitment of RNA polymerase II. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 94, 337-346.
- Derynck, R., and Akhurst, R.J. (2007). Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol* 9, 1000-1004.
- DeSantis, C., Ma, J., Bryan, L., and Jemal, A. (2014). Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 64, 52-62.
- Diep, C.H., Daniel, A.R., Mauro, L.J., Knutson, T.P., and Lange, C.A. (2015). Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *J Mol Endocrinol* 54, R31-53.
- Divito, K.A., Berger, A.J., Camp, R.L., Dolled-Filhart, M., Rimm, D.L., and Kluger, H.M. (2004). Automated quantitative analysis of tissue microarrays reveals an association between high Bcl-2 expression and improved outcome in melanoma. *Cancer research* 64, 8773-8777.
- Domchek, S.M., Friebel, T.M., Singer, C.F., Evans, D.G., Lynch, H.T., Isaacs, C., Garber, J.E., Neuhausen, S.L., Matloff, E., Eeles, R., *et al.* (2010). Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *Jama* 304, 967-975.
- Dong, X., Challis, J.R., and Lye, S.J. (2004). Intramolecular interactions between the AF3 domain and the C-terminus of the human progesterone receptor are mediated through two LXXLL motifs. *J Mol Endocrinol* 32, 843-857.



- Donnez, J., Hudecek, R., Donnez, O., Matule, D., Arhndt, H.J., Zatik, J., Kasilovskiene, Z., Dumitrascu, M.C., Fernandez, H., Barlow, D.H., *et al.* (2015). Efficacy and safety of repeated use of ulipristal acetate in uterine fibroids. *Fertil Steril* *103*, 519-527 e513.
- Donnez, J., Tatarchuk, T.F., Bouchard, P., Puscasiu, L., Zakharenko, N.F., Ivanova, T., Ugocsai, G., Mara, M., Jilla, M.P., Bestel, E., *et al.* (2012a). Ulipristal acetate versus placebo for fibroid treatment before surgery. *The New England journal of medicine* *366*, 409-420.
- Donnez, J., Tomaszewski, J., Vazquez, F., Bouchard, P., Lemieszczuk, B., Baro, F., Nouri, K., Selvaggi, L., Sadowski, K., Bestel, E., *et al.* (2012b). Ulipristal acetate versus leuprolide acetate for uterine fibroids. *The New England journal of medicine* *366*, 421-432.
- Donnez, J., Vazquez, F., Tomaszewski, J., Nouri, K., Bouchard, P., Fauser, B.C., Barlow, D.H., Palacios, S., Donnez, O., Bestel, E., *et al.* (2014). Long-term treatment of uterine fibroids with ulipristal acetate. *Fertil Steril* *101*, 1565-1573 e1561-1518.
- Dorgan, J.F., Longcope, C., Stephenson, H.E., Jr., Falk, R.T., Miller, R., Franz, C., Kahle, L., Campbell, W.S., Tangrea, J.A., and Schatzkin, A. (1996). Relation of prediagnostic serum estrogen and androgen levels to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *5*, 533-539.
- Dran, G., Luthy, I.A., Molinolo, A.A., Montecchia, F., Charreau, E.H., Pasqualini, C.D., and Lanari, C. (1995). Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma. *Breast Cancer Res Treat* *35*, 173-186.
- Dressing, G.E., Knutson, T.P., Schiewer, M.J., Daniel, A.R., Hagan, C.R., Diep, C.H., Knudsen, K.E., and Lange, C.A. (2014). Progesterone receptor-cyclin D1 complexes induce cell cycle-dependent transcriptional programs in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* *28*, 442-457.
- Edey, M., McGrath, M., Larson, L., and Nandi, S. (1984). Correlation between in vitro growth and regulation of estrogen and progesterone receptors in rat mammary epithelial cells. *Endocrinology* *115*, 1691-1697.
- 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.
- El Etreby, M.F., Liang, Y., Wrenn, R.W., and Schoenlein, P.V. (1998). Additive effect of mifepristone and tamoxifen on apoptotic pathways in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* *51*, 149-168.
- Enewold, L., Geiger, A.M., Zujewski, J., and Harlan, L.C. (2015). Oncotype Dx assay and breast cancer in the United States: usage and concordance with chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* *151*, 149-156.
- Engman, M., Skoog, L., Soderqvist, G., and Gemzell-Danielsson, K. (2008). The effect of mifepristone on breast cell proliferation in premenopausal women evaluated through fine needle aspiration cytology. *Human reproduction (Oxford, England)* *23*, 2072-2079.
- Epping, M.T., Wang, L., Edel, M.J., Carlee, L., Hernandez, M., and Bernards, R. (2005). The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell* *122*, 835-847.
- Eroles, P., Bosch, A., Perez-Fidalgo, J.A., and Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev* *38*, 698-707.
- Esber, N., Le Billan, F., Resche-Rigon, M., Loosfelt, H., Lombes, M., and Chabbert-Buffet, N. (2015). Ulipristal Acetate Inhibits Progesterone Receptor Isoform A-Mediated Human Breast Cancer Proliferation and BCL2-L1 Expression. *PLoS ONE* *10*, e0140795.
- Esber, N.L.B., F.; Resche-Rigon, M.; Loosfelt, H.; Lombes, M.; Chabbert-Buffet, N. (2015). Ulipristal Acetate inhibits Progesterone Receptor Isoform A-mediated Human Breast Cancer Proliferation and BCL2-L1 Expression. *PLoS ONE In Press*.
- Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science (New York, NY)* *240*, 889-895.
- Ewan, K.B., Oketch-Rabah, H.A., Ravani, S.A., Shyamala, G., Moses, H.L., and Barcellos-Hoff, M.H. (2005). Proliferation of estrogen receptor-alpha-positive mammary epithelial cells is restrained by transforming growth factor-beta1 in adult mice. *The American journal of pathology* *167*, 409-417.
- Faivre, E.J., and Lange, C.A. (2007). Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* *27*, 466-480.
- Faupel-Badger, J.M., Arcaro, K.F., Balkam, J.J., Eliassen, A.H., Hassiotou, F., Lebrilla, C.B., Michels, K.B., Palmer, J.R., Schedin, P., Stuebe, A.M., *et al.* (2013). Postpartum remodeling, lactation, and breast cancer risk: summary of a National Cancer Institute-sponsored workshop. *J Natl Cancer Inst* *105*, 166-174.
- Feigelson, H.S., Calle, E.E., Robertson, A.S., Wingo, P.A., and Thun, M.J. (2001). Alcohol consumption increases the risk of fatal breast cancer (United States). *Cancer Causes Control* *12*, 895-902.
- Fensome, A., Adams, W.R., Adams, A.L., Berroddin, T.J., Cohen, J., Huselton, C., Illenberger, A., Kern, J.C., Hudak, V.A., Marella, M.A., *et al.* (2008). Design, synthesis, and SAR of new pyrrole-oxindole progesterone receptor modulators leading to 5-(7-fluoro-3,3-dimethyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-1-methyl-1H-pyrrole-2-carbonitrile (WAY-255348). *J Med Chem* *51*, 1861-1873.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* *136*, E359-386.
- Fernandes, I., Bastien, Y., Wai, T., Nygard, K., Lin, R., Cormier, O., Lee, H.S., Eng, F., Bertos, N.R., Pelletier, N., *et al.* (2003). Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell* *11*, 139-150.

- Fleming, F.J., Myers, E., Kelly, G., Crotty, T.B., McDermott, E.W., O'Higgins, N.J., Hill, A.D., and Young, L.S. (2004). Expression of SRC-1, AIB1, and PEA3 in HER2 mediated endocrine resistant breast cancer; a predictive role for SRC-1. *J Clin Pathol* *57*, 1069-1074.
- Foumier, 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.
- Foumier, A., Fabre, A., Mesrine, S., Boutron-Ruault, M.C., Berrino, F., and Clavel-Chapelon, F. (2008). Use of different postmenopausal hormone therapies and risk of histology- and hormone receptor-defined invasive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *26*, 1260-1268.
- Frech, M.S., Jones, L.P., and Furth, P.A. (2005). Validation of transgenic models of breast cancer: ductal carcinoma in situ (DCIS) and Brca1-mutation-related breast cancer. *Breast cancer online : BCO* *8*.
- Fu, M., Rao, M., Wang, C., Sakamaki, T., Wang, J., Di Vizio, D., Zhang, X., Albanese, C., Balk, S., Chang, C., *et al.* (2003). Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth. *Mol Cell Biol* *23*, 8563-8575.
- Gaddy, V.T., Barrett, J.T., Delk, J.N., Kallab, A.M., Porter, A.G., and Schoenlein, P.V. (2004). Mifepristone induces growth arrest, caspase activation, and apoptosis of estrogen receptor-expressing, antiestrogen-resistant breast cancer cells. *Clin Cancer Res* *10*, 5215-5225.
- Gainer, E.E., and Ulmann, A. (2003). Pharmacologic properties of CDB(VA)-2914. *Steroids* *68*, 1005-1011.
- Giangrande, P.H., Kimbrel, E.A., Edwards, D.P., and McDonnell, D.P. (2000). The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol Cell Biol* *20*, 3102-3115.
- Giangrande, P.H., and McDonnell, D.P. (1999). The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res* *54*, 291-313; discussion 313-294.
- Ginsburg, E.S., Walsh, B.W., Shea, B.F., Gao, X., Gleason, R.E., and Barbieri, R.L. (1995). The effects of ethanol on the clearance of estradiol in postmenopausal women. *Fertil Steril* *63*, 1227-1230.
- Girault, I., Lerebours, F., Amarir, S., Tozlu, S., Tubiana-Hulin, M., Lidereau, R., and Bieche, I. (2003). Expression analysis of estrogen receptor alpha coregulators in breast carcinoma: evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen. *Clin Cancer Res* *9*, 1259-1266.
- Giulianelli, S., Molinolo, A., and Lanari, C. (2013). Targeting progesterone receptors in breast cancer. *Vitamins and hormones* *93*, 161-184.
- Giulianelli, S., Vaque, J.P., Soldati, R., Wargon, V., Vanzulli, S.I., Martins, R., Zeitlin, E., Molinolo, A.A., Helguero, L.A., Lamb, C.A., *et al.* (2012a). Estrogen receptor alpha mediates progestin-induced mammary tumor growth by interacting with progesterone receptors at the cyclin D1/MYC promoters. *Cancer research* *72*, 2416-2427.
- Giulianelli, S., Vaque, J.P., Wargon, V., Soldati, R., Vanzulli, S.I., Martins, R., Zeitlin, E., Helguero, L., Lamb, C., Molinolo, A.A., *et al.* (2012b). [The role of estrogen receptor alpha in breast cancer cell proliferation mediated by progestins]. *Medicina (B Aires)* *72*, 315-320.
- Gizard, F., Robillard, R., Gervois, P., Faucompre, A., Revillion, F., Peyrat, J.P., Hum, W.D., and Staels, B. (2005). Progesterone inhibits human breast cancer cell growth through transcriptional upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 gene. *FEBS Lett* *579*, 5535-5541.
- Gizard, F., Robillard, R., Gross, B., Barbier, O., Revillion, F., Peyrat, J.P., Torpier, G., Hum, D.W., and Staels, B. (2006). TRP-132 is a novel progesterone receptor coactivator required for the inhibition of breast cancer cell growth and enhancement of differentiation by progesterone. *Mol Cell Biol* *26*, 7632-7644.
- Glasier, A.F., Cameron, S.T., Fine, P.M., Logan, S.J., Casale, W., Van Horn, J., Sogor, L., Blithe, D.L., Scherrer, B., Mathe, H., *et al.* (2010). Ulipristal acetate versus levonorgestrel for emergency contraception: a randomised non-inferiority trial and meta-analysis. *Lancet (London, England)* *375*, 555-562.
- Glinka, A., Dolde, C., Kirsch, N., Huang, Y.L., Kazanskaya, O., Ingelfinger, D., Boutros, M., Cruciat, C.M., and Niehrs, C. (2011). LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep* *12*, 1055-1061.
- Graham, J.D., and Clarke, C.L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine reviews* *18*, 502-519.
- Graham, J.D., Mote, P.A., Salagame, U., van Dijk, J.H., Balleine, R.L., Huschtscha, L.I., Reddel, R.R., and Clarke, C.L. (2009). DNA replication licensing and progenitor numbers are increased by progesterone in normal human breast. *Endocrinology* *150*, 3318-3326.
- Graham, J.D., Roman, S.D., McGowan, E., Sutherland, R.L., and Clarke, C.L. (1995a). Preferential stimulation of human progesterone receptor B expression by estrogen in T-47D human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* *270*, 30693-30700.
- Graham, J.D., Yager, M.L., Hill, H.D., Byth, K., O'Neill, G.M., and Clarke, C.L. (2005). Altered progesterone receptor isoform expression remodels progestin responsiveness of breast cancer cells. *Mol Endocrinol* *19*, 2713-2735.
- Graham, J.D., Yeates, C., Balleine, R.L., Harvey, S.S., Milliken, J.S., Bilous, A.M., and Clarke, C.L. (1995b). Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer research* *55*, 5063-5068.
- Grigoriadis, A., Mackay, A., Noel, E., Wu, P.J., Natrajan, R., Frankum, J., Reis-Filho, J.S., and Tutt, A. (2012). Molecular characterisation of cell line models for triple-negative breast cancers. *BMC Genomics* *13*, 619.
- Grimm, S.L., Seagroves, T.N., Kabotyanski, E.B., Hovey, R.C., Vonderhaar, B.K., Lydon, J.P., Miyoshi, K., Hennighausen, L., Ormandy, C.J., Lee, A.V., *et al.* (2002). Disruption of steroid and prolactin receptor patterning in the mammary gland correlates with a block in lobuloalveolar development. *Mol Endocrinol* *16*, 2675-2691.

- Groshong, S.D., Owen, G.I., Grimison, B., Schauer, I.E., Todd, M.C., Langan, T.A., Sclafani, R.A., Lange, C.A., and Horwitz, K.B. (1997a). Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27(Kip1). *Mol Endocrinol* *11*, 1593-1607.
- Groshong, S.D., Owen, G.I., Grimison, B., Schauer, I.E., Todd, M.C., Langan, T.A., Sclafani, R.A., Lange, C.A., and Horwitz, K.B. (1997b). Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27(Kip1). *Mol Endocrinol* *11*, 1593-1607.
- Guiochon-Mantel, A., Delabre, K., Lescop, P., and Milgrom, E. (1994a). Nuclear localization signals also mediate the outward movement of proteins from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 7179-7183.
- Guiochon-Mantel, A., Delabre, K., Lescop, P., Perrot-Applanat, M., and Milgrom, E. (1994b). Cytoplasmic-nuclear trafficking of progesterone receptor. In vivo study of the mechanism of action of antiproggestins. *Biochem Pharmacol* *47*, 21-24.
- Guiochon-Mantel, A., Lescop, P., Christin-Maitre, S., Loosfelt, H., Perrot-Applanat, M., and Milgrom, E. (1991). Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J* *10*, 3851-3859.
- Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Lescop, P., Sar, S., Atger, M., Perrot-Applanat, M., and Milgrom, E. (1989). Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell* *57*, 1147-1154.
- Hagan, C.R., Knutson, T.P., and Lange, C.A. (2013). A Common Docking Domain in Progesterone Receptor-B links DUSP6 and CK2 signaling to proliferative transcriptional programs in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* *41*, 8926-8942.
- Hagan, C.R., and Lange, C.A. (2014). Molecular determinants of context-dependent progesterone receptor action in breast cancer. *BMC Med* *12*, 32.
- Hah, N., and Kraus, W.L. (2014). Hormone-regulated transcriptomes: Lessons learned from estrogen signaling pathways in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* *382*, 652-664.
- Hammond, M.E., Hayes, D.F., Wolff, A.C., Mangu, P.B., and Temin, S. (2010). American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract* *6*, 195-197.
- Han, S.J., DeMayo, F.J., Xu, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (2006). Steroid receptor coactivator (SRC)-1 and SRC-3 differentially modulate tissue-specific activation functions of the progesterone receptor. *Mol Endocrinol* *20*, 45-55.
- Han, S.J., Jeong, J., Demayo, F.J., Xu, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (2005). Dynamic cell type specificity of SRC-1 coactivator in modulating uterine progesterone receptor function in mice. *Mol Cell Biol* *25*, 8150-8165.
- Han, S.J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (2007). Distinct temporal and spatial activities of RU486 on progesterone receptor function in reproductive organs of ovariectomized mice. *Endocrinology* *148*, 2471-2486.
- Hankinson, S.E., Willett, W.C., Manson, J.E., Hunter, D.J., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., Longcope, C., and Speizer, F.E. (1995). Alcohol, height, and adiposity in relation to estrogen and prolactin levels in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* *87*, 1297-1302.
- Hard, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B.A., Dahlman, K., Freedman, L.P., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K.R., Gustafsson, J.A., and Kaptein, R. (1990). Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science (New York, NY)* *249*, 157-160.
- Haslam, S.Z. (1989). The ontogeny of mouse mammary gland responsiveness to ovarian steroid hormones. *Endocrinology* *125*, 2766-2772.
- Haslam, S.Z., and Shyamala, G. (1981). Relative distribution of estrogen and progesterone receptors among the epithelial, adipose, and connective tissue components of the normal mammary gland. *Endocrinology* *108*, 825-830.
- He, X., Semenov, M., Tamai, K., and Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* *131*, 1663-1677.
- Heneghan, A.F., Connaghan-Jones, K.D., Miura, M.T., and Bain, D.L. (2007). Coactivator assembly at the promoter: efficient recruitment of SRC2 is coupled to cooperative DNA binding by the progesterone receptor. *Biochemistry (Mosc)* *46*, 11023-11032.
- Hermanson, O., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2002). Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* *13*, 55-60.
- Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., *et al.* (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* *8*, R76.
- Hild, S.A., Reel, J.R., Hoffman, L.H., and Blye, R.P. (2000). CDB-2914: anti-progestational/anti-glucocorticoid profile and post-coital anti-fertility activity in rats and rabbits. *Human reproduction (Oxford, England)* *15*, 822-829.
- Hissom, J.R., Bowden, R.T., and Moore, M.R. (1989). Effects of progestins, estrogens, and antihormones on growth and lactate dehydrogenase in the human breast cancer cell line T47D. *Endocrinology* *125*, 418-423.
- Hissom, J.R., and Moore, M.R. (1987). Progestin effects on growth in the human breast cancer cell line T-47D—possible therapeutic implications. *Biochem Biophys Res Commun* *145*, 706-711.
- Hofseth, L.J., Raafat, A.M., Osuch, J.R., Pathak, D.R., Slomski, C.A., and Haslam, S.Z. (1999). Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. *J Clin Endocrinol Metab* *84*, 4559-4565.
- Holliday, D.L., and Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res* *13*, 215.

- Hopp, T.A., Weiss, H.L., Hilsenbeck, S.G., Cui, Y., Allred, D.C., Horwitz, K.B., and Fuqua, S.A. (2004). Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res* *10*, 2751-2760.
- Horak, P., Mara, M., Dunder, P., Kubinova, K., Kuzel, D., Hudecek, R., and Chmel, R. (2012). Effect of a selective progesterone receptor modulator on induction of apoptosis in uterine fibroids in vivo. *International journal of endocrinology* *2012*, 436174.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., *et al.* (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* *377*, 397-404.
- Horwitz, K.B., Dye, W.W., Harrell, J.C., Kabos, P., and Sartorius, C.A. (2008). Rare steroid receptor-negative basal-like tumorigenic cells in luminal subtype human breast cancer xenografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 5774-5779.
- Horwitz, K.B., and Freidenberg, G.R. (1985). Growth inhibition and increase of insulin receptors in antiestrogen-resistant T47DCO human breast cancer cells by progestins: implications for endocrine therapies. *Cancer research* *45*, 167-173.
- Horwitz, K.B., and Sartorius, C.A. (2008). Progestins in hormone replacement therapies reactivate cancer stem cells in women with preexisting breast cancers: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab* *93*, 3295-3298.
- Horwitz, K.B., Sartorius, C.A., Hovland, A.R., Jackson, T.A., Groshong, S.D., Tung, L., and Takimoto, G.S. (1995). Surprises with antiprogestins: novel mechanisms of progesterone receptor action. *Ciba Found Symp* *191*, 235-249; discussion 250-233.
- Hovey, R.C., Trott, J.F., Ginsburg, E., Goldhar, A., Sasaki, M.M., Fountain, S.J., Sundararajan, K., and Vonderhaar, B.K. (2001). Transcriptional and spatiotemporal regulation of prolactin receptor mRNA and cooperativity with progesterone receptor function during ductal branch growth in the mammary gland. *Dev Dyn* *222*, 192-205.
- Huniadi, C.A., Pop, O.L., Antal, T.A., and Stamatian, F. (2013). The effects of ulipristal on Bax/Bcl-2, cytochrome c, Ki-67 and cyclooxygenase-2 expression in a rat model with surgically induced endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* *169*, 360-365.
- Huse, B., Verca, S.B., Matthey, P., and Rusconi, S. (1998). Definition of a negative modulation domain in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol* *12*, 1334-1342.
- Hyder, S.M., Murthy, L., and Stancel, G.M. (1998). Progestin regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells. *Cancer research* *58*, 392-395.
- Imagawa, W., Tomooka, Y., Hamamoto, S., and Nandi, S. (1985). Stimulation of mammary epithelial cell growth in vitro: interaction of epidermal growth factor and mammogenic hormones. *Endocrinology* *116*, 1514-1524.
- Ismail, P.M., Li, J., DeMayo, F.J., O'Malley, B.W., and Lydon, J.P. (2002). A novel LacZ reporter mouse reveals complex regulation of the progesterone receptor promoter during mammary gland development. *Mol Endocrinol* *16*, 2475-2489.
- Jacobsen, B.M., and Horwitz, K.B. (2012). Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol* *357*, 18-29.
- Jacobsen, B.M., Richer, J.K., Schittone, S.A., and Horwitz, K.B. (2002). New human breast cancer cells to study progesterone receptor isoform ratio effects and ligand-independent gene regulation. *The Journal of biological chemistry* *277*, 27793-27800.
- Jacobsen, B.M., Schittone, S.A., Richer, J.K., and Horwitz, K.B. (2005). Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology. *Mol Endocrinol* *19*, 574-587.
- Johnson, A.B., and O'Malley, B.W. (2012). Steroid receptor coactivators 1, 2, and 3: critical regulators of nuclear receptor activity and steroid receptor modulator (SRM)-based cancer therapy. *Mol Cell Endocrinol* *348*, 430-439.
- Jonat, W., Bachelot, T., Ruhstaller, T., Kuss, I., Reimann, U., and Robertson, J.F. (2013). Randomized phase II study of lonaprisan as second-line therapy for progesterone receptor-positive breast cancer. *Ann Oncol* *24*, 2543-2548.
- Jordan, V.C., and Dowse, L.J. (1976). Tamoxifen as an anti-tumour agent: effect on oestrogen binding. *The Journal of endocrinology* *68*, 297-303.
- Joshi, P.A., Jackson, H.W., Beristain, A.G., Di Grappa, M.A., Mote, P., Clarke, C., Stingl, J., Waterhouse, P.D., and Khokha, R. (2010). Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature*, 1-10.
- Kakarala, K.K., Jamil, K., and Devaraji, V. (2014). Structure and putative signaling mechanism of Protease activated receptor 2 (PAR2) - a promising target for breast cancer. *J Mol Graph Model* *53*, 179-199.
- Kamangar, F., Dores, G.M., and Anderson, W.F. (2006). Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *24*, 2137-2150.
- Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y.L., Girard, L., Gandhi, J., Kwei, K.A., Hernandez-Boussard, T., Wang, P., Gazdar, A.F., *et al.* (2009). Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS ONE* *4*, e6146.
- Kariagina, A., Aupperlee, M.D., and Haslam, S.Z. (2008). Progesterone receptor isoform functions in normal breast development and breast cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* *18*, 11-33.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* *9*, 1603-1614.

- Kelsey, J.L., Gammon, M.D., and John, E.M. (1993). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15, 36-47.
- Key, T.J., Appleby, P.N., Reeves, G.K., Roddam, A.W., Helzlsouer, K.J., Alberg, A.J., Rollison, D.E., Dorgan, J.F., Brinton, L.A., Overvad, K., *et al.* (2011). Circulating sex hormones and breast cancer risk factors in postmenopausal women: reanalysis of 13 studies. *British journal of cancer* 105, 709-722.
- Khan, J.A., Amazit, L., Bellance, C., Guiochon-Mantel, A., Lombes, M., and Loosfelt, H. (2011). p38 and p42/44 MAPKs Differentially Regulate Progesterone Receptor A and B Isoform Stabilization. *Mol Endocrinol* doi:10.1210/me.2011-1042.
- Khan, J.A., Bellance, C., Guiochon-Mantel, A., Lombes, M., and Loosfelt, H. (2012). Differential regulation of breast cancer-associated genes by progesterone receptor isoforms PRA and PRB in a new bi-inducible breast cancer cell line. *PLoS ONE* 7, e45993.
- Khan, J.A., Tikad, A., Fay, M., Hamze, A., Fagart, J., Chabbert-Buffet, N., Meduri, G., Amazit, L., Brion, J.D., Alami, M., *et al.* (2013). A new strategy for selective targeting of progesterone receptor with passive antagonists. *Mol Endocrinol* 27, 909-924.
- Khanim, F.L., Gommersall, L.M., Wood, V.H., Smith, K.L., Montalvo, L., O'Neill, L.P., Xu, Y., Peehl, D.M., Stewart, P.M., Tumer, B.M., *et al.* (2004). Altered SMRT levels disrupt vitamin D3 receptor signalling in prostate cancer cells. *Oncogene* 23, 6712-6725.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., and Matsumoto, S. (2011). New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int Rev Cell Mol Biol* 291, 21-71.
- Kim, J.J., Kurita, T., and Bulun, S.E. (2013). Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocrine reviews* 34, 130-162.
- Kim, J.Y., Son, Y.L., and Lee, Y.C. (2009). Involvement of SMRT corepressor in transcriptional repression by the vitamin D receptor. *Mol Endocrinol* 23, 251-264.
- Kim, M.Y., Woo, E.M., Chong, Y.T., Homenko, D.R., and Kraus, W.L. (2006). Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Mol Endocrinol* 20, 1479-1493.
- Kirkin, V., Joos, S., and Zomig, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1644, 229-249.
- Klijin, J.G., de Jong, F.H., Bakker, G.H., Lamberts, S.W., Rodenburg, C.J., and Alexieva Figusch, J. (1989). Antiprogestins, a new form of endocrine therapy for human breast cancer. *Cancer research* 49, 2851-2856.
- Klijin, J.G., Setyono-Han, B., Sander, H.J., Lamberts, S.W., de Jong, F.H., Deckers, G.H., and Foekens, J.A. (1994). Pre-clinical and clinical treatment of breast cancer with antiprogestins. *Human reproduction (Oxford, England)* 9 Suppl 1, 181-189.
- Klijin, J.G., Setyono Han, B., and Foekens, J.A. (2000). Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids* 65, 825-830.
- Knutson, T.P., Daniel, A.R., Fan, D., Silverstein, K.A., Covington, K.R., Fuqua, S.A., and Lange, C.A. (2012). Phosphorylated and sumoylation-deficient progesterone receptors drive proliferative gene signatures during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 14, R95.
- Knutson, T.P., and Lange, C.A. (2014). Tracking progesterone receptor-mediated actions in breast cancer. *Pharmacol Ther* 142, 114-125.
- Kohn, A.D., and Moon, R.T. (2005). Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 38, 439-446.
- Koizume, S., and Miyagi, Y. (2014). Breast cancer phenotypes regulated by tissue factor-factor VII pathway: Possible therapeutic targets. *World J Clin Oncol* 5, 908-920.
- Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A., *et al.* (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315-323.
- Koyama, H., Sinha, D., and Dao, T.L. (1972). Effects of hormones and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene on rat mammary tissue grown in organ culture. *J Natl Cancer Inst* 48, 1671-1680.
- LaCroix, A.Z., Chlebowski, R.T., Manson, J.E., Aragaki, A.K., Johnson, K.C., Martin, L., Margolis, K.L., Stefanick, M.L., Brzyski, R., Curb, J.D., *et al.* (2011). Health outcomes after stopping conjugated equine estrogens among postmenopausal women with prior hysterectomy: a randomized controlled trial. *Jama* 305, 1305-1314.
- Lahmann, P.H., Hoffmann, K., Allen, N., van Gils, C.H., Khaw, K.T., Tehard, B., Berrino, F., Tjonneland, A., Bigaard, J., Olsen, A., *et al.* (2004). Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 111, 762-771.
- Lamb, C., Simian, M., Molinolo, A., Pazos, P., and Lanari, C. (1999). Regulation of cell growth of a progestin-dependent murine mammary carcinoma in vitro: progesterone receptor involvement in serum or growth factor-induced cell proliferation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 70, 133-142.
- Lamb, C.A., Fabris, V., Gorostiaga, M.A., Helguero, L.A., Efeyan, A., Bottino, M.C., Simian, M., Soldati, R., Sanjuan, N., Molinolo, A., *et al.* (2005). Isolation of a stromal cell line from an early passage of a mouse mammary tumor line: a model for stromal parenchymal interactions. *J Cell Physiol* 202, 672-682.
- Lanari, C., Lamb, C.A., Fabris, V.T., Helguero, L.A., Soldati, R., Bottino, M.C., Giulianelli, S., Cerliani, J.P., Wargon, V., and Molinolo, A. (2009). The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 16, 333-350.

- Lanari, C., Wargon, V., Rojas, P., and Molinolo, A.A. (2012). Antiprogestins in breast cancer treatment: are we ready? *Endocr Relat Cancer* 19, R35-50.
- Landis, M.D., Lehmann, B.D., Pietenpol, J.A., and Chang, J.C. (2013). Patient-derived breast tumor xenografts facilitating personalized cancer therapy. *Breast Cancer Res* 15, 201.
- Lange, C.A. (2008a). Challenges to defining a role for progesterone in breast cancer. *Steroids* 73, 914-921.
- Lange, C.A. (2008b). Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 108, 203-212.
- Lange, C.A., Shen, T., and Horwitz, K.B. (2000). Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1032-1037.
- Lanz, R.B., McKenna, N.J., Onate, S.A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1999). A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* 97, 17-27.
- Lapidus, R.G., Ferguson, A.T., Ottaviano, Y.L., Parl, F.F., Smith, H.S., Weitzman, S.A., Baylin, S.B., Issa, J.P., and Davidson, N.E. (1996). Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. *Clin Cancer Res* 2, 805-810.
- Lavasani, M.A., and Moinfar, F. (2012). Molecular classification of breast carcinomas with particular emphasis on "basal-like" carcinoma: a critical review. *Journal of biophotonics* 5, 345-366.
- Lavery, D.N., and McEwan, I.J. (2005). Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem J* 391, 449-464.
- Le Billan, F., Khan, J.A., Lamribet, K., Viengchareun, S., Bouligand, J., Fagart, J., and Lombes, M. (2015). Cistrome of the aldosterone-activated mineralocorticoid receptor in human renal cells. *FASEB J*.
- Lee, K., Jeong, J., Tsai, M.J., Tsai, S., Lydon, J.P., and DeMayo, F.J. (2006). Molecular mechanisms involved in progesterone receptor regulation of uterine function. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 102, 41-50.
- Leek, R.D., and Harris, A.L. (2002). Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 177-189.
- Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y., and Pietenpol, J.A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation* 121, 2750-2767.
- Leibowitz, B., and Yu, J. (2010). Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther* 9, 417-422.
- Leo, J.C., and Lin, V.C. (2008). The activities of progesterone receptor isoform A and B are differentially modulated by their ligands in a gene-selective manner. *Int J Cancer* 122, 230-243.
- Leonhardt, S.A., Boonyaratanakomkit, V., and Edwards, D.P. (2003). Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids* 68, 761-770.
- Leonhardt, S.A., and Edwards, D.P. (2002). Mechanism of action of progesterone antagonists. *Exp Biol Med (Maywood)* 227, 969-980.
- Li, M., Spitzer, E., Zschesche, W., Binas, B., Parczyk, K., and Grosse, R. (1995). Antiprogestins inhibit growth and stimulate differentiation in the normal mammary gland. *J Cell Physiol* 164, 1-8.
- Li, S., Shen, D., Shao, J., Crowder, R., Liu, W., Prat, A., He, X., Liu, S., Hoog, J., Lu, C., *et al.* (2013). Endocrine-therapy-resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts. *Cell reports* 4, 1116-1130.
- Li, X., Lonard, D.M., and O'Malley, B.W. (2004). A contemporary understanding of progesterone receptor function. *Mech Ageing Dev* 125, 669-678.
- Liang, Y., Benakanakere, I., Besch-Williford, C., Hyder, R.S., Ellersieck, M.R., and Hyder, S.M. (2010). Synthetic progestins induce growth and metastasis of BT-474 human breast cancer xenografts in nude mice. *Menopause* 17, 1040-1047.
- Liang, Y., Besch-Williford, C., Brekken, R.A., and Hyder, S.M. (2007). Progestin-dependent progression of human breast tumor xenografts: a novel model for evaluating antitumor therapeutics. *Cancer research* 67, 9929-9936.
- Liang, Y., Hou, M., Kallab, A.M., Barrett, J.T., El Etreby, F., and Schoenlein, P.V. (2003). Induction of antiproliferation and apoptosis in estrogen receptor negative MDA-231 human breast cancer cells by mifepristone and 4-hydroxytamoxifen combination therapy: a role for TGFbeta1. *Int J Oncol* 23, 369-380.
- Liang, Y., and Hyder, S.M. (2005). Proliferation of endothelial and tumor epithelial cells by progestin-induced vascular endothelial growth factor from human breast cancer cells: paracrine and autocrine effects. *Endocrinology* 146, 3632-3641.
- Liang, Y., Wu, J., Stancel, G.M., and Hyder, S.M. (2005). p53-dependent inhibition of progestin-induced VEGF expression in human breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 93, 173-182.
- Lind, T., Cameron, E.H., and Hunter, W.M. (1978). Serum prolactin, gonadotrophin and oestrogen levels in women receiving hormone replacement therapy. *Br J Obstet Gynaecol* 85, 138-141.
- Lindet, C., Revillion, F., Lhotellier, V., Homez, L., Peyrat, J.P., and Bonneterre, J. (2012). Relationships between progesterone receptor isoforms and the HER/ErbB receptors and ligands network in 299 primary breast cancers. *Int J Biol Markers* 27, e111-117.
- Lonard, D.M., Lanz, R.B., and O'Malley, B.W. (2007). Nuclear receptor coregulators and human disease. *Endocrine reviews* 28, 575-587.

- Lonard, D.M., and O'Malley B. W. (2007). Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol Cell* 27, 691-700.
- Longman, S.M., and Buehring, G.C. (1987). Oral contraceptives and breast cancer. In vitro effect of contraceptive steroids on human mammary cell growth. *Cancer* 59, 281-287.
- Lorenzo, F., Jolivet, A., Loosfelt, H., Thu vu Hai, M., Brailly, S., Perrot-Applanat, M., and Milgrom, E. (1988). A rapid method of epitope mapping. Application to the study of immunogenic domains and to the characterization of various forms of rabbit progesterone receptor. *Eur J Biochem* 176, 53-60.
- Lu, N.Z., Wardell, S.E., Bumstein, K.L., Defranco, D., Fuller, P.J., Giguere, V., Hochberg, R.B., McKay, L., Renoir, J.M., Weigel, N.L., *et al.* (2006). International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol Rev* 58, 782-797.
- Luisi, B.F., Xu, W.X., Otwinowski, Z., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R., and Sigler, P.B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352, 497-505.
- Luo, X., Yin, P., Coon, V.J., Cheng, Y.H., Wiehle, R.D., and Bulun, S.E. (2010). The selective progesterone receptor modulator CDB4124 inhibits proliferation and induces apoptosis in uterine leiomyoma cells. *Fertil Steril* 93, 2668-2673.
- Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R., Mani, S.K., Hughes, A.R., Montgomery, C.A., Jr., Shyamala, G., Conneely, O.M., and O'Malley, B.W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9, 2266-2278.
- Lydon, J.P., and Edwards, D.P. (2009). Finally! A model for progesterone receptor action in normal human breast. *Endocrinology* 150, 2988-2990.
- Madauss, K.P., Grygielko, E.T., Deng, S.J., Sulpizio, A.C., Stanley, T.B., Wu, C., Short, S.A., Thompson, S.K., Stewart, E.L., Laping, N.J., *et al.* (2007a). A structural and in vitro characterization of asoprisnil: a selective progesterone receptor modulator. *Mol Endocrinol* 21, 1066-1081.
- Madauss, K.P., Stewart, E.L., and Williams, S.P. (2007b). The evolution of progesterone receptor ligands. *Med Res Rev* 27, 374-400.
- Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 10, 955-960.
- Manavathi, B., Dey, O., Gajulapalli, V.N., Bhatia, R.S., Bugide, S., and Kumar, R. (2013). Derailed estrogen signaling and breast cancer: an authentic couple. *Endocrine reviews* 34, 1-32.
- Mangal, R.K., Wiehle, R.D., Poindexter, A.N., 3rd, and Weigel, N.L. (1997). Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 63, 195-202.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., *et al.* (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Mani, S.K., Reyna, A.M., Chen, J.Z., Mulac-Jericevic, B., and Conneely, O.M. (2006). Differential response of progesterone receptor isoforms in hormone-dependent and -independent facilitation of female sexual receptivity. *Mol Endocrinol* 20, 1322-1332.
- Manni, A., Wright, C., and Buck, H. (1991). Growth factor involvement in the multihormonal regulation of MCF-7 breast cancer cell growth in soft agar. *Breast Cancer Res Treat* 20, 43-52.
- Marangoni, E., and Poupon, M.F. (2014). Patient-derived tumour xenografts as models for breast cancer drug development. *Curr Opin Oncol* 26, 556-561.
- Marangoni, E., Vincent-Salomon, A., Auger, N., Degeorges, A., Assayag, F., de Cremoux, P., de Plater, L., Guyader, C., De Pinieux, G., Judde, J.G., *et al.* (2007). A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res* 13, 3989-3998.
- Martin, A.M., and Weber, B.L. (2000). Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 92, 1126-1135.
- Martin, L.A., and Dowsett, M. (2013). BCL-2: a new therapeutic target in estrogen receptor-positive breast cancer? *Cancer Cell* 24, 7-9.
- Massague, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 215-230.
- McDonnell, D.P., Park, S., Goulet, M.T., Jasper, J., Wardell, S.E., Chang, C.Y., Norris, J.D., Guyton, J.R., and Nelson, E.R. (2014). Obesity, cholesterol metabolism, and breast cancer pathogenesis. *Cancer research* 74, 4976-4982.
- McEwan, I.J. (2009). Nuclear receptors: one big family. *Methods Mol Biol* 505, 3-18.
- McGowan, E.M., and Clarke, C.L. (1999). Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoints in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 13, 1657-1671.
- McGowan, E.M., Saad, S., Bendall, L.J., Bradstock, K.F., and Clarke, C.L. (2004). Effect of progesterone receptor a predominance on breast cancer cell migration into bone marrow fibroblasts. *Breast Cancer Res Treat* 83, 211-220.
- McKenna, N.J., Lanz, R.B., and O'Malley, B.W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine reviews* 20, 321-344.
- McKenna, N.J., Nawaz, Z., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1998). Distinct steady-state nuclear receptor coregulator complexes exist in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11697-11702.
- McKenna, N.J., and O'Malley, B.W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108, 465-474.

- Michna, H., Schneider, M.R., Nishino, Y., and el Etreby, M.F. (1989). Antitumor activity of the antiprogesterins ZK 98.299 and RU 38.486 in hormone dependent rat and mouse mammary tumors: mechanistic studies. *Breast Cancer Res Treat* *14*, 275-288.
- Molenda-Figueira, H.A., Murphy, S.D., Shea, K.L., Siegal, N.K., Zhao, Y., Chadwick, J.G., Jr., Denner, L.A., and Tetel, M.J. (2008). Steroid receptor coactivator-1 from brain physically interacts differentially with steroid receptor subtypes. *Endocrinology* *149*, 5272-5279.
- Montano, M.M., Ekena, K., Delage-Mourroux, R., Chang, W., Martini, P., and Katzenellenbogen, B.S. (1999). An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 6947-6952.
- Moore, M.R., Conover, J.L., and Franks, K.M. (2000). Progesterin effects on long-term growth, death, and Bcl-xL in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* *277*, 650-654.
- Moore, M.R., Hathaway, L.D., and Bircher, J.A. (1991). Progesterin stimulation of thymidine kinase in the human breast cancer cell line T47D. *Biochim Biophys Acta* *1096*, 170-174.
- Moore, M.R., Spence, J.B., Kinningham, K.K., and Dillon, J.L. (2006). Progesterin inhibition of cell death in human breast cancer cell lines. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *98*, 218-227.
- Moore, M.R., Zhou, J.L., Blankenship, K.A., Strobl, J.S., Edwards, D.P., and Gentry, R.N. (1997). A sequence in the 5' flanking region confers progesterin responsiveness on the human c-myc gene. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *62*, 243-252.
- Mote, P.A., Balleine, R.L., McGowan, E.M., and Clarke, C.L. (1999). Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* *84*, 2963-2971.
- Mote, P.A., Bartow, S., Tran, N., and Clarke, C.L. (2002). Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* *72*, 163-172.
- Mote, P.A., Gompel, A., Howe, C., Hilton, H.N., Sestak, I., Cuzick, J., Dowsett, M., Hugol, D., Forgez, P., Byth, K., *et al.* (2015). Progesterone receptor A predominance is a discriminator of benefit from endocrine therapy in the ATAC trial. *Breast Cancer Res Treat* *151*, 309-318.
- Mote, P.A., Graham, J.D., and Clarke, C.L. (2007). Progesterone receptor isoforms in normal and malignant breast. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 77-107.
- Mote, P.A., Leary, J.A., Avery, K.A., Sandelin, K., Chenevix-Trench, G., Kirk, J.A., and Clarke, C.L. (2004). Germ-line mutations in BRCA1 or BRCA2 in the normal breast are associated with altered expression of estrogen-responsive proteins and the predominance of progesterone receptor A. *Genes Chromosomes Cancer* *39*, 236-248.
- Mulac-Jercevic, B., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., and Conneely, O.M. (2003). Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 9744-9749.
- Mulac-Jercevic, B., Mullinax, R.A., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., and Conneely, O.M. (2000). Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science (New York, NY)* *289*, 1751-1754.
- Musgrove, E.A., Lee, C.S., and Sutherland, R.L. (1991a). Progesterins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. *Mol Cell Biol* *11*, 5032-5043.
- Musgrove, E.A., Lee, C.S., and Sutherland, R.L. (1991b). Progesterins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. *Mol Cell Biol* *11*, 5032-5043.
- Musgrove, E.A., Swarbrick, A., Lee, C.S., Cornish, A.L., and Sutherland, R.L. (1998). Mechanisms of cyclin-dependent kinase inactivation by progesterins. *Mol Cell Biol* *18*, 1812-1825.
- Nagaraj, N.S., and Datta, P.K. (2010). Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer. *Expert Opin Investig Drugs* *19*, 77-91.
- Nawaz, Z., Lonard, D.M., Dennis, A.P., Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (1999). Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 1858-1862.
- Nemati, F., Livartowski, A., De Cremoux, P., Bourgeois, Y., Arvelo, F., Poullart, P., and Poupon, M.F. (2000). Distinctive potentiating effects of cisplatin and/or ifosfamide combined with etoposide in human small cell lung carcinoma xenografts. *Clin Cancer Res* *6*, 2075-2086.
- Newman, B., Austin, M.A., Lee, M., and King, M.C. (1988). Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 3044-3048.
- Nicksch, K., Nair, H.B., Kesavaram, N., Das, B., Garfield, R., Shi, S.Q., Bhaskaran, S.S., Grimm, S.L., and Edwards, D.P. (2013). Synthesis and antiprogesterational properties of novel 17-fluorinated steroids. *Steroids* *78*, 909-919.
- Nishino, T., Ishibashi, K., Hirtreiter, C., and Nishino, Y. (2009). Potentiation of the antitumor effect of tamoxifen by combination with the antiprogesterin onapristone. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *116*, 187-190.
- Nishino, Y., Schneider, M.R., and Michna, H. (1994). Enhancement of the antitumor efficacy of the antiprogesterin, onapristone, by combination with the antiestrogen, ICI 164384. *J Cancer Res Clin Oncol* *120*, 298-302.



- Nishita, M., Enomoto, M., Yamagata, K., and Minami, Y. (2010). Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells. *Trends Cell Biol* 20, 346-354.
- Nusse, R. (1999). WNT targets. Repression and activation. *Trends in genetics : TIG* 15, 1-3.
- O'Malley, B.W., and Means, A.R. (1974). Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science (New York, NY)* 183, 610-620.
- Obr, A.E., and Edwards, D.P. (2012). The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 357, 4-17.
- Obr, A.E., Grimm, S.L., Bishop, K.A., Pike, J.W., Lydon, J.P., and Edwards, D.P. (2013). Progesterone receptor and Stat5 signaling cross talk through RANKL in mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 27, 1808-1824.
- Olopade, O.I., Adeyanju, M.O., Safa, A.R., Hagos, F., Mick, R., Thompson, C.B., and Recant, W.M. (1997). Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J Sci Am* 3, 230-237.
- Olate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science (New York, NY)* 270, 1354-1357.
- Ory, K., Lebeau, J., Levalois, C., Bishay, K., Fouchet, P., Allemand, I., Therwath, A., and Chevillard, S. (2001). Apoptosis inhibition mediated by medroxyprogesterone acetate treatment of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 68, 187-198.
- Osborne, C.K., and Schiff, R. (2005). Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 1616-1622.
- Oue, T., Fukuzawa, M., Kamata, S., and Okada, A. (1995). Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen expression in human neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 30, 528-532.
- Ouhtit, A., Madani, S., Gupta, I., Shanmuganathan, S., Abdraboh, M.E., Al-Riyami, H., Al-Farsi, Y.M., and Raj, M.H. (2013). TGF-beta2: A Novel Target of CD44-Promoted Breast Cancer Invasion. *J Cancer* 4, 566-572.
- Owen, G.I., Richer, J.K., Tung, L., Takimoto, G., and Horwitz, K.B. (1998). Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300. *The Journal of biological chemistry* 273, 10696-10701.
- Palijan, A., Fernandes, I., Bastien, Y., Tang, L., Verway, M., Kourelis, M., Tavera-Mendoza, L.E., Li, Z., Bourdeau, V., Mader, S., *et al.* (2009a). Function of histone deacetylase 6 as a cofactor of nuclear receptor coregulator LCoR. *The Journal of biological chemistry* 284, 30264-30274.
- Palijan, A., Fernandes, I., Verway, M., Kourelis, M., Bastien, Y., Tavera-Mendoza, L.E., Sacheli, A., Bourdeau, V., Mader, S., and White, J.H. (2009b). Ligand-dependent corepressor LCoR is an attenuator of progesterone-regulated gene expression. *The Journal of biological chemistry* 284, 30275-30287.
- Pathiraja, T.N., Shetty, P.B., Jelinek, J., He, R., Hartmaier, R., Margossian, A.L., Hilsenbeck, S.G., Issa, J.P., and Oesterreich, S. (2011). Progesterone receptor isoform-specific promoter methylation: association of PRA promoter methylation with worse outcome in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 17, 4177-4186.
- Pathiraja, T.N., Stearns, V., and Oesterreich, S. (2010). Epigenetic regulation in estrogen receptor positive breast cancer—role in treatment response. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15, 35-47.
- Perraut, D., Eisenhauer, E.A., Prichard, K.I., Panasci, L., Norris, B., Vandenberg, T., and Fisher, B. (1996). Phase II study of the progesterone antagonist mifepristone in patients with untreated metastatic breast carcinoma : a National Cancer Institute of Canada Clinic Trials Group Study. *J Clin Oncol* 14, 2709-2712.
- Petit-Topin, I., Fay, M., Resche-Rigon, M., Ulmann, A., Gainer, E., Rafestin-Oblin, M.E., and Fagart, J. (2014). Molecular determinants of the recognition of ulipristal acetate by oxo-steroid receptors. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 144 Pt B, 427-435.
- Picard, D. (2006). Chaperoning steroid hormone action. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 17, 229-235.
- Picard, D., and Yamamoto, K.R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 6, 3333-3340.
- Polo, M.L., Amoni, M.V., Riggio, M., Wargon, V., Lanari, C., and Novaro, V. (2010). Responsiveness to PI3K and MEK inhibitors in breast cancer. Use of a 3D culture system to study pathways related to hormone independence in mice. *PLoS ONE* 5, e10786.
- Poole, A.J., Li, Y., Kim, Y., Lin, S.C., Lee, W.H., and Lee, E.Y. (2006). Prevention of Brca1-mediated mammary tumorigenesis in mice by a progesterone antagonist. *Science (New York, NY)* 314, 1467-1470.
- Poulin, R., Dufour, J.M., and Labrie, F. (1989). Progestin inhibition of estrogen-dependent proliferation in ZR-75-1 human breast cancer cells: antagonism by insulin. *Breast Cancer Res Treat* 13, 265-276.
- Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.L., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 12, R68.
- Prat, A., and Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 5, 5-23.
- Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Harrell, J.M., and DeFranco, D.B. (2004a). Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal* 16, 857-872.
- Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Morishima, Y., and Murphy, P.J. (2004b). Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* 40, 41-58.

- Proskuryakov, S.Y., and Gabai, V.L. (2010). Mechanisms of tumor cell necrosis. *Curr Pharm Des* 16, 56-68.
- Quiles, I., Millan-Arino, L., Subtil-Rodriguez, A., Minana, B., Spinedi, N., Ballare, C., Beato, M., and Jordan, A. (2009). Mutational analysis of progesterone receptor functional domains in stable cell lines delineates sets of genes regulated by different mechanisms. *Mol Endocrinol* 23, 809-826.
- Raaijmakers, H.C., Versteegh, J.E., and Uitdehaag, J.C. (2009). The X-ray structure of RU486 bound to the progesterone receptor in a destabilized agonistic conformation. *The Journal of biological chemistry* 284, 19572-19579.
- Rajaram, R.D., and Briskin, C. (2012). Paracrine signaling by progesterone. *Mol Cell Endocrinol* 357, 80-90.
- Rajaram, R.D., Buric, D., Caikovski, M., Ayyanan, A., Rougemont, J., Shan, J., Vainio, S.J., Yalcin-Ozuyal, O., and Briskin, C. (2015). Progesterone and Wnt4 control mammary stem cells via myoepithelial crosstalk. *EMBO J* 34, 641-652.
- Ranney, M.K., Ahmed, I.S., Potts, K.R., and Craven, R.J. (2007). Multiple pathways regulating the anti-apoptotic protein clusterin in breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 1772, 1103-1111.
- Rewinkel, J., Enthoven, M., Golstein, I., van der Rijst, M., Scholten, A., van Tilborg, M., de Weys, D., Wisse, J., and Hamersma, H. (2008). 11-(pyridinylphenyl)steroids—a new class of mixed-profile progesterone agonists/antagonists. *Bioorg Med Chem* 16, 2753-2763.
- Richards, J.E., Edery, M., Osborn, R.C., Larson, L.N., and Nandi, S. (1986). Effect of hormones and epidermal growth factor on the growth of the hormone-responsive 13762NF rat mammary tumor in collagen gel culture. *J Natl Cancer Inst* 76, 669-682.
- Richardson, A.R., and Maltz, F.N. (2012). Ulipristal acetate: review of the efficacy and safety of a newly approved agent for emergency contraception. *Clin Ther* 34, 24-36.
- Richer, J.K., Jacobsen, B.M., Manning, N.G., Abel, M.G., Wolf, D.M., and Horwitz, K.B. (2002). Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 5209-5218.
- Robertson, J.F., Willsher, P.C., Winterbottom, L., Blamey, R.W., and Thorpe, S. (1999). Onapristone, a progesterone receptor antagonist, as first-line therapy in primary breast cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 35, 214-218.
- Rocha, A., and Soares, R. (2009). Unraveling progesterone-induced molecular mechanisms in physiological and pathological conditions. *Curr Clin Pharmacol* 4, 148-153.
- Romieu, G., Maudelonde, T., Ulmann, A., Pujol, H., Grenier, J., Cavalie, G., Khalaf, S., and Rochefort, H. (1987). The antiprogesterin RU486 in advanced breast cancer: preliminary clinical trial. *Bull Cancer* 74, 455-461.
- Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A., Howard, B.V., Johnson, K.C., *et al.* (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 288, 321-333.
- Rowan, B.G., Garrison, N., Weigel, N.L., and O'Malley, B.W. (2000). 8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol Cell Biol* 20, 8720-8730.
- Rudas, M., Lehnert, M., Huynh, A., Jakesz, R., Singer, C., Lax, S., Schippinger, W., Dietze, O., Greil, R., Stiglbauer, W., *et al.* (2008). Cyclin D1 expression in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen-based therapy. *Clin Cancer Res* 14, 1767-1774.
- Russo, J., Ao, X., Grill, C., and Russo, I.H. (1999). Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res Treat* 53, 217-227.
- Russo, J., Moral, R., Balogh, G.A., Mailo, D., and Russo, I.H. (2005). The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 7, 131-142.
- Sainsbury, S., Bernecky, C., and Cramer, P. (2015). Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 129-143.
- Santen, R.J. (2003). Risk of breast cancer with progestins: critical assessment of current data. *Steroids* 68, 953-964.
- Santen, R.J. (2014). Menopausal hormone therapy and breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 142, 52-61.
- Sartorius, C.A., Groshong, S.D., Miller, L.A., Powell, R.L., Tung, L., Takimoto, G.S., and Horwitz, K.B. (1994a). New T47D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B- and A-receptors: only antiprogesterin-occupied B-receptors are switched to transcriptional agonists by cAMP. *Cancer research* 54, 3868-3877.
- Sartorius, C.A., Melville, M.Y., Hovland, A.R., Tung, L., Takimoto, G.S., and Horwitz, K.B. (1994b). A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol* 8, 1347-1360.
- Schneider, C.C., Gibb, R.K., Taylor, D.D., Wan, T., and Gercel-Taylor, C. (1998). Inhibition of endometrial cancer cell lines by mifepristone (RU 486). *J Soc Gynecol Investig* 5, 334-338.
- Schnitt, S.J. (2010). Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol* 23 Suppl 2, S60-64.
- Schramek, D., Leibbrandt, A., Sigl, V., Kenner, L., Pospisilik, J.A., Lee, H.J., Hanada, R., Joshi, P.A., Aliprantis, A., Glimcher, L., *et al.* (2010). Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. *Nature* 468, 98-102.
- Schreiber, V., Illuzzi, G., Heberle, E., and Dantzer, F. (2015). [From poly(ADP-ribose) discovery to PARP inhibitors in cancer therapy]. *Bull Cancer*.

- Schumacher, M., Sitruk-Ware, R., and De Nicola, A.F. (2008). Progesterone and progestins: neuroprotection and myelin repair. *Curr Opin Pharmacol* 8, 740-746.
- Seagroves, T.N., Lydon, J.P., Hovey, R.C., Vonderhaar, B.K., and Rosen, J.M. (2000). C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein) controls cell fate determination during mammary gland development. *Mol Endocrinol* 14, 359-368.
- Seong, M.K., Lee, J.Y., Byeon, J., Sohn, Y.J., Seol, H., Lee, J.K., Kim, E.K., Kim, H.A., and Noh, W.C. (2015). Bcl-2 is a highly significant prognostic marker of hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 150, 141-148.
- Shah, R., Rosso, K., and Nathanson, S.D. (2014). Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol* 5, 283-298.
- Shojima, K., Sato, A., Hanaki, H., Tsujimoto, I., Nakamura, M., Hattori, K., Sato, Y., Dohi, K., Hirata, M., Yamamoto, H., *et al.* (2015). Wnt5a promotes cancer cell invasion and proliferation by receptor-mediated endocytosis-dependent and -independent mechanisms, respectively. *Sci Rep* 5, 8042.
- Shyamala, G., Yang, X., Cardiff, R.D., and Dale, E. (2000). Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3044-3049.
- Shyamala, G., Yang, X., Silberstein, G., Barcellos-Hoff, M.H., and Dale, E. (1998). Transgenic mice carrying an imbalance in the native ratio of A to B forms of progesterone receptor exhibit developmental abnormalities in mammary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 696-701.
- Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 63, 11-30.
- Siegel, R.L., Sahar, L., Portier, K.M., Ward, E.M., and Jemal, A. (2015). Cancer death rates in US congressional districts. *CA Cancer J Clin.*
- Sieri, S., Chiodini, P., Agnoli, C., Pala, V., Berrino, F., Trichopoulou, A., Benetou, V., Vasilopoulou, E., Sanchez, M.J., Chirlaque, M.D., *et al.* (2014). Dietary fat intake and development of specific breast cancer subtypes. *J Natl Cancer Inst* 106.
- Silfen, S.L., Ciaccia, A.V., and Bryant, H.U. (1999). Selective estrogen receptor modulators: tissue selectivity and differential uterine effects. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society* 2, 268-283.
- Siolas, D., and Hannon, G.J. (2013). Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer research* 73, 5315-5319.
- Skildum, A., Faivre, E., and Lange, C.A. (2005). Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol Endocrinol* 19, 327-339.
- Smith, D.F. (1993). Dynamics of heat shock protein 90-progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes. *Mol Endocrinol* 7, 1418-1429.
- Smith, D.F., Schowalter, D.B., Kost, S.L., and Toft, D.O. (1990). Reconstitution of progesterone receptor with heat shock proteins. *Mol Endocrinol* 4, 1704-1711.
- Soini, T., Hurskainen, R., Grenman, S., Maenpaa, J., Paavonen, J., and Pukkala, E. (2014). Cancer risk in women using the levonorgestrel-releasing intrauterine system in Finland. *Obstet Gynecol* 124, 292-299.
- Soldin, O.P., Makambi, K.H., Soldin, S.J., and O'Mara, D.M. (2011). Steroid hormone levels associated with passive and active smoking. *Steroids* 76, 653-659.
- Stephens, P.J., Tarpey, P.S., Davies, H., Van Loo, P., Greenman, C., Wedge, D.C., Nik-Zainal, S., Martin, S., Varela, I., Bignell, G.R., *et al.* (2012). The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* 486, 400-404.
- Stumpf, W.E., Narbaitz, R., and Sar, M. (1980). Estrogen receptors in the fetal mouse. *J Steroid Biochem* 12, 55-64.
- Swarbrick, A., Lee, C.S., Sutherland, R.L., and Musgrove, E.A. (2000). Cooperation of p27(Kip1) and p18(INK4c) in progestin-mediated cell cycle arrest in T-47D breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 20, 2581-2591.
- Tanos, T., Sflomos, G., Echeverria, P.C., Ayyanan, A., Gutierrez, M., Delaloye, J.F., Raffoul, W., Fiche, M., Dougall, W., Schneider, P., *et al.* (2013). Progesterone/RANKL is a major regulatory axis in the human breast. *Sci Transl Med* 5, 182ra155.
- Thomas, C., and Gustafsson, J.A. (2011). The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 11, 597-608.
- Thomas, C., and Gustafsson, J.A. (2015). Estrogen receptor mutations and functional consequences for breast cancer. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.*
- Thomas, P., Pang, Y., Dong, J., Groenen, P., Kelder, J., de Vlieg, J., Zhu, Y., and Tubbs, C. (2007). Steroid and G protein binding characteristics of the sea trout and human progestin membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins. *Endocrinology* 148, 705-718.
- Toss, A., and Cristofanilli, M. (2015). Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Cancer Res* 17, 60.
- Tung, L., Abdel-Hafiz, H., Shen, T., Harvell, D.M., Nitao, L.K., Richer, J.K., Sartorius, C.A., Takimoto, G.S., and Horwitz, K.B. (2006). Progesterone receptors (PR)-B and -A regulate transcription by different mechanisms: AF-3 exerts regulatory control over coactivator binding to PR-B. *Mol Endocrinol* 20, 2656-2670.
- Valkenburg, K.C., Steensma, M.R., Williams, B.O., and Zhong, Z. (2013). Skeletal metastasis: treatments, mouse models, and the Wnt signaling. *Chin J Cancer* 32, 380-396.

- Vanzulli, S., Efeyan, A., Benavides, F., Helguero, L.A., Peters, G., Shen, J., Conti, C.J., Lanari, C., and Molinolo, A. (2002). p21, p27 and p53 in estrogen and antiprogesterin-induced tumor regression of experimental mouse mammary ductal carcinomas. *Carcinogenesis* 23, 749-758.
- Vanzulli, S.I., Soldati, R., Meiss, R., Colombo, L., Molinolo, A.A., and Lanari, C. (2005). Estrogen or antiprogesterin treatment induces complete regression of pulmonary and axillary metastases in an experimental model of breast cancer progression. *Carcinogenesis* 26, 1055-1063.
- Vazquez, S.M., Mladovan, A., Garbovesky, C., Baldi, A., and Luthy, I.A. (2004). Three novel hormone-responsive cell lines derived from primary human breast carcinomas: functional characterization. *J Cell Physiol* 199, 460-469.
- Veeman, M.T., Axelrod, J.D., and Moon, R.T. (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5, 367-377.
- Vegeto, E., Shahbaz, M.M., Wen, D.X., Goldman, M.E., O'Malley, B.W., and McDonnell, D.P. (1993). Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 7, 1244-1255.
- Vicent, G.P., Nacht, A.S., Smith, C.L., Peterson, C.L., Dimitrov, S., and Beato, M. (2004). DNA instructed displacement of histones H2A and H2B at an inducible promoter. *Mol Cell* 16, 439-452.
- Vignon, F., Bardon, S., Chalbos, D., and Rochefort, H. (1983). Antiestrogenic effect of R5020, a synthetic progestin in human breast cancer cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 56, 1124-1130.
- Vuong, D., Simpson, P.T., Green, B., Cummings, M.C., and Lakhani, S.R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch* 465, 1-14.
- Walsh, C.A., Qin, L., Tien, J.C., Young, L.S., and Xu, J. (2012). The function of steroid receptor coactivator-1 in normal tissues and cancer. *International journal of biological sciences* 8, 470-485.
- Wang, C., Fu, M., Angeletti, R.H., Siconolfi-Baez, L., Reutens, A.T., Albanese, C., Lisanti, M.P., Katzenellenbogen, B.S., Kato, S., Hopp, T., et al. (2001). Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *The Journal of biological chemistry* 276, 18375-18383.
- Wang, S., Yuan, Y., Liao, L., Kuang, S.Q., Tien, J.C., O'Malley, B.W., and Xu, J. (2009). Disruption of the SRC-1 gene in mice suppresses breast cancer metastasis without affecting primary tumor formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 151-156.
- Ward, H.W. (1973). Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels. *British medical journal* 1, 13-14.
- Wargon, V., Helguero, L.A., Bolado, J., Rojas, P., Novaro, V., Molinolo, A., and Lanari, C. (2009). Reversal of antiprogesterin resistance and progesterone receptor isoform ratio in acquired resistant mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 116, 449-460.
- Wargon, V., Riggio, M., Giulianelli, S., Sequeira, G.R., Rojas, P., May, M., Polo, M.L., Gorostiaga, M.A., Jacobsen, B., Molinolo, A., et al. (2015). Progesterin and antiprogesterin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters. *Int J Cancer* 136, 2680-2692.
- Wei, L.L., Hawkins, P., Baker, C., Norris, B., Sheridan, P.L., and Quinn, P.G. (1996). An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progesterin-induced transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 10, 1379-1387.
- Wei, L.N., Hu, X., Chandra, D., Seto, E., and Faroquii, M. (2000). Receptor-interacting protein 140 directly recruits histone deacetylases for gene silencing. *The Journal of biological chemistry* 275, 40782-40787.
- Weigel, N.L., and Moore, N.L. (2007). Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Mol Endocrinol* 21, 2311-2319.
- Weigelt, B., Geyer, F.C., and Reis-Filho, J.S. (2010). Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol* 4, 192-208.
- Weigelt, B., and Reis-Filho, J.S. (2009). Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nature reviews Clinical oncology* 6, 718-730.
- Weil, M.K., and Chen, A.P. (2011). PARP inhibitor treatment in ovarian and breast cancer. *Curr Probl Cancer* 35, 7-50.
- Welboren, W.J., Sweep, F.C., Span, P.N., and Stunnenberg, H.G. (2009). Genomic actions of estrogen receptor alpha: what are the targets and how are they regulated? *Endocr Relat Cancer* 16, 1073-1089.
- Whittle, J.R., Lewis, M.T., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2015). Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. *Breast Cancer Res* 17, 17.
- Widschwendter, M., Rosenthal, A.N., Philpott, S., Rizzuto, I., Fraser, L., Hayward, J., Intermaggio, M.P., Edlund, C.K., Ramus, S.J., Gayther, S.A., et al. (2013). The sex hormone system in carriers of BRCA1/2 mutations: a case-control study. *Lancet Oncol* 14, 1226-1232.
- Wiehle, R., Lantvit, D., Yamada, T., and Christov, K. (2011). CDB-4124, a progesterone receptor modulator, inhibits mammary carcinogenesis by suppressing cell proliferation and inducing apoptosis. *Cancer Prev Res* 4, 414-424.
- Wiehle, R.D., Christov, K., and Mehta, R. (2007). Anti-progestins suppress the growth of established tumors induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene: comparison between RU486 and a new 21-substituted-19-nor-progestin. *Oncol Rep* 18, 167-174.
- Winneker, R.C., Fensome, A., Zhang, P., Yudit, M.R., McComas, C.C., and Unwalla, R.J. (2008). A new generation of progesterone receptor modulators. *Steroids* 73, 689-701.
- Wolf, I.M., Heitzer, M.D., Grubisha, M., and DeFranco, D.B. (2008). Coactivators and nuclear receptor transactivation. *J Cell Biochem* 104, 1580-1586.

- Wu, R.C., Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (2005). Transcriptional regulation by steroid receptor coactivator phosphorylation. *Endocrine reviews* 26, 393-399.
- Xu, J., Wu, R.C., and O'Malley, B.W. (2009). Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nat Rev Cancer* 9, 615-630.
- Xu, Q., Ohara, N., Chen, W., Liu, J., Sasaki, H., Morikawa, A., Sitruk-Ware, R., Johansson, E.D., and Maruo, T. (2006). Progesterone receptor modulator CDB-2914 down-regulates vascular endothelial growth factor, adrenomedullin and their receptors and modulates progesterone receptor content in cultured human uterine leiomyoma cells. *Human reproduction (Oxford, England)* 21, 2408-2416.
- Xu, Q., Takekida, S., Ohara, N., Chen, W., Sitruk-Ware, R., Johansson, E.D., and Maruo, T. (2005). Progesterone receptor modulator CDB-2914 down-regulates proliferative cell nuclear antigen and Bcl-2 protein expression and up-regulates caspase-3 and poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase expression in cultured human uterine leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 953-961.
- Xu, Y., Hu, B., Qin, L., Zhao, L., Wang, Q., and Jiang, J. (2014). SRC-1 and Twist1 expression positively correlates with a poor prognosis in human breast cancer. *International journal of biological sciences* 10, 396-403.
- Yin, P., Roqueiro, D., Huang, L., Owen, J.K., Xie, A., Navarro, A., Monsivais, D., Coon, J.S.t., Kim, J.J., Dai, Y., *et al.* (2012). Genome-wide progesterone receptor binding: cell type-specific and shared mechanisms in T47D breast cancer cells and primary leiomyoma cells. *PLoS ONE* 7, e29021.
- Yudt, M.R., Russo, L.A., Berrodin, T.J., Jelinsky, S.A., Ellis, D., Cohen, J.C., Cooch, N., Haglund, E., Unwalla, R.J., Fensome, A., *et al.* (2011). Discovery of a novel mechanism of steroid receptor antagonism: WAY-255348 modulates progesterone receptor cellular localization and promoter interactions. *Biochem Pharmacol*.
- Yun, B.S., Seong, S.J., Cha, D.H., Kim, J.Y., Kim, M.L., Shim, J.Y., and Park, J.E. (2015). Changes in proliferating and apoptotic markers of leiomyoma following treatment with a selective progesterone receptor modulator or gonadotropin-releasing hormone agonist. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 191, 62-67.
- Zardavas, D., Irrthum, A., Swanton, C., and Piccart, M. (2015). Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nature reviews Clinical oncology* 12, 381-394.
- Zerlin, M., Julius, M.A., and Kitajewski, J. (2008). Wnt/Frizzled signaling in angiogenesis. *Angiogenesis* 11, 63-69.
- Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hara, Y., Kobayashi, S., and Iwase, H. (2006). NCOR1 mRNA is an independent prognostic factor for breast cancer. *Cancer Lett* 237, 123-129.