



HAL
open science

Méthylation de l'ADN, phyto-oestrogènes et cancer du sein et de l'ovaire

Rémy Bosviel

► **To cite this version:**

Rémy Bosviel. Méthylation de l'ADN, phyto-oestrogènes et cancer du sein et de l'ovaire. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2011. Français. NNT : 2011CLF1MM21 . tel-02062618

HAL Id: tel-02062618

<https://theses.hal.science/tel-02062618>

Submitted on 9 Mar 2019

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.



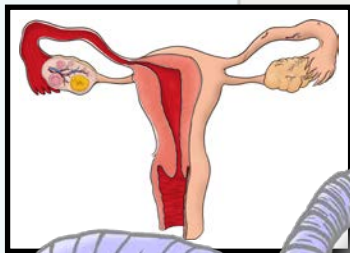
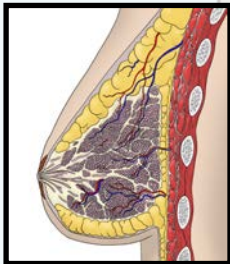
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé,
Agronomie, Environnement



Année 2011

N° d'ordre :

Méthylation de l'ADN, Phyto-œstrogènes et Cancer du Sein et de l'Ovaire



Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne

Pour l'obtention du grade de

Docteur d'Université

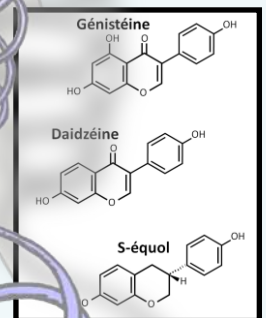
Spécialité

Nutrition et Cancer

Soutenance le 2 décembre 2011

par

Rémy Bosviel



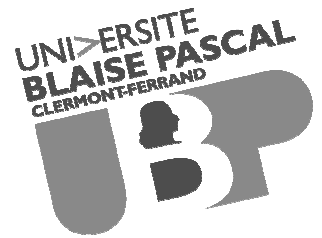
Membres du jury :

Dr. Dominique Bernard-Gallon	Directrice de thèse	Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand
Pr. Yves-Jean Bignon	Président du jury	U. d'Auvergne, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand
Pr. Catherine Bennetau-Pelissero	Rapporteur extérieur	U. de Bordeaux, ENITA de Bordeaux
Dr. Paule Latino-Martel	Rapporteur extérieur	INRA de Jouy-en-Josas
Pr. Luc Fontana	Membre du jury	CHU de Saint Etienne

Département d'Oncogénétique du Centre Jean Perrin
EA 4233 « Nutrition, Cancérogénèse et Thérapie Anti-tumorale »
Centre Biomédical de Recherche et Valorisation 1^{er} étage
28 Place Henri Dunant, BP 38
63001 Clermont-Ferrand cedex 01



Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé,
Agronomie, Environnement



Année 2011

N° d'ordre :

Méthylation de l'ADN, Phyto-œstrogènes et Cancer du Sein et de l'Ovaire

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne

Pour l'obtention du grade de

Docteur d'Université

Spécialité

Nutrition et Cancer

Soutenance le 2 décembre 2011

par

Rémy Bosviel

Membres du jury :

Dr. Dominique Bernard-Gallon	Directrice de thèse	Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand
Pr. Yves-Jean Bignon	Président du jury	U. d'Auvergne, Centre Jean Perrin, Clermont-Fd
Pr. Catherine Bennetau-Pelissero	Rapporteur extérieur	U. de Bordeaux, ENITA de Bordeaux
Dr. Paule Latino-Martel	Rapporteur extérieur	INRA de Jouy-en-Josas
Pr. Luc Fontana	Membre du jury	CHU de Saint Etienne

Département d'Oncogénétique du Centre Jean Perrin
EA 4233 « Nutrition, Cancérogénèse et Thérapie Anti-tumorale »
Centre Biomédical de Recherche et Valorisation 1^{er} étage
28 Place Henri Dunant, BP 38
63001 Clermont-Ferrand cedex 01

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Dominique Bernard-Gallon, qui m'a permis d'effectuer ce travail au sein de l'équipe Nutrition et Cancer du Département d'Oncogénétique du Centre Jean Perrin. Je la remercie pour son encadrement et ses conseils, mais aussi pour sa disponibilité et pour m'avoir aidé à maintenir le cap et le rythme tout au long de mon doctorat.

Je remercie le Professeur Yves-Jean Bignon, pour m'avoir accueilli au sein du Département d'Oncogénétique et pour la mise à disposition des moyens financiers pour réaliser mon travail de thèse.

Je remercie également le Professeur Catherine Bennetau-Pelissero et le Docteur Paule Latino-Martel pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie le Professeur Luc Fontana d'être revenu pour participer à mon jury de thèse.

Enfin, je remercie toutes les personnes membres du laboratoire, stagiaires, amis et membres de ma famille, qui m'ont permis de vivre chaque jour de ces trois années de thèse, heureux, tout simplement.

ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine Di-Phosphate

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

AKT : Ak transforming (le Ak se réfère au nom temporaire donné à une souche de souris)

AMPc : Adénosine Mono Phosphate cyclique

ARN : Acide Ribonucléique

Asn : Asparagine

Asp : Acide Aspartique

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

A^{vy} : Agouti Viable Yellow (allele)

BRC : Breast Cancer

BRCA1 : Breast Cancer 1

BRCA2 : Breast Cancer 2

BRCT : BRCA1 C terminus (domain)

CBP : CRE-Binding Protein

CCND2 : Cyclin D2

CPP : Comité de Protection des Personnes

CDKN2A : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A

CHD1 : Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1

ChIP : Chromatin Immunoprecipitation

Chk1 : Checkpoint Homolog 1

Chk2 : Checkpoint Homolog 2

c-H-ras : Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog

COSA : Cancer des Ovaires et du Sein

CpG : Cytosine phosphate Guanine

CRE : cAMP Response Element

CTCF : CCCTC-binding factor

CYP19A1 : Cytochrome P450, Family 19, Subfamily A, Polypeptide 1

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DNMT : DNA Methyl Transferase

E₂ : 17-β-œstradiol

ERCC2 : Excision Repair Cross-Complementing rodent repair deficiency, complementation group 2

ERE : Element de Réponse aux Œstrogènes

ESR : Estrogen Receptor

EZH2 : Enhancer of Zeste Human Homolog

FSH : Follicle-stimulating hormone

Gln : Glutamine

H3K27 : Histone 3 Lysine 27

H3K4 : Histone 3 Lysine 4

H3K9 : Histone 3 Lysine 9

HAT : Histone Acétyl Transférase

HDAC : Histone Déacétylase

HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2

HKMT : Histone Lysine Methyl Transferase

HP1 : Heterochromatin Protein 1

hTERT : Human Telomerase Reverse Transcriptase

IMC : Indice de Masse Corporelle

IP : Immunoprécipitation

LH : Luteinizing Hormone

Lys : Lysine

MBD : Methyl Binding Domain

MCF-10a : Michigan Cancer Foundation - 10a

MCF-7 : Michigan Cancer Foundation - 7

MDA-MB-231 : Monroe Dunaway Anderson - Metastatic Breast - 231

MeCP2 : Methyl CpG Binding Protein 2

MeDIP : Methylated DNA Immunoprecipitation

MRE11 : Meiotic Recombination 11

c-MYC : Myelocytomatosis oncogene

NBS1 : Nijmegen Breakage Syndrome 1

NF- κ B : Nuclear Factor-kappa B

NHEJ : Non Homologous End Joining

NSBP1 : Nucleosome-Binding Protein 1

O-DMA : O-Desmethyl-Angolensin

PARP : Poly ADP Ribose Polymérase

PCR : Polymerase Chain Reaction

PGR : Progesterone Receptor

PHD : Plant Homeo Domain

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma

PR : Progesterone Receptor

QAMA : Quantitative Analysis of Methylated Alleles

RAD51 : Radiation 51

RAR β : Retinoic Acid Receptor Beta

RB : Rétinoblastome

RE : Récepteur aux Œstrogènes

RING : Really Interesting New Gene

RITS : RNA-induced Initiation of Transcriptional Gene Silencing

RTH : Rapport tour de Taille/tour de Hanches

SF-1 : Splicing Factor 1

SINEB1 : Short Interspersed Nuclear Element B1

SINEB2 : Short Interspersed Nuclear Element B2

siRNA : Small Interfering Ribonucleic Acid

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SRD5A2 : Steroid-5-Alpha-Reductase, Alpha Polypeptide 2

SUV39H : Suppressor of Variegation 3-9 Homolog 1

SV40 : Simian Virus 40

THM : Traitement Hormonal de la Ménopause

UHRF1 : Ubiquitin-like containing PHD and RING Finger domain1

VNTR : Variable Number of Tandem Repeats

XRCC2 : X-ray Repair Cross-Complementing 2

XRCC3 : X-ray Repair Cross-Complementing 3

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	2
1. LE CANCER DU SEIN.....	2
1.1. Rappels sur le sein.....	2
1.1.1. Développement.....	2
1.1.2. Anatomie	2
1.1.3. Histologie	3
1.1.4. Physiologie	4
1.2. Le cancer	4
1.3. Chiffres sur le cancer du sein	5
1.4. Les types histologiques de cancer du sein.....	6
1.5. Facteurs de risque et facteurs protecteurs	6
1.5.1. Facteurs environnementaux.....	6
1.5.1.1. Exposition aux radiations.....	6
1.5.1.2. Xénoœstrogènes	7
1.5.2. Facteurs comportementaux.....	7
1.5.2.1. Exercice physique	7
1.5.2.2. Tabagisme	8
1.5.2.3. Facteurs alimentaires.....	8
1.5.2.3.1. Alcool	8
1.5.2.3.2. Thé vert.....	8
1.5.2.3.3. Café.....	8
1.5.2.3.4. Phyto-œstrogènes.....	9
1.5.2.3.5. Vitamine D.....	9
1.5.2.3.6. Iode	9
1.5.2.3.7. Surpoids/obésité.....	9
1.5.2.4. Défaut de rythme circadien et sécrétion de mélatonine.....	10
1.5.3. Facteurs reproductifs	10
1.5.3.1. Age des premières règles et de la ménopause	10
1.5.3.2. Grossesse.....	10
1.5.3.3. Allaitement.....	11
1.5.3.4. Contraception hormonale	11
1.5.3.5. Traitement hormonal de la ménopause	11
1.5.4. Facteurs génétiques	12
1.5.4.1. Mutations héréditaires des gènes <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i>	12
1.5.4.1.1. Le gène <i>BRCA1</i>	12
1.5.4.1.2. Le gène <i>BRCA2</i>	12
1.5.4.1.3. Mutations dans les gènes <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i>	13
1.5.4.2. Autres polymorphismes génétiques	13
Publication N°1 : « DNA repair gene ERCC2 polymorphisms and associations with breast and ovarian cancer risk » Dominique Bernard-Gallon, Rémy Bosviel, Laetitia Delort, Luc Fontana, Alain Chamoux, Nadège Rabiau, Fabrice Kwiatkowski, Nasséra Chalabi, Samir Satih and Yves-Jean Bignon Molecular Cancer 2008, 7:36.....	15
2. LE CANCER DES OVAIRES.....	17
2.1. Rappels sur les ovaires.....	17
2.1.1. Développement.....	17
2.1.2. Anatomie	17
2.1.3. Histologie	18
2.1.4. Physiologie	18
2.2. Chiffres sur le cancer des ovaires	20
2.3. Les types histologiques de cancers ovariens.....	20
2.4. Facteurs de risque et facteurs protecteurs	20
2.4.1. Facteurs environnementaux.....	20
2.4.1.1. Talc et amiante	20
2.4.2. Facteurs comportementaux.....	20
2.4.2.1. Tabagisme	20
2.4.2.2. Facteurs alimentaires.....	21
2.4.2.2.1. Thé vert.....	21
2.4.2.2.2. Vitamine D.....	21

2.4.2.2.3. Surpoids et obésité	21
2.4.2.3. Endométriose	21
2.4.3. Facteurs reproductifs	21
2.4.3.1. Age des premières règles et de la ménopause	21
2.4.3.2. Grossesse.....	22
2.4.3.3. Allaitement.....	22
2.4.3.4. Contraception orale	22
2.4.3.5. Traitement de l'infertilité	22
2.4.3.6. Thérapie hormonale	23
2.4.4. Facteurs génétiques	23
2.4.4.1. Mutations des gènes <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i>	23
2.4.4.2. Autres polymorphismes	23
3. LES MARQUES EPIGENETIQUES.....	23
3.1. A propos de la chromatine.....	24
3.2. Marques au niveau des histones.....	25
3.3. La méthylation de l'ADN.....	27
3.4. Epigénétique et cancer.....	29
3.4.1. Notions générales	29
3.4.2. Epigénétique de <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i> dans les cancers du sein et de l'ovaire.....	30
4. LES PHYTO-ŒSTROGENES DU SOJA	32
4.1. Données générales	32
4.2. Effets physiologiques des phyto-œstrogènes du soja	33
4.2.1. Actions œstrogéniques et anti-œstrogéniques.....	33
4.2.2. Autres actions.....	35
4.2.3. Effets au niveau épigénétique.....	36
4.3. Phyto-œstrogènes du soja et cancers du sein	38
OBJECTIFS.....	41
RESULTATS	42
1. LA METHYLATION DES ONCOSUPPESSEURS <i>BRCA1</i> ET <i>BRCA2</i> IN VIVO.....	42
1.1. Dans le cancer de l'ovaire.....	42
Publication N°2 : « Peripheral blood DNA methylation detected in the <i>BRCA1</i> or <i>BRCA2</i> promoter for sporadic ovarian cancer patients and controls ». Rémy Bosviel, Emilie Michard, Lavediaux Guillaume, Kwiatkowski Fabrice, Yves-Jean Bignon and Dominique Bernard-Gallon Clin Chim Acta. 2011, 412(15-16):1472-5.....	42
1.2. Dans le cancer du sein.....	44
Publication N°3 : « <i>BRCA1</i> promoter methylation in peripheral blood DNA was identified in sporadic breast cancer and controls » Rémy Bosviel, Stéphane Garcia, Guillaume Lavediaux, Emilie Michard, Marine Dravers, Fabrice Kwiatkowski, Yves-Jean Bignon, Dominique J. Bernard-Gallon Soumis, 2011	44
Publication N°4 : « <i>BRCA2</i> promoter hypermethylation in sporadic breast cancer » Rémy Bosviel, Julie Durif, Jiaoli Guo, Mourad Mebrek, Fabrice Kwiatkowski, Yves-Jean Bignon, Dominique Bernard-Gallon Soumis, 2011.....	46
2. ACTION DES PHYTO-ŒSTROGENES SUR LA METHYLATION DE <i>BRCA1</i> ET <i>BRCA2</i> DANS DES CELLULES MAMMAIRES EN LIGNEES CONTINUES	48
Publication N°5 : « Can Soy Phytoestrogens Decrease DNA Methylation in <i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i> Oncosuppressor Genes in Breast Cancer Cell Lines? ». Rémy Bosviel, Elise Dumollard, Pierre Déchelotte, Yves-Jean Bignon and Dominique Bernard-Gallon OMICS, 2011 (sous presse).....	48
Publication N°6 : « Modulation of <i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i> gene expression by equol in breast cancer cell lines. » Rémy Bosviel, Julie Durif, Pierre Déchelotte, Yves-Jean Bignon, Dominique Bernard-Gallon British Journal of Nutrition, 2011 (sous presse).	50
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	52
CONCLUSIONS.....	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	64
REFERENCES INTERNET	89

INTRODUCTION

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et la première cause de mortalité par cancer chez la femme dans le monde [1]. De nombreux facteurs participent au développement de cette maladie et les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont particulièrement impliqués. En effet, des mutations dans ces deux oncosuppresseurs sont responsables de 5 à 10% des cancers du sein héréditaires [2]. De plus, une baisse de leur expression est retrouvée dans un grand nombre de cancers du sein sporadiques [3]. Les mutations héréditaires des gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont également à l'origine de cancers de l'ovaire [4]. Ce cancer est beaucoup moins fréquent que le cancer du sein, mais il est associé à un mauvais pronostic. En plus de ces facteurs génétiques, des facteurs hormonaux semblent également intervenir dans les processus de carcinogenèse mammaire et ovarienne, mais aussi des facteurs environnementaux et plus particulièrement l'alimentation. En effet, la consommation de soja, fréquente dans certaines régions de l'Asie serait responsable d'une diminution du risque de développer un cancer du sein dans les pays Asiatiques par rapport aux pays Occidentaux. Ce sont les phyto-œstrogènes contenus dans le soja qui agiraient, grâce à leur similarité de structure avec le 17- β -œstradiol de la femme [5]. Les phyto-œstrogènes du soja pourraient également agir sur le développement du cancer de l'ovaire puisque celui-ci est un cancer œstrogéno-dépendant, comme le cancer du sein.

L'équipe Nutrition et Cancer du Département d'Oncogénétique du Centre Jean Perrin étudie les effets potentiellement préventifs des phyto-œstrogènes du soja dans le processus de cancérogenèse.

Une première étude, menée au sein de l'équipe, a montré que l'expression des gènes *BRCA1* et *BRCA2* dans la glande mammaire pouvait être modulée par la consommation de soja chez des rates ovariectomisées [6]. Aussi, des études transcriptomiques, ont montré que les conséquences de l'inactivation des oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2* par l'utilisation d'un petit ARN interférent dans les cellules mammaires pouvaient être contrées par un traitement avec les phyto-œstrogènes du soja [7, 8].

Suite à l'émergence de travaux montrant des effets des phyto-œstrogènes du soja sur la méthylation de l'ADN, et la présence de méthylation dans le promoteur des gènes *BRCA1* et *BRCA2* dans les cancers sporadiques du sein, nous avons voulu voir si les phyto-œstrogènes du soja pourraient agir directement sur la méthylation de ces deux oncosuppresseurs, que nous avons au préalable mis en évidence dans les cancers du sein et de l'ovaire.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE CANCER DU SEIN

1.1. Rappels sur le sein

Le sein est un organe dont la fonction est la production de lait, permettant ainsi la nutrition du nouveau-né, indépendamment de l'environnement. De par leur forte innervation, les seins sont également une zone érogène importante chez la femme.

1.1.1. Développement

La glande mammaire est une annexe cutanée se développant à partir de l'épaississement de l'ectoderme au niveau de la face ventrale de l'embryon : la crête mammaire. Cette crête mammaire va ensuite régresser pour laisser deux bourgeons pectoraux. Ces bourgeons sont enchâssés dans le fascia superficialis qui va se dédoubler. Les futurs canaux galactophores, au nombre de 15 à 25 sont émis à partir du bourgeon pectoral et débouchent au niveau du futur mamelon par autant d'orifices. Le sein se maintient dans cet état chez le garçon. A la puberté, le volume du sein croît plus ou moins chez la femme à cause d'un développement glandulaire ainsi que d'une augmentation du tissu conjonctif et de la graisse. Une grossesse menée à terme permettra d'achever le développement de la glande mammaire, avec la différenciation des acini au cours des derniers mois. S'il y a allaitement, la glande mammaire va diminuer en volume, tandis que peu de modifications interviendront dans le cas contraire. Avec l'âge, puis la ménopause, la glande subit une involution plus ou moins prononcée accompagnée d'une augmentation proportionnelle de la graisse [9].

1.1.2. Anatomie

La base du sein s'étend de la deuxième à la sixième côte et du sternum jusqu'à la ligne axillaire antérieure. La partie inférieure de la base du sein constitue le sillon infra-mammaire dont la localisation est relativement identique d'une femme à l'autre et ne varie pas avec l'âge en raison de sa constitution fibreuse. En revanche, la taille et la forme des seins dépendent de facteurs génétiques et environnementaux (nutritionnels, notamment) et évoluent au cours de la vie. Le sein repose par le fascia superficialis sur le muscle grand pectoral. On peut distinguer plusieurs couches de tissus composant le sein : en surface, la peau est unie au tissu glandulaire par les retinaculum cutanés qui abritent du tissu adipeux. L'aréole se situe sur la zone la plus proéminente du sein. Il s'agit d'une zone fortement pigmentée fixée très étroitement à la glande mammaire et possédant des glandes sébacées aréolaires qui augmentent de volume lors de la grossesse. Un muscle lisse, localisé sous l'aréole est responsable du réflexe de thélotisme. Au centre de l'aréole se trouve le mamelon, qui, bien qu'en surface, fait partie

intégrante de la glande mammaire. Il présente les 15 à 25 orifices des conduits lactifères qui drainent les 15 à 25 lobes du sein. Ces lobes possèdent chacun un arbre canalaire, mais sont totalement intriqués. Ils sont entourés de tissus adipeux et conjonctifs dont les proportions sont variables. Le sein présente également une forte vascularisation, un vaste réseau de drainage lymphatique ainsi qu'une forte innervation cutanée, plus particulièrement au niveau de l'aréole et du mamelon, mais aussi en profondeur, dans la glande [9, 10] (Figure 1).

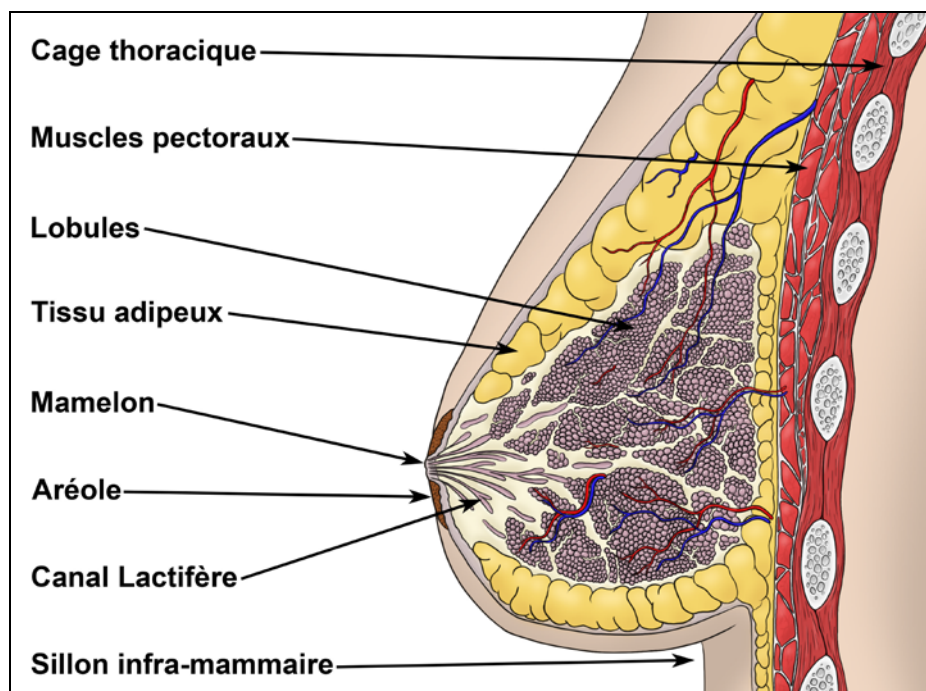


Figure 1 : Coupe sagittale du sein.

1.1.3. Histologie

Les arbres canaux démarrent dans le lobule mammaire par les canalicules. On trouve, successivement en aval, les canaux terminaux, les canaux galactophores sous-segmentaires et segmentaires, le sinus lactifère et le canal collecteur qui débouche au niveau du mamelon. Ce système canalaire est constitué d'une couche épithéliale interne doublée d'une couche myoépithéliale externe discontinue. Ces cellules reposent sur une lame basale entourée d'un manchon fibroblastique. Les cellules épithéliales de l'arbre canalaire possèdent des vacuoles sécrétoires. Le tissu interlobulaire est constitué de collagène et d'adipocytes. Au cours du cycle menstruel, le sein, influencé par les hormones sexuelles, se modifie avec la formation de petits lobules associés à des lumières étroites, une faible activité mitotique épithéliale et une forte activité mitotique interlobulaire. En revanche, l'inverse est retrouvé lors de la phase sécrétoire. Au cours de la grossesse, une forte prolifération cellulaire, associée à une multiplication des acini dans le lobule sont observés pendant les vingt premiers jours. L'accumulation de sécrétions au cours du deuxième trimestre est suivie de la période de

sécrétion lactée, entre deux et cinq jours après accouchement. La glande retourne à son état de repos après trois à quatre mois d'arrêt de lactation. Cette involution peut se traduire par une augmentation de tissu conjonctif adipeux et fibreux. Une involution a également lieu à la ménopause et peut se traduire par une disparition de structures lobulaires et une diminution du tissu conjonctif associée à une augmentation du tissu adipeux [9].

1.1.4. Physiologie

Le sein possède des cellules souches au niveau du parenchyme et du stroma. La stimulation hormonale de ces cellules va permettre leur multiplication et leur différenciation en tissu mammaire lors des différentes étapes du développement de la glande mammaire. Ainsi, la croissance mammaire observée à la puberté est sous l'influence des stéroïdes ovariens. Ces mêmes hormones agissent lors de la phase lutéale du cycle ovarien, induisant un début de développement mammaire, annulé en l'absence de gestation. La gestation, accompagnée du maintien de ces hormones permet le véritable développement du tissu sécréteur mammaire. Les œstrogènes semblent faiblement impliqués dans la croissance du tissu mammaire normal et agiraient plutôt en modifiant la structure du tissu. La progestérone semble avoir un effet plus direct. A la fin de la gestation, la lactogénèse est due à la diminution de progestérone qui entraîne l'augmentation de libération de prolactine par l'hypophyse. Cette prolactine est maintenue durant toute la galactopoïèse et la stimulation du téton provoque la libération d'ocytocine par l'hypophyse, provoquant la contraction des canaux galactophores et donc l'éjection du lait. Au sevrage, l'arrêt de l'évacuation du lait va provoquer un ralentissement de sa synthèse et induire l'involution de la glande [9].

1.2. Le cancer

Le cancer est un groupe de maladies provoquant le changement et la croissance des cellules de façon non contrôlée. Il est caractérisé par une prolifération cellulaire incontrôlée. Celle-ci résulte de l'accumulation de remaniements génétiques dans une population cellulaire qui acquièrent leur indépendance vis-à-vis des systèmes de régulation de leur prolifération. Ces remaniements génétiques sont causés par de nombreux facteurs et des prédispositions peuvent exister. La cancérogenèse peut-être divisée en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression. L'initiation correspond à l'étape où différents facteurs vont provoquer, *in fine*, le dérèglement cellulaire, par activation d'oncogènes ou inactivation de suppresseurs de tumeur suffisamment importants pour conférer un avantage à la cellule. Ces dérèglements sont obtenus par modifications génétiques ou épigénétiques. Les modifications génétiques comprennent la transmission héréditaire d'un allèle muté pour un gène suppresseur de tumeur et le cumul de mutations somatiques non réparées, obtenues suite à des erreurs de réplication

de l'ADN ou une exposition prolongée à des agents mutagènes. Les modifications épigénétiques comprennent la dérégulation de gènes, avec l'inhibition d'expression d'oncosuppresseurs ou l'activation de l'expression d'oncogènes. Ces dérégulations vont agir sur plusieurs mécanismes intervenant dans l'homéostasie : l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, la prolifération cellulaire, la différenciation et la sénescence cellulaire, ainsi que le maintien de l'intégrité du génome. L'étape suivante correspond à la promotion du cancer : la cellule ayant subi l'initiation va se diviser et accumuler les altérations génétiques, conduisant à la formation d'un clone de cellules ayant la capacité à former une tumeur. Ce clone de cellules va cumuler une croissance rapide avec une perte d'inhibition de contact, une acquisition de l'immortalité et une instabilité génétique qui, ensemble, vont permettre la sélection de clones de plus en plus agressifs, pouvant mener à l'étape suivante : la progression. La progression correspond à une extension de la tumeur, toujours à un niveau local : des mécanismes de néo-angiogenèse, permettant l'apport d'oxygène et de nutriments à la tumeur, sont mis en jeu, mais aussi des mécanismes permettant l'invasion tissulaire, voire un franchissement de la lame basale. La tumeur va finalement être capable de former des métastases, par invasion du système lymphatique ou sanguin et réimplantation puis progression dans un autre tissu. Le décès par cancer peut survenir suite à la perte de fonction de certains organes, comme le foie ou les reins, à une trop forte consommation en oxygène de la part des cellules tumorales, empêchant l'oxygénation correcte de l'organisme, ou à une trop forte demande nutritionnelle de la part des cellules tumorales.

Le cancer est la première cause de mortalité dans les pays développés et la deuxième dans les pays en développement. D'après le GLOBOCAN de 2008, il y avait 12,7 millions de cas dans le monde en 2008 et 7,6 millions de décès par cancer [1]. L'incidence des cancers ne cesse de progresser en France, avec une augmentation par an de 1,2% pour les hommes et 1,4% pour les femmes entre 1980 et 2005 du taux d'incidence. De nombreuses raisons peuvent expliquer cela : l'allongement de la durée de vie, qui aboutit à un vieillissement de la population, les changements de mode de vie (alimentation, sédentarisation), mais aussi un meilleur dépistage. Par ailleurs, la mortalité par cancer diminue (-1,1% par an chez l'homme et -0,9% chez la femme, en France entre 1980 et 2005), notamment grâce à un dépistage plus précoce et une meilleure prise en charge thérapeutique. En France, on estime à 357 500 le nombre de cas en 2010 et 146 500 le nombre de décès par cancer (a).

1.3. Chiffres sur le cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme au niveau mondial. Il compte pour 23% (1,38 million) des nouveaux cas et 14% (458 400) des décès en 2008 [1].

En France, il a eu 52 500 nouveaux cas en 2010 et l'on estime à 11 500 le nombre décès par cancer du sein cette même année en France (a).

1.4. Les types histologiques de cancer du sein

Les cancers du sein sont nommés de par leur localisation, ainsi, la majorité des cancers mammaires sont localisés dans les canaux galactophores et représentent 70 à 80% des cancers du sein. Il semblerait que la plupart des cancers du sein évoluent depuis un cancer canalaire *in situ*, confiné dans les canaux galactophores vers un cancer invasif, capable de franchir la lame basale de ces canaux. En fait, les cancers canaux regroupent un vaste ensemble de tumeurs. Les cancers du sein moins représentés regroupent les carcinomes tubuleux, mucineux, lobulaires ou encore médullaires [11].

1.5. Facteurs de risque et facteurs protecteurs

Les causes du cancer du sein ne sont pas toutes connues. Toutefois, des études ont identifié différents facteurs pouvant augmenter le risque de développer un cancer du sein. Ces facteurs de risque ne déclenchent pas le cancer du sein, mais augmentent le risque de développer ce cancer au cours de la vie.

Le sexe est le premier facteur de risque de cancer du sein, en effet, ce cancer est le plus fréquent chez les femmes, tandis qu'il est plutôt rare chez les hommes. Cette différence s'explique par un nombre de cellules mammaires plus important chez les femmes, ainsi qu'une exposition relativement constante aux hormones féminines (œstrogènes et progestérone) qui ont un effet promoteur sur la croissance des cellules mammaires.

L'âge est également un facteur de risque du cancer du sein, comme pour l'ensemble des cancers, simplement parce que la cancérogenèse est un processus long qui a plus de probabilités d'aboutir sur de longues durées [12].

1.5.1. Facteurs environnementaux

1.5.1.1. Exposition aux radiations

Les radiations non-ionisantes comprennent tout type de radiation ne délivrant pas assez d'énergie pour arracher des électrons aux atomes.

La lumière est une radiation non-ionisante. Ses effets sur le risque de développer un cancer du sein seraient indirects et plutôt liés à la sécrétion de mélatonine.

Les champs électro-magnétiques sont également des radiations non-ionisantes, suspectées d'avoir des effets cancérogènes. Malgré le nombre d'études sur le sujet, il semblerait qu'il n'y a pas de relation claire entre l'exposition aux champs électro-magnétiques et une augmentation du risque de développer un cancer du sein [13, 14].

Enfin, les radiations ionisantes comprennent tout type de radiation suffisamment énergétique pour arracher des électrons aux atomes. Ces radiations peuvent ainsi détruire les liaisons chimiques des molécules, y compris l'ADN, perturbant alors son fonctionnement normal. Les rayons gamma et les rayons X sont les principaux rayonnements capables de traverser et d'endommager les tissus sous la peau. De nombreuses études rapportent une augmentation du risque de développer un cancer du sein associée à une exposition aux radiations ionisantes. Les radiations étudiées comprennent celles d'origines médicales, les expositions professionnelles et les expositions aux radiations des bombes de Nagasaki et Hiroshima. Cette augmentation du risque semble retrouvée pour de faibles doses d'expositions (0,5 Gy) et atteint un plateau au-delà de 20 Gy, ce qui pourrait s'expliquer par une mortalité des cellules, qui ne peuvent donc pas aboutir à une tumeur. Enfin, le fractionnement des expositions semble réduire cet effet, mais aucun résultat significatif n'a encore été obtenu [15].

1.5.1.2. Xénoœstrogènes

Les xénoœstrogènes font partie de la classe des perturbateurs endocriniens, des molécules capables de mimer ou de perturber l'activité, ou la liaison d'hormones. Les xénoœstrogènes sont des molécules utilisées par l'homme pour des raisons indépendantes de leur effet sur le système endocrinien. Il peut s'agir d'additifs, de solvants industriels, de pesticides, d'herbicides ou de produits de combustion ou de synthèse de produits courants. De nombreuses études ont montré la capacité de ces molécules à perturber le système endocrinien, mais l'influence de ces composés sur le risque de cancer du sein reste incertaine. En effet, chacun de ces composés n'est présent qu'à faible dose dans l'environnement et l'exposition à un ensemble de ces molécules pourrait augmenter le risque de développer un cancer du sein [16].

1.5.2. Facteurs comportementaux

1.5.2.1. Exercice physique

De nombreuses études montrent qu'une trop faible activité physique augmente le risque de développer un cancer du sein. Des études montrent ainsi que l'activité physique diminue d'environ 25% le risque de développer un cancer du sein, en comparaison avec les personnes les moins actives. Cet effet protecteur s'expliquerait notamment par une réduction de la masse graisseuse [17].

1.5.2.2. Tabagisme

L'effet du tabagisme sur le risque de cancer du sein est actuellement uniquement soupçonné parce que les résultats des nombreuses études sur le sujet ne mettent pas en évidence un effet clair. Une étude a même supposé que le tabagisme pourrait avoir un effet protecteur de par une action antiœstrogénique. La plupart des études épidémiologiques concluent à une absence de risque, tandis que d'autres révèlent une augmentation du risque qui pourrait être due à des facteurs confondants (comme la consommation d'alcool). Aujourd'hui, il semble probable que le tabagisme augmente le risque de développer le cancer du sein en raison de la multitude de composés carcinogènes contenus dans la fumée. Un effet plus important sur la durée, ou pendant la période précédant la première grossesse sont soupçonnés [18].

1.5.2.3. Facteurs alimentaires

1.5.2.3.1. Alcool

De nombreuses études révèlent un risque plus important de développer un cancer du sein associé à la consommation d'alcool. Si cet effet semble clair, plusieurs mécanismes sont à l'étude pour l'expliquer : une augmentation du taux d'œstrogène circulant, une stimulation de la prolifération cellulaire ou la formation d'adduits sur l'ADN [19].

1.5.2.3.2. Thé vert

Un nombre croissant d'études s'intéressent à un possible effet protecteur du thé vert vis-à-vis du cancer du sein. Un petit nombre d'entre elles révèlent un risque plus faible de développer un cancer du sein ou de faire une rechute, suite au traitement d'un cancer du sein associés à une forte consommation de thé vert. Cet effet protecteur serait dû à l'(-)-epigallocatechin-3-gallate, un antioxydant fortement présent dans le thé vert [20, 21].

1.5.2.3.3. Café

De par sa composition, riche en antioxydants et en molécules potentiellement bénéfiques pour la santé, ainsi que de par le fait qu'il s'agit d'une des boissons les plus consommées dans les pays occidentaux, de nombreuses études ont recherché des effets protecteurs du café. Certaines études montrent qu'une forte consommation de café diminuerait modestement le risque de développer un cancer du sein chez les femmes non ménopausées [22, 23].

1.5.2.3.4. Phyto-œstrogènes

Les phyto-œstrogènes sont des composés phénoliques végétaux possédant une similarité structurale avec le 17- β -œstradiol, l'œstrogène humain, ce qui permet leur liaison aux récepteurs aux œstrogènes. Leurs mécanismes d'action ne sont toutefois pas limités à des interactions avec les récepteurs aux œstrogènes. Deux catégories de phyto-œstrogènes sont principalement étudiées : les isoflavones et les lignanes. Les isoflavones, sont retrouvés dans les légumineuses et plus particulièrement le soja et ses produits dérivés, ainsi que le trèfle. Les lignanes sont quand à eux présents dans les parties fibreuses des fruits et légumes ou dans les enveloppes ou le son des céréales. La métabolisation de ces composés va permettre leur transformation en composés plus ou moins actifs. Les études sur effets des phyto-œstrogènes sur le risque de cancer du sein ne révèlent pas nettement un effet positif ou négatif ; il semblerait que la consommation de phyto-œstrogènes du soja avant l'adolescence ait un effet protecteur, tandis qu'une consommation plus tardive sans exposition précoce augmenterait le risque. Concernant les lignanes, il semblerait qu'une forte consommation diminuerait le risque de cancer du sein [24].

1.5.2.3.5. Vitamine D

Une quantité importante de données suggère un effet protecteur de la vitamine D dans le cancer du sein, plus particulièrement chez les femmes non ménopausées, cet effet s'explique par une limitation de la prolifération associée à une augmentation de la différenciation, l'apoptose et l'autophagie des cellules mammaires par la voie de signalisation vitamine D dépendante [25].

1.5.2.3.6. Iode

Suite à l'observation d'un nombre de cancers du sein plus faible au Japon, où la consommation d'iode est importante par rapport aux Etats-Unis, de nombreuses études ont cherché à montrer un risque plus important de développer un cancer du sein chez les personnes consommant peu d'iode, avec des résultats conflictuels. Certaines études révèlent toutefois une altération du tissu mammaire suite à un déficit en iode et la supplémentation en iode semble favoriser la régression tumorale chez l'animal. L'iode agirait en protégeant la glande mammaire des réactifs oxygénés [26].

1.5.2.3.7. Surpoids/obésité

L'obésité augmente le risque de cancer du sein après la ménopause et est facteur de mauvais pronostic. Cet effet serait dû à l'augmentation de la synthèse des hormones sexuelles et/ou un déséquilibre dans la balance leptine/adiponectine qui conduiraient à une promotion

de la croissance des cellules mammaires, une diminution de l'apoptose et une promotion de l'angiogenèse [27].

1.5.2.4. Défaut de rythme circadien et sécrétion de mélatonine

Plusieurs études relativement récentes ont montré que les travailleurs de nuit auraient un risque plus élevé de développer un cancer du sein. Cette augmentation du risque serait due à une diminution de la sécrétion de mélatonine, due à une exposition prolongée à la lumière. L'utilisation de lumière artificielle est notamment impliquée. Cette diminution de sécrétion de mélatonine serait responsable d'une augmentation de sécrétion des œstrogènes, ainsi que d'un dérèglement du rythme circadien qui pourrait aboutir à un dérèglement du cycle cellulaire dans certains tissus. Peu d'études ont démontré un tel effet et le mécanisme impliqué n'a pas encore été déterminé, cependant, un nombre croissant d'études s'intéressent au sujet et devraient amener des conclusions quant à cet éventuel facteur de risque [28].

1.5.3. Facteurs reproductifs

1.5.3.1. Age des premières règles et de la ménopause

Si une faible élévation du risque de développer un cancer du sein est associée à un âge précoce pour les premières règles, une régularisation des cycles menstruels rapide (moins de un an) semble avoir un impact beaucoup plus important sur ce même risque. Cette augmentation du risque serait due à une exposition plus précoce de la glande mammaire aux œstrogènes et à la progestérone, induisant la prolifération du tissu mammaire. L'exposition à ces hormones est également prolongée lorsque la ménopause est tardive, expliquant que l'on retrouve également une augmentation du risque de développer un cancer du sein lorsque la ménopause survient tardivement. De plus, il a été démontré que l'induction d'une ménopause très précoce, par oophorectomie a un effet protecteur très important sur le risque de développer un cancer du sein [29].

1.5.3.2. Grossesse

En 1970, MacMahon *et al.* montrait déjà qu'une grossesse précoce avait un effet protecteur sur le cancer du sein [30]. Cet effet a été retrouvé dans de multiples autres études, qui ont émis l'hypothèse qu'il serait dû à une différenciation des cellules mammaires au cours de la grossesse, une modification du profil hormonal des femmes ayant eu un enfant et/ou une modification de réponse aux hormones de la part des cellules mammaires [31].

1.5.3.3. Allaitement

Les études sur le lien entre allaitement et cancer du sein sont nombreuses, et une partie ne montre aucun effet de l'allaitement sur le risque de cancer du sein, tandis que l'autre montre un effet protecteur. L'allaitement protégerait du cancer du sein par deux mécanismes : une augmentation de la différenciation des cellules mammaires, et une diminution du nombre de cycles ovariens (et donc l'exposition du tissu mammaire aux hormones ovariennes) au cours de la vie, puisque l'allaitement retarde le retour des règles et l'ovulation après accouchement. Cependant, des études menées avec des protocoles particuliers doivent être menées pour confirmer ou infirmer ces deux hypothèses [32].

1.5.3.4. Contraception hormonale

L'utilisation d'hormones dans un but contraceptif date des années 60 ; il s'agit de contrer le cycle ovarien naturel par la prise d'œstrogènes combinés à un progestatif, ou la prise de progestatifs seuls. Ceux-ci vont empêcher la maturation des follicules et par conséquent empêcher l'ovulation par diminution de sécrétion de LH et FSH par l'hypophyse. Les effets de la contraception hormonale sur le cancer du sein ont été très étudiés, mais les résultats obtenus vont d'une absence à une augmentation légère de risque. Il semblerait que cette légère augmentation du risque de développer un cancer du sein soit principalement due aux traitements fortement dosés, utilisés jusqu'en 1975. Quoi qu'il en soit, cette augmentation du risque de développer un cancer du sein semble disparaître après 10 ans sans prise de contraceptif [33, 34].

1.5.3.5. Traitement hormonal de la ménopause

La ménopause se définit comme l'arrêt des règles suite à une diminution de la sécrétion d'hormones par les ovaires. Un nombre insuffisant de follicules ovariens, suite à l'utilisation de ceux-ci à chaque cycle ovarien et à l'atrésie folliculaire conduit à cette diminution de sécrétion d'hormones (œstrogènes et progestérone). En l'absence de ces hormones, l'hypophyse va sécréter la FSH et l'ensemble de ces modifications endocrinologiques vont conduire à l'apparition de plusieurs symptômes. Les principaux symptômes retrouvés sont : les bouffées de chaleur, sueurs nocturnes, sécheresses cutanées et vaginales, troubles du sommeil, accélération de la perte de densité osseuse, prise de poids, atrophie des organes génitaux et des glandes mammaires [35]. Un traitement hormonal de la ménopause (THM) peut alors être mis en place pour empêcher la survenue de ces symptômes. Ce traitement consiste à compenser la diminution d'hormones circulantes par la prise d'œstrogènes seuls ou combinés à un progestatif. Il est efficace sur les divers symptômes de la ménopause, y compris l'ostéoporose. Des études ont cependant révélé que ce traitement

entraîne une augmentation de risque de développer certains cancers, notamment le cancer du sein [36, 37]. Cependant, les résultats de ces études sont controversés et il semblerait que seule l'utilisation d'un traitement œstroprogestatif soit à risque [38, 39].

1.5.4. Facteurs génétiques

La plupart des cancers du sein sont sporadiques, c'est-à-dire dus à de multiples facteurs, et se développant plus ou moins aléatoirement, cependant, une faible proportion des cancers du sein (environ 5%) sont héréditaires. Après l'âge, l'appartenance à une famille à risque est le facteur augmentant le plus le risque de développer un cancer du sein [40]. Si une petite proportion des familles à risque de cancer du sein présente des mutations héréditaires dans les oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2*, le risque présent dans certaines familles pourrait être le résultat de la combinaison entre mutations héréditaires dans des gènes de faible pénétrance et la présence de polymorphismes favorisant le risque de cancer du sein.

1.5.4.1. Mutations héréditaires des gènes *BRCA1* et *BRCA2*

1.5.4.1.1. Le gène *BRCA1*

Le gène *BRCA1*, localisé en position 21.31 sur le bras long du chromosome 17 est constitué de 24 exons et code pour une protéine de 1863 acides aminés [41] impliquée dans la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire et le maintien de la stabilité génétique. Deux domaines fonctionnels ont été identifiés sur la protéine : un domaine N-terminal à doigts de zinc RING, possédant une activité ubiquitine ligase E3 et un domaine BRCT C-terminal permettant la liaison de *BRCA1* aux protéines phosphorylées, ainsi que son recrutement au niveau de sites de réparation de l'ADN. L'implication de *BRCA1* dans la réparation de l'ADN est principalement prouvée par le fait que la protéine est recrutée au niveau des cassures double-brin [42]. Ce recrutement met en jeu la présence d'histones H2AX à proximité des cassures double brins, et l'ubiquitinylation des histones H2A et H2B [43]. *BRCA1* agirait dans les deux mécanismes de réparation des cassures double brin : la recombinaison homologue et le NHEJ [44]. *BRCA1* possède un rôle dans l'arrêt du cycle en G1/S, suite à des dommages à l'ADN en favorisant la phosphorylation de p53 par ATM [45]. Durant la phase S, ainsi que lors de la transition G2/M, *BRCA1* régule l'activité de Chk1, responsable, avec Chk2 de la régulation de la progression de ces phases, permettant ainsi stopper le cycle cellulaire en cas de dommages à l'ADN [46, 47].

1.5.4.1.2. Le gène *BRCA2*

Localisé en position 13.1 sur le bras long du chromosome 13, le gène *BRCA2* est constitué de 27 exons et code pour une protéine de 3418 acides aminés [48]. Cette protéine

possède, côté C-terminal, un domaine de liaison à l'ADN simple brin [49] et plus au centre, des répétitions BRC, permettant la liaison à la protéine RAD51 [50]. BRCA2 est impliquée de manière cruciale dans la recombinaison homologue, notamment de par son affinité pour l'ADN simple-brin, permettant le recrutement de RAD51 au niveau de l'ADN simple-brin et des jonctions double-brin, mais pas au niveau de l'ADN double-brin [51-53]. La protéine BRCA2 est probablement impliquée dans d'autres fonctions, puisque la mutation de partenaires de BRCA2, affectant la recombinaison homologue n'est pas aussi fortement associée au risque de cancer du sein [54].

1.5.4.1.3. Mutations dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2*

De part leurs fonctions dans les systèmes de réparation de l'ADN, les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont considérés comme des gardiens de l'intégrité du génome : leur mutation n'entraîne pas directement la multiplication cellulaire ou d'autres mécanismes impliqués dans la cancérogenèse, mais favorise l'altération d'autres gènes. Les doubles mutants *BRCA1* ou *BRCA2* ne pouvant franchir l'étape de l'embryogenèse [55], les personnes portant une mutation pour l'un de ces gènes sont hétérozygotes, le gène reste donc fonctionnel de par la présence d'un allèle sauvage. Ces gènes sont dits de forte pénétrance pour le cancer du sein, puisque environ 80% des femmes portant une mutation dans l'un de ces gènes est susceptible de développer un cancer du sein avant l'âge de 70 ans [56]. Le risque de cancer du sein est fortement augmenté chez les personnes porteuses d'une mutation *BRCA1* ou *BRCA2* car il ne reste qu'une copie du gène à inactiver pour que le gène ne soit plus fonctionnel (selon la théorie de Knudson, il ne reste que le second coup à porter). Le second coup semble rarement porté par mutation somatique localisée et il semble qu'il soit plus fréquemment dû à une perte d'hétérozygotie, c'est-à-dire une délétion, ou un remaniement chromosomique touchant l'allèle sauvage du gène qui n'est, dès lors, plus fonctionnel [56].

1.5.4.2. Autres polymorphismes génétiques

A l'heure actuelle aucune mutation dont la pénétrance est aussi forte que celle dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* n'a été trouvée dans les cancers du sein. Des gènes de pénétrance « intermédiaire » ont toutefois été identifiés dont le gène *ATM* (impliqué dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN et à l'origine de l'ataxie-télangiectasie chez les individus porteurs de deux allèles mutés), le gène *CHEK2* (impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire lors de dommages à l'ADN) et les gènes *MRE11*, *RAD50* et *NBS1* (formant le complexe de détection des cassures double-brins) [54].

La présence de polymorphismes dans certains gènes peut également être responsable d'une modification du risque de développer un cancer du sein. Ces polymorphismes sont des

variations dans la séquence la plus fréquente d'un gène. Si, au sens strict, les mutations et les différents allèles des gènes, à l'origine de pathologies ou de phénotypes divers, sont des polymorphismes, seuls ceux non responsables de pathologies, de variations phénotypiques et retrouvés dans plus de 1% de la population sont définis comme des polymorphismes, dans sa définition la plus courante. Tout comme les mutations, les polymorphismes peuvent résulter de phénomènes de translocation/inversion ou de délétion/insertion de séquences. Il peut également s'agir de variations du nombre de répétitions dans les séquences répétées ou de changements d'une seule base. La plupart des études cherchant un lien entre le risque de développer un cancer et les polymorphismes s'intéressent à ceux issus de ces deux derniers phénomènes. Les études sur le nombre de répétitions dans les séquences répétées s'intéressent plus particulièrement aux séquences répétées en tandem, plus à même de varier en nombre. Ce type de polymorphisme est nommé variation du nombre de répétitions en tandem (VNTR) et touche les séquences satellites de toutes tailles dans le génome. Si les VNTR dans les séquences microsatellites peuvent parfois être à l'origine de modifications de risque dans les cancers, ce sont surtout celles localisées au niveau de séquences microsatellites, plus présentes au niveau des séquences codantes qui sont étudiées [57].

Les polymorphismes découlant du changement d'une seule base de l'ADN (SNP) sont pour leur part beaucoup plus étudiés : le changement d'un nucléotide dans la séquence d'un gène peut avoir des conséquences sur l'expression du gène ou sur sa fonction, notamment lorsqu'il conduit à un changement d'acide aminé au niveau de la protéine. Ainsi, les SNP présents sur des gènes jouant un rôle dans des mécanismes impliqués dans la cancérogenèse pourraient modifier le risque de développer un cancer du sein [58].

Présentation de la publication N°1 :

L'hélicase ADN encodée par le gène *ERCC2* est l'une des 7 enzymes du système de réparation par excision de nucléotide, responsable de *Xeroderma Pigmentosum* lorsque le gène est muté en lignée germinale [59]. Plusieurs polymorphismes ont été identifiés dans ce gène et notamment celui conduisant à la substitution de l'Acide asparatique en position 312 de la protéine en Asparagine (*ERCC2 Asp312Asn*) et celui conduisant à la substitution de la Lysine en position 751 de la protéine en Glutamine (*ERCC2 Lys751Gln*) [60]. Des résultats contradictoires ont été retrouvés concernant l'influence de ces polymorphismes sur le risque de développer un cancer de l'ovaire ou du sein [61-63]. Nous avons voulu établir l'influence de ces deux polymorphismes sur le risque de développer un cancer du sein ou de l'ovaire grâce à une étude cas-témoin. Pour cela, nous avons utilisé l'ADN extrait du sang de deux populations : la population COSA (Cancer des Ovaires et du Sein en Auvergne) et la population témoin. La population COSA est issue du recrutement de 1000 cas de cancers du sein et 54 cas de cancers des ovaires chez des femmes n'ayant pas plus d'un antécédent familial au premier degré de cancer du sein ou de l'ovaire. La population témoin est quant à elle issue du recrutement de 1000 femmes sans antécédent de cancer, ni plus d'un antécédent familial au premier degré de cancer des ovaires ou du sein. Nous avons également recherché les éventuelles interactions entre ces polymorphismes et différents facteurs de risque (facteurs reproductifs, indice de masse corporel, tabagisme...).

Publication N°1 :

« DNA repair gene ERCC2 polymorphisms and associations with breast and ovarian cancer risk »

Dominique Bernard-Gallon, **Rémy Bosviel**, Laetitia Delort, Luc Fontana, Alain Chamoux, Nadège Rabiau, Fabrice Kwiatkowski, Nasséra Chalabi, Samir Satih and Yves-Jean Bignon
Molecular Cancer 2008, 7:36

Research

Open Access

DNA repair gene *ERCC2* polymorphisms and associations with breast and ovarian cancer risk

Dominique Bernard-Gallon^{1,2}, Rémy Bosviel^{1,2}, Laetitia Delort^{1,2}, Luc Fontana^{3,4}, Alain Chamoux^{3,4}, Nadège Rabiau^{1,2}, Fabrice Kwiatkowski^{1,2}, Nasséra Chalabi^{1,2}, Samir Satih^{1,2} and Yves-Jean Bignon*^{1,2,3}

Address: ¹Département d'Oncogénétique du Centre Jean Perrin, EA 2416 CBRV, 28 Place Henri Dunant, B.P. 38, 63001 Clermont-Ferrand Cedex 01, France, ²CRNH, 58 rue Montalembert, 63009 Clermont-Ferrand Cedex 01, France, ³Univ Clermont 1, UFR Médecine, Institut de Médecine du Travail, 28 place Henri Dunant, 63001 Clermont-Ferrand, France and ⁴CHU Clermont-Ferrand, Service Santé Travail Environnement, 28 place Henri Dunant, 63001 Clermont-Ferrand cedex, France

Email: Dominique Bernard-Gallon - Dominique.Bernard-Gallon@cjp.fr; Rémy Bosviel - remy.bosviel@caramail.com; Laetitia Delort - delort.laetitia@neuf.fr; Luc Fontana - Luc.Fontana@u-clermont1.fr; Alain Chamoux - Alain.Chamoux@u-clermont1.fr; Nadège Rabiau - rabiau@soluscience.fr; Fabrice Kwiatkowski - Fabrice.KWIATKOWSKI@cjp.fr; Nasséra Chalabi - chalabi.nassera@wanadoo.fr; Samir Satih - samir.satih@caramail.com; Yves-Jean Bignon* - Yves-Jean.Bignon@cjp.fr

* Corresponding author

Published: 2 May 2008

Received: 14 November 2007

Molecular Cancer 2008, **7**:36 doi:10.1186/1476-4598-7-36

Accepted: 2 May 2008

This article is available from: <http://www.molecular-cancer.com/content/7/1/36>

© 2008 Bernard-Gallon et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Breast and ovarian cancers increased in the last decades. Except rare cases with a genetic predisposition and high penetrance, these pathologies are viewed as a polygenic disease. In this concept, association studies look for genetic variations such as polymorphisms in low penetrance genes, *i.e.* genes in interaction with environmental factors. DNA repair systems that protect the genome from deleterious endogenous and exogenous damages have been shown to have significantly reduced. In particular, enzymes of the nucleotide excision repair pathway are suspected to be implicated in cancer. In this study, 2 functional polymorphisms in a DNA repair gene *ERCC2* were analyzed. The population included 911 breast cancer cases, 51 ovarian cancer cases and 1000 controls. The genotyping of 2 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) was carried out on the population with the MGB (Minor Groove Binder) probe technique which consists of the use of the allelic discrimination with the Taqman[®] method. This study enabled us to show an increase in risk of breast cancer with no oral contraceptive users and with women exhibiting a waist-to-hip ratio (WHR) > 0.85 for Asn homozygous for *ERCC2* 312.

Background

High levels of DNA damage, caused by excessive exposure to carcinogens, might be responsible for increased breast cancer susceptibility in women known to have significantly reduced DNA repair proficiencies [1]. In particular, dysfunctions of the nucleotide excision repair (NER) pathway are known or suspected to be involved in cancer. The DNA helicase encoded by the excision repair cross-

complementing group 2 gene *ERCC2* (formerly *XPD*) is one of seven nucleotide excision repair enzymes that cause *Xeroderma Pigmentosum* when mutated in germ line [2]. Several polymorphisms have been identified in this gene and particularly the *Asp312Asn ERCC2* polymorphism which consists of the substitution of a G to A resulting in an amino acid change in the coding region, and the *Lys751Gln* which consists in a A to C substitution in the

coding region [3]. A change of amino acid is able to modify the effect of protein more or less, which can translate by an effect on the systems of repair and consequently on the carcinogenesis. Conflicting data on the roles of these polymorphisms on cancer risk including breast and ovarian cancers have been described [4-6].

The objective of this study was to establish the role of two functional polymorphisms of a DNA repair gene *ERCC2* in the risk of breast or ovarian cancer. We investigated the possible interactions between these polymorphisms and specific environmental factors (reproductive factors, body mass index, tobacco smoking...) which could influence the risk of cancer.

Results

Risk associated with individual SNPs

In this breast cancer population (Table 1), no significant differences were found between breast cancer cases and controls. A trend to the increase in breast cancer risk could be observed with heterozygous women for the SNP at position 312 of *ERCC2* protein (OR = 1.06; 95% CI = 0.93–1.21) after adjustment for age. For ovarian cancer (Table 2), there was no significant modification in the risk for the two studied SNP.

Interaction between genetic factors and anthropometric/lifestyle factors

Results concerning interactions between environmental factors and risk of breast cancer were reported in Table 3. Nonsmoker homozygous Asn at position 312 of *ERCC2* tended towards an increase in the risk of developing breast cancer (OR = 1.4; 95% CI = 0.98–2.02). Heterozygous individuals for *ERCC2 Asp312Asn* which received a hormonal replacement therapy (HRT) exhibited a risk to develop breast cancer (OR = 1.39; 95% CI = 0.97–1.99). A significant increase in the risk was observed for individuals who did not take oral contraceptives and who were homozygous Asn at position 312 of *ERCC2* (OR = 1.66; 95% CI = 1.08–2.53). An increase was observed for heterozygous individuals at position 751 of *ERCC2* who took oral contraceptives (OR = 1.54; 95% CI = 1.00–2.36).

When age at first oral contraceptive use was after 23 years, a significant increase in breast cancer risk was obtained for heterozygous *ERCC2 Lys751Gln* (OR = 2.22; 95% CI = 1.15–4.29). Lastly, women with a waist-to-hip ratio (WHR) > 0.85 and homozygous for position 312 of *ERCC2* exhibited a significant increase in the risk of breast cancer (OR = 1.96; 95% CI = 1.12–3.43).

Concerning ovarian cancer (Table 4), a significant increase in the risk was found for heterozygous *ERCC2 Lys751Gln* and who had menarche before 13 years old (OR = 6.03; 95% CI = 1.02–35.78). Heterozygous individuals *ERCC2 Asp312Asn* who did not take oral contraceptives had a significant increase in the risk of ovarian cancer (OR = 2.16; 95% CI = 1.08–4.33). Heterozygous *ERCC2 Asp312Asn* with BMI > 25 exhibited a significant increase in ovarian cancer risk (OR = 3.5; 95% CI = 1.00–12.26), while heterozygous *ERCC2 Lys751Gln* with body mass index (BMI) < 25 exhibited an upward tendency in ovarian cancer risk (OR = 5.64; 95% CI = 0.93–33.99). Heterozygous *ERCC2 Lys751Gln* with WHR = 0.85 also exhibited an upward tendency in the risk of ovarian cancer (OR = 5.68; 95% CI = 0.94–34.25).

Discussion

Nucleotide Excision Repair (NER) pathway is a key DNA repair system. A dysfunction of this system would result in higher cancer susceptibility because individuals would be more exposed to carcinogens. Exogenous (cigarette smoke, pollutants) and endogenous carcinogens are potential breast and ovarian cancer risk factors. Above all, exposition to estrogens seemed to be the major risk factor. Indeed, estrogens had proliferative effects on mammary cells and could be metabolized in potential carcinogens and induce DNA damage [7]. Many investigations were done concerning breast cancer risk and DNA repair polymorphisms. At the opposite, few studies were done with ovarian cancer which exhibited a lower incidence but a high mortality rate. So we studied two polymorphisms in *ERCC2* DNA repair gene because these polymorphisms might modify the exposure of women to estrogens.

Table 1: *ERCC2 Asp312Asn* and *ERCC2 Lys751Gln* polymorphisms and breast cancer risk

Genotype	Cases (%)	Controls (%)	OR (95%CI)	ORadj* (95%CI)	P value
<i>ERCC2 Asp312Asn</i>					
Asp/Asp	403 (45)	458 (46)	1.00 (reference)	1.00 (reference)	
Asp/Asn	383 (42)	418 (42)	1.04 (0.86–1.26)	1.06 (0.93–1.21)	
Asn/Asn	118 (13)	118 (12)	1.14 (0.85–1.52)	1.12 (0.86–1.46)	0.68
<i>ERCC2 Lys751Gln</i>					
Lys/Lys	121 (13)	119 (11)	1.00 (reference)	1.00	
Lys/Gln	419 (46)	446 (44)	0.92 (0.69–1.23)	0.92 (0.80–1.05)	
Gln/Gln	368 (40)	430 (43)	0.84 (0.63–1.12)	0.84 (0.64–1.09)	0.43

* Adjusted for age

Table 2: ERCC2 Asp312Asn and ERCC2 Lys751Gln polymorphisms and ovarian cancer risk

Genotype	Cases (%)	Controls (%)	OR (95%CI)	ORadj* (95%CI)	P value
ERCC2 Asp312Asn					
Asp/Asp	21 (41)	458 (46)	1.00 (reference)	1.00 (reference)	
Asp/Asn	28 (55)	418 (42)	1.46 (0.82–2.60)	0.95 (0.62–1.45)	
Asn/Asn	2 (4)	118 (12)	0.37 (0.09–1.51)	0.9 (0.39–2.12)	0.088
ERCC2 Lys751Gln					
Lys/Lys	1 (2)	119 (12)	1.00 (reference)	1.00 (reference)	
Lys/Gln	31 (61)	446 (45)	8.27 (1.54–44.43)	1.08 (0.70–1.66)	
Gln/Gln	19 (37)	430 (43)	5.26 (0.86–32.18)	1.16 (0.49–2.75)	0.025

* Adjusted for age

An early age at menarche increases the risk of ovarian and breast cancers, probably due to the prolonged exposure of breast epithelium to endogenous hormones. Similarly a late age at menopause is considered as a risk for cancer because it increases the number of ovulatory cycles [8]. Concerning parity, a dual effect of pregnancy is reported. On one hand, parity inhibits the early stages of mammary carcinogenesis (long-term risk reduction) due to the terminal differentiation of breast tissue. On the other hand, there is a short-term risk increase because of the proliferation of breast tissue in response to high gestational hormone levels which render the mammary gland more susceptible to carcinogens [9]. Overall early pregnancy and high parity are considered to have a protective effect [10-13].

Oral contraceptive use was by far the most influential factor on breast cancer development. However, the hormonal replacement therapy generates a prolonged exposure to estrogens during life, leading to an increased risk of breast and ovarian cancers. At the opposite, the established protective effect of OC use in ovarian cancer may also be due to the suppression of the LH peak and to a decrease of endogenous estradiol production. If estrogens are related to an increased risk of ovarian cancer, oral contraception might have some protective effect by lowering the overall level of estrogens [14,15].

Studies of the relationship between BMI and the risk of ovarian cancer have been inconclusive, finding either a positive correlation [16-23], no relationship [24-31], or negative association [32]. Our results suggested an interaction with menopausal status, with higher BMI being more associated with ovarian cancer risk in premenopausal women than in postmenopausal women, in agreement with Beehler et al (2006) [33]. Greer et al (2005) showed a slight increase in risk with weight during adulthood and later in life, which was most apparent among nulliparous women [34]. Fairfield et al (2002) did not find any association between recent BMI and risk of ovarian cancer, but reported that a high BMI during early adulthood was asso-

ciated with an increased risk of premenopausal cancer [26]. A case-control study reported an association between increased BMI at age 18 and during most adult life and ovarian cancer [23].

We found a strong relationship between waist-to-hip ratio and the risk of ovarian cancer regardless of menopausal status, underscoring the role of central adiposity in the induction of ovarian cancer [35].

In addition, we studied tobacco smoking, the role of which was very important in ovarian and breast cancers. For ovarian and breast cancers, the role of the tobacco is complex. Some of cigaret smoke compounds will have an anti-estrogen effect, while others such as HAP, AAH and N-nitrosamines will act as carcinogens by acting directly on DNA. The lipophilic HAP are stored in fat tissues, which include the mammary glands and tissues surrounding the ovaries [7].

Our results showed an increase in the risk of breast cancer in individual heterozygous for *ERCC2 Asp312Asn* with women receiving a menopause substitutive treatment and an increased risk for ovarian cancer with no oral contraceptive uses, and/or BMI > 25. For heterozygous *ERCC2 Lys751Gln*, an increased risk for breast cancer was found with age at first OC use after 23 years. Heterozygous *ERCC2 Lys751Gln* exhibited a higher risk for ovarian cancer when age at menarche was before 13 years, BMI < 25 and WHR < 0.85.

Besides, homozygous *Asn* for *ERCC2 312* tended to have an increase in breast cancer risk among nonsmokers, and a significant increase in breast cancer risk among OC users or with WHR > 0.85. It might be a combined effect between DNA damage caused by estrogens and reduced DNA repair proficiency with *ERCC2*. For the other first results, the explanation might be a reduced DNA repair proficiency with *ERCC2* but it was found when the interaction between genetic factors and anthropometric/lifestyle factors was considered.

Table 3: ERCC2 Asp312Asn, ERCC2 Lys751Gln polymorphisms and potential breast cancer risk factors

Nonsmokers					Smokers			
Genotype	Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)	P value	Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)	P value
ERCC2 Asp312Asn								
Asp/Asp	283 (45)	299 (47)	1.00 (reference)		102 (42)	159 (44)	1.00 (reference)	
Asp/Asn	258 (41)	270 (43)	1.01 (0.80–1.28)		111 (46)	146 (41)	1.19 (0.83–1.68)	
Asn/Asn	85 (14)	64 (10)	1.4 (0.98–2.02)	0.16	29 (12)	54 (15)	0.84 (0.50–1.40)	0.36
No HRT* users					HRT users			
Genotype	Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)	P value	Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)	P value
ERCC2 Asp312Asn								
Asp/Asp	175 (46)	137 (48)	1.00 (reference)		75 (40)	216 (47)	1.00 (reference)	
Asp/Asn	152 (40)	119 (41)	1.00 (0.72–1.39)		92 (49)	191 (42)	1.39 (0.97–1.99)	
Asn/Asn	54 (14)	31 (11)	1.36 (0.83–2.23)	0.44	19 (10)	50 (11)	1.09 (0.61–1.97)	0.20
No OC** users					OC users			
Genotype	Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)	P value	Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)	P value
ERCC2 Asp312Asn								
Asp/Asp	240 (46)	215 (50)	1.00 (reference)		143 (42)	243 (43)	1.00 (reference)	
Asp/Asn	208 (40)	176 (41)	1.06 (0.81–1.39)		161 (47)	242 (43)	1.13 (0.85–1.51)	
Asn/Asn	74 (14)	40 (9)	1.66 (1.08–2.53)	0.061	40 (12)	78 (14)	0.87 (0.56–1.34)	0.44
ERCC2 Lys751Gln								
Lys/Lys	79 (15)	39 (9)	1.00 (reference)		38 (11)	80 (14)	1.00 (reference)	
Lys/Gln	223 (43)	198 (46)	0.56 (0.36–0.85)		181 (52)	248 (44)	1.54 (1.00–2.36)	
Gln/Gln	222 (42)	195 (45)	0.56 (0.37–0.86)	0.018	127 (37)	235 (42)	1.14 (0.73–1.77)	0.044
Age at first OC use ≤ 23 years					Age at first OC > 23 years			
Genotype	Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)	P value	Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)	P value
ERCC2 Lys751Gln								
Lys/Lys	23 (14)	46 (15)	1.00 (reference)		15 (8)	34 (13)	1.00 (reference)	
Lys/Gln	80 (50)	145 (47)	1.10 (0.62–1.95)		101 (55)	103 (40)	2.22 (1.15–4.29)	
Gln/Gln	58 (36)	115 (38)	1.01 (0.56–1.82)	0.89	69 (37)	120 (47)	1.3 (0.66–2.56)	0.008
Waist-to-hip ratio = 0.85					Waist-to-hip ratio > 0.85			
Genotype	Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)	P value	Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)	P value
ERCC2 Asp312Asn								
Asp/Asp	252 (46)	356 (46)	1.00 (reference)		151 (42)	102 (48)	1.00 (reference)	
Asp/Asn	234 (43)	326 (42)	1.01 (0.80–1.28)		149 (42)	92 (43)	1.09 (0.76–1.57)	
Asn/Asn	60 (11)	98 (13)	0.86 (0.60–1.24)	0.68	58 (16)	20 (9)	1.96 (1.12–3.43)	0.06

* HRT = Hormone Replacement Therapy

** OC = Oral Contraceptive

Contradictory results were found in the literature. Tang et al (2002) did not show an association between these two SNP in *ERCC2* and breast cancer risk whereas a lower A allele frequency in *ERCC2 Asp312Asn* was found in a Chinese population by Zhang et al (2005) [5,36]. On the contrary, a case-control study in Portugal revealed that

women with the *Asn312Asn* or the *Gln751Gln* genotype presented a three-fold risk of ovarian cancer in comparison with heterozygous or wild-type homozygous women [3].

Table 4: ERCC2 Asp312Asn, ERCC2 Lys751Gln polymorphisms and potential ovarian cancer risk factors

Age at menarche = 13 years					Age at menarche > 13 years			
Genotype	Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)	P value	Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)	P value
<i>ERCC2 Lys751Gln</i>								
Lys/Lys	1 (3)	87 (13)	1.00 (reference)		0 (0)	32 (10)	-	
Lys/Gln	21 (57)	303 (46)	6.03 (1.02–35.78)		10 (71)	175 (52)	1.00 (reference)	
Gln/Gln	15 (41)	271 (41)	4.82 (0.6–30.62)	0.14	4 (29)	127 (38)	0.55 (0.17–1.77)	0.32
No OC* users					OC users			
Genotype	Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)		Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)	
<i>ERCC2 Asp312Asn</i>								
Asp/Asp	13 (35)	215 (50)	1.00 (reference)		5 (50)	243 (43)	1.00 (reference)	
Asp/Asn	23 (62)	176 (41)	2.16 (1.08–4.33)		5 (50)	242 (43)	1.00 (0.29–3.51)	
Asn/Asn	1 (3)	40 (9)	0.41 (0.06–3.05)	0.032	0 (0)	78 (14)	-	0.45
<i>ERCC2 Lys751Gln</i>								
Lys/Lys	0 (0)	39 (9)	-		0 (0)	80 (14)	-	
Lys/Gln	27 (73)	198 (46)	1.00 (reference)		4 (40)	248 (44)	1.00 (reference)	
Gln/Gln	10 (27)	195 (45)	0.38 (0.18–0.78)	0.0085	6 (60)	235 (42)	1.58 (0.45–5.62)	0.7**
BMI ≤ 25					BMI >25			
Genotype	Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)		Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)	
<i>ERCC2 Asp312Asn</i>								
Asp/Asp	18 (47)	311 (45)	1.00 (reference)		3 (23)	147 (48)	1.00 (reference)	
Asp/Asn	19 (50)	292 (43)	1.12 (0.58–2.18)		9 (69)	126 (41)	3.5 (1.00–12.26)	
Asn/Asn	1 (3)	84 (12)	0.21 (0.03–1.29)	0.19	1 (8)	34 (11)	1.44 (0.15–14.11)	0.13
<i>ERCC2 Lys751Gln</i>								
Lys/Lys	1 (3)	84 (12)	1.00 (reference)		0 (0)	35 (11)	-	
Lys/Gln	21 (55)	313 (45)	5.64 (0.93–33.99)		10 (77)	133 (43)	1.00 (reference)	
Gln/Gln	16 (42)	291 (42)	4.62 (0.72–29.53)	0.17	3 (23)	139 (45)	0.29 (0.08–0.99)	0.048
Waist-to-hip ratio = 0.85					Waist-to-hip ratio > 0.85			
Genotype	Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)		Cases (%)	Controls (%)	OR (CI 95%)	
<i>ERCC2 Lys751Gln</i>								
Lys/Lys	1 (4)	102 (13)	1.00 (reference)		0 (0)	17 (8)	-	
Lys/Gln	19 (70)	341 (44)	5.68 (0.94–34.25)		12 (50)	105 (49)	1.00 (reference)	
Gln/Gln	7 (26)	338 (43)	2.11 (0.27–16.57)	0.02	12 (50)	92 (43)	1.14 (0.49–2.66)	0.76

* OC = Oral Contraceptive

** after Yates correction

Conclusion

This study enabled us to show an increase in risk of breast cancer with no oral contraceptive users and with women exhibiting a waist-to-hip ratio superior to 0.85 for Asn homozygous for *ERCC2* 312.

Subjects and Methods

Study Subjects

911 breast cancer cases and 51 ovarian cancer cases (aged 26–89 years), from the Auvergne region in France were included. They are belonging to the COSA program (Breast and Ovarian Cancer in the Auvergne region) that consisted of the recruitment of identified women from different clinics and hospitals in the Auvergne region in France from November 1996 through November 1999.

Table 5: Two functional polymorphisms were studied in a DNA repair gene (ERCC2)

Gene Symbols	Names	Studied Polymorphisms (SNP)	Polymorphism NCBI References
ERCC2/XPD	Excision Repair Cross-Complementing group 2 Xeroderma Pigmentosum group D	Asp312Asn [G23591A (exon 10)] Lys751Gln [A35931C (exon 23)]	rs1799793 rs13181

Eligible subjects were women who had been diagnosed with breast or ovarian cancer with no *BRCA* mutation and no more than one first degree relative breast cancer.

1,000 healthy control women (aged 24–85 years) were recruited in a mammographic screening center from July 2005 to April 2006. Eligible controls were women with no previous history of cancer and resident in the Auvergne region. All study subjects received counseling and provided written consent for the study.

Data collection

Participants completed a questionnaire about their medical and reproductive histories in particular. Breast and ovarian cases filled in the questionnaire at the time of clinic appointment whereas controls were interviewed at the medical center at the time of enrollment. Data regarding reproductive history (including gravidity, parity, age at first-full term pregnancy, history of breastfeeding, age at menarche and menopause, menstrual cycle regularity, hormone replacement therapy), use of oral contraceptives (OC) ("Ever use" of OC was defined as at least 3 months of use), age at first OC use and duration of OC, anthropometric characteristics (height, weight, weight at age 20, waist and hip measurements), smoking status ("ever smoker" was defined as at least 1 year of smoking) were collected.

Genotyping

For breast and ovarian cancer patients and healthy women, genomic DNAs were extracted from whole blood using DNA extraction kit by Euromedex according to the manufacturer's protocol (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Two functional polymorphisms of a DNA repair gene *ERCC2* were selected (Table 5). The corresponding probes were ordered at the company Applied Biosystems. Allelic discrimination using fluorogenic probes (5' nuclease assay, Taqman[®]) was chosen for genotyping on the ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and consisted of the use of allele-specific fluorogenic probes [37]. Sixteen nanograms of DNA were amplified by AmpliTaq Gold DNA polymerase which was included in Taqman[®] Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The PCR reactions were as follows: one step of 10 min at 95 °C followed by 40 cycles of two-step PCR with denaturation at 92 °C for 15s and annealing and extension at 60 °C for 1

min. Ten percent of all samples were genotyped again for quality control.

Statistical Analysis

The software SEM (Centre Jean Perrin, Clermont Ferrand, France) was used for data analyses [38]. Standard descriptive statistics consisted in means plus standard deviation for quantitative data. Comparisons between cases and controls were performed using *Chi*²-squared test for qualitative parameters. Univariate and multivariate analyses were performed to determine cancer risk factors in our populations, and odds ratios (ORs) with corresponding 95% confidence interval (95% CI) were estimated.

Allelic frequencies and the distribution of genotype were compared within the two populations using *Chi*² analysis and ORs with 95% CI. Yates correction was performed when the number of cases was inferior to 5. The potential confounding effects of known breast cancer risk factors (age at menarche, number of children, age at first child birth, menopause, breastfeeding, oral contraceptive (OC) use, age at first OC use, body mass index [BMI], BMI at 20 years old, waist-to-hip ratio [WHR] and smoking) were evaluated by adjusting for unconditional logistic regression and calculation of ORs. As no changes in ORs were noted, results were reported without adjustment for these factors.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

DBG, LD was responsible for genotyping polymorphisms, statistical analyses and interpretation, and drafting of the manuscript; RB, NC, SS, NR contributed with the coordination of the study and helped in statistical analyses; FK provided expertise in data analyses; YJB, DBG, LF, AC contributed to the study design and manuscript preparation. All authors participated in the preparation of the manuscript and approved the final version.

Acknowledgements

This study was supported by "La Ligue Nationale Française de Lutte Contre le Cancer" (Puy-de-Dôme, Allier and Cantal). Laetitia Delort is a recipient of a grant from the "Association pour la Recherche sur le Cancer", Villejuif, France. Nasséra Chalabi is a post-graduate of the CLARA "Cancéropôle Lyon-Auvergne-Rhône-Alpes", France. N. Rabiau is a recipient of a grant "CIFRE" from Soluscience S.A., Clermont-Ferrand, France. The authors

wish to thank Centre République, Clermont Ferrand, France, for the enrollment of control population.

References

- Helzlsouer KJ, Harris EL, Parshad R, Perry HR, Price FM, Sanford KK: **DNA repair proficiency: potential susceptibility factor for breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* 1996, **88**:754-755.
- Coin F, Marinoni JC, Rodolfo C, Fribourg S, Pedrini AM, Egly JM: **Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH.** *Nat Genet* 1998, **20**:184-188.
- Costa S, Pinto D, Pereira D, Vasconcelos A, Afonso-Lopes C, Osorio T, Lopes C, Medeiros R: **Importance of xeroderma pigmentosum group D polymorphisms in susceptibility to ovarian cancer.** *Cancer Lett* 2007, **246**:324-330.
- Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, Bell DA: **XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency.** *Carcinogenesis* 2000, **21**:551-555.
- Tang D, Cho S, Rundle A, Chen S, Phillips D, Zhou J, Hsu Y, Schnabel F, Estabrook A, Perera FP: **Polymorphisms in the DNA repair enzyme XPD are associated with increased levels of PAH-DNA adducts in a case-control study of breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2002, **75**:159-166.
- Justenhoven C, Hamann U, Pesch B, Harth V, Rabstein S, Baisch C, Vollmert C, Illig T, Ko YD, Bruning T, Brauch H: **ERCC2 genotypes and a corresponding haplotype are linked with breast cancer risk in a German population.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004, **13**:2059-2064.
- Mitrunen K, Hirvonen A: **Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism.** *Mutat Res* 2003, **544**:9-41.
- Dumitrescu RG, Cotarla I: **Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005?** *J Cell Mol Med* 2005, **9**:208-221.
- Bernard-Gallon DJ, De Latour MP, Sylvain V, Vissac C, Aunoble B, Chassagne J, Bignon YJ: **Brca1 and Brca2 protein expression patterns in different tissues of murine origin.** *Int J Oncol* 2001, **18**:271-280.
- Dumitrescu RG, Cotarla I: **Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005?** *J Cell Mol Med* 2005, **9**:208-221.
- Innes KE, Byers TE: **First pregnancy characteristics and subsequent breast cancer risk among young women.** *Int J Cancer* 2004, **112**:306-311.
- Pathak DR: **Dual effect of first full term pregnancy on breast cancer risk: empirical evidence and postulated underlying biology.** *Cancer Causes Control* 2002, **13**:295-298.
- Russo J, Russo IH: **Cellular basis of breast cancer susceptibility.** *Oncol Res* 1999, **11**:169-178.
- Killick S, Eyoung E, Elstein M: **Ovarian follicular development in oral contraceptive cycles.** *Fertil Steril* 1987, **48**:409-413.
- Pelucchi C, Galeone C, Talamini R, Bosetti C, Montella M, Negri E, Franceschi S, La Vecchia C: **Lifetime ovulatory cycles and ovarian cancer risk in 2 Italian case-control studies.** *Am J Obstet Gynecol* 2007, **196**(1):83 e1-7.
- Rodriguez C, Calle EE, Fakhrabadi-Shokoohi D, Jacobs EJ, Thun MJ: **Body mass index, height, and the risk of ovarian cancer mortality in a prospective cohort of postmenopausal women.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002, **11**:822-828.
- Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA: **Height, weight, weight change, and ovarian cancer risk in the Netherlands cohort study on diet and cancer.** *Am J Epidemiol* 2003, **157**:424-433.
- Hirose K, Tajima K, Hamajima N, Kuroishi T, Kuzuya K, Miura S, Tokudome S: **Comparative case-referent study of risk factors among hormone-related female cancers in Japan.** *Jpn J Cancer Res* 1999, **90**:255-261.
- Riman T, Dickman PW, Nilsson S, Correia N, Nordlinder H, Magnusson CM, Persson IR: **Risk factors for epithelial borderline ovarian tumors: results of a Swedish case-control study.** *Gynecol Oncol* 2001, **83**:575-585.
- Purdie DM, Bain CJ, Webb PM, Whiteman DC, Pirozzo S, Green AC: **Body size and ovarian cancer: case-control study and systematic review (Australia).** *Cancer Causes Control* 2001, **12**:855-863.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ: **Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults.** *N Engl J Med* 2003, **348**:1625-1638.
- Farrow DC, Weiss NS, Lyon JL, Daling JR: **Association of obesity and ovarian cancer in a case-control study.** *Am J Epidemiol* 1989, **129**:1300-1304.
- Lubin F, Chetrit A, Freedman LS, Alfandary E, Fishler Y, Nitzan H, Zultan A, Modan B: **Body mass index at age 18 years and during adult life and ovarian cancer risk.** *Am J Epidemiol* 2003, **157**:113-120.
- Engeland A, Tretli S, Bjorge T: **Height, body mass index, and ovarian cancer: a follow-up of 1.1 million Norwegian women.** *J Natl Cancer Inst* 2003, **95**:1244-1248.
- Dal Maso L, Franceschi S, Negri E, Conti E, Montella M, Vaccarella S, Canzonieri V, Parazzini F, La Vecchia C: **Body size indices at different ages and epithelial ovarian cancer risk.** *Eur J Cancer* 2002, **38**:1769-1774.
- Fairfield KM, Willett WC, Rosner BA, Manson JE, Speizer FE, Hankinson SE: **Obesity, weight gain, and ovarian cancer.** *Obstet Gynecol* 2002, **100**:288-296.
- Kuper H, Cramer DW, Titus-Ernstoff L: **Risk of ovarian cancer in the United States in relation to anthropometric measures: does the association depend on menopausal status?** *Cancer Causes Control* 2002, **13**:455-463.
- Wolk A, Gridley G, Svensson M, Nyren O, McLaughlin JK, Fraumeni JF, Adam HO: **A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden).** *Cancer Causes Control* 2001, **12**:13-21.
- Moller H, Mellegaard A, Lindvig K, Olsen JH: **Obesity and cancer risk: a Danish record-linkage study.** *Eur J Cancer* 1994, **30A**:344-350.
- Slattery ML, Schuman KL, West DW, French TK, Robison LM: **Nutrient intake and ovarian cancer.** *Am J Epidemiol* 1989, **130**:497-502.
- Anderson JP, Ross JA, Folsom AR: **Anthropometric variables, physical activity, and incidence of ovarian cancer: The Iowa Women's Health Study.** *Cancer* 2004, **100**:1515-1521.
- Lukanova A, Toniolo P, Lundin E, Micheli A, Akhmedkhanov A, Muti P, Zeleniuch-Jacquotte A, Biessy C, Lenner P, Krogh V, Berrino F, Hallmans G, Riboli E, Kaaks R: **Body mass index in relation to ovarian cancer: a multi-centre nested case-control study.** *Int J Cancer* 2002, **99**:603-608.
- Beehler GP, Sekhon M, Baker JA, Teter BE, McCann SE, Rodabaugh KJ, Moysich KB: **Risk of ovarian cancer associated with BMI varies by menopausal status.** *J Nutr* 2006, **136**:2881-2886.
- Greer JB, Modugno F, Ness RB, Allen GO: **Anthropometry and the risk of epithelial ovarian cancer.** *Cancer* 2006, **106**:2247-2257.
- Delort L, Kwiatkowski F, Chalabi N, Satih S, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ: **Risk factors for early age at breast cancer onset--the "COSA program" population-based study.** *Anticancer Res* 2007, **27**:1087-1094.
- Zhang L, Zhang Z, Yan W: **Single nucleotide polymorphisms for DNA repair genes in breast cancer patients.** *Clin Chim Acta* 2005, **359**:150-155.
- Livak KJ: **Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay.** *Genet Anal* 1999, **14**:143-149.
- Kwiatkowski F, Girard M, Hacène K, Berlie J: **Sem: a suitable statistical software adapted for research in oncology.** *Bull Cancer* 2000, **87**:715-721.

Conclusions de la publication N°1 :

Dans cette étude, nous avons recherché l'influence de deux SNP fonctionnels, *ERCC2 Asp312Asn* et *ERCC2 Lys751Gln* sur le risque de développer un cancer du sein ou de l'ovaire. Ces SNP sont retrouvés au niveau du gène *ERCC2*, impliqué dans la réparation de l'ADN par le système d'excision de nucléotide. Pour réaliser cette étude, l'ADN extrait de 911 patientes atteintes de cancer du sein, 51 patientes atteintes de cancers de l'ovaire et 1000 témoins a été utilisé. Nous n'avons pas trouvé de modification du risque de développer un cancer de l'ovaire ou du sein associée aux SNP *Asp312Asn* et *Lys751Gln* d'*ERCC2*. En revanche, nous avons trouvé une augmentation du risque de développer un cancer du sein chez les femmes homozygotes pour le polymorphisme conduisant à la présence d'une Asparagine en position 312 d'*ERCC2* lorsque celles-ci n'utilisent pas de contraceptifs oraux ou présentent un rapport tour de taille/tour de hanches supérieur à 0,85.

2. LE CANCER DES OVAIRES

2.1. Rappels sur les ovaires

Les ovaires sont les organes hébergeant les cellules germinales de la femme. Leur rôle est de produire les ovocytes, mais également de synthétiser les hormones sexuelles de la femme.

2.1.1. Développement

L'ovaire est constitué de deux populations cellulaires d'origine embryologique différente. Les cellules germinales primordiales, destinées à former les gamètes et les cellules somatiques, (cellules folliculaires et thécales) entourent les cellules germinales. Les cellules germinales primordiales sont localisées dans l'épiblaste de l'embryon en cours de gastrulation. Au cours de l'embryogenèse, ces cellules vont tout d'abord se retrouver à l'extérieur de l'embryon, puis migrer jusqu'à la crête génitale. Au cours de cette migration, deux populations de cellules se seront distinguées, l'une migrant vers la crête génitale gauche et l'autre vers la crête génitale droite. Une forte prolifération (par mitose) a également lieu lors de cette migration. La crête génitale correspond à un épaississement de l'épithélium cœlomique. Les cellules épithéliales cœlomiques forment ensuite les cordons sexuels en entourant les cellules germinales primitives et s'insinuant en profondeur dans le mésenchyme cœlomique. A ce stade, soit environ 6 semaines de l'embryogenèse, les gonades mâles et femelles ne peuvent pas être différenciées morphologiquement. La formation des ovaires s'effectue avec une régression des cordons sexuels distants de l'épithélium cœlomique, qui deviendront la partie médullaire de l'ovaire. L'épithélium cœlomique entoure les cordons sexuels restants qui formeront le cortex. L'irrigation par des vaisseaux en provenance de la médullaire va provoquer le désagrègement des cordons sexuels de la région corticale. Les ovogonies vont alors se multiplier par mitoses successives, puis entrer en prophase de la méiose. Une couche de cellules issues des cordons sexuels va alors entourer chaque ovogonie, formant les follicules primordiaux. Au cours de leur formation, les ovaires vont se déplacer, depuis l'abdomen, au début du 3^{ème} mois de l'embryogenèse, jusqu'à la cavité pelvienne, à la fin du 4^{ème} mois [64] (b).

2.1.2. Anatomie

Les ovaires sont localisés au niveau de la cavité pelvienne, en position postérieure. Ils sont de forme ovoïde et possèdent deux extrémités : l'une, dite utérine, pointe en direction de l'utérus, tandis que l'autre, dite tubaire, est accolée à l'extrémité de la trompe de Fallope. Chaque ovaire est maintenu en place grâce à plusieurs ligaments : le ligament lombo-ovarien lie la partie supérieure de l'ovaire au rétropéritoine, le ligament utéro-ovarien lie l'extrémité

utérine de l'ovaire à l'utérus et le ligament infundibulo-ovarien lie l'ovaire au pavillon de la trompe de Fallope. De plus, la partie inférieure de l'ovaire est fixée au mésovarium, une épaisseur du péritoine, où se situe le hile de l'ovaire. La vascularisation de l'ovaire se fait par l'artère iliaque au niveau de la jonction utérus-trompe, par l'artère ovarienne qui longe le ligament lombo-ovarien et par les veines ovarienne et utérine. Un réseau lymphatique est également présent, parallèle au réseau veineux [65] (b) (Figure 2).

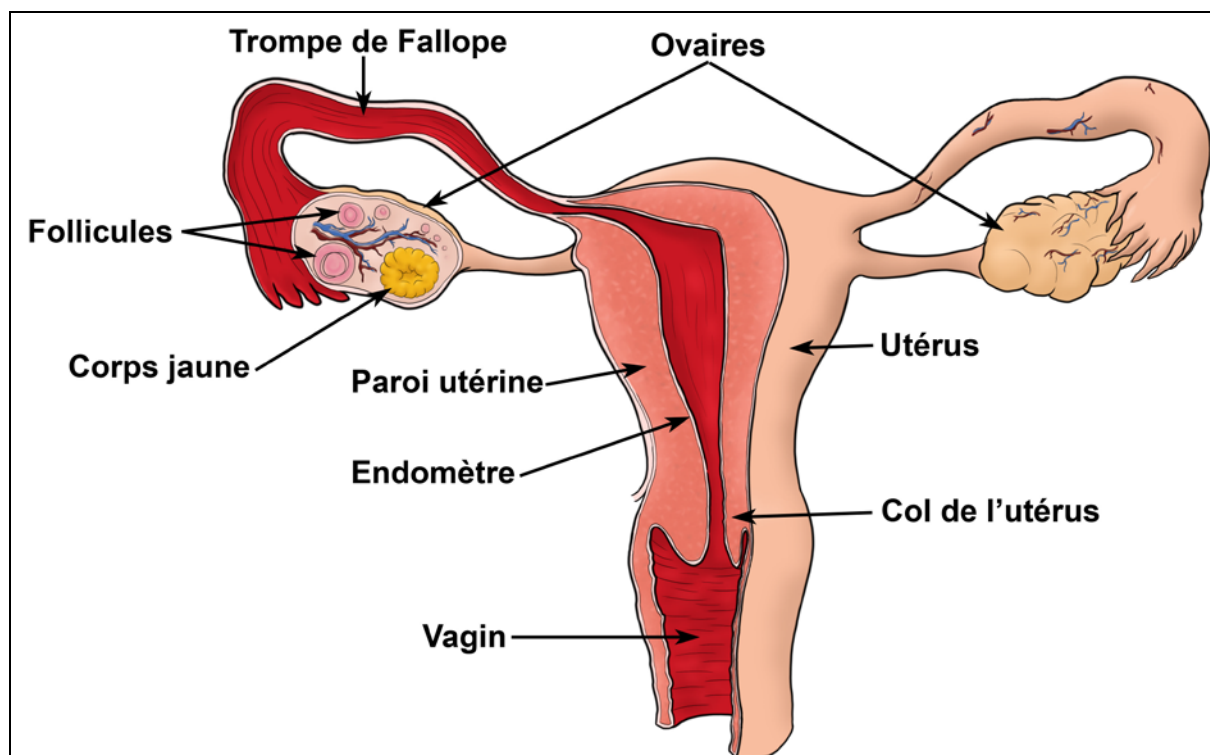


Figure 2 : Anatomie des organes reproducteurs de la femme.

2.1.3. Histologie

L'ovaire est entouré d'une couche cellulaire fibreuse, l'albuginée. Sous l'albuginée, le cortex est formé de stroma et de follicules ovariens à divers stades entourés de cellules interstitielles. Les ovaires, enveloppés d'une couche de cellules épithéliales (la granulosa) et d'une couche moins organisée, mésenchymateuse (la thèque) forment les follicules primordiaux. Au cours de lu cycle ovarien, les follicules primordiaux, en grossissant, se rapprochent de la paroi extérieure de l'ovaire, laissant une cavité lors de l'ovulation qui va se cicatriser lors de la formation du corps jaune. La zone médullaire de l'ovaire est formée de tissus conjonctifs et de fibres musculaires lisses, vascularisées par le hile [65].

2.1.4. Physiologie

Dans les ovaires, une partie des follicules primordiaux va spontanément se transformer en follicules primaires par multiplication des cellules de la granulosa, et augmentation de

volume de l'ovocyte. Une cavité, remplie de protéines, d'hormones et autres molécules va ensuite se creuser dans la masse des cellules folliculaires, donnant ainsi de petits follicules à antrum. Une stimulation par la FSH est alors nécessaire pour la poursuite de leur développement, sans quoi ils involuent (phénomène d'atrésie). Cette stimulation ne se produit jamais avant la puberté, puis a lieu cycliquement lors de la phase folliculaire. A ce stade, l'hypophyse sécrète une quantité de plus en plus importante de FSH à laquelle répondent les follicules matures, avec une croissance et une prolifération cellulaire, devenant ainsi des follicules à grand antrum. Les follicules sont responsables de la sécrétion d'œstrogènes, inhibant la sécrétion de LH et FSH par l'hypophyse. La diminution de FSH va provoquer l'arrêt de croissance, puis l'involvement des follicules. L'un d'entre eux toutefois continuera sa croissance indépendamment du taux de FSH et sécrètera de plus en plus d'œstrogènes. Lorsque le taux d'œstrogènes dépasse un certain seuil, le contrôle négatif de LH par les œstrogènes devient contrôle positif, aboutissant alors à la sécrétion d'un pic de LH (accompagné d'un pic plus faible de FSH) par l'hypophyse. Ce pic de LH va permettre au follicule sélectionné d'évoluer en follicule de De Graaf. Lors de ce pic de LH, le premier globule polaire est émis par l'ovocyte, dans la zone pellucide. Dix à 12 heures après le pic de LH, l'ovulation, par éclatement de l'antra folliculaire a lieu et l'ovule est capté par la trompe de Fallope. Lors de la phase lutéale du cycle menstruel, les cellules restantes du follicule évoluent en corps jaune qui sécrète des œstrogènes, mais surtout de la progestérone qui inhibe la sécrétion de FSH par l'hypophyse, empêchant ainsi la maturation d'autres follicules. En l'absence de fécondation, le corps jaune dégénère, laissant place à une cicatrice fibreuse, le corps blanc et arrêtant la production de progestérone. Le cycle menstruel recommence alors avec les règles. En cas de fécondation, le trophoblaste va sécréter la lutéotrophine qui va maintenir le corps jaune et donc la sécrétion de progestérone. Le corps jaune se maintiendra pendant le premier trimestre de la grossesse avant d'involuer (la sécrétion de progestérone étant alors réalisée par le placenta). Le cycle menstruel ne sera rétabli qu'après arrêt de la sécrétion de prolactine, maintenue par un allaitement important. En effet, la prolactine empêche la sécrétion de LH et FSH par l'hypophyse.

Au cours de la vie d'une femme, le taux de follicules va s'accroître, jusqu'à près de 3,5 millions par ovaires vers le 5^{ème} mois de gestation, il y en aura moins de 300 000 à la naissance et 200 000 à la puberté. La raréfaction, puis la disparition de l'ensemble des follicules conduit à la ménopause, vers l'âge de 50 ans. En tout, environ 400 follicules seulement auront effectué leur maturation [64, 65].

2.2. Chiffres sur le cancer des ovaires

Le cancer des ovaires est le huitième cancer chez la femme au niveau mondial, on estime à 225 500 le nombre de nouveaux cas en 2008 et 140 200 le nombre de décès, ce qui en fait la septième cause de décès par cancer dans le monde en 2008 [1]. En France on estime à 4 530 le nombre de nouveaux cas en 2010 et 3130 le nombre de décès (a).

2.3. Les types histologiques de cancers ovariens

Les ovaires sont constitués de plusieurs types cellulaires qui, chacun peut aboutir au cancer. Ces cancers se distingueront les uns des autres par différents paramètres histologiques et sont classées en fonction de la structure normale qu'elles reproduisent. Ainsi, les tumeurs épithéliales représentent environ 60% des tumeurs de l'ovaire et sont classées selon trois critères : leur potentiel évolutif, la présence d'une composante stromale d'accompagnement ou le type de différenciation épithéliale. Hormis ces tumeurs épithéliales, les tumeurs des cordons sexuels, du stroma, de la granulosa ou autres sont bien moins fréquentes [66].

2.4. Facteurs de risque et facteurs protecteurs

Tout comme pour le cancer du sein, si les causes entraînant la survenue d'un cancer des ovaires ne sont pas clairement définies, certains facteurs de risque sont définis dans la littérature.

Comme pour l'ensemble des cancers, l'âge reste un facteur de risque important.

2.4.1. Facteurs environnementaux

2.4.1.1. Talc et amiante

Actuellement, un certain nombre de publications débattent d'une éventuelle augmentation du risque de développer un cancer des ovaires suite à l'exposition à l'amiante et à l'application de talc au niveau du périnée. Il semblerait que des études menées selon un protocole strict soient nécessaires pour confirmer ou infirmer l'hypothèse selon laquelle le talc et l'amiante seraient facteurs de risque pour le cancer des ovaires [67-69].

2.4.2. Facteurs comportementaux

2.4.2.1. Tabagisme

Bien que les résultats ne soient pas clairs pour l'ensemble des cancers des ovaires, il semblerait que le tabagisme augmente sensiblement le risque de développer un cancer des ovaires mucineux avec un retour à la normale 20 à 30 jours après arrêt de l'exposition au tabac [70].

2.4.2.2. Facteurs alimentaires

2.4.2.2.1. Thé vert

Bien que peu de données ne soient disponibles à l'heure actuelle, il semble que la consommation de thé vert ait un effet protecteur sur le risque de développer un cancer de l'ovaire [20, 71].

2.4.2.2.2. Vitamine D

La présence de récepteurs nucléaires à la vitamine D et l'inhibition de prolifération associée à l'apoptose induites par la vitamine D en lignées continues de cellules issues de cancers de l'ovaire, permettent de suspecter un effet de la vitamine D sur le risque de développer un cancer des ovaires. Toutefois, les données épidémiologiques actuelles ne permettent pas de conclure sur un tel effet [72, 73].

2.4.2.2.3. Surpoids et obésité

La synthèse d'hormones sexuelles et l'augmentation d'œstrogènes actives dus au tissu adipeux conduisent à penser que surpoids et obésité augmenteraient le risque de développer un cancer de l'ovaire, plus particulièrement après la ménopause. Toutefois les données épidémiologiques ne confirment pas cette hypothèse et des résultats contradictoires ont été retrouvés [74].

2.4.2.3. Endométriose

L'endométriose consiste en la propagation des cellules de l'endomètre en dehors de la cavité utérine. Dans la plupart des cas, cette invasion touche l'ovaire, toutefois cette pathologie est considérée comme bénigne. Cependant, il semblerait qu'une association entre l'endométriose et certaines formes du cancer de l'ovaire soit retrouvée. Ainsi, l'endométriose pourrait être responsable d'une augmentation du risque de développer un cancer de l'ovaire, ou alors ces deux pathologies partagent des facteurs de risque communs [75].

2.4.3. Facteurs reproductifs

2.4.3.1. Age des premières règles et de la ménopause

Selon l'hypothèse de « l'ovulation incessante », un âge des premières règles précoce et une ménopause tardive devraient augmenter le risque de développer un cancer de l'ovaire en augmentant le nombre de cycles ovariens. Très peu de données existent concernant un âge des premières règles précoce. En revanche, de nombreuses études se sont intéressées à l'âge de la ménopause. Les résultats de ces études ne sont pas clairs, d'autant plus qu'il a été suggéré que

la ménopause, en entraînant des remaniements importants de l'ovaire, pourrait augmenter les dommages à l'ADN dans les cellules de l'ovaire et donc conduire à un cancer des ovaires [76].

2.4.3.2. Grossesse

Il est admis, aujourd'hui, qu'une grossesse précoce protège du cancer de l'ovaire. De même, chaque grossesse semble diminuer le risque de développer un cancer de l'ovaire. Cet effet pourrait s'expliquer par l'absence de cycles ovariens pendant la grossesse, mais aussi par l'augmentation de progestérone durant la grossesse, ou encore l'impossibilité d'évacuer pleinement les fluides ovariens lors de la grossesse, qui permettrait aux facteurs de l'apoptose d'agir et éliminerait les cellules endommagées [77].

2.4.3.3. Allaitement

Malgré un effet limité, il semblerait qu'un allaitement prolongé après la grossesse protégerait du cancer de l'ovaire. Cet effet pourrait être dû à l'arrêt du cycle menstruel durant l'allaitement, ou encore à l'inhibition de sécrétion de LH et FSH par l'hypophyse au cours de l'allaitement [77].

2.4.3.4. Contraception orale

La prise de contraceptifs oraux semble diminuer le risque de développer un cancer de l'ovaire. Cet effet protecteur serait effectif dès 1 an de prise de contraceptif oraux, avec une efficacité liée à la durée de la contraception. Après arrêt de prise de contraceptifs oraux, le risque de développer un cancer de l'ovaire semble réaugmenter sans jamais, toutefois, revenir au même niveau que les femmes n'ayant jamais utilisé de contraceptifs oraux. Ces résultats sont valables pour tous les contraceptifs oraux mais pas pour tous les cancers de l'ovaire, puisque aucun effet protecteur n'est retrouvé pour les tumeurs mucineuses. Cet effet protecteur s'expliquerait par l'absence d'ovulation induite par la prise de contraceptif qui permettrait, selon la théorie de « l'ovulation incessante », de diminuer les erreurs de réparations des cellules suite à l'ovulation [78].

2.4.3.5. Traitement de l'infertilité

Le traitement de l'infertilité jouant à la fois sur la théorie de « l'ovulation incessante » et celle de « la gonadotrophine accrue », il pourrait être associé avec le développement de tumeurs ovariennes, comme suggéré par certaines études. Toutefois des facteurs confondants, comme la nulliparité pourraient être responsables de tels résultats. Le risque de développer un

cancer des ovaires associé au traitement de l'infertilité n'est donc aujourd'hui pas démontré [79].

2.4.3.6. Thérapie hormonale

Il semble aujourd'hui clair que le traitement substitutif de la ménopause augmente le risque de développer un cancer de l'ovaire [80, 81]. L'utilisation d'œstrogènes seuls ou combinés avec un progestatif semblent augmenter le risque, toutefois l'utilisation d'œstrogènes seuls semble plus à risque [82]. Le mécanisme impliqué n'est aujourd'hui pas encore connu.

2.4.4. Facteurs génétiques

2.4.4.1. Mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2*

Tout comme pour le cancer du sein, les individus porteurs d'un allèle muté de *BRCA1* ou *BRCA2* sont plus à risque de développer un cancer des ovaires. La pénétrance de ces mutations est plus faible pour le cancer des ovaires que pour le cancer du sein, puisque 40 et 18% des femmes portant un allèle muté de *BRCA1* et *BRCA2* respectivement développent un cancer de l'ovaire avant 70 ans. Les mécanismes impliqués sont les mêmes que pour le cancer du sein [83].

2.4.4.2. Autres polymorphismes

De nombreux polymorphismes ont été identifiés comme modulateurs du risque de développer un cancer des ovaires ; ceux-ci touchent des gènes impliqués dans diverses fonctions, comme la voie de synthèse ou de métabolisme des stéroïdes (*PGR*, *CYP19A1*, *SRD5A2*), le contrôle du cycle cellulaire (*CDKN2A*) ou encore la réparation de l'ADN (*XRCC2*, *XRCC3*). Comme pour le cancer du sein, l'association de certains polymorphismes pourrait conduire à une augmentation importante du risque de développer un cancer de l'ovaire [84].

3. LES MARQUES EPIGENETIQUES

L'épigénétique consiste en « l'étude de changements du fonctionnement de gènes, héritable par la méiose et/ou la mitose, non expliquée par des modifications dans la séquence de l'ADN » [85]. On peut estimer les débuts de l'émergence des concepts épigénétiques tels qu'ils sont connus actuellement au début du XXI^{ème} siècle. En 1930, Muller a observé que la présence d'un phénotype « tacheté » au niveau des yeux de drosophiles était associé à des réarrangements de chromatine différents pour chaque cellule de l'œil [86]. Des études réalisées durant les 10 à 20 années suivantes confirment que ces phénotypes sont observés

lorsque les réarrangements touchent le gène « white », codant pour la couleur des yeux de drosophiles. Au cours de cette période, il est devenu clair que la localisation d'un gène pouvait jouer sur leur fonctionnement. L'étude des processus de développement a également conduit à connaître l'existence de mécanismes permettant la mise en place et le maintien de phénotypes variables entre les cellules. Enfin, le lien entre information génétique et la molécule d'ADN, puis la découverte que les cellules somatiques d'un individu possèdent toutes le même génome ont conduit à l'hypothèse que des facteurs ne modifiant pas la structure de l'ADN étaient capables de modifier le phénotype des cellules. La découverte du rôle de la méthylation de l'ADN et des marques au niveau des histones ont ensuite suivi, ainsi que celle de liens entre ces marques et de mécanismes impliqués dans leur mise en place, leur maintien et leur suppression. [87].

3.1. A propos de la chromatine

Chez l'homme, l'ADN est organisé en 23 paires de chromosomes, portant approximativement 25 000 gènes. Si ces molécules étaient déroulées, elles s'étendraient sur environ 2 mètres et c'est donc la condensation de l'ADN (environ 10 000 fois) qui permet de les contenir dans le noyau. Cette condensation est faite par enroulement de l'ADN autour de protéines, les histones (Figure 3).

Ce complexe protéine-ADN constitue la chromatine. La structure de la chromatine n'est pas uniforme, et permet l'existence de zones très compactées, l'hétérochromatine et de zones peu compactes, l'euchromatine, en passant par de nombreux niveaux de compaction intermédiaires. Des variations dans la chromatine peuvent aboutir à ces différents niveaux de compaction : l'introduction de protéines histones inhabituelles (les variants d'histones), des structures chromatiniennes altérées (les remaniements de chromatine) et l'addition de marques chimiques sur les histones. De plus, l'addition d'un groupement méthyle sur une cytosine de l'ADN (la méthylation de l'ADN) peut permettre le recrutement de protéines pouvant remanier la chromatine ou modifier les marques des histones. La décompaction (l'ouverture) de la chromatine va permettre d'accéder à l'ADN et éventuellement la mise en place des complexes permettant l'expression des gènes, tandis que la compaction (la fermeture) de la chromatine empêchera cet accès à l'ADN. Les différents états de compaction de la chromatine vont permettre un contrôle de l'expression des gènes, voire des allèles. Les mécanismes épigénétiques responsables de la fermeture ou l'ouverture de la chromatine seront ainsi responsables de différences phénotypiques entre les cellules d'un même individu, mais aussi au cours de la vie, pour une même cellule. L'influence de l'environnement sur ces mécanismes épigénétiques pourra ainsi avoir des conséquences sur le phénotype des cellules, voire d'un individu [87, 88].

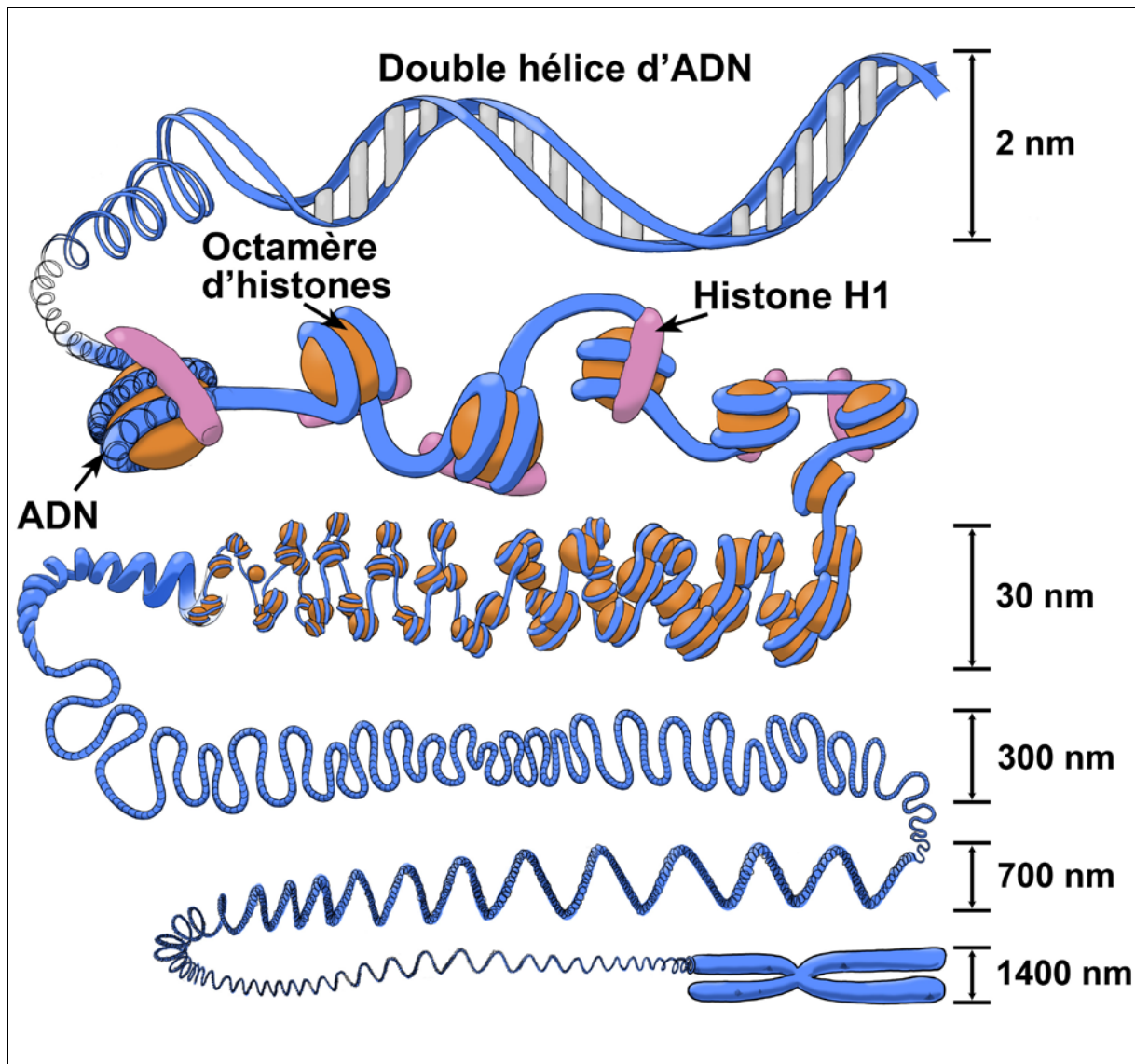


Figure 3 : Les différents stades de compaction de la chromatine.

3.2. Marques au niveau des histones

Le nucléosome constitue l'unité fondamentale de la chromatine [89]. Il s'agit d'un octamère de protéines formé des quatre histones nucléosomiques (H2A, H2B, H3 et H4) en deux exemplaires autour desquelles sont enroulés 147 paires de bases d'ADN. Les histones du nucléosome sont de petites protéines hautement basiques. Elles sont formées d'un domaine globulaire et de « queues d'histones » émergeant de ce domaine. Ce sont les queues d'histones, pouvant subir de nombreuses modifications post-traductionnelles (acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, ADP-ribosylation, biotinylation, isomérisation avec la proline et probablement d'autres [90]), qui seront responsables de la variabilité des nucléosomes. En plus de ces modifications post-traductionnelles, des variants d'histones existent, et leur présence au sein du nucléosome peut également influencer l'état de la chromatine.

L'étude des nombreuses marques des histones est actuellement en plein essor et toutes ne sont pas encore bien caractérisées ; dans cette partie, je ne parlerais que des marques les plus connues pour leur rôle au niveau de l'expression des gènes : l'acétylation et la méthylation des lysines des histones.

Les histones peuvent être acétylées au niveau de leur lysines, ce qui aboutit à l'ouverture de la chromatine. L'acétylation des histones est réalisée par les histones acétyltransférases (HAT), recrutées par des activateurs liés à l'ADN, tandis que des histones déacétylases (HDAC), recrutées par des répresseurs liés à l'ADN, pourront supprimer l'acétylation des histones. Ces enzymes font partie de gros complexes multiprotéiques dont les fonctions ne se limitent pas à l'acétylation ou la déacétylation des histones. Certains récepteurs nucléaires aux hormones sont répresseurs lorsqu'ils ne sont pas liés à leur ligand et recrutent donc des HDAC, tandis qu'ils deviennent activateurs et recrutent des HAT en présence de leur ligand [91]. Les HAT sont classées en 3 familles, dont l'une (constituée de CBP et p300) est majoritairement sollicitée par les activateurs. Deux mécanismes permettent d'expliquer le lien entre ouverture de la chromatine et acétylation des histones. Premièrement, les charges positives des histones (leur permettant de se lier à l'ADN, chargé négativement) sont neutralisées par l'acétylation, diminuant ainsi leur force de liaison avec l'ADN et permettant alors l'ouverture de sites de liaison avec l'ADN [92] et la décompaction des groupes de nucléosomes [93]. Deuxièmement, l'acétylation des histones permet la fixation de protéines à bromodomaines dont certaines sont des HAT (ce qui permettra l'entretien de l'acétylation) et qui recruteront à leur tour des co-activateurs. Les HDAC, pour leur part, sont recrutés dans des complexes multiprotéiques eux-mêmes recrutés par des répresseurs liés à l'ADN [94, 95].

La méthylation des lysines des histones est un peu plus complexe que leur acétylation, puisqu'elle peut être responsable de l'activation ou la répression de l'activité transcriptionnelle en fonction de la position de la lysine touchée dans l'histone. Un niveau de complexité supplémentaire est le fait de pouvoir avoir différents niveaux de méthylation sur chaque lysine qui peuvent être mono-, di- ou tri-méthylées. Les histones lysines méthyle transférases (HKMT) sont responsables de la méthylation des lysines. Trois sites de méthylation sont actuellement bien caractérisés : les méthylations des lysines 4, 9 et 27 de l'histone 3 (H3K4, H3K9 et H3K27 respectivement). De nombreuses protéines peuvent se lier à ces marques grâce à leur chromodomaines, domaines tudor, et domaines PHD (plant homeo domain).

La méthylation sur H3K4 est retrouvée dans l'euchromatine, en position 5' des gènes actifs. C'est l'ARN polymérase II activée qui recrute, au début de la transcription, la protéine Set1, qui possède l'activité H3K4 méthyle transférase. Cette marque permet ensuite de

recruter des facteurs spécifiques, tel que CHD1, impliquée dans les mécanismes d'ouverture de la chromatine et empêche la méthylation de H3K9 par SUV39H.

La méthylation de H3K9 est la plus étudiée, elle est largement présente au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique. C'est l'HKMT SUV39H qui permet la méthylation de H3K9 et la présence de cette méthylation et de SUV39H sur l'ADN permet de recruter HP1, une protéine à chromodomaine [96, 97]. HP1 va pouvoir se propager dans les nucléosomes voisins en association avec SUV39H, catalysant ainsi la méthylation des H3K9 à proximité [98]. La formation de dimères de HP1, par le biais du domaine chromoshadow favorise encore ce mécanisme d'invasion de l'hétérochromatine. Le départ de la méthylation de H3K9 au niveau de la région péricentromérique se fait grâce à des ARN synthétisés de façon bidirectionnelle dans les régions répétées du centromère. Ces ARN, pris en charge par l'enzyme DICER vont former des siRNA (petit ARN interférents). Ces siRNA, seront pris en charge par le complexe RITS et vont l'amener au niveau du centromère où il recrutera l'HKMT SUV39H, à l'origine de la méthylation de H3K9. Cette marque n'est toutefois pas seulement localisée au niveau du centromère, mais aussi au niveau de gènes réprimés, dans l'euchromatine, où SUV39H1 et HP1 sont recrutés par la protéine répresseur RB (rétinoblastome), sans qu'il n'y ait propagation de la méthylation. La méthylation H3K9 est également retrouvée au niveau des télomères, où HP1 est remplacée par des protéines homologues se liant également à H3K9 méthylé et transduites par SUV39H1 et SUV39H2.

Enfin, la méthylation H3K27 est une modification répressive, retrouvée au niveau de gènes réprimés, au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique et au niveau du chromosome X inactif. Cette méthylation est apportée par EZH2 (Homologue Humaine de Enhancer of Zeste, trouvée chez la drosophile). Chez la drosophile, EZ est retrouvée dans le complexe répresseur Polycomb qui cible des régions de l'ADN spécifiques. Chez l'homme, ces régions cibles ne sont toutefois pas retrouvées. Les complexes impliquant EZH2 seraient recrutés par des facteurs de transcription, comme MYC, capable de réguler l'expression de plus de 15% des gènes [99]. EZH2 induirait alors la méthylation de H3K27 et le recrutement de Polycomb.

Ces méthylations, sur les résidus lysine des histones peuvent être retirées par des histones lysine déméthylases, récemment caractérisées. Les mécanismes mettant en jeu ces enzymes ne sont toutefois actuellement pas connus [87].

3.3. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN correspond au plus ancien mécanisme épigénétique connu pour être associé avec la répression des gènes [100]. Il s'agit de l'addition d'un groupement méthyle au niveau d'une cytosine de l'ADN. Chez les mammifères, cette marque est

majoritairement présente au niveau de dinucléotides CpG (cytosine suivie d'une guanine et reliés par un groupement phosphate dans l'ADN). Cette méthylation est apportée par les ADN méthyle transférases (DNMT) (Figure 4).

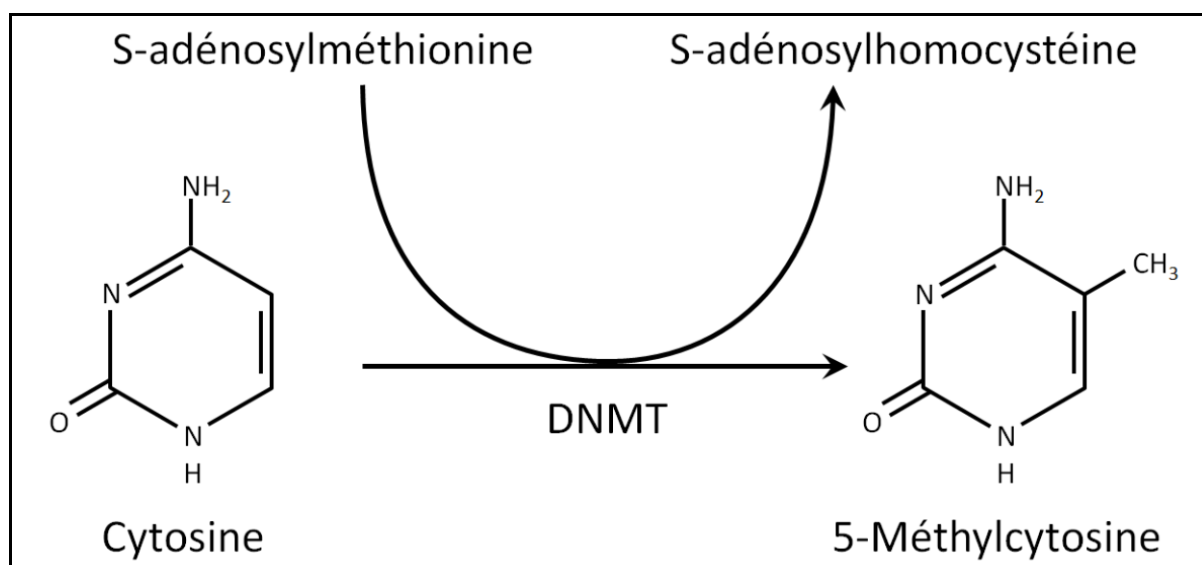


Figure 4 : Schéma de la réaction de conversion d'une cytosine en 5-méthylcytosine.

Trois d'entre elles ont été caractérisées chez l'homme : les DNMT3a et 3b, permettant la méthylation *de novo* de sites CpG, et la DNMT1, permettant la méthylation de sites CpG hémiméthylés (dont l'un des brins est méthylé, mais pas l'autre). La réplication de l'ADN, au cours de la division cellulaire, est majoritairement responsable de la formation d'ADN hémiméthylé. En effet, le brin néosynthétisé ne présente pas de méthylation. La DNMT1 est considérée comme une enzyme permettant le maintien de la méthylation de l'ADN, puisqu'elle permet la méthylation du brin néosynthétisé, par symétrie avec le brin matrice et évite la perte de la méthylation au fur et à mesure des divisions cellulaires.

Les dinucléotides CpG sont moins fréquemment retrouvés dans le génome qu'ils ne devraient l'être, statistiquement [101]. Ceci serait dû à la conversion spontanée et relativement fréquente des cytosines méthylées en thymine, par une réaction de déamination et ce, malgré des systèmes de réparation spécifiques [102, 103].

Dans les tissus somatiques, 70% des sites CpG sont méthylés [104]. Cette méthylation est majoritairement retrouvée au niveau de séquences satellites, d'éléments répétés (transposons et reliquats de transposons compris), de séquences intergéniques non répétitives, et d'exons de gènes. Il existe cependant des régions denses en sites CpG, retrouvées pour la plupart (si ce n'est toutes) au niveau des promoteurs et des domaines en 5' des gènes. Ces régions sont appelées les îlots CpG et sont non méthylées dans les cellules germinales, l'embryon ainsi que, la plupart du temps, dans les cellules somatiques [105]. Globalement, ce

profil de méthylation est retrouvé dans l'ensemble des cellules somatiques, mais il peut varier au niveau de séquences spécifiques et au cours du développement. Par exemple, sites CpG retrouvés sur le chromosome X paternel sont méthylés au cours de l'embryogénèse féminine, afin d'inactiver l'un des chromosome X [106], cette inactivation du chromosome X paternel est maintenue dans les cellules extraembryonnaires, tandis qu'elle est supprimée (par déméthylation), puis rétablie sur l'un ou l'autre des chromosomes X lors des premiers stades de l'embryogénèse [106]. Le promoteur du gène *interleukin-2* quand à lui est déméthylé lors de la différenciation des lymphocytes T [107]. De plus, des séquences spécifiques seront méthylées dans l'ovocyte ou le spermatozoïde, permettant la mise en place de l'empreinte parentale, qui demeure étonnamment stable au cours de l'embryogénèse. En plus de ces changements locaux, des changements globaux de la méthylation de l'ADN surviennent lors de la gamétogénèse et la fécondation. En effet, lors de la gamétogénèse, l'absence de maintien de la méthylation au cours des divisions cellulaires aboutit à la perte de méthylation. Bien que le mécanisme ne soit pas encore connu, l'ADN paternel est fortement déméthylé quelques heures après la fécondation. Ce mécanisme implique une déméthylation active puisqu'il n'y a pas synthèse d'ADN. De plus, un mécanisme actif serait également impliqué dans la déméthylation du promoteur du gène *interleukine-2* lors de la différenciation des lymphocytes T, pourtant aucune « déméthylase » n'a encore été isolée. Deux mécanismes peuvent expliquer les effets de la méthylation de l'ADN sur l'expression des gènes. La présence de groupements méthyle dans le sillon majeur de l'ADN peut gêner la liaison de facteurs de transcription et ainsi empêcher l'expression d'un gène. Des protéines possédant un domaine de liaison à l'ADN méthylé (protéines à MBD) peuvent également se lier à l'ADN méthylé et recruter un complexe co-répresseur, capable de modifier les marques sur les histones, aboutissant à la fermeture de la chromatine. Par exemple, la protéine à MBD, MeCP2 est capable de se lier à l'ADN méthylé et de recruter le complexe mSin3a, possédant une activité HDAC [87].

3.4. Epigénétique et cancer

3.4.1. Notions générales

La dérive d'une cellule vers la formation d'un cancer passe par l'activation d'oncogènes et l'inactivation d'oncosuppresseurs [108-111]. Selon la théorie de Knudson (2001), l'inactivation d'oncosuppresseurs nécessite, en règle générale, l'inactivation des deux copies du gène [112]. Trois classes de « coups » peuvent participer à la perte totale d'activité d'un oncosuppresseur : la mutation directe d'une séquence codante, la perte de parties, ou de copies entières de gènes ou alors la perte d'expression due à des mécanismes épigénétiques [113]. L'altération directe de l'expression d'oncosuppresseurs n'est pas le seul mécanisme

épigénétique impliqué dans le cancer : une diminution globale de la méthylation de l'ADN est retrouvée dans les cancers et pourrait être la cause d'instabilités génomiques conduisant au cancer [108-110, 114-117]. La perte d'empreinte parentale, pouvant conduire à la surexpression d'oncogènes peut également participer aux stades précoces de la cancérogenèse [118]. Plus récemment, un nombre croissant de données montre que la méthylation des îlots CpG dans les promoteurs d'oncosuppresseurs peut inhiber leur expression et conduire au cancer [108-110]. Enfin, les cytosines méthylées ont une forte propension à être converties en thymines, aboutissant à la formation de mutations et pouvant également faire partie du processus de carcinogenèse [119].

3.4.2. Epigénétique de *BRCA1* et *BRCA2* dans les cancers du sein et de l'ovaire

Les mutations héréditaires de *BRCA1* et *BRCA2* sont responsables d'environ 10% des cancers héréditaires du sein et de l'ovaire. De nombreuses études se sont par conséquent intéressées aux mécanismes qui pourraient inactiver ces gènes dans les cancers sporadiques et plus particulièrement aux mécanismes épigénétiques. La majorité de ces données concernent la méthylation des promoteurs de *BRCA1* et *BRCA2* dans les cancers du sein et de l'ovaire.

La méthylation de *BRCA1* au niveau d'un site de liaison CRE (élément de réponse à l'AMPcyclique) dans le promoteur du gène induirait une perte de son expression [120-122]. Selon les études, la méthylation de *BRCA1* est retrouvée dans une proportion extrêmement variable (de 5 à 60%, environ) dans le tissu tumoral de cancers du sein sporadiques. En revanche, cette méthylation semble beaucoup plus rare dans les tumeurs mammaires de patientes porteuses de mutations héréditaires au niveau de *BRCA1* ou *BRCA2* et serait donc rarement responsable du deuxième « coup » de la théorie de Knudson [123-125]. Trois études récentes révèlent la présence de cette marque dans les patientes présentant un risque héréditaire non associé à une mutation *BRCA1* ou *BRCA2* [126-128], en opposition avec les résultats de Chen *et al.* [129]. Bien que cette marque ait été retrouvée au niveau de cellules germinales [130], il semblerait qu'elle ne soit, en général pas retrouvée dans les tissus sains [131-133]. Toutefois, des études montrent que la méthylation du promoteur de *BRCA1* est détectée dans le sérum ou le plasma de patientes porteuses de tumeurs méthylées pour *BRCA1* [134-139]. A l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressées aux mécanismes responsables de l'hyperméthylation de *BRCA1* dans les cancers du sein. Butcher et Rodenhiser (2007) ont montré que la DNMT3b est surexprimée dans les tumeurs du sein sporadiques où *BRCA1* est réprimé et la protéine CTCF, possédant un rôle dans le maintien de la déméthylation du promoteur de *BRCA1* [140] est délocalisée dans le cytoplasme des cellules tumorales [141]. Hachana *et al.* (2009) ont pour leur part montré que l'augmentation de la méthylation de

BRCA1 est associée avec la présence du virus SV40 dans les tumeurs ductales invasives du sein [142]. Enfin, Jin *et al.* (2010) ont révélé que la surexpression de UHRF1 (ubiquitin-like containing PHD and RING finger domain1) pouvait être à l'origine du recrutement de DNMT1 au niveau du promoteur de *BRCA1* et donc de sa méthylation [143]. La plupart des études s'intéressent à la valeur pronostique ou classificatrice de cette marque épigénétique dans les cancers du sein. Globalement, de nombreuses études s'accordent à dire que cette marque est associée à des cancers du sein sporadiques infiltrants, de haut grade et/ou de mauvais pronostic [127, 133, 144-148]. Elle est surtout retrouvée dans les cancers mammaires diagnostiqués avant ou autour de la ménopause [134, 149, 150] et est associée à des tumeurs présentant un phénotype triple négatif (HER2-, PR-, ER-) [132, 133, 136, 137, 150-156], comme de nombreuses tumeurs du sein associées aux mutations héréditaires de *BRCA1* mais, contrairement à ces dernières, pas forcément basal-like [146, 155, 157-159]. Plusieurs études ont tenté d'associer la méthylation de *BRCA1* avec des types de cancers mammaires particuliers (mucineux, médullaires, ductal...) mais leurs résultats sont conflictuels, probablement en raison de variations importantes de l'échantillonnage des tumeurs [132, 160-163]. Plusieurs études montrent que les tumeurs du sein hyperméthylées pour *BRCA1* sont plus sensibles aux chimiothérapies basées sur le platine [156, 164] et celles utilisant les inhibiteurs de PARP (poly ADP ribose polymérase) [165]. Enfin, l'hyperméthylation du promoteur de *BRCA1* semble pouvoir être supprimée par des traitements avec la 5-aza-2'-déoxycytidine et la trichostatine A [133, 166].

Tout comme dans les cancers du sein, la méthylation du promoteur de *BRCA1* est retrouvée dans certains cancers ovariens et est associée à une diminution de l'expression de *BRCA1*, sous forme d'ARNm et de protéine. Cette marque n'a, jusqu'à présent jamais été retrouvée dans des cancers ovariens de patientes porteuses de mutation héréditaire au niveau des gènes *BRCA1* et *BRCA2*. Elle a été associée aux cancers sévères, aux cancers épithéliaux de haut grade et aux peu fréquents cancers issus de cellules de la granulosa et est très peu présente dans les cancers des ovaires à cellules claires. Elle semble également améliorer la réponse des cancers ovariens à la chimiothérapie basée sur le platine ou utilisant les inhibiteurs de PARP. Esteller *et al.* (2000) montrent qu'elle serait fréquemment associée avec une perte d'hétérozygotie, dans les cancers de l'ovaire [132]. Une seule étude montre que la méthylation de *BRCA1* peut être retrouvée dans le plasma de patientes ayant développé des tumeurs ovariennes péritonéales [167]. Enfin, une seule étude présente une plus faible survie pour les patientes ayant développé une tumeur des ovaires méthylée au niveau de *BRCA1*. Cette même étude établit un lien entre cette marque et une activation de la voie PI3K/AKT [168].

Concernant la méthylation du promoteur de *BRCA2*, peu de données sont actuellement disponibles. Dans les cancers du sein, Radpour *et al.* (2009) ne trouvent pas de différence significative au niveau de la fréquence de méthylation de *BRCA2* entre les tissus sains et tumoraux, tandis que Cucer *et al.* (2008) ainsi que Pal *et al.* (2010) trouvent une méthylation plus importante de *BRCA2* dans le tissu tumoral mammaire [138, 169, 170]. Dans les cancers des ovaires, une première étude a montré une diminution significative de la méthylation de *BRCA2* associée à une augmentation de son ARNm et à l'augmentation de la méthylation de *BRCA1* dans les tumeurs de l'ovaire, liées au grade de ces tumeurs [171]. Trois autres études trouvent une augmentation de la méthylation de *BRCA2* dans quelques tumeurs ovariennes [172-174], tandis que Gras *et al.* (2001) n'ont pas détecté cette marque dans les cancers épithéliaux de l'ovaire [175].

4. LES PHYTO-ŒSTROGENES DU SOJA

4.1. Données générales

Les phyto-œstrogènes sont des molécules naturellement présentes dans les plantes ou dont le précurseur, d'origine végétale, sera métabolisé dans l'organisme. Ils possèdent une similitude structurale avec l'œstradiol leur permettant d'avoir une action œstrogénique. Selon le rapport de l'AFFSA (2005), sont considérées comme phyto-œstrogènes les molécules issues de la consommation de végétaux et possédant une activité œstrogénique retrouvée lors de tests *in vivo*, ou *in vitro* pour des concentrations correspondant aux taux circulants observés lors des apports alimentaires traditionnels [176].

De nombreuses molécules dont les isoflavones, isoflavanes, coumestranes, flavanones, chalcones, stilbènes et entérolignanes entrent dans ce groupe, et de nombreuses plantes, notamment de la famille des fabacées, sont à l'origine de tels composés, mais seule une partie en fournit en quantités importantes. Parmi elles, on peut citer le soja, le trèfle, la luzerne ou encore le houblon [176].

Le soja est l'une des plantes riches en phyto-œstrogènes les plus étudiées. Les graines de soja contiennent de la génistine et de la daidzine. Il s'agit d'isoflavones, des molécules de la famille des flavonoïdes. Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes, possédant une structure de deux cycles aromatiques reliés par trois carbones (C₆-C₃-C₆). Ces molécules existent sous deux formes : les formes aglycones (non conjuguées) et glucosides (liées à un sucre). Les formes glucosides (génistine et daidzine) sont les plus représentées dans la graine de soja et sont biologiquement inactives. La fermentation ou la digestion (par hydrolyse acide dans l'estomac, ou par action de β -glycosidases de la flore intestinale) des graines de soja ou de produits dérivés conduit à la libération de la molécule de sucre et à la formation de l'aglycone correspondant (génistéine et daidzéine). Les formes aglycones des

phyto-œstrogènes du soja peuvent ensuite être absorbés dans le sang [177, 178]. La flore intestinale pourra ensuite convertir la génistéine en métabolites non-œstrogéniques (majoritairement en p-éthylphénol). La daidzéine pourra quand à elle à nouveau être métabolisée par les bactéries intestinales, en S-équol ou en O-desméthylangolensine (O-DMA) avant d'entrer dans le compartiment sanguin [179-182]. Les formes aglycones peuvent encore être conjuguées (à l'acide glucuronique, majoritairement) lors du passage de la barrière entérohépatique [183]. Ainsi, une grande variabilité individuelle existe au niveau du métabolisme des phyto-œstrogènes. En effet, les différences de flore intestinale (pouvant être influencées par la prise d'antibiotiques ou le régime alimentaire), le temps de transit intestinal, les aliments consommés avec les phyto-œstrogènes, ainsi que des facteurs génétiques peuvent moduler le métabolisme de ces molécules [184]. Par exemple, les individus capables de métaboliser la daidzéine en S-équol ne représentent que 25 à 30% des adultes dans les pays occidentaux, tandis qu'ils représentent 50 à 60% des adultes au Japon, en Corée ou en Chine [185].

4.2. Effets physiologiques des phyto-œstrogènes du soja

4.2.1. Actions œstrogéniques et anti-œstrogéniques

La structure chimique des phyto-œstrogènes du soja est très proche de celle des œstrogènes des mammifères et notamment du 17- β -œstradiol (E_2) [5] (Figure 5).

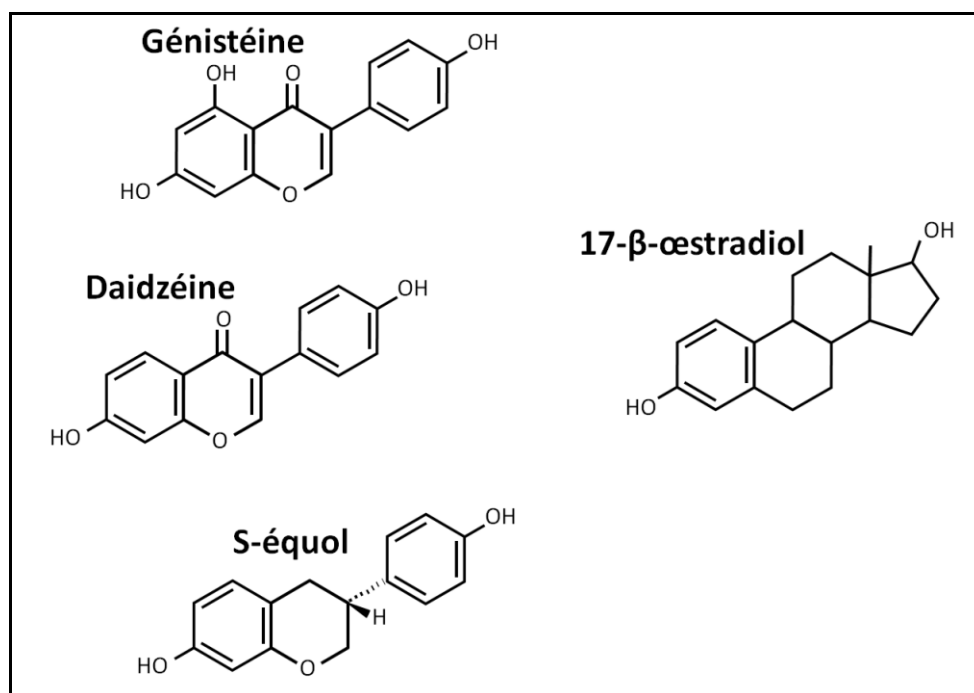


Figure 5 : Structure de la génistéine, la daidzéine, le S-équol et du 17- β -œstradiol.

Cette structure leur permet de se lier aux récepteurs aux œstrogènes et de les activer. Le cycle phénolique est en effet un élément clé des composés capables de se lier aux récepteurs aux œstrogènes [186]. Cette capacité va conduire les phyto-œstrogènes du soja à avoir des effets œstrogéniques, par activation des récepteurs aux œstrogènes et anti-œstrogéniques, par compétition entre les phyto-œstrogènes du soja et les œstrogènes naturels. De plus, contrairement au 17- β -œstradiol, les phyto-œstrogènes du soja possèdent une plus forte affinité pour le récepteur β aux œstrogènes (RE β) par rapport au récepteur α . Muthyala *et al.* (2004) ont mesuré l'affinité de la génistéine, la daidzéine et l'équol, en compétition avec le 17- β -œstradiol pour les récepteurs aux œstrogènes [187]. Leurs résultats montrent une affinité beaucoup plus faible que le 17- β -œstradiol de la génistéine, la daidzéine et le S-équol pour les deux récepteurs aux œstrogènes. Toutefois, ces trois composés, et plus particulièrement la génistéine et le S-équol montrent une affinité plus grande pour le RE β que pour le RE α . Bien que les phyto-œstrogènes du soja possèdent une affinité pour les récepteurs aux œstrogènes plus faible que le 17- β -œstradiol, leurs taux plasmatiques sont de l'ordre de 1 à une centaine de nanomolaires [188], tandis que celui des œstrogènes est de l'ordre de 1 à un millier de picomolaires, en fonction du moment de la vie [189], permettant ainsi une compétition efficace entre phyto-œstrogènes et œstrogènes.

Les récepteurs aux œstrogènes sont des membres de la superfamille des récepteurs intracellulaires des stéroïdes, principalement localisés dans la membrane nucléaire des cellules. Le 17- β -œstradiol, ainsi que les phyto-œstrogènes du soja sont capable de diffuser à travers la membrane plasmique dans le cytoplasme pour atteindre le noyau, où sont localisés les récepteurs aux œstrogènes, liés à des protéines chaperonnes. Les œstrogènes, en se liant au récepteur aux œstrogènes, provoquent sa séparation avec les protéines chaperonne, aboutissant à un changement de conformation du récepteur. Ce changement de conformation est dépendant de la molécule qui s'est liée au récepteur. Les récepteurs aux œstrogènes vont alors former des dimères entre eux et subir une translocation dans le noyau. Ils se fixent ensuite sur des séquences particulières de l'ADN : les éléments de réponse aux œstrogènes (ERE), retrouvés dans le promoteur de gènes œstrogéno-sensibles. La fixation des récepteurs aux œstrogènes sur l'ADN entraîne le recrutement de protéines régulatrices, co-activatrices ou co-répressives. La disponibilité de ces molécules influencera la réponse cellulaire aux œstrogènes et la présence ou l'absence de certains co-régulateurs dans un tissu pourra donc être responsable de réponses tissu spécifiques aux œstrogènes. De plus, les différences structurales entre le RE α et le RE β leur permettent d'avoir des activités biologiques différentes [190-192] et leur présence ou leur absence dans les tissus permettra de conduire à des réponses aux œstrogènes différentes. Le recrutement des co-régulateurs va permettre la

mise en place ou non du complexe d'initiation de la transcription. L'activation des récepteurs aux œstrogènes aboutit alors à l'expression ou à la répression de gènes possédant un ERE. Certaines études ont toutefois montré que les récepteurs aux œstrogènes pouvaient également agir sur certains gènes ne possédant pas d'ERE fonctionnels [193]. L'ensemble de ces mécanismes est appelé la « voie génomique » des RE, mais ceux-ci peuvent également agir par la « voie non-génomique ». La voie non-génomique des RE passe par l'activation de RE présents au niveau de la membrane plasmique des cellules. Ces RE sont peu nombreux, mais peuvent être présents dans des tissus ne possédant pas de RE au niveau du noyau. L'activation de ces RE permettrait l'activation, ou la répression de protéines cytoplasmiques.

Les phyto-œstrogènes du soja, de par leur similarité de structure avec l'E₂, vont pouvoir activer les RE et induire les voies génomiques et non-génomiques des RE. Toutefois, les phyto-œstrogènes ont une activité plus faible que les œstrogènes [187]. Ainsi, les phyto-œstrogènes vont bien activer l'expression des gènes répondant aux œstrogènes en l'absence d'œstrogènes, ou en présence de faibles quantités d'œstrogènes. Cependant, lorsque les phyto-œstrogènes entrent en compétition avec les œstrogènes naturels, ils vont « prendre la place » de molécules plus efficaces et par conséquent réduire l'activité œstrogénique. Ainsi, selon la compétition qu'il y aura avec les œstrogènes, les phyto-œstrogènes pourront avoir une action œstrogénique ou antiœstrogénique [194]. Les récepteurs α et β sont exprimés ensemble dans nombreux tissus, au niveau du système nerveux central, du système cardiovasculaire, du système urinaire, du sein et de l'os notamment. Toutefois, le RE α est bien plus exprimé que le RE β dans l'utérus, la glande mammaire et le foie et le RE β est très présent dans le système gastrointestinal [195]. Ces différences de statuts en récepteurs aux œstrogènes tissus spécifiques seront à l'origine d'actions tissus spécifiques des phyto-œstrogènes, mais également d'actions différentes des œstrogènes du fait de la plus grande affinité des phyto-œstrogènes pour le RE β par rapport au RE α .

Par ces mécanismes, les RE peuvent agir sur la prolifération, la croissance, la différenciation, l'angiogenèse, ou encore l'apoptose. Les phyto-œstrogènes du soja, en agissant sur les récepteurs aux œstrogènes, pourront ainsi agir sur ces mécanismes.

4.2.2. Autres actions

En plus des récepteurs aux œstrogènes, les phyto-œstrogènes du soja pourraient également se lier à d'autres récepteurs nucléaires, comme le récepteur des androgènes, ou de la progestérone. La génistéine peut, par exemple se lier au récepteur PPAR γ et induire l'adipogenèse et l'ostéogenèse [196]. Les phyto-œstrogènes du soja sont également des inhibiteurs compétitifs de l'ATP au niveau de son site de liaison kinase [197], pouvant ainsi inhiber l'action des récepteurs de facteurs de croissance [198] et ainsi limiter la prolifération

de certaines cellules. Ils semblent également agir sur les enzymes du métabolisme des œstrogènes, diminuant la biodisponibilité en œstradiol [176]. Enfin, les phyto-œstrogènes du soja possèdent une activité antioxydante qui pourrait notamment protéger l'ADN et les lipides de dommages dus aux réactifs oxygénés, cependant, ces effets ont été découverts à l'aide de doses supra-physiologiques [176].

4.2.3. Effets au niveau épigénétique

Récemment, des études ont montré la capacité des phyto-œstrogènes du soja à agir au niveau épigénétique et plus particulièrement au niveau de la méthylation de l'ADN. Quatre études ont évalué les effets d'une consommation maternelle de génistéine sur la méthylation de régions particulières de l'ADN de souris. Les études de Dolinoy *et al.* (2006 et 2007) révèlent que cette consommation maternelle de génistéine augmente la méthylation du promoteur A^{vy}, un promoteur résultant de l'insertion d'un rétrotransposon dans le gène *agouti*, responsable de la coloration brune des souris. Cette augmentation de méthylation est par ailleurs retrouvée dans de nombreux tissus des souris [199]. Ces auteurs ont également montré que la consommation maternelle de génistéine pouvait empêcher la diminution de méthylation du promoteur A^{vy} provoquée par une exposition pré ou post-natale au bisphénol A chez les nouveaux nés [200]. En 2011, Vanhees *et al.* ont quand à eux révélé qu'une consommation maternelle de génistéine provoquait une hyperméthylation d'éléments répétés riches en CpG (SINEB1 et SINEB2) dans la moelle osseuse de souris et ce, sur le long terme [201]. Compte tenu de la nature des régions génomiques étudiées, (éléments répétés et promoteur issu d'un rétrotransposon), ces résultats tendent à montrer qu'une consommation maternelle de génistéine permettrait de réduire l'instabilité génomique, grâce à une hyperméthylation durable de régions « instables » de l'ADN. Une dernière étude montre que l'exposition pré et post-natale à un régime riche en phyto-œstrogènes diminue les écarts de méthylation observés entre les souris mâles et femelles au niveau du gène *Acta1* dans le foie, tandis qu'une augmentation de la méthylation de ce gène est observée chez les deux sexes dans le pancréas [202]. Cette étude révèle surtout que les modifications épigénétiques induites par une exposition précoce aux phyto-œstrogènes sont tissu et sexe dépendantes.

Quatre autres études sur les effets des phyto-œstrogènes du soja sur la méthylation de l'ADN ont été réalisées sur l'animal. En 1995, Lyn-Cook *et al.* montrent que des rats consommant de l'équol avaient une augmentation de méthylation dans le promoteur du proto-oncogène *c-H-ras* dans les cellules des acini de pancréas, offrant ainsi un effet protecteur vis-à-vis du cancer [203]. Day *et al.* (2002), ont quant à eux montré une augmentation globale de la méthylation des îlots CpG dans la prostate, mais pas le foie de souris consommant de la génistéine [204]. Cette étude révèle à nouveau l'effet tissu dépendant de la daidzéine. L'étude

de Tang *et al.* (2008) pour sa part, suggère que les effets épigénétiques de la génistéine sont des effets œstrogéniques ou anti-œstrogéniques. En effet, ils montrent que chez des souris ovariectomisées, la consommation de génistéine augmente la méthylation du promoteur de Nsbp1 (une protéine de liaison au nucléosome permettant une augmentation de l'activité transcriptionnelle des régions où elle se fixe) de façon durable, tandis que chez des souris non ovariectomisées, la consommation de génistéine diminue durablement la méthylation du promoteur du gène Nsbp1 [205]. Une dernière étude chez l'animal révèle enfin que les effets de la génistéine sur la méthylation de l'ADN sont probablement cellule spécifiques puisque Matsukura *et al.* (2011) observent une diminution de la méthylation dans le promoteur de SF-1 (un récepteur orphelin et un facteur de transcription impliqué dans la stéroïdogénèse) dans une partie seulement des cellules de la couche luminale de l'utérus de souris ovariectomisées [206].

En parallèle avec ces études sur les animaux, plusieurs études ont montré *in vitro* les effets au niveau épigénétique de la daidzéine. L'une d'entre elles s'est intéressée aux effets de la génistéine sur la méthylation de l'ADN dans des cellules souches embryonnaires de souris en cours de différenciation. Cette étude révèle que la génistéine n'affecte pas la méthylation globale de l'ADN de ces cellules, mais de nombreuses régions proches de sites de départ de la transcription. Cet effet n'est pas observé avant 10 jours après le début de la différenciation, ce qui correspond à l'apparition des RE α dans la cellule. Cette étude suggère donc que les modifications de méthylation observées au niveau de l'ADN seraient dues à un effet de la génistéine sur les RE α [207]. La plupart des études *in vitro* restantes révèlent que la génistéine, en agissant sur des mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN, mais aussi méthylation ou acétylation des histones), augmente l'expression d'oncosuppresseurs impliqués dans la croissance et le cycle cellulaire, le maintient de l'intégrité du génome, ou encore les mécanismes de détoxification, notamment. Une seule de ces études, en revanche montre une diminution de l'expression d'un oncogène (*hTERT*, le gène codant pour la télomérase) induit par la déméthylation du site de fixation d'un répresseur par la génistéine [208]. Trois de ces études ont également regardé l'activité et/ou l'expression des protéines responsables de la mise en place des marques épigénétiques et retrouvent notamment une diminution de l'activité des ADN méthyle transférases (DNMT) ainsi qu'une diminution de leur expression (qui n'est pas retrouvée dans l'étude de Fang *et al.* 2005) [208-210]. Hong *et al.* (2004) ont pour leur part étudié l'activité histone acétyl transférase des cofacteurs SRC2 et p300 (recrutés par les récepteurs aux œstrogènes activés, sur les ERE) en présence de récepteurs aux œstrogènes et en réponse à la génistéine ou l'équol. Ils démontrent que ces phyto-œstrogènes sont capables de stimuler l'activité HAT par le biais des RE α et des RE β ,

ajoutant ainsi du poids à l'hypothèse que les effets épigénétiques des phyto-œstrogènes du soja passeraient, au moins en partie, par les récepteurs aux œstrogènes [211].

Enfin, une seule étude a été réalisée dans une population de femmes ménopausées [212]. Celle-ci révèle que la présence d'une faible dose de génistéine dans le plasma diminue la méthylation dans les promoteurs de *RARβ* (codant pour le récepteur β à l'acide rétinoïque et impliqué dans l'embryogenèse, la régulation de la croissance cellulaire et la différenciation des cellules) et *CCND2* (codant pour la cycline D2, classé comme oncogène impliqué dans le cycle cellulaire). En revanche, la présence de fortes doses plasmatiques en génistéine augmente la méthylation du promoteur de ces deux gènes. De plus, il semblerait que la quantité de génistéine nécessaire pour passer d'un effet méthylant à un effet déméthylant ne soit pas la même pour les deux gènes. Cette étude révèle l'importance de la dose de génistéine sur ses effets au niveau épigénétique, ceux-ci pouvant être inversés.

Ainsi, les études en cours révèlent que les phyto-œstrogènes du soja peuvent agir, au niveau épigénétique, ce qui pourrait protéger de divers cancers. L'implication des récepteurs aux œstrogènes dans ce mécanisme semble possible mais reste à vérifier. De même, la période et la dose d'exposition semblent avoir des effets importants, ainsi que la présence, ou non d'œstrogènes. Enfin, il semble que la réponse épigénétique aux phyto-œstrogènes du soja soit tissu, voire cellule-dépendante et gène-dépendante.

4.3. Phyto-œstrogènes du soja et cancers du sein

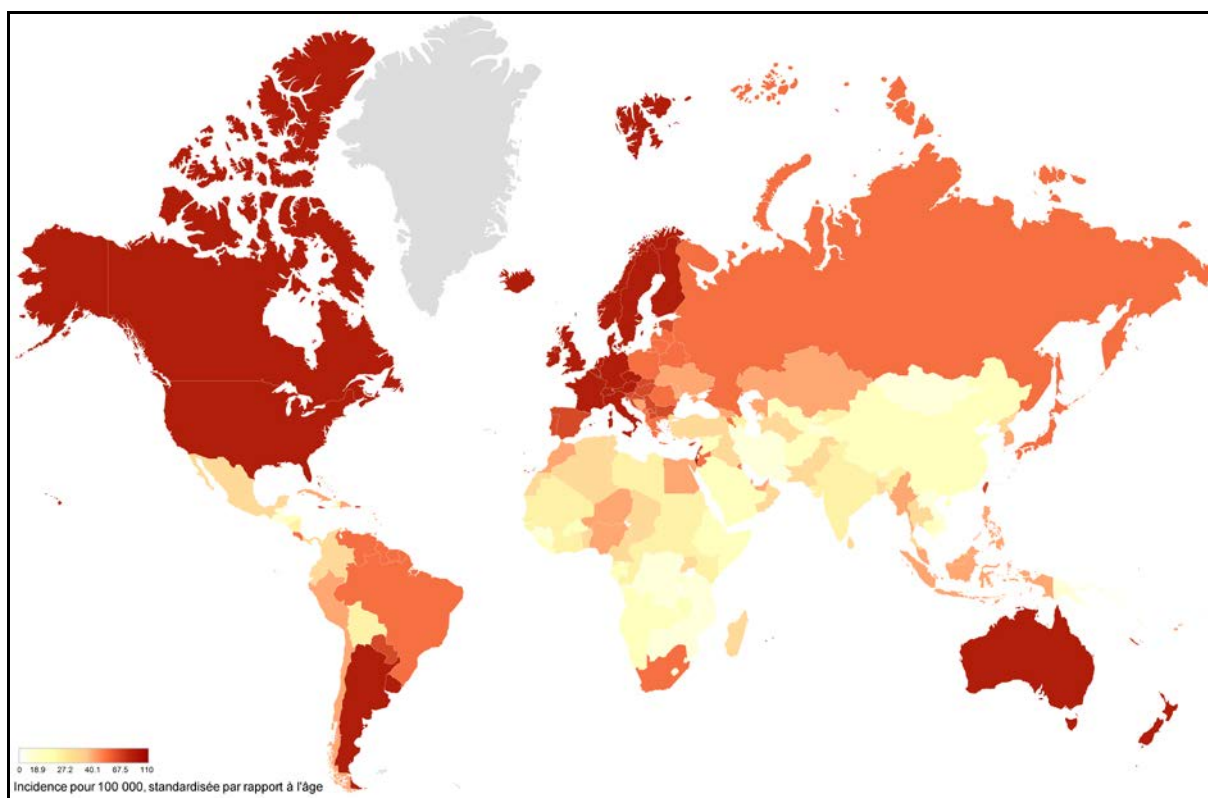


Figure 6 : Incidence des cancers du sein dans le monde en 2008 (c).

L'effet protecteur des phyto-œstrogènes du soja vis-à-vis du cancer du sein est soupçonné depuis plus de 15 ans [213]. Ce soupçon est né de la plus faible incidence du nombre de cancers du sein dans les pays Asiatiques, dont une partie consomme de grandes quantités de soja par rapport aux pays Occidentaux, retrouvée depuis les études épidémiologiques les plus précoces [214-216], jusqu'à aujourd'hui [1, 217] (Figure 6). De plus, quelques générations après avoir immigré dans des pays Occidentaux, les femmes asiatiques ont une incidence de cancer du sein comparable à celle de leurs équivalentes occidentales. Ce changement est principalement dû à des facteurs alimentaires [218]. Une exposition précoce aux phyto-œstrogènes du soja pourrait être nécessaire pour assurer cet effet protecteur puisque le risque de développer un cancer du sein augmente au fur et à mesure des générations de femmes après immigration aux Etats-Unis [218]. De nombreuses études se sont attelées à montrer cet effet protecteur, mais les résultats obtenus sont variables [219, 220]. De plus, sachant que les facteurs responsables d'une exposition plus longue aux œstrogènes augmentent le risque de cancer du sein et que les phyto-œstrogènes du soja ont des capacités œstrogéniques, certains chercheurs et cliniciens ont émis des réserves quand à un effet protecteur et estiment que l'exposition à de fortes doses d'isoflavones pourrait augmenter le risque de développer un cancer du sein. Deux études épidémiologiques montrent, par ailleurs, que la génistéine peut avoir des effets stimulants sur des cancers établis [221, 222]. Ces résultats ne sont toutefois pas confirmés par certaines études d'intervention, qui ne révèlent pas d'effets [223, 224] ou un effet proapoptotique au niveau des cellules tumorales mammaires [225]. Bien qu'aucun consensus n'ait été établi, il semblerait que la dose, les niveaux d'œstrogènes présents, le stade de la vie et le type de tumeur influent sur les effets des phyto-œstrogènes du soja. Globalement, un effet protecteur semble ressortir des études épidémiologiques chez la femme [226-228]. Les études cliniques pour leur part apportent des résultats conflictuels qui pourraient être dus à la présence de facteurs confondants et aux différences méthodologiques. Les études sur l'animal semblent également apporter des résultats conflictuels. En effet, une étude sur des rattes exposées à la génistéine ou la daidzéine dès la naissance, puis exposées au DMBA, un puissant agent cancérigène, révèle une incidence plus faible de cancers mammaires chez les rattes exposées à la génistéine, mais pas à la daidzéine [229]. Cet effet n'est pourtant pas retrouvé dans une autre étude similaire [230]. Globalement, les études chez le rat tendent à montrer un effet protecteur des phyto-œstrogènes du soja lorsque ceux-ci sont administrés pendant la période prépubertaire, tandis que l'exposition à d'autres moments de la vie serait délétère [231]. De nombreuses études ont été réalisées avec l'implantation de cellules cancéreuses chez des

souris athymiques. Les phyto-œstrogènes du soja semblent augmenter la prolifération de ces cellules cancéreuses, toutefois la présence d'un système immunitaire endommagé pourrait ne pas être étrangère à cet effet des isoflavones. Toujours chez les souris, les études sur des souris transfectées avec un oncogène sont à l'origine de données conflictuelles, ne permettant pas de conclure [231].

Les études *in vitro* sont pour leur part à l'origine de nombreux résultats qui confirmeraient l'effet protecteur des isoflavones, avec toutefois, certaines contradictions. De nombreuses études indiquent que les phyto-œstrogènes du soja sont capables d'induire des phénomènes d'apoptose, seuls ou en synergie avec des molécules thérapeutiques dans des lignées continues de cancer du sein [232, 233]. L'inhibition de l'expression de facteurs de transcription comme NF- κ B et Akt permettrait notamment cet effet propapoptotique, ainsi que la réduction de l'adhésion et la migration des cellules mammaires [232, 234, 235]. La diminution de la croissance cellulaire passerait également par l'inhibition de tyrosines kinases [236], de l'ADN topoisomérase II [237-239] et l'induction de p21 [240]. De plus, les propriétés antioxydantes des isoflavones, en diminuant l'action des réactifs oxygénés, pourraient protéger les cellules de dommages protéiques et génomiques et par conséquent de la dérive vers la formation de cellules tumorales [241]. L'induction de l'expression de gènes comme *BRCA1* et *BRCA2* [242, 243] et la surexpression de nombreux gènes liés à leur voie [244] aurait également un effet protecteur. Il semblerait que l'ensemble des études *in vitro* s'intéressant à un effet épigénétique des phyto-œstrogènes du soja rapportent un effet aboutissant à l'augmentation de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et la diminution de l'expression d'oncogènes. Ce mécanisme passerait en partie par une action au niveau des récepteurs aux œstrogènes, d'où l'importance du statut en récepteurs aux œstrogènes des tissus mammaires ou cancéreux. Toutefois, plusieurs études révèlent que la génistéine est capable de stimuler la croissance de cellules cancéreuses exprimant le RE α [245-250], ou des cellules tumorales sensibles au tamoxifène [248, 251-253] tandis qu'elle ne montre pas d'effets ou un effet inhibiteur sur la croissance de cellules mammaires résistantes au tamoxifène, ou n'exprimant pas le RE α [248, 250, 254].

L'ensemble des données de la littérature semble pencher en faveur d'un effet protecteur des phyto-œstrogènes du soja vis-à-vis du cancer du sein. Cet effet serait dû à de nombreux mécanismes et notamment la réexpression d'oncosuppresseurs, toutefois de nombreux facteurs semblent entrer en ligne de compte, comme le statut en récepteurs aux œstrogènes, la présence d'œstrogènes endogènes ou encore le moment de la vie où les phyto-œstrogènes sont consommés.

OBJECTIFS

Notre objectif était de comprendre comment la méthylation de l'ADN, un élément clé régulant l'expression des oncosuppresseurs dans les cancers hormono-dépendants du sein et de l'ovaire, était modifiable par les phyto-œstrogènes du soja.

Pour cela, nous avons mis en évidence l'existence d'une méthylation des oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2* dans les cancers du sein et de l'ovaire.

Parallèlement, nous avons étudié dans des cellules mammaires en lignée continue l'effet des phyto-œstrogènes du soja mais aussi du S-équol, un métabolite de la daidzéine sur la méthylation de l'ADN, par microscopie confocale et plus spécifiquement au niveau des oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2* par MeDIP suivie d'une PCR, ou par QAMA puis, au niveau protéique par western-blotting et immunohistochimie.

RESULTATS

1. LA METHYLATION DES ONCOSUPPESSEURS *BRCA1* ET *BRCA2* *IN VIVO*

1.1. Dans le cancer de l'ovaire

Présentation de la publication N°2 :

A ce jour, peu d'études ont montré que l'hyperméthylation de *BRCA1* ou *BRCA2* pouvait être retrouvée en dehors du tissu tumoral, dans les cas de cancers des ovaires : Snell *et al.* (2008) ont montré qu'une méthylation de *BRCA1* peut être retrouvée dans d'autres tissus chez les patientes atteintes de cancer des ovaires où *BRCA1* est fortement méthylé [255]. Ibanez de Caceres *et al.* (2004) montrent pour leur part que la méthylation de *BRCA1* peut être détectée dans le plasma de patientes atteintes de cancers de l'ovaire où ce gène est méthylé [167]. Nous avons donc voulu déterminer si la méthylation des gènes *BRCA1* et *BRCA2* dans les cellules du sang périphérique, qui pourrait indiquer le niveau de méthylation de *BRCA1* et *BRCA2* dans le tissu ovarien, serait indicateur du risque de développer un cancer de l'ovaire.

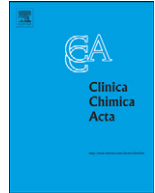
Pour réaliser cette étude, nous avons fait appel à la technique d'Analyse Quantitative des Allèles Méthylés (QAMA) [256] afin de quantifier la méthylation dans les promoteurs de *BRCA1* et *BRCA2* dans l'ADN extrait du sang périphérique de 51 patientes atteintes de cancer de l'ovaire, issues de la population COSA et 349 femmes ne présentant aucune tumeur, issues de la population témoin.

Publication N°2 :

« Peripheral blood DNA methylation detected in the *BRCA1* or *BRCA2* promoter for sporadic ovarian cancer patients and controls ».

Rémy Bosviel, Emilie Michard, Lavediaux Guillaume, Kwiatkowski Fabrice, Yves-Jean Bignon and Dominique Bernard-Gallon

Clin Chim Acta. 2011, 412(15-16):1472-5.



Short communication

Peripheral blood DNA methylation detected in the *BRCA1* or *BRCA2* promoter for sporadic ovarian cancer patients and controls

Rémy Bosviel, Emilie Michard, Guillaume Lavediaux, Fabrice Kwiatkowski, Yves-Jean Bignon*, Dominique J. Bernard-Gallon

Centre Jean Perrin, Département d'Oncogénétique, CBRV, 28 place Henri Dunant, BP 38, 63001 Clermont-Ferrand, France

CRNH, 58 Rue Montalembert, BP 321, 63009 Clermont-Ferrand, France

Université d'Auvergne, EA 4233 «Nutrition, Cancérogenèse et Thérapie anti-tumorale», 28 place Henri Dunant, BP 38, 63001 Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 December 2010

Received in revised form 22 April 2011

Accepted 23 April 2011

Available online 30 April 2011

Keywords:

Sporadic ovarian carcinoma

DNA methylation

*BRCA1**BRCA2*

QAMA

ABSTRACT

Background: Ovarian cancer is located at the fifth rank of female cancers. Different risk factors including genetic factors with *BRCA1* and *BRCA2* genes played an important role in the etiology of the ovarian cancer. In most of sporadic ovarian cancer, variation in the expression of *BRCA1* and *BRCA2* genes was observed and it could be a consequence of epigenetic modifications. This work aimed to study methylation at CpG islands within the promoter of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in sporadic ovarian cancers.

Methods: For this, we conducted a case-control study consisted of 51 ovarian cancer cases with no *BRCA* mutation and 349 healthy women. All participants came from the Auvergne region in France. Genomic DNA was extracted from peripheral blood cells (PBCs) and we used the Quantitative Analysis of Methylated Alleles (QAMA) to estimate the per cent of methylation in the *BRCA1* and *BRCA2* promoters.

Results: *BRCA1* methylation is significantly decreased in ovarian cancer by comparison with the control group. The comparison between the two different populations did not show any significant difference regarding *BRCA2* methylation but exhibited a trend in the decrease of *BRCA2* promoter methylation in peripheral blood DNA of sporadic ovarian cancer.

Conclusions: These results may have implications in better understanding the underlying epigenetic mechanisms in *BRCA1* and *BRCA2* oncosuppressors in sporadic ovarian cancer.

© 2011 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Ovarian cancer is one of the main causes of death among gynecological malignancies [1]. Methylation is an important silencing mechanism of breast and ovarian cancer susceptibility gene 1 (*BRCA1*) expression in sporadic ovarian cancer. Less is known in methylation about ovarian cancer susceptibility gene 2 (*BRCA2*).

Aberrant methylation may contribute to the disruption of key biological pathways during the progression of ovarian cancer to the drug-resistant phenotype [2–4].

Methylation-specific PCR (MSP) is a the technique frequently used for methylation analysis [5,6]. The methylation is discriminated by PCR in methylated and unmethylated target DNA. Many improvements appeared like the MethylLight [7]. Here, we used the assay

Abbreviations: PBCs, peripheral blood cells; QAMA, quantitative analysis of methylated alleles; COSA, breast and ovarian cancer in Auvergne; ARDOC, organized regional screening program association; MGB, minor groove binder; FAM, fluorescein amidite; SEM, standard error to mean.

* Corresponding author at: Centre Jean Perrin, Département d'Oncogénétique, CBRV, 28 place Henri Dunant, BP 38, 63001 Clermont-Ferrand, France. Tel.: +33 473278050; fax: +33 473278042.

E-mail address: Yves-Jean.BIGNON@cjp.fr (Y.-J. Bignon).

presented by Zeschnigk et al., [8] which is a quantitative MethylLight based on minor groove binder (MGB) technology, called QAMA (Quantitative analysis of methylated alleles).

These results taken together led us to hypothesize that *BRCA1* and *BRCA2* promoter methylation in PBCs may indicate the propensity of a woman's normal ovarian tissue to have *BRCA1* and *BRCA2* promoter methylation and that such would become susceptible to ovarian cancer pathogenesis. This would mean that *BRCA1* and *BRCA2* promoter methylation in PBCs could constitute a risk factor for ovarian cancer. In the case-control study presented here, we, there investigated whether *BRCA1* and *BRCA2* promoter methylation in PBCs is associated with risk of cancer, especially ovarian cancer with *BRCA1* and *BRCA2* promoter methylation.

2. Patients and methods

2.1. Patients and controls

Fifty-five women aged 24–84 years who had been diagnosed with ovarian cancer with no *BRCA* mutation were enrolled in the COSA (Breast and Ovarian Cancer in Auvergne) program between November 1996 and November 1999 in different hospitals within the

Auvergne region of France. A control population (n = 349) was gathered in 2005 and 2006 in a mammographic screening center. The majority of volunteers were women who went for screening in response to the Organized Regional Screening Program Association (ARDOC). This program consisted of inviting all women from the Auvergne region for a free mammography read by two independent radiologists. Eligible controls were women with no previous history of cancer, no more than one first degree relative breast or ovarian cancer and resident in Auvergne. Written informed consent was obtained from all the cases and the controls. A blood sample was collected.

2.2. DNA extraction

Genomic DNA samples were extracted from control patients and from ovarian cancer patients using DNA extraction kit by Euromedex according to the manufacturer's protocol (Euromedex, Souffelweyersheim, France).

2.3. Bisulfite treatment

Bisulfite treatment of denatured DNA that converts all unmethylated cytosines to uracil, leaving methylated cytosines unaltered [9] was carried out using the methylSEQR™ Bisulfite Modification Kit (Applied Biosystems) following manufacturer's instructions.

2.4. Quantitative analysis of methylated alleles (QAMA)

Real-time PCR-based QAMA assay was described previously by Zeschnigk et al.[8]. PCR was performed using a 96-well optical tray with optical adhesive film at a final reaction volume of 20 µl. Samples contained 10 µl of TaqMan® Universal PCR Master Mix II, No AmpErase® UNG (uracil-N-glycosylase), 8 µl of bisulfite-treated DNA, an additional 5 U of FastStart Taq DNA Polymerase (Roche), 2.5 µM each of the primers and 150nM of the fluorescently labeled methylated and unmethylated BRCA1 or methylated and unmethylated BRCA2 probes. Initial denaturation at 95 °C for 10 min to activate DNA polymerase was followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing and extension at 60 °C for 1 min (Applied Biosystems, 7900HT, Real-Time PCR System). Primer and probe sequences were selected with the help of Primer Express software (ABI). PCR primers were designed to amplify the bisulfite-converted sense strand of the CpG Island BRCA1 promoter sequence or antisense strand of the CpG Island BRCA2 promoter sequence, lacking any known nucleotide polymorphisms. The software designs primers with a melting temperature (Tm) of 58–60 °C and probes with Tm value of 68°–69 °C. The Tm of both primers should be equal. The amplicon sizes were 79 bp for BRCA1 and 87 bp for BRCA2. Primer and probe sequences were shown in Table 1. The primer binding sites lack CpG dinucleotides and, therefore, the nucleotide sequences in methylated and unmethylated DNA are identical after bisulfite treatment. Consequently, it is possible to amplify both alleles in the same reaction tube with one primer pair. Methylation discrimination occurs during probe hybridization by the use of two different MGB Taqman® probes. The binding site of the BRCA1 and BRCA2 MGB Taqman® probes both cover 2 CpG dinucleotides. We used a VIC-labeled MGB Taqman® probe that specifically hybridizes to the sequence derived from the methylated allele, and a FAM-labeled MGB Taqman® probe that binds to the sequence generated from the unmethylated allele (Fig. 1). The amount of FAM and VIC fluorescence released during PCR was measured by real-time PCR system and is directly proportional to the amount of the PCR product generated. The cycle number at which the fluorescence signal crosses a detection threshold is referred to as CT and the difference of both CT values within a sample (ΔCT) is calculated (ΔCT = CT-FAM - CT-VIC). All samples were measured in duplicate using the mean for further analysis. For precise quantification of the ratio of methylated to unmethylated alleles, the ΔCT value

Table 1 Sequences of primers and MGB Taqman® probes for QAMA.

Target genes	Amplified sequence location	Forward primers	Reverse primers	MGB Taqman® probes	
				Methylated	Unmethylated
BRCA1	17: 41278096 to 41278175 ^a	5'-GGAGTTTGGGGTAAGTAGTTTGTGAAG-3'	5'-TTCCCTACCCCAACAAT-3'	5'-VIC-ACTACGTCCTCCCAAA-MGBNFQ-3'	5'-6FAM-ACTACATCCCAAA-MGBNFQ-3'
BRCA2	13: 32889345 to 32889428 ^a	5'-GTTGGAGTAAAAACAAGGGATGG-3'	5'-CCTTAAAAATCCCAACCACC-3'	5'-VIC-AAACCCCTTATAC-MGBNFQ-3'	5'-6FAM-AAACCCCTTATACC-MGBNFQ-3'

^a Ensembl (GRCh37/hg19) assembly.

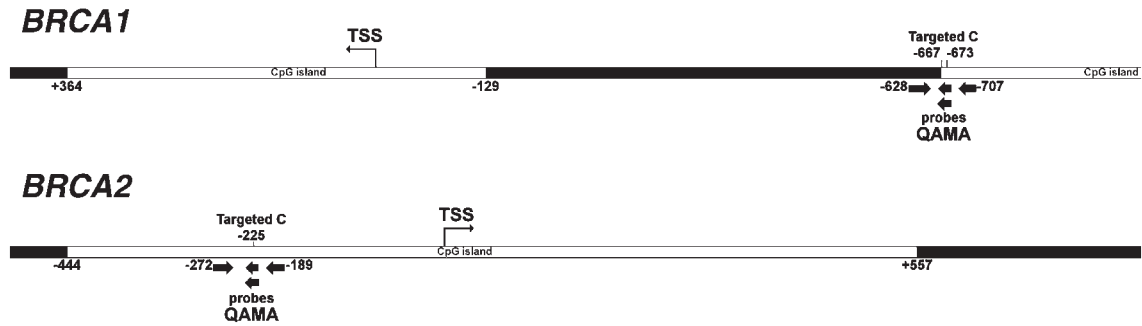


Fig. 1. Map of the *BRCA1* and *BRCA2* promoter regions studied by the QAMA assay. CpG islands were annotated using <http://epinexus.usc.edu/cpgannot.html> with the Takai-Jones criteria. The numbering of the promoter refers to the TSSs of the genes (at chr17: 41,277,468 for *BRCA1* and chr13:32,889,617 for *BRCA2* with GRCh37/hg19 Assembly). TSS denotes the transcription start site. The positions of the primers flanking QAMA amplicons are indicated as well as the position of the probes and the position of the targeted cytosines and CpG islands.

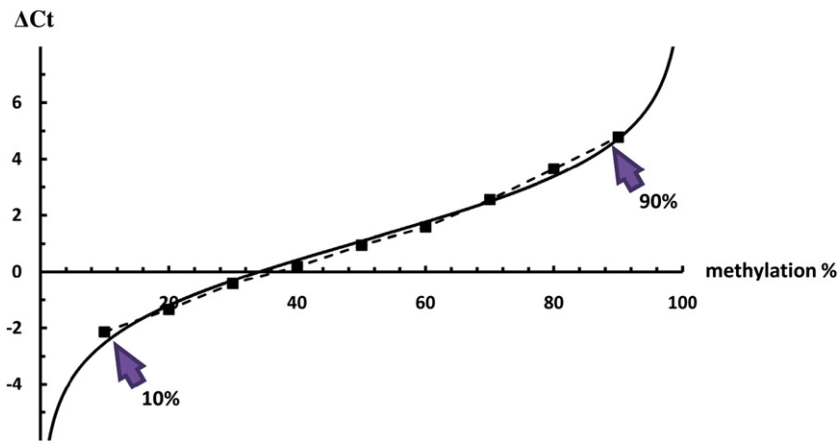


Fig. 2. Standard curve as obtained by plotting the ΔC_T values against the predefined methylation ratio of each sample. The relative prevalence of either the methylated or the unmethylated allele was set to 100% in the case that only one fluorescence signal crossed the threshold, indicating a relative absence of the opposite target.

is determined and compared to a standard curve (Fig. 2). To set up the *BRCA1* or *BRCA2* methylation assays, we mixed bisulfite-treated and methylated control human DNA (EpiTect, ref. 59655, Qiagen) with defined ratios of bisulfite-treated and unmethylated control human DNA (EpiTect, ref. 59665, Qiagen) implemented in each run.

After bisulfite modification, each sample was examined by real-time PCR analysis in duplicate. We correlated the ΔC_T values with the predefined prevalence of methylated alleles. The curve exhibits a sigmoid shape with a linear part in the range of 10–90% of methylated DNA. From this we deduced, thanks to the Mathematica notebooks given in the supplementary materials [8], an algorithm to calculate the methylation ratio of an unknown sample from its ΔC_T value by the Mathematica software package 5.2 from Wolfram Research (<http://www.wolfram.com>).

3. Results

3.1. *BRCA1* promoter methylation in PBCs from ovarian cancer patients and controls

DNA samples extracted from PBCs from 51 ovarian cancer patients and 349 healthy controls were subjected to QAMA (Fig. 3). *BRCA1* promoter methylation in PBCs corresponded to 46.08% with a SEM = 2.05% in ovarian cancer patients and to 52.05% with a SEM = 0.70% in controls. We demonstrated a significant *BRCA1* promoter hypomethylation in PBCs of sporadic ovarian cancer patients by comparison with controls ($p = 0.006$).

3.2. *BRCA2* promoter methylation in PBCs from ovarian cancer patients and controls

DNA samples extracted from PBCs from 51 ovarian cancer patients and 349 healthy controls were subjected to QAMA (Fig. 4). *BRCA2* promoter methylation in PBCs corresponded in ovarian cancer

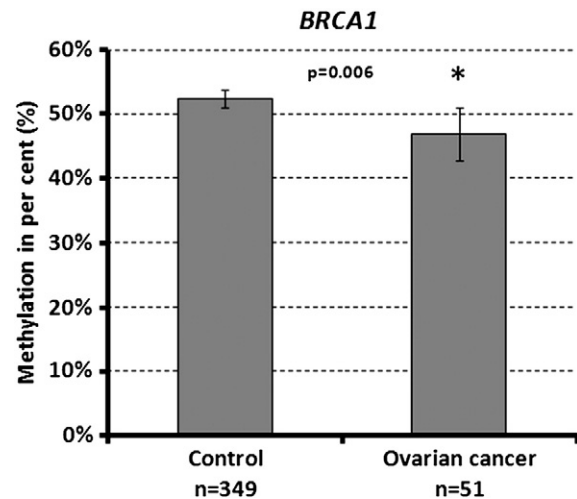


Fig. 3. Distribution of *BRCA1* methylation status in a case-control study of 51 sporadic ovarian carcinomas and 349 healthy women ($\pm 95\%$ CI).

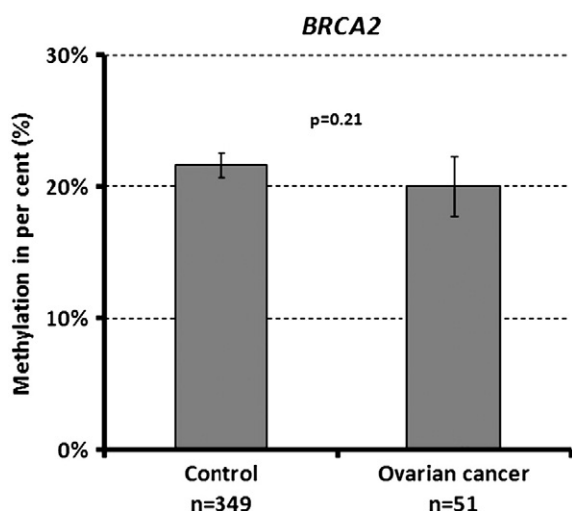


Fig. 4. Distribution of *BRCA2* methylation status in a case-control study of 51 ovarian cancer cases and 349 healthy women ($\pm 95\%$ CI).

patients to 19.99% with a SEM = 1.14% and in controls to 21.62% with a SEM = 0.46%. We found an insignificant *BRCA2* promoter hypomethylation in PBCs of sporadic ovarian cancer patients by comparison with controls ($p = 0.21$).

4. Discussion

We detected with the QAMA, in ovarian cancer patients, a significant *BRCA1* promoter hypomethylation in PBCs corresponding to 46.08% by comparison to controls with 52.05%. Our results are consistent with different previous reports. First, those by Catteau et al. [10] who showed in sporadic ovarian adenocarcinoma ($n = 43$) using Southern analyses that methylation within the *BRCA1* promoter region was detected in 5% of ovarian cancer. They also compared their results to a group of sporadic invasive breast carcinoma ($n = 96$) and they found methylation in 11% of breast cancer cases.

Other previous studies had reported that hypomethylation was detected in the majority of ovarian cancer cells [11,12]. More lately, Wang et al. [13] reported that the frequency of *BRCA1* methylation in the platinum-sensitive human ovarian cancer cell line COC1 was higher than in platinum-resistant cell line COC1/DDP and SKOV-3 cell lines and they demonstrated that the methylation status is associated with the cisplatin based chemosensitive response in ovarian cancer.

For *BRCA2* promoter in PBCs we reported an insignificant hypomethylation, corresponded in ovarian cancer patients to 19.99% by comparison with controls to 21.62% ($p = 0.21$).

Our results are in agreement with Collins et al. [14] who reported an absence of methylation of CpG dinucleotides within the promoter of *BRCA2* in normal tissues and in breast and ovarian cancers. They concluded that methylation was not detected in any of the tissues examined, suggesting that this mechanism of transcriptional repression is unlikely to explain the absence of somatic mutations in sporadic cancers.

Then, Gras et al. [15] reported a lack of *BRCA2* promoter hypermethylation in sporadic epithelial ovarian tumors by methylation specific PCR.

And lately, Dhillon et al. [16] reported the frequencies of CpG methylation in Granulosa cell tumors of ovarian origin ($n = 25$) that

were respectively 28% for *FHIT*, 24% for *FNACF*, 12% for *cyclin D2*, 56% for *RUNX3* and finally 4% for *BRCA2* (1/25). They also used methylation specific PCR. There exist two different pathways that can contribute to the development of cancers; genome-wide hypomethylation may lead to the loss of chromosomes leading to chromosomal instability, whereas promoter methylation in tumor suppressor genes, which are responsible for gene silencing, can lead to the development of cancers in somatic cells [17]. Therefore the balance in DNA methylation is very important, and alteration in these may be protective in one pathway but deleterious in the other.

In summary, *BRCA1* or *BRCA2* promoter methylation in PBCs might represent a new target for improving ovarian cancer detection and subsequently ovarian cancer treatment.

Acknowledgements

The full disclosure presents no conflict of interest. This work was supported by La Ligue Contre Le Cancer (Comité de l'Allier). Rémy Bosviel is the recipient of a grant from the Auvergne Regional Council / CPER 2008 + FEDER n°32316 – 0930FDBG – 106NL.

References

- [1] Ozols RF, Bookman MA, Connolly DC, et al. Focus on epithelial ovarian cancer. *Cancer Cell* 2004;5:19–24.
- [2] Fojo T, Bates S. Strategies for reversing drug resistance. *Oncogene* 2003;22:7512–23.
- [3] Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;128:683–92.
- [4] Konstantinopoulos PA, Fountzilas E, Pillay K, et al. Carboplatin-induced gene expression changes in vitro are prognostic of survival in epithelial ovarian cancer. *BMC Med Genomics* 2008;1:59.
- [5] Vardi A, Bosviel R, Rabiau N, et al. Soy phytoestrogens modify DNA methylation of *GSTP1*, *RASSF1A*, *EPH2* and *BRCA1* promoter in prostate cancer cells. *2010*;24:393–400.
- [6] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821–6.
- [7] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000;28:E32.
- [8] Zeschnick M, Bohringer S, Price EA, Onadim Z, Maschofer L, Lohmann DR. A novel real-time PCR assay for quantitative analysis of methylated alleles (QAMA): analysis of the retinoblastoma locus. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e125.
- [9] Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1827–31.
- [10] Catteau A, Harris WH, Xu CF, Solomon E. Methylation of the *BRCA1* promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene* 1999;18:1957–65.
- [11] Chan KY, Ozcelik H, Cheung AN, Ngan HY, Khoo US. Epigenetic factors controlling the *BRCA1* and *BRCA2* genes in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res* 2002;62:4151–6.
- [12] Teodoridis JM, Hall J, Marsh S, et al. CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer. *Cancer Res* 2005;65:8961–7.
- [13] Wang YQ, Zhang JR, Li SD, et al. Aberrant methylation of breast and ovarian cancer susceptibility gene 1 in chemosensitive human ovarian cancer cells does not involve the phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt pathway. *Cancer Sci* 2010;101:1618–23.
- [14] Collins N, Wooster R, Stratton MR. Absence of methylation of CpG dinucleotides within the promoter of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2* in normal tissues and in breast and ovarian cancers. *Br J Cancer* 1997;76:1150–6.
- [15] Gras E, Cortes J, Diez O, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 13q12-q14, *BRCA-2* mutations and lack of *BRCA-2* promoter hypermethylation in sporadic epithelial ovarian tumors. *Cancer* 2001;92:787–95.
- [16] Dhillon VS, Shahid M, Husain SA. CpG methylation of the *FHIT*, *FANCF*, *cyclin-D2*, *BRCA2* and *RUNX3* genes in granulosa cell tumors (GCTs) of ovarian origin. *Mol Cancer* 2004;3:33.
- [17] Catteau A, Morris JR. *BRCA1* methylation: a significant role in tumour development? *Semin Cancer Biol* 2002;12:359–71.

Conclusions de la publication N°2 :

Dans cette étude, nous avons quantifié la méthylation des promoteurs des gènes *BRCA1* et *BRCA2* dans l'ADN extrait du sang périphérique de 51 patientes atteintes de cancer de l'ovaire et 349 femmes ne présentant aucune tumeur. Une méthylation significativement moins importante de *BRCA1* a été retrouvée tandis que la méthylation de *BRCA2* tend seulement à être plus faible dans l'ADN extrait du sang périphérique de patientes atteintes de cancer de l'ovaire par rapport aux personnes saines. Ce résultat est surprenant ; en effet, *BRCA1* est un oncosuppresseur, et la méthylation de son promoteur conduit à sa répression, ainsi une diminution de sa méthylation dans le cancer des ovaires signifierait une augmentation de son expression qui devrait donc éloigner le risque de cancer. Ce résultat résulte probablement du fait que nous avons étudié les cellules sanguines où l'hyperméthylation détectée dans certaines cellules tumorales de l'ovaire [171, 257], ne serait pas retrouvée, comme dans l'étude de Catteau *et al.* (1999) [151]. Le résultat que nous avons obtenu pourrait refléter cette absence de méthylation de *BRCA1* et l'hypométhylation de *BRCA1* détectée dans les cellules sanguines de patientes ayant développé un cancer de l'ovaire pourrait refléter le statut de méthylation d'autres tissus. Concernant la méthylation du promoteur de *BRCA2*, notre faible échantillon de patientes atteintes de tumeurs de l'ovaire est peut être responsable de l'absence de significativité du résultat retrouvé. Toutefois, l'absence de différence de méthylation dans le promoteur de *BRCA2* a été retrouvée dans plusieurs autres études [175, 258].

1.2. Dans le cancer du sein

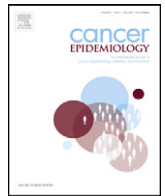
Présentation de la publication N°3 :

Les dérèglements dans la méthylation de l'ADN et plus particulièrement l'hyperméthylation de gènes suppresseurs de tumeurs, associée à l'hypométhylation globale de l'ADN, sont un phénomène connu dans la cancérogenèse [110, 259]. La détection de profils de méthylation locus spécifiques dans l'ADN de sang périphérique a montré leur potentiel rôle de marqueur du cancer du sein [170, 260, 261]. De plus, le gène *BRCA1*, dont la mutation est à forte pénétrance dans le cancer du sein héréditaire, est hyperméthylé au niveau de son promoteur dans une partie des cancers du sein sporadiques, conduisant à une diminution des ARNm et protéines BRCA1 [132, 133, 146, 262, 263]. L'ensemble de ces données nous ont conduits à étudier la méthylation du promoteur de *BRCA1* dans l'ADN extrait du sang de 990 patientes de la population COSA atteintes de cancers du sein, en opposition avec 902 femmes saines de la population témoin. De nombreuses données, obtenues grâce à un questionnaire, ont également permis d'obtenir des informations sur les caractéristiques anthropométriques (taille, poids, tour de taille et de hanche...), mais aussi hormonales (âge des premières règles, âge de la ménopause, prise de contraceptifs...) des patientes. L'influence de ces paramètres ainsi que de SNP précédemment étudiés, sur la méthylation de *BRCA1* ont également été analysés dans cette étude.

Publication N°3 :

« BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA was identified in sporadic breast cancer and controls »

Rémy Bosviel, Stéphane Garcia, Guillaume Lavediaux, Emilie Michard, Marine Dravers, Fabrice Kwiatkowski, Yves-Jean Bignon, Dominique J. Bernard-Gallon
Cancer Epidemiol. 2012, 36(3):e177-82.



BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA was identified in sporadic breast cancer and controls

Rémy Bosviel^{a,b,c}, Stéphane Garcia^{a,b,c}, Guillaume Lavediaux^{a,b,c}, Emilie Michard^{a,b,c},
Marine Dravers^{a,b,c}, Fabrice Kwiatkowski^{a,b,c}, Yves-Jean Bignon^{a,b,c,*}, Dominique J. Bernard-Gallon^{a,b,c}

^a Centre Jean Perrin, Département d'Oncogénétique, CBRV, 28 place Henri-Dunant, BP 38, 63001 Clermont-Ferrand, France

^b CRNH, 58 rue Montalembert, BP 321, 63009 Clermont-Ferrand, France

^c Université d'Auvergne, EA 4233 Nutrition, Cancérogénèse et Thérapie anti-tumorale, 28 place Henri-Dunant, BP 38, 63001 Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 September 2011

Received in revised form 1 February 2012

Accepted 2 February 2012

Available online 7 March 2012

Keywords:

Breast cancer

BRCA1

DNA methylation

ABSTRACT

Objective Epigenetics, particularly DNA methylation, has recently been shown to be important in breast cancer initiation. We investigated the clinical and prognostic importance of whole blood breast cancer early onset gene 1 (*BRCA1*) DNA methylation in sporadic breast cancer. **Methods** Genomic DNA was extracted from the peripheral blood cells (PBCs) of 902 breast cancer patients at diagnosis, with no *BRCA1* mutation, and 990 control women. DNA methylation was measured by quantitative analysis of methylated alleles (QAMA) to estimate the extent of methylation of 2 CpG sites in the promoter region of *BRCA1* oncosuppressor. **Results** *BRCA1* promoter methylation rate in PBCs was 47.1% with a 95% confidence interval [46.1; 48.1] in breast cancer patients, and 45.9% with a 95% confidence interval [45.0; 46.8] in controls. We found a trend toward *BRCA1* promoter hypermethylation in PBCs of sporadic breast cancer patients compared with controls. Association between methylation and clinicopathological features was evaluated using statistical tests. *BRCA1* promoter methylation in PBCs increased significantly in breast cancer patients compared with controls, for age over 70 years ($p = 0.022$), in post-menopausal status ($p = 0.013$), for a body mass index (BMI) <20 ($p = 0.0095$) or a waist-to-hip ratio (WHR) ≤ 76.8 ($p = 0.0027$). We also found an association of increased *BRCA1* promoter methylation in PBCs with ACA/ACA genotype for the SNP Thr594Thr in *ESR* (estrogen receptor gene), known to be associated with breast cancer risk ($p = 0.092$), reflecting the reduced presence of this genotype in this breast cancer case-control study. **Conclusion** Analysis of site-specific DNA methylation in PBCs by QAMA provides quantitative DNA methylation values that may serve as important prognostic indicators.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Approximately 5% of all breast cancers are caused by inherited mutations in breast cancer susceptibility genes such as *BRCA1* and *BRCA2* [1,2]. Although somatic mutations of the

BRCA1 and *BRCA2* genes are rare, several lines of evidence implicate reduced *BRCA1* gene expression in sporadic tumors [3,4]. Epigenetic regulation, especially promoter methylation, is an important mechanism for down-regulating tumor suppressor genes in human cancer cells [5,6]. Methylation of the *BRCA1* promoter has been reported in sporadic breast cancer with links to reduced mRNA and protein expression in tumors and cancer cell lines [4,7–10]. Other genes have also been found to exhibit promoter hypermethylation resulting in gene silencing in cancer [11]. Global DNA hypomethylation and locus-specific methylation patterns in peripheral blood DNA were found to be potential surrogate markers for breast cancer risk [12–14]. The analysis of DNA methylation could thus offer a simple, barely invasive test for breast cancer detection. Given the above findings in favor of analyzing global and specific methylation and cancer risk predisposition, we studied the prognostic significance of whole blood DNA methylation levels in the promoter region of the *BRCA1* gene using quantitative analysis of methylated alleles (QAMA).

Abbreviations: PBCs, peripheral blood cells; QAMA, quantitative analysis of methylated alleles; SNP, single nucleotide polymorphisms; *ESR*, estrogen receptor gene; COSA, breast and ovarian cancer in Auvergne; ARDOC, Organized Regional Screening Program Association; MGB, minor groove binder; WHR, waist-to-hip ratio; BMI, body mass index; SBR, Scarff–Bloom–Richardson; ERT, ER- α target; PCGT, polycomb group target; GC, gastric cancer; TSG, tumor suppressor gene.

* Corresponding author at: Département d'Oncogénétique, Centre Jean Perrin, 58 rue Montalembert, BP 392, 63011 Clermont-Ferrand, France. Tel.: +33 473278201; fax: +33 473278042.

E-mail addresses: remy.bosviel@u-clermont1.fr (R. Bosviel), steph0.63@hotmail.fr (S. Garcia), lavediaux.guillaume@wanadoo.fr (G. Lavediaux), emilie.michard03@gmail.com (E. Michard), m.dravers@laposte.net (M. Dravers), fabrice.kwiatkowski@cjp.fr (F. Kwiatkowski), yves-jean.bignon@cjp.fr (Y.-J. Bignon), dominique.bernard-gallon@cjp.fr (D.J. Bernard-Gallon).

Table 1
Primers and MGB Taqman[®] probes for methylated and unmethylated *BRCA1* alleles.

Sequence location	Primers		MGB Taqman [®] probes	
	Forward	Reverse	Methylated	Unmethylated
17: 41278096 to 41278175 ^a	5'-GGAGTTTGGGTAAG-TAGTTTTGTAAG-3'	5'-TTCCCTACCCAAA-CAAATT-3'	5'-VIC-ACTACGTCCC-CGAAA-MGBNFQ-3'	5'-6FAM-ACTACATCCCC-ACAAAC-MGBNFQ-3'

^a Ensembl (GRCh37/hg19) assembly.

2. Patients and methods

2.1. Patients suffering from sporadic breast cancer and controls

Eligible patients ($n = 902$) were women aged 26–89 years diagnosed with breast cancer with no *BRCA* mutation and no more than one first degree relative breast cancer. They all participated in the COSA program (breast and ovarian cancer in Auvergne) between November 1996 and November 1999 in different hospitals in the Auvergne region of France.

Eligible controls ($n = 990$) were women with no previous history of cancer, no more than one first degree relative breast cancer and resident in Auvergne. They were enrolled in 2005 and 2006 in a mammographic screening center. Most of the volunteers were women who attended screening in response to the Organized Regional Screening Program Association (ARDOC).

Written informed consent was obtained from all the cases and controls, and data on them were obtained using a questionnaire [15–17].

2.2. Blood collection and DNA extraction

A 10 ml blood sample was collected from each participant in an EDTA tube and stored frozen until DNA extraction. Whole blood DNA was extracted using a commercial kit (Euromedex, Souffelweyersheim, France) and stored until processing for analysis. DNA had been used for previous experiments including genotyping of the *ESR* (estrogen receptor gene) Thr⁵⁹⁴Thr single nucleotide polymorphism [17].

2.3. Bisulfite conversion and quantitative analysis of methylated alleles (QAMA)

To perform bisulfite conversion of the target sequence, the methylSEQ[™] Bisulfite Modification Kit (Applied Biosystems) was used, following the manufacturer's protocol.

As reported previously [18], we used the real-time PCR-based QAMA assay developed by Zeschnigk *et al.* [19]. PCR was performed using a 96-well optical plate at a final reaction volume of 20 μ l. Samples contained 10 μ l of TaqMan[®] Universal PCR Master Mix II, No AmpErase[®] UNG (uracil-*N*-glycosylase), 8 μ l of bisulfite-treated DNA, an additional 5 U of FastStart Taq DNA

Polymerase (Roche), 2.5 μ M of each primer and 150 nM of each fluorescently labeled (methylated and unmethylated) *BRCA1* probe. Initial denaturing at 95 °C for 10 min to activate DNA polymerase was followed by 40 cycles of denaturing at 95 °C for 15 s and annealing and extension at 60 °C for 1 min (Applied Biosystems, 7900HT, Real-Time PCR System). Primer and probe sequences are shown in Table 1 and were selected with Primer Express software (ABI). PCR primers were designed to amplify the bisulfite-converted sense strand of the CpG island *BRCA1* promoter sequence, lacking any known nucleotide polymorphisms. The software designed primers with a melting temperature (T_m) of 58–60 °C and probes with T_m value of 68–69 °C. The T_m values of the two primers should be equal. The amplicon sizes were 79 bp for *BRCA1*. The primer binding sites lack CpG dinucleotides and so the nucleotide sequences in methylated and unmethylated DNA were identical after bisulfite treatment. Consequently, both alleles could be amplified in the same reaction tube with one primer pair. Methylation discrimination occurs during probe hybridization by the use of two different minor groove binder (MGB) Taqman[®] probes. The binding site of both *BRCA1* MGB Taqman[®] probes covered 2 CpG dinucleotides selected to meet design constraints. We used a VIC-labeled MGB Taqman[®] probe that specifically hybridizes to the sequence derived from the methylated allele, and a FAM-labeled MGB Taqman[®] probe that binds to the sequence generated from the unmethylated allele (Fig. 1). The amount of FAM and VIC fluorescence released during PCR was measured by a real-time PCR system and was directly proportional to the amount of the PCR product generated. The cycle number at which the fluorescence signal crossed a detection threshold was noted C_T and the difference between the two C_T values in a sample (ΔC_T) was calculated ($\Delta C_T = C_{T-FAM} - C_{T-VIC}$). All the samples were measured in duplicate using the mean for further analysis. For precise quantification of the ratio of methylated to unmethylated alleles, the ΔC_T value was determined and compared with a standard curve (Fig. 2), plotted by mixing, after bisulfite treatment, methylated human control DNA (EpiTect, ref. 59655, Qiagen) and unmethylated human control DNA (EpiTect, ref. 59665, Qiagen) in set ratios. We thence deduced an algorithm to calculate the methylation ratio of an unknown sample from its ΔC_T value using the Mathematica software package 5.2 from Wolfram Research (<http://www.wolfram.com>).

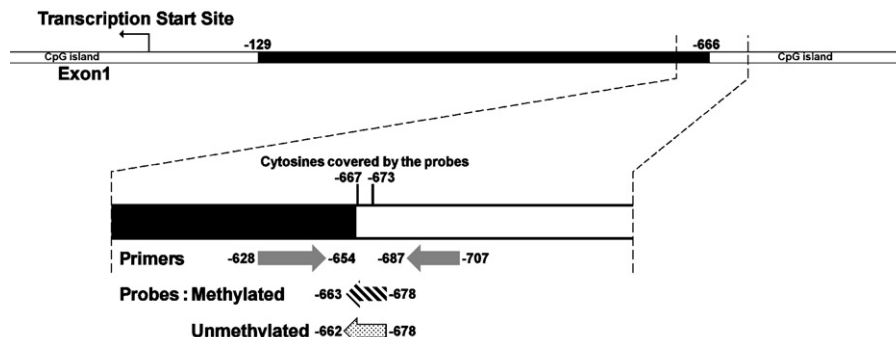


Fig. 1. Position of informative CpG sites in the range –667 to –673 according to recognition sites of QAMA probes in the *BRCA1* promoter.

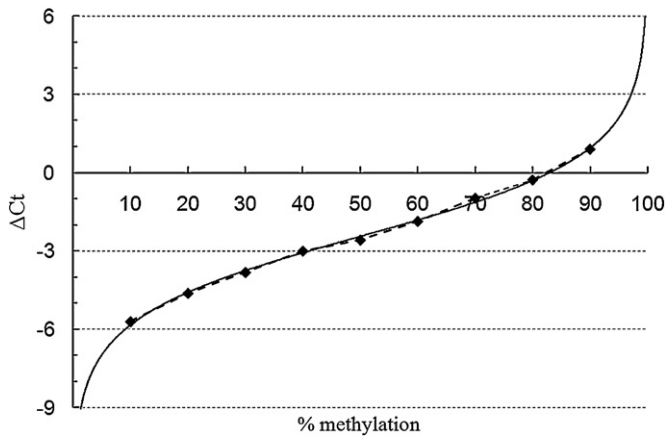


Fig. 2. ΔC_t values plotted against preset methylation ratio in different samples from 10% to 90% to obtain the standard curve.

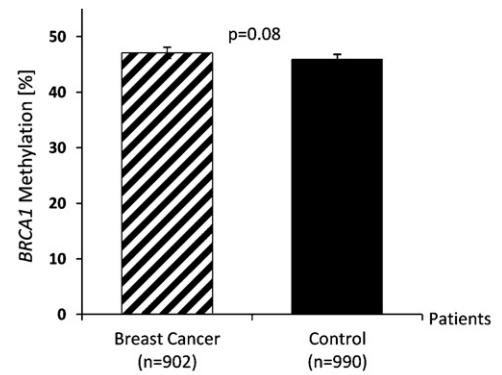
2.4. Statistical analyses

For comparison of two populations with a Gaussian distribution, a Student *t* test was used for equal variance populations; in other cases a Z-score test ($n \geq 30$) was used. For comparison in more than two populations, variance analysis was performed. Finally, a Kruskal–Wallis test was performed for non-Gaussian population comparisons.

3. Results

3.1. BRCA1 promoter methylation in PBCs from breast cancer patients and controls

DNA samples extracted from PBCs from 902 breast cancer patients and 990 healthy controls underwent QAMA (Fig. 3). BRCA1 promoter methylation rate in PBCs was 47.1% with a 95%



Patients	Mean	Standard Deviation	95% Confidence Interval	<i>p</i>
Breast Cancer (n=902)	47.1	15.3	[46.1 ; 48.1]	0.08
Control (n=990)	45.9	14.6	[45.0 ; 46.8]	

Fig. 3. Analysis of breast cancer vs. control patients based on methylation patterns of BRCA1 gene in PBCs.

confidence interval [46.1; 48.1] in breast cancer patients, and 45.9% with a 95% confidence interval [45.0; 46.8] in controls. We found a trend toward BRCA1 promoter hypermethylation in PBCs of sporadic breast cancer patients compared with controls, although the difference was non-significant ($p = 0.08$).

Demographics of breast cancer patients and controls are shown in Table 2. BRCA1 promoter methylation in PBCs was significantly associated with age in breast cancer patients ($p = 0.017$). The BRCA1 promoter methylation increased in breast cancer patients aged over 70 years. Also, the BRCA1 promoter methylation increased significantly in breast cancer patients compared with controls included in the study and preferentially aged over 70 years ($p = 0.022$).

Table 2

Demographics of breast cancer patients and controls and their association with BRCA1 promoter methylation in PBCs (%).

	Breast cancer patients				Comparison in the category	Controls				Patients/Controls comparison		
	Number	Average	SD	CI95%		Number	Average	SD	95%CI			
	902	47.1	15.3	46.1–48.1		990	45.9	14.6	45.0–46.8	$p = 0.08$		
Age												
<50 years	260	46.3	14.5	37.3–56.8	$p = 0.017$	141	44.1	13.4	41.9–46.3	$p = 0.13$		
[50–60]years	254	46.9	16.5	44.8–48.9		442	46.7	14.4	45.3–48.0		$p = 0.22$	
[60–70]years	228	45.9	14.3	44.0–47.8		309	46.1	14.9	44.5–47.8			$p = 0.85$
≥ 70 years	160	50.5	15.3	48.2–52.9		98	44.4	15.9	41.2–47.5		$p = 0.022$	
Menopausal status												
Premenopausal	278	45.9	14.7	44.1–47.6	$p = 0.065$	248	45.6	13.4	43.9–47.2	$p = 0.64$	$p = 0.81$	
Postmenopausal	568	48.1	15.6	46.9–49.4		742	46.0	15.0	45.0–47.1		$p = 0.013$	
BMI												
<20	101	47.8	15.3	44.8–50.8	$p = 0.1$	135	42.8	14.0	40.4–45.1	$p = 0.0095$	$p = 0.81$	
[20–25]	406	46.6	14.3	45.2–48.0		547	45.9	14.9	44.7–47.2		$p = 0.019$	$p = 0.97$
[25–30]	225	46.6	16.3	44.4–48.7		221	46.6	14.2	44.8–48.5			$p = 0.43$
≥ 30	111	50.5	16.4	47.4–53.5		87	48.8	14.2	45.8–51.8			
WHR												
<76.8	111	48.5	17.4	45.2–51.7	$p = 0.36$	327	44.4	14.6	42.8–46.0	$p = 0.001$	$p = 0.027$	
[76.8–81.7]	172	46.3	13.6	44.2–48.3		269	44.4	14.1	42.7–46.1		$p = 0.17$	
[81.7–87.5]	204	46.6	14.6	44.6–48.6		241	48.1	14.9	46.2–50.0		$p = 0.29$	
> 87.5	281	48.4	15.8	46.6–50.3		151	48.3	14.4	46.0–50.1		$p = 0.95$	
ESR Thr ⁵⁹⁴ Thr												
ACA/ACA	30	53.7	19.3	46.9–60.6	$p = 0.092$	39	48.8	13.5	44.6–53.1	$p = 0.015$	$p = 0.22$	
ACA/ACG	246	47.9	15.5	46.0–49.9		273	47.7	14.3	46.0–49.4		$p = 0.81$	
ACG/ACG	625	46.5	14.8	45.4–47.7		672	45.0	14.7	43.9–46.1		$p = 0.89$	

BMI = body mass index; WHR = waist-to-hip ratio; ESR Thr⁵⁹⁴Thr = threonine 594 polymorphism in estrogen receptor gene; 95%CI = 95% confidence interval; SD = standard deviation.

In women with post-menopausal status, there was a significant increase in *BRCA1* promoter methylation in breast cancer patients compared with controls ($p = 0.013$).

As the body mass index (BMI) increased, *BRCA1* promoter methylation significantly increased in controls ($p = 0.019$), but we also observed a trend toward *BRCA1* promoter hypermethylation in the breast cancer patients. In addition, *BRCA1* promoter methylation was higher in breast cancer patients than in controls. BMI < 20 showed a significant increase in *BRCA1* promoter methylation of breast cancer patients compared with controls ($p = 0.0095$).

As the waist-to-hip ratio (WHR) increased, *BRCA1* promoter methylation significantly increased in controls ($p = 0.001$); in the breast cancer patients a trend toward *BRCA1* promoter hypermethylation was observed. Also, *BRCA1* promoter methylation was higher in breast cancer patients than in controls. WHR ≤ 76.8 showed a significant increase in *BRCA1* promoter methylation of breast cancer patients compared with controls ($p = 0.0027$).

Concerning the single nucleotide polymorphism (SNP) in *ESR* Thr⁵⁹⁴Thr [db SNP: rs2228480], known to be associated with breast cancer risk [17,20], we found a significant difference in *BRCA1* promoter methylation according to the genotype with this polymorphism in controls ($p = 0.015$). In particular, with the ACA/ACA genotype, we observed an association with *BRCA1* promoter methylation, and a high increase in both breast cancer patients and controls was seen, but the difference was non-significant, due to the scarcity of this genotype in this breast cancer case-control study.

3.2. Distribution of *BRCA1* promoter methylation in peripheral blood according to clinicopathological characteristics of breast tumors

In breast cancer patients, the relationship between *BRCA1* promoter methylation in peripheral blood and clinicopathological characteristics of studied breast tumors are shown in Table 3. *BRCA1* promoter methylation in peripheral blood was not significantly associated with Scarff–Bloom–Richardson (SBR) grade, tumor size, histological type, or lymph node metastasis despite the small sample sizes. However, according to the SBR grade and the tumor size, a trend to increased *BRCA1* promoter methylation was observed.

4. Discussion

The extent of *BRCA1* promoter methylation in PBCs was 47.1% with a 95% confidence interval [46.1; 48.1] in breast cancer patients ($n = 902$) and to 45.9% with a 95% confidence interval [45.0; 46.8] in controls ($n = 990$). We found a trend toward *BRCA1* promoter hypermethylation in PBCs of sporadic breast cancer patients compared with controls, although the difference was non-significant ($p = 0.08$).

Our results are consistent with those of Snell *et al.*, who had a small sample size ($n = 7$), but demonstrated that promoter methylation in PBCs could be detected in three out of seven familial breast cancer patients, and that all breast tumors in such patients carried *BRCA1* promoter methylation [21].

More recently, Iwamoto *et al.* studied the association of *BRCA1* promoter methylation in PBCs with breast cancer risk in a case-control study (200 breast cancer patients and 200 controls). *BRCA1* promoter methylation in PBCs was seen in 43 (21.5%) of breast cancer patients and in 27 (13.5%) of the controls [22].

Detection of *BRCA1* methylation in blood seems quite representative of *BRCA1* methylation [23–25], although few blood cells display this methylation [21].

Other authors previously used quantitative methylation analysis in a case-control study ($n = 1083$) in PBCs to predict breast cancer risk. They demonstrated that only *ER- α target (ERT)* genes and *PCGT (polycomb group target)* genes were important predictors of breast cancer risk [14].

To complete the study of the DNA methylation, which plays an important role in biological processes in human health and cancer, recent technological advances allow whole-genome DNA methylation (methylome) analysis to be carried out on PBCs. PBCs are an important source for clinical blood tests worldwide. Analysis of the PBC methylome has revealed a rich epigenomic landscape for 20 distinct genomic features, including regulatory, protein-coding, non-coding, RNA-coding, and repeat sequences [26].

In gastric cancer (GC), it was found by pyrosequencing in PBCs that older GC patients had increased whole DNA methylation levels in the promoter of the *CDH1*, *p53*, and *RUNX3* genes, a preliminary analysis suggesting that epigenetic changes detected in whole blood DNA were associated with several prognostic

Table 3
Comparison of clinicopathological characteristics of tumors with *BRCA1* methylation in PBCs (%) in breast cancer patients.

	<i>BRCA1</i> promoter methylation in peripheral blood (%)				
	Breast cancer patients				Comparison in the category ^a
	Number	Average	SD	95%CI	
	902	47.1	15.3	46.1–48.1	
SBR degree					
1	251	47.4	14.1	45.7–49.1	$p = 0.11$
2	301	46.6	15.4	44.8–48.3	
3	131	49.8	14.9	47.3–52.4	
Histological type					
IDC	617	47.3	15	46.1–48.5	$p = 0.6$
ILC	113	46.3	16.6	43.2–49.3	
Other	171	47.0	15.4	44.7–49.3	
Tumor size					
Infraclinic	130	47.3	14.9	44.8–49.9	$p = 0.16$
<2 cm	166	45.7	14.9	43.5–48.0	
2–5 cm	154	48.8	15.3	46.4–51.2	
>5 cm	27	51.7	12.6	46.7–56.7	
Epidermal invasion	29	50.3	15.6	44.4–56.2	
Lymph node metastasis					
N0	393	47.8	15.2	46.3–49.3	$p = 0.71$
N1–N2	116	47.3	14.6	44.6–49.9	

95%CI = 95% confidence interval; SD = standard deviation; SBR = Scarff–Bloom–Richardson; IDC = invasive ductal carcinoma; ILC = invasive lobular carcinoma; N0 = no invasive lymph node and N1–N2 = invasive lymph nodes.

^a Student *t* test.

factors so that these results could benefit patients in terms of treatment protocol design and follow-up. In addition, the present study quantifying DNA methylation may serve as a non-invasive prognostic tool [27]. In addition, our results correlated with increased DNA methylation levels in older patients, *BRCA1* promoter methylation in PBCs increasing significantly in breast cancer patients compared with controls, with age over 70 years ($p = 0.022$).

Similarly, other authors have presented promising data with the design of a panel of tumor suppressor genes (TSG), and have developed a blood-based screening method for breast cancer that relies on pathologic methylation changes. Tissue-specific and blood-based methylation markers might be valuable as prognostic and predictive markers for breast cancer, and for developing novel targeted therapeutic strategies. With this in mind, they studied 126 samples comprising 36 plasma samples from breast cancer patients, 30 healthy plasma samples and 60 triple samples (tumor tissue, matched normal tissue and serum sample) from 20 patients with non-familial breast cancer. Hierarchical clustering showed significant hypermethylation patterns for serum and tumor tissue compared with normal tissue for seven genes (*APC*, *BIN1*, *BMP6*, *BRCA1*, *CST6*, *P16* and *TIMP3*) [28].

In our study, the association of *BRCA1* methylation in PBCs with other parameters, such as age (over 70 years), menopausal status, BMI and WHR or even the *ESR* Thr⁵⁹⁴Thr SNP could offer breast cancer detection markers.

We found no increase in *BRCA1* promoter methylation with aging in controls, whereas a higher methylation rate was found for breast cancer patients aged over 70 years ($p = 0.017$). Our results also show that this *BRCA1* promoter methylation in breast cancer patients aged over 70 years is higher than in the control population. As we showed that breast cancer patients aged over 70 years had a higher *BRCA1* promoter methylation in PBCs, we suggest that the screening of this parameter in women aged over 70 years could be used for breast cancer detection.

The results obtained concerning menopausal status and association with *BRCA1* promoter methylation suggest a pattern similar to age (which could thus be a confounding factor), and so the screening of *BRCA1* promoter methylation in PBCs of women who have reached menopause could be considered.

BMI and WHR showed that in the control population, the higher the values of these parameters, the higher the methylation in *BRCA1* promoter in PBCs. This result was not obtained in the breast cancer patient population, but methylation of *BRCA1* was significantly higher for low BMI and WHR scores in this population compared with the controls ($p = 0.0095$ and 0.027 , respectively). This suggests that women who develop breast cancer despite having a low BMI and/or WHR (*i.e.* women with low weight and/or fat located on the hips rather than the waist) have higher *BRCA1* methylation rates than healthy women. Screening such women could thus help diagnose breast cancer.

Finally, we found that women with ACA allele for the *ESR* Thr⁵⁹⁴Thr SNP had higher *BRCA1* promoter methylation in PBCs than other women, but only in the control population ($p = 0.015$). This result suggests that *BRCA1* methylation linked to this SNP is not associated with breast cancer, and could mean that *BRCA1* methylation might not, or at least not always, be a cause of breast cancer. The low number of ACA homozygous women in our population could also be the cause of this result.

We demonstrate that analysis of site-specific DNA methylation *BRCA1* in PBCs provides quantitative DNA methylation patterns that could be used as a biomarker for diagnosis and management of cancer patients. The mechanisms linking the methylation of *BRCA1* in PBCs and the different parameters studied have yet to be found, but we advocate further targeting of pathological epigenetic changes for therapeutic interventions.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This study was supported by “Ligue Nationale Française de Lutte Contre le Cancer” (Puy-de-Dôme, Allier and Cantal). Rémy Bosviel is a recipient of a grant from the Auvergne Regional Council/CPER 2008 + FEDER No. 32316 – 0930FDBG – 106NL.

References

- [1] Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science* 1994;266(5182):66–71.
- [2] Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature* 1995;378(6559):789–92.
- [3] Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the *BRCA1* gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 1997;57(16):3347–50.
- [4] Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and *BRCA1* inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(7):564–9.
- [5] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349(21):2042–54.
- [6] Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;128(4):683–92.
- [7] Matros E, Wang ZC, Lodeiro G, Miron A, Iglehart JD, Richardson AL. *BRCA1* promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Res Treat* 2005;91(2):179–86.
- [8] Rice JC, Massey-Brown KS, Futscher BW. Aberrant methylation of the *BRCA1* CpG island promoter is associated with decreased *BRCA1* mRNA in sporadic breast cancer cells. *Oncogene* 1998;17(14):1807–12.
- [9] Rice JC, Ozelik H, Maxeiner P, Andrulis I, Futscher BW. Methylation of the *BRCA1* promoter is associated with decreased *BRCA1* mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis* 2000;21(9):1761–5.
- [10] Wei M, Grushko TA, Dignam J, Hagos F, Nanda R, Sveen L, et al. *BRCA1* promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced *BRCA1* copy number and chromosome 17 aneusomy. *Cancer Res* 2005;65(23):10692–99.
- [11] Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 2007;447(7143):433–40.
- [12] Choi JY, James SR, Link PA, McCann SE, Hong CC, Davis W, et al. Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. *Carcinogenesis* 2009;30(11):1889–97.
- [13] Pal R, Srivastava N, Chopra R, Gochhait S, Gupta P, Prakash N, et al. Investigation of DNA damage response and apoptotic gene methylation pattern in sporadic breast tumors using high throughput quantitative DNA methylation analysis technology. *Mol Cancer* 2010;9:303.
- [14] Widschwendter M, Apostolidou S, Raum E, Rothenbacher D, Fiegl H, Menon U, et al. Epigenotyping in peripheral blood cell DNA and breast cancer risk: a proof of principle study. *PLoS One* 2008;3(7):e2656.
- [15] Bernard-Gallon D, Bosviel R, Delort L, Fontana L, Chamoux A, Rabiau N, et al. DNA repair gene *ERCC2* polymorphisms and associations with breast and ovarian cancer risk. *Mol Cancer* 2008;7:36.
- [16] Delort L, Kwiatkowski F, Chalabi N, Satih S, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ. Risk factors for early age at breast cancer onset – the “COSA program” population-based study. *Anticancer Res* 2007;27(2):1087–94.
- [17] Delort L, Satih S, Kwiatkowski F, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ. Evaluation of breast cancer risk in a multigenic model including low penetrance genes involved in xenobiotic and estrogen metabolisms. *Nutr Cancer* 2010;62(2):243–51.
- [18] Bosviel R, Michard E, Lavediaux G, Kwiatkowski F, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ. Peripheral blood DNA methylation detected in the *BRCA1* or *BRCA2* promoter for sporadic ovarian cancer patients and controls. *Clin Chim Acta* 2011;412(15–16):1472–5.
- [19] Zeschinik M, Bohringer S, Price EA, Onadim Z, Masshofer L, Lohmann DR. A novel real-time PCR assay for quantitative analysis of methylated alleles (QAMA): analysis of the retinoblastoma locus. *Nucleic Acids Res* 2004;32(16):e125.
- [20] de Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ, van der Graaf WT, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, et al. Genes other than *BRCA1* and *BRCA2* involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet* 2002;39(4):225–42.
- [21] Snell C, Krypuy M, Wong EM, Loughrey MB, Dobrovic A. *BRCA1* promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a *BRCA1* tumour phenotype. *Breast Cancer Res* 2008;10(1):R12.
- [22] Iwamoto T, Yamamoto N, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. *BRCA1* promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with *BRCA1* promoter methylation. *Breast Cancer Res Treat* 2010;129(1):69–77.
- [23] Jing F, Zhang J, Tao J, Zhou Y, Jun L, Tang X, et al. Hypermethylation of tumor suppressor genes *BRCA1*, *p16* and *14-3-3σ* in serum of sporadic breast cancer patients. *Onkologie* 2007;30:14–9.

- [24] Mirza S, Sharma G, Prasad CP, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD, et al. Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ERalpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci* 2007;81:280–7.
- [25] Sharma G, Mirza S, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD, Pandya P, et al. Clinical significance of promoter hypermethylation of DNA repair genes in tumor and serum DNA in invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci* 2010;87:83–91.
- [26] Li Y, Zhu J, Tian G, Li N, Li Q, Ye M, et al. The DNA methylome of human peripheral blood mononuclear cells. *PLoS Biol* 2010;8(11):e1000533.
- [27] Al-Moundhri MS, Al-Nabhani M, Tarantini L, Baccarelli A, Rusiecki JA. The prognostic significance of whole blood global and specific DNA methylation levels in gastric adenocarcinoma. *PLoS One* 2010;5(12):e15585.
- [28] Radpour R, Barekati Z, Kohler C, Lv Q, Burki N, Diesch C, et al. Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. *PLoS One* 2011;6(1):e16080.

Conclusions de la publication N°3 :

Dans cette étude, nous avons comparé le taux de méthylation du promoteur de *BRCA1* dans l'ADN extrait du sang de femmes ayant développé ou non un cancer sporadique du sein. Les données obtenues ont également été mises en relation avec des paramètres anthropométriques, hormonaux ou génétiques des patientes étudiées, afin d'observer d'éventuelles associations entre ces paramètres, la méthylation de *BRCA1* et le risque de développer un cancer du sein.

Aucune différence significative entre la méthylation du promoteur de *BRCA1* dans le sang périphérique de patientes atteintes de cancers du sein n'a été retrouvée par rapport au groupe témoin. Cette absence d'augmentation significative de *BRCA1* dans le groupe de patientes atteintes de cancer du sein pourrait signifier que l'augmentation de méthylation n'est pas liée à tous les cancers du sein, mais peut être à des sous-groupes. Nous observons en revanche une méthylation significativement plus forte du promoteur de *BRCA1* chez les patientes par rapport aux contrôles dans différentes catégories : les femmes de plus de 70 ans, ayant atteint le stade de ménopause, ou dont l'indice de masse corporelle (IMC) est inférieur à 20 ou le rapport tour de taille/tour de hanches (RTH) est inférieur à 76,8. De plus, la méthylation de *BRCA1* augmente significativement avec l'âge chez les patientes ayant développé un cancer du sein. Cette méthylation augmente également chez les femmes de la population témoin avec l'IMC, le RTH ou la présence de l'allèle ACG du SNP *ESR Thr594Thr*. Il ressort ainsi de cette étude que les femmes présentant une augmentation de méthylation de *BRCA1* avec l'âge sont plus à risque de développer un cancer du sein, de même que les femmes présentant une augmentation de la méthylation de *BRCA1* alors que leur masse grasseuse, particulièrement au niveau abdominal, est faible. Enfin, il semblerait l'allèle ACG du SNP *ESR Thr594Thr* puisse influencer positivement la méthylation de *BRCA1*. Cette étude ouvre des perspectives intéressantes sur les interactions entre masse grasseuse et méthylation de *BRCA1*, ainsi qu'entre le rôle du SNP *ESR Thr594Thr* dans la méthylation de *BRCA1*.

Présentation de la publication N°4 :

A notre connaissance, deux études montrent une augmentation de la méthylation du promoteur de *BRCA2* dans des cancers du sein sporadiques [169, 170], tandis que Collins *et al.* (1997) ne trouvent pas de différence significative entre les tissus sains et tumoraux [258]. Une étude antérieure montrait qu'une augmentation de l'ARNm de *BRCA2* était présente dans certains cancers du sein sporadiques [264]. Dans cette étude, nous avons voulu comparer le taux de méthylation du promoteur de *BRCA2* dans l'ADN extrait du sang de 873 femmes ayant développé un cancer sporadique du sein (population COSA) et 980 femmes de la population témoin. Les données obtenues ont également été mises en relation avec des paramètres anthropométriques (taille, poids, tour de taille et de hanche...), hormonaux (âge des premières règles, âge de la ménopause, prise de contraceptifs...), mais aussi génétiques (génotypes de SNP) des patientes étudiées, afin d'observer d'éventuelles associations entre ces paramètres, la méthylation de *BRCA2* et le risque de développer un cancer du sein.

Publication N°4 :

« *BRCA2* promoter hypermethylation in sporadic breast cancer »

Rémy Bosviel, Julie Durif, Jiaoli Guo, Mourad Mebrek, Fabrice Kwiatkowski, Yves-Jean Bignon, Dominique Bernard-Gallon
OMICS. 2012, 16(12):707-10.

BRCA2 Promoter Hypermethylation in Sporadic Breast Cancer

Rémy Bosviel, Julie Durif, Jiaoli Guo, Mourad Mebrek, Fabrice Kwiatkowski,
Yves-Jean Bignon, and Dominique J. Bernard-Gallon

Dear Editor:

BREAST CANCER is a multifactorial disease. It is the first cause of mortality per cancer for the woman in the world (Jemal *et al.*, 2011). The implication of specific genes, such as *BRCA1* and *BRCA2* tumor suppressor genes, has been shown in mammary carcinogenesis. In sporadic breast cancers, specific modifications of *BRCA1* and *BRCA2* mRNA expression have been reported too (Bernard-Gallon *et al.*, 1999; Bieche *et al.*, 1999). Epigenetic modifications such as promoter hypermethylation of the oncosuppressor genes *BRCA1* and *BRCA2* can play a role in the oncogenesis of cancer (Esteller *et al.*, 2000). Indeed, hypermethylation of the CpG islands in the promoters of these genes involve their inactivation and therefore a higher risk of developing a tumor (Baylin and Ohm, 2006; Moelans *et al.*, 2011; Rahmatpanah *et al.*, 2009).

We have compared the DNA methylation rates of the *BRCA1* and *BRCA2* gene promoters using DNA isolated from blood samples from COSA (Cancer d'Ovaire et du Sein en Auvergne) patients suffering from breast or ovarian cancer and from a population of healthy women. To this aim, the QAMA method (Quantitative Analysis of Methylated Alleles) was used (Zeschnek *et al.*, 2004) and adapted to *BRCA1* and *BRCA2* genes (Bosviel *et al.*, 2011). This method is based on bisulfite conversion of the nonmethylated cytosines and an analysis by qPCR using Taqman minor groove binder probes specific for methylated or nonmethylated target sites after conversion. Percentage of methylation is then obtained by calculating the difference between C_T values of the methylated DNA targeting probe and the nonmethylated DNA targeting probe (ΔC_T) and reporting the obtained values on a standard curve.

In a previous work, we reported that *BRCA1* methylation is significantly decreased in ovarian cancer by comparison with the control group. The comparison between the two different populations did not show any significant difference regarding *BRCA2* methylation but exhibited a trend in the decrease of *BRCA2* promoter methylation in peripheral blood DNA of sporadic ovarian cancer (Bosviel *et al.*, 2011).

Then we demonstrated a trend toward *BRCA1* promoter hypermethylation in PBCs of sporadic breast cancer patients by comparison with controls (Bosviel *et al.*, 2012). *BRCA1* promoter methylation in PBCs corresponded to 47.1% with CI 95% [46.1; 48.1] in breast cancer patients and to 45.9% with CI

95% [45.0; 46.8] in controls. Association between methylation level and clinicopathological features were evaluated using statistical tests. *BRCA1* promoter methylation in PBCs increased significantly in breast cancer patients by comparison with controls, with the age over 70 years old ($p=0.022$), in post menopausal status ($p=0.013$), with a BMI < 20 ($p=0.0095$), or with a WHR ≤ 76.8 ($p=0.0027$). We also found an association of increased *BRCA1* promoter methylation in PBCs with ACA/ACA genotype for the SNP Thr⁵⁹⁴Thr in *ESR* (estrogen receptor), known to be associated with breast cancer risk ($p=0.092$), due to the reduced presence of this genotype in this breast cancer case-control study.

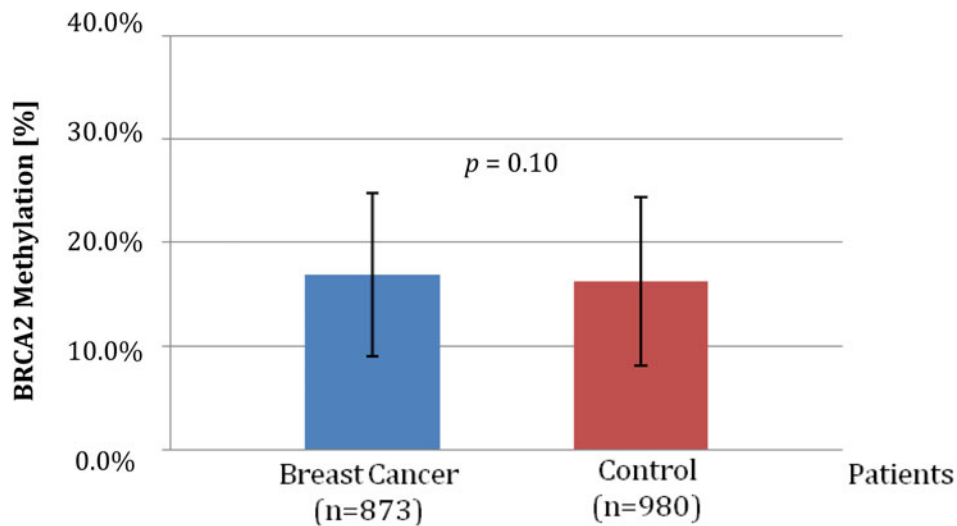
Within this study, the objective was to compare the methylation of the CpG islands present in the *BRCA2* promoter in the same population of women suffering from breast cancer compared to the control population. In total, 873 breast samples belonging to COSA and 980 control samples were converted and the methylation rates measured. The complete database of this study is available as supplementary data (supplementary data are available online at www.liebertonline.com/omi).

BRCA2 promoter methylation mean in PBCs is 16.9% (CI95% [16.3; 17.4]) in breast cancer patients and 16.2% (CI95% [15.7; 16.8]) in controls. The statistical analysis of the mean methylation rates obtained for the *BRCA2* promoter did not reveal a significant difference ($p=0.1$) between the two populations (Fig. 1).

Significant differences in methylation rates between patients and healthy women were, however, obtained for different subclasses (Table 1). It reached 17.3% in breast cancer patients older than 70 years by comparison with control patients (14.7%) with $p=0.016$. In the subclass with an early menopause (before 48 years), the level was respectively 16.6% in breast cancer patients versus 15.4% in control patients ($p=0.028$).

Then, breast cancer patients showing a normal BMI (Body Mass Index) [20–25] exhibited a *BRCA2* promoter methylation in PBCs of 17.6% versus 16.5% for control patients ($p=0.019$).

Concerning the increase in the WHR (Waist-to-Hip Ratio) [81.7%–87.5%], the *BRCA2* promoter methylation in PBCs was 17.1% in COSA patients by comparison to control patients (15.4%) with $p=0.0046$. So, an android distribution of fat tissue revealed a higher methylation rate of the *BRCA2* promoter region.



Patients	Mean	Standard Deviation	95% Confidence Interval	<i>p</i>
Breast Cancer (n=873)	16.9	8.0	[16.3 ; 17.4]	0.10
Control (n=980)	16.2	8.1	[15.7 ; 16.8]	

FIG. 1. Average percentage of methylation of the promoter of *BRCA2* in DNA from control patients and COSA ($p=0.10$).

TABLE 1. DEMOGRAPHICS OF BREAST CANCER PATIENTS AND CONTROLS AND THEIR ASSOCIATION WITH *BRCA2* PROMOTER METHYLATION IN PERIPHERAL BLOOD CELLS

	Data on breast cancer patients and controls and their association with <i>BRCA2</i> promoter methylation in peripheral blood cells										
	Breast Cancer Patients					Control					Patients/Controls comparison <i>p</i> = 0.10
	Number	Average	SD	95%CI	Comparison in the category	Number	Average	SD	95%CI	Comparison in the category	
	873	16.9	8.0	[16.3 - 17.4]		980	16.2	8.1	[15.7 - 16.8]		
Age											
<50 years	252	17.2	7.6	[16.3 - 18.1]	<i>p</i> = 0.66	142	16.8	8.2	[15.4 - 18.1]	<i>p</i> = 0.23	<i>p</i> = 0.39
[50-60[years	241	16.6	7.8	[15.6 - 17.6]		437	16.5	8.0	[15.7 - 17.2]		<i>p</i> = 0.57
[60-70[years	221	16.4	7.9	[15.4 - 17.5]		304	16.2	8.3	[15.2 - 17.1]		<i>p</i> = 0.45
≥70 years	159	17.3	8.8	[16.0 - 18.7]		97	14.7	7.5	[13.2 - 16.2]		<i>p</i> = 0.016
Menopausal status											
Premenopausal	265	17.1	7.8	[16.2 - 18.0]	<i>p</i> = 0.52	246	16.3	8.0	[15.3 - 17.3]	<i>p</i> = 0.72	<i>p</i> = 0.18
Postmenopausal	552	16.7	8.0	[16.1 - 17.4]		734	16.2	8.1	[15.6 - 16.8]		<i>p</i> = 0.24
Menopausal Age											
≤48 years	170	16.6	7.3	[15.5 - 17.7]	<i>p</i> = 0.63	196	15.4	8.4	[14.2 - 16.6]	<i>p</i> = 0.076	<i>p</i> = 0.028
]48-50[years	117	16.9	7.6	[15.5 - 18.3]		186	16.7	8.6	[15.5 - 18.0]		<i>p</i> = 0.45
]50-53[years	136	15.6	7.6	[14.3 - 16.8]		191	15.8	7.5	[14.8 - 16.9]		<i>p</i> = 0.72
>53 years	123	18.0	9.4	[16.4 - 19.7]		159	17.2	7.8	[16.0 - 18.4]		<i>p</i> = 0.62
BMI											
<20	97	16.9	8.1	[15.3 - 18.5]	<i>p</i> = 0.091	134	15.4	8.1	[14.0 - 16.7]	<i>p</i> = 0.29	<i>p</i> = 0.094
[20-25[394	17.6	8.1	[16.8 - 18.4]		541	16.5	8.0	[15.8 - 17.2]		<i>p</i> = 0.019
[25-30[216	15.9	7.5	[14.9 - 16.9]		220	16.4	8.4	[15.3 - 17.5]		<i>p</i> = 0.82
≥30	106	16.3	7.6	[14.9 - 17.8]		85	15.5	7.8	[13.9 - 17.2]		<i>p</i> = 0.48
WHR											
≤76.8	105	17.2	8.4	[15.6 - 18.8]	<i>p</i> = 0.83	320	17.1	8.6	[16.2 - 18.1]	<i>p</i> = 0.052	<i>p</i> = 0.74
]76.8-81.7[163	16.7	7.4	[15.6 - 17.9]		266	15.7	7.6	[14.8 - 16.6]		<i>p</i> = 0.13
]81.7-87.5[196	17.1	7.6	[16.0 - 18.2]		238	15.4	7.8	[14.4 - 16.4]		<i>p</i> = 0.0046
>87.5	272	16.6	8.0	[15.7 - 17.6]		144	16.9	8.4	[15.6 - 18.3]		<i>p</i> = 0.80

BMI = Body Mass Index; WHR = Waist-to-Hip Ratio; 95%CI = 95% Confidence Interval; SD = Standard Deviation

(For two populations with a Gaussian distribution. Student t test was used for equal variance population. otherwise, Z-score test ($n \geq 30$) was used. To compare more than 2 populations, variance analysis was performed. Finally, Kruskal-Wallis test was performed for non-Gaussian population comparisons).

TABLE 2. RELATIONSHIP BETWEEN CLINICOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TUMORS AND *BRCA2* PROMOTER METHYLATION IN PBCs OF BREAST CANCER PATIENTS

	<i>BRCA2</i> promoter methylation in peripheral blood				
	Breast cancer patients				
	Number	Average	SD	95%CI	Comparison in the category ^a
	873	16.9	8.0	[16.3 - 17.4]	
SBR degrees					
1	244	17.1	8.9	[15.9 - 18.2]	<i>p</i> = 1.00
2	290	16.7	8.0	[15.8 - 17.6]	
3	129	16.5	7.2	[15.3 - 17.8]	
Histological type					
IDC	599	16.7	7.9	[16.1 - 17.4]	<i>p</i> = 0.80
ILC	105	17.1	7.1	[15.7 - 18.4]	
other	168	17.0	8.7	[15.7 - 18.3]	
Tumor size					
Infraclinic	127	16.9	7.5	[15.6 - 18.2]	<i>p</i> = 0.92
<2cm	157	16.2	7.7	[15.0 - 17.4]	
2 - 5cm	150	16.2	6.6	[15.2 - 17.3]	
>5cm	26	16.7	8.2	[13.4 - 20.0]	
Epidermal invasion	26	16.8	9.3	[13.2 - 20.4]	
Lymph node metastasis					
N0	306	16.5	7.1	[15.7 - 17.3]	<i>p</i> = 0.20
N1 - N2	111	15.8	7.9	[14.3 - 17.3]	

95%CI = 95% Confidence Interval; SD = Standard Deviation; SBR = Scarff-Bloom-Richardson; IDC = Invasive Ductal Carcinoma; ILC = Invasive Lobular Carcinoma; N0 = no invasive lymph node and N1 - N2 = invasive lymph nodes.

^a Student t test.

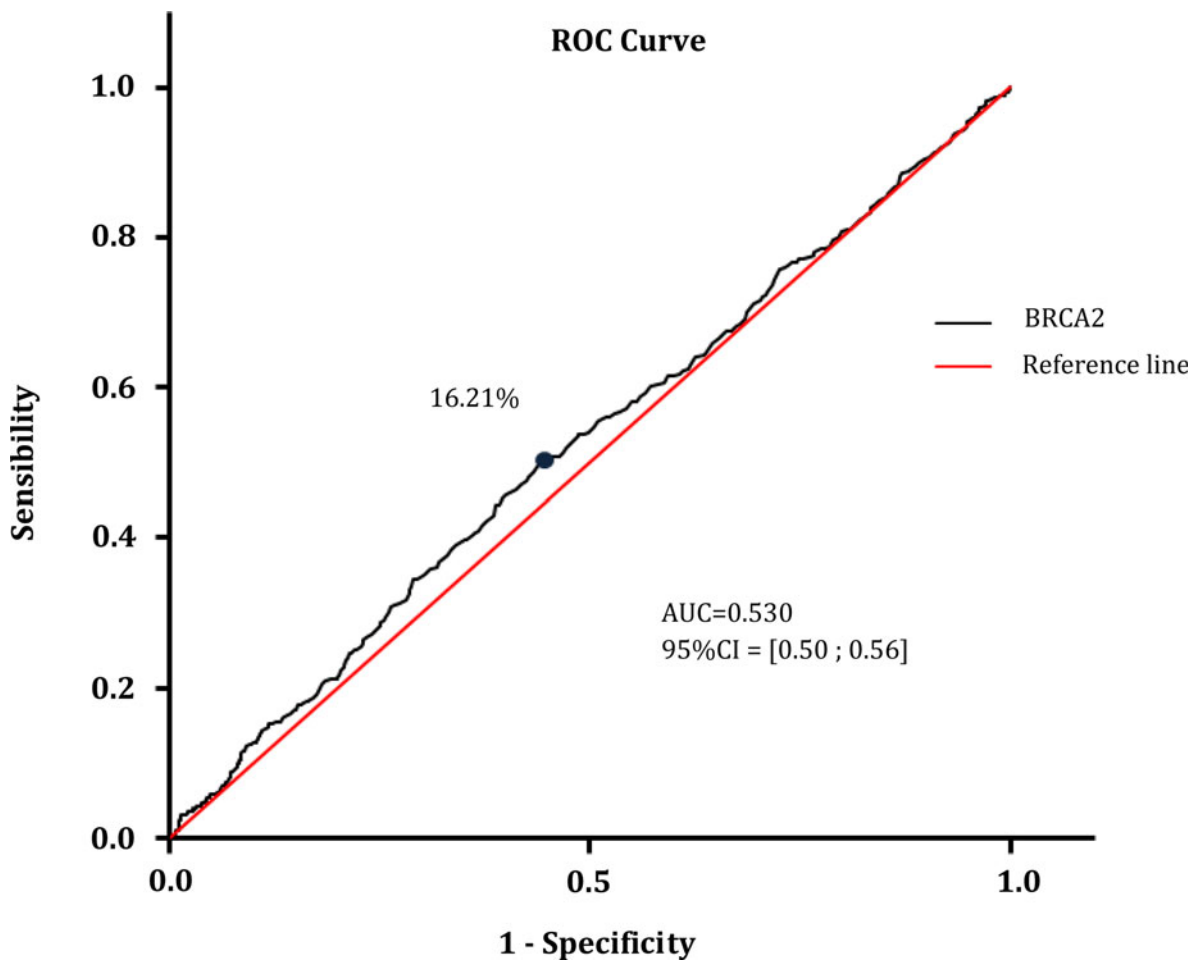


FIG. 2. ROC curve analysis using DNA samples extracted from PBCs for discriminating between breast cancer patients and normal subjects based on methylation pattern of the *BRCA2* gene.

TABLE 3. ROC CURVE ANALYSIS OF DNA SAMPLES EXTRACTED FROM PBCs BASED ON METHYLATION PROPORTION OF THE *BRCA2* GENE

AUC*	0.53
Sensibility	52.50%
Specificity	55.80%
Positive predictive value	51.40%
Negative predictive value	56.90%
Chi ²	12.68
p Chi ²	0.00037
Relative Risk (RR)	1.19
Asymptotic 95% CI**	[1.08; 1.31]
Odd Ratio (OR)	1.39
Asymptotic 95% CI	[1.16; 1.67]

*AUC, area under the curve; **CI, confidence interval (lower-upper bound).

Conversely, relationship between clinicopathological characteristics of tumors in subclasses and *BRCA2* promoter methylation in PBCs of breast cancer patients demonstrated no statistical significant difference for any of the analyzed clinical parameters (Table 2).

Sensibility and specificity of the blood-based assay to distinguish breast cancer cases from controls, using *BRCA2* methylation, were calculated. Reliability of the methylation of a gene such as *BRCA2* to serve as a sensitive and specific blood-based breast cancer test was assessed with significant different methylation patterns between cancerous and normal PBCs. To evaluate the applicability of *BRCA2* methylation in circulating DNA from PBCs as a marker for breast cancer, receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used (Fig. 2). The best cut-off point (16.21% of methylation) and the corresponding sensitivity (52.3%), specificity (55.8%), area under curve (AUC=0.530) and confidence interval were calculated (Table 3). The positive predictive value (PPV) was 51.4% and negative predictive value (NPV) was 56.9% in case of a cut-off point at 16.21% for the methylation. The Chi² test (12.68) between the risk and the disease was found significant ($p=0.00037$). The Relative Risk (RR=1.19; 95% CI [1.08; 1.31]) and the Odd Ratio (OR=1.39; 95% CI [1.16; 1.67]) to develop the disease by comparison with the reference fixed at 1, were calculated and were found included in their respective asymptotic 95% CI.

The presenting data are promising for development of a blood-based screening method for breast cancer that relies on pathologic methylation changes, corroborating other results with different genes (Radpour *et al.*, 2011). Further studies comparing tissue specific and blood-based methylation markers might provide valuable information as prognostic and predictive markers for breast cancer, as well as for developing novel targeted therapeutic strategies.

Rémy Bosviel, Julie Durif, Jiaoli Guo,
Mourad Mebrek, Fabrice Kwiatkowski,
Yves-Jean Bignon, and
Dominique J. Bernard-Gallon

Acknowledgments

This study was supported by “La Ligue Nationale Française de Lutte Contre le Cancer” (Puy-de-Dôme, Allier and

Cantal). Rémy Bosviel is a recipient of a grant from the Auvergne Regional Council/CPER 2008+FEDER n°32316 – 0930FDBG – 106NL.

Author Disclosure Statement

The authors declare that no competing financial interests exist.

References

- Baylin SB, and Ohm JE. (2006). Epigenetic gene silencing in cancer. A mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6, 107–116.
- Bernard-Gallon DJ, De Latour MP, Rio PG, et al. (1999). Subcellular localization of BRCA1 protein in sporadic breast carcinoma with or without allelic loss of BRCA1 gene. *Int J Oncol* 14, 653–661.
- Bieche I, Nogues C, and Lidereau R. (1999). Overexpression of BRCA2 gene in sporadic breast tumours. *Oncogene* 18, 5232–5238.
- Bosviel R, Garcia S, Lavediaux G, et al. (2012). BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA was identified in sporadic breast cancer and controls. *Cancer Epidemiol* 36, e177–182.
- Bosviel R, Michard E, Lavediaux G, Kwiatkowski F, Bignon YJ, and Bernard-Gallon DJ. (2011). Peripheral blood DNA methylation detected in the BRCA1 or BRCA2 promoter for sporadic ovarian cancer patients and controls. *Clin Chim Acta* 412, 1472–1475.
- Esteller M, Silva JM, Dominguez G, et al. (2000). Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 92, 564–569.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, and Forman D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61, 69–90.
- Moelans CB, Verschuur-Maes AH, and Van Diest PJ. (2011). Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma *in situ* and invasive breast cancer. *J Pathol* 225, 222–231.
- Radpour R, Barekati Z, Kohler C, et al. (2011). Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. *PLoS One* 6, e16080.
- Rahmatpanah FB, Carstens S, Hooshmand SI, et al. (2009). Large-scale analysis of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenomics* 1, 39–61.
- Zeschnigk M, Bohringer S, Price EA, Onadim Z, Masshofer L, and Lohmann DR. (2004). A novel real-time PCR assay for quantitative analysis of methylated alleles (QAMA): Analysis of the retinoblastoma locus. *Nucleic Acids Res* 32, e125.

Address correspondence to:

Dr. Yves-Jean Bignon
CBRV
Centre Jean Perrin
Département d'Oncogénétique
28 place Henri Dunant, BP 38
63001 Clermont-Ferrand
France

E-mail: Yves-Jean.Bignon@cjp.fr

Conclusions de la publication N°4 :

Dans cette étude, nous avons quantifié la méthylation du promoteur de *BRCA2* dans l'ADN extrait du sang de patientes atteintes de cancers du sein, en opposition avec des femmes saines. Nous n'avons pas trouvé d'augmentation significative entre la méthylation du promoteur de *BRCA2* dans le sang de patientes atteintes de cancer du sein en comparaison avec des femmes saines. Nous avons toutefois constaté une augmentation significative de la méthylation du promoteur de *BRCA2* chez les patientes par rapport au groupe témoin, chez les femmes de plus de 70 ans, ayant atteint la ménopause avant 48 ans, dont l'IMC est compris entre 20 et 25 ou dont le RTH est compris entre 81,7 et 87,5. Il semble que les femmes âgées présentant une plus grande méthylation au niveau de *BRCA2* sont plus à risque de développer un cancer du sein, de même que celles ayant une hyperméthylation de *BRCA2* et une ménopause précoce, ou une masse graisseuse intermédiaire. Bien que cette étude ne permette pas d'expliquer les mécanismes mis en jeu derrière ces résultats, elle révèle des facteurs pouvant avoir valeur de pronostic.

2. ACTION DES PHYTO-ŒSTROGENES SUR LA METHYLATION DE *BRCA1* ET *BRCA2* DANS DES CELLULES MAMMAIRES EN LIGNEES CONTINUES

En parallèle de l'étude *in vivo* de la méthylation des oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2* dans le sang périphérique de patientes atteintes de cancers des ovaires et du sein, une étude *in vitro* a été réalisée afin de montrer que cette méthylation de *BRCA1* et *BRCA2* peut être modulée par les phyto-œstrogènes du soja dans des cellules mammaires en lignées continues.

Présentation de la publication N°5 :

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux effets des phyto-œstrogènes du soja sur la méthylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN est la marque épigénétique la plus étudiée et la mieux connue à l'heure actuelle. Une hyperméthylation des promoteurs de gènes oncosuppresseurs est notamment retrouvée dans les cancers. Les gènes *BRCA1* et *BRCA2*, fortement impliqués dans les cancers du sein héréditaires, sont par conséquent des sujets d'étude de choix. Une hyperméthylation de *BRCA1* [122, 131, 132, 151, 153, 262, 263] et *BRCA2* [162, 169] a été détectée dans les cancers sporadiques du sein. Comme un nombre croissant d'études montrent une action des phyto-œstrogènes du soja sur la méthylation de l'ADN [199, 203, 204, 212, 265-268], l'effet protecteur des phyto-œstrogènes du soja sur le cancer du sein pourrait être dû, au moins en partie, à un effet sur la méthylation de l'ADN. Cette étude a été menée afin d'analyser la méthylation des îlots CpG présents dans les promoteurs de *BRCA1* et *BRCA2* en cellules mammaires, suite à leur exposition aux phyto-œstrogènes du soja, par technique d'immunoprécipitation de l'ADN méthylé (MeDIP), couplée à de la PCR. Les conséquences de modifications de la méthylation de ces gènes sur l'expression de leurs protéines ont également été observés, par Immunohistochimie, Western-Blotting et Microscopie Confocale. La méthylation globale de l'ADN a également été analysée par microscopie confocale, ainsi que l'expression de la protéine MeCP2, dont la dérégulation est opposée à celle de *BRCA1* et *BRCA2* dans les cancers.

Publication N°5 :

« Can Soy Phytoestrogens Decrease DNA Methylation in *BRCA1* and *BRCA2* Oncosuppressor Genes in Breast Cancer Cell Lines? ».

Rémy Bosviel, Elise Dumollard, Pierre Déchelotte, Yves-Jean Bignon and Dominique Bernard-Gallon

OMICS. 2012, 16(5):235-44.

Can Soy Phytoestrogens Decrease DNA Methylation in *BRCA1* and *BRCA2* Oncosuppressor Genes in Breast Cancer?

Rémy Bosviel,^{1,2} Elise Dumollard,^{1,2} Pierre Déchelotte,^{3,4}
Yves-Jean Bignon,^{1,2,4} and Dominique Bernard-Gallon^{1,2}

Abstract

Although soy phytoestrogens have been postulated to exert a protective effect against breast cancer, the attendant mechanisms, in particular epigenetics underpinnings, have remained elusive. We investigated the putative effects on DNA methylation by two naturally occurring isoflavones, genistein and daidzein, in a study of the *BRCA1* and *BRCA2* oncosuppressor genes in breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB 231, and MCF10a). A demethylant agent, the 5-azacytidine, and a methylant, the budesonide, were used as treatment controls. DNA methylation of *BRCA1* and *BRCA2* was investigated with methylated DNA immunoprecipitation coupled with PCR. In parallel, protein expression was determined by Western blot, immunohistochemistry, and confocal microscopy. Our results suggest that treatment with 18.5 μM Genistein or 78.5 μM Daidzein might reverse DNA hypermethylation and restore the expression of the oncosuppressor genes *BRCA1* and *BRCA2*. 5-Azacytidine also enhanced the re-expression of these genes while budesonide had an opposite effect. To the best of our knowledge, these observations, while requiring replication, provide new evidence on potential epigenetic mechanisms by which genistein and daidzein might contribute to regulation of the *BRCA1* and *BRCA2*. Future studies are warranted on whether the demethylating effect of genistein and daidzein is global or focused on select candidate genes.

Introduction

IN EUROPE, an estimated 420,850 breast cancer cases have been diagnosed in 2008, with 129,390 deaths (Ferlay et al., 2010). By contrast, lower incidence rates were found in Asian countries compared to Western countries (Adlercreutz and Mazur, 1997). As soy is highly consumed in numerous Asian countries, it has been postulated that soy consumption, for example, by virtue of soy isoflavones, might have a protective effect on breast cancer. The isoflavones share similarities in their chemical structure with 17- β -estradiol, the natural human estrogen. They have the ability to bind and activate estrogen receptors (ER) (Kuiper et al., 1997, 1998; Pfischer et al., 2008) and thus, exert estrogen effects (Liu et al., 2010). They are considered as mixed estrogen agonists and antagonists (Brzezinski and Debi, 1999; Oseni et al., 2008; Setchell, 2001). However, as a contrast to estrogens, they preferentially bind and activate ER- β compared with ER- α (Kuiper et al., 1998; Takeuchi et al., 2009). The effects of soy isoflavones have been intensively studied during the past decade (Messina and Wu, 2009).

In this study, we focused on putative epigenetic effects of the two naturally occurring isoflavones—genistein and daidzein—on DNA methylation. Epigenetics is the study of mitotically and/or meiotically heritable changes in gene expression that are not due to alterations in the DNA sequence (Rossetto et al., 2010; Wu and Morris, 2001). Notably, DNA methylation is one of the most studied and well-understood epigenetic mechanism. In humans, DNA methylation occurs in cytosines that precedes guanines, called CpG dinucleotides, via addition of a methyl group on the 5' position of the cytosine ring to form 5-methylcytosine. CpG sites are not randomly distributed in the genome; instead, there are CpG-rich regions known as CpG islands, which cover the 5' end of the promoters of many genes. These islands are not usually methylated in normal cells, whereas CpG sites found in repetitive genomic sequences are highly methylated, presumably to prevent chromosomal instability, translocations, and gene disruption caused by the reactivation of transposable DNA sequences. In tumors, this methylation pattern has a trend that is inverted: there is a hypomethylation of the global

¹Centre Jean Perrin, Département d'Oncogénétique, CBRV, Clermont-Ferrand, France.

²Université d'Auvergne, "Nutrition, Cancérogenèse et Thérapie anti-tumorale," Clermont-Ferrand, France.

³CHU, Nouvel Hôpital Estaing, Service d'Anatomie Pathologique, Clermont-Ferrand, France.

⁴Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France.

genome, with a hypermethylation of CpG islands in the promoter regions of tumor-suppressor genes (Tost, 2010). For example, hypermethylation of the tumor suppressor *BRCA1* has been found in sporadic breast cancer cases (Catteau et al., 1999; Dobrovic and Simpfendorfer, 1997; Esteller et al., 2000; Hedenfalk et al., 2001; Mancini et al., 1998; Rice et al., 1998, 2000; Wessels et al., 2002). *BRCA2* promoter methylation has also been reported in sporadic breast cancer cases (Cucer et al., 2008).

As a growing number of studies show effects of soy phytoestrogens on DNA methylation (Day et al., 2002; Dolinoy et al., 2006; Fang et al., 2007; King-Batoon et al., 2008; Li and Tollefsbol, 2010; Lyn-Cook et al., 1995; Majid et al., 2009; Qin et al., 2009), the protective effects of soy isoflavones on breast cancer could be due, at least in part, to epigenetic effect on DNA methylation. On the other hand, the putative effects of the common soy phytoestrogens genistein and daidzein on *BRCA1* and *BRCA2* oncosuppressor gene methylation and the attendant downstream consequences on their expression have not been studied in detail in breast cancer cells. We therefore undertook this study to examine changes in DNA methylation of the CpG islands in the promoters of *BRCA1* and *BRCA2* in breast cancer cells following exposure to these soy phytoestrogens.

Materials and Methods

Cell Lines

MCF-7 and MDA-MB-231 breast tumor cell lines came from a pleural effusion of patients with invasive breast carcinoma (Cailleau et al., 1974; Soule et al., 1973). The MCF-10a cell line was established from the breast tissue of patient with fibrocystic breast disease (Soule et al., 1990). All three human cell lines were provided by the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD).

MCF-7 was cultured in RPMI 1640 media supplemented with 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA), 20 μ g/mL gentamicin (Panpharma, Fougères, France), 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 0.04 UI/mL insulin (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) in a humidified atmosphere at 37°C containing 5% CO₂. This cell line has a positive estrogen-receptor status (ER α + /ER β +).

MCF-10a cells were maintained in DMEM-F12 (Invitrogen) containing 10% horse serum (Invitrogen), 2 mM L-glutamine, 20 μ g/mL gentamicin (Panpharma), 20 ng/mL epidermal growth factor (Sigma, St. Louis, MO), 100 ng/mL cholera toxin (Sigma), 0.25 UI/mL insulin (Novo Nordisk), and 0.5 μ g/mL hydrocortisone (Sigma) held at 37°C with 5% CO₂ in a humidified atmosphere. This cell line has a negative estrogen receptor status (ER α - /ER β -).

MDA-MB-231 cells were grown in Leibovitz L-15 media with 15% fetal bovine serum (Invitrogen), 20 μ g/mL gentamicin (Panpharma), and 2 mM L-glutamine in a 37°C humidified atmosphere without CO₂. This cell line has ER α - /ER β + estrogen receptor status.

Cell treatments

Treatments were carried out for 48 h with 18.5 μ M genistein, 78.5 μ M daidzein, or 2 μ M 5-Azacytidine, 2 μ M budesonide (here, only for confocal microscopy). They were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma). 18.5 μ M genistein or 78.5 μ M Daidzein were previously studied as corresponding to

the 50% inhibition of the proliferation (IC₅₀) (Vissac-Sabatier et al., 2003). 5-Azacytidine (2 μ M) and 2 μ M budesonide dosages were chosen according to studies by other authors (Mirza et al., 2010; Zhao et al., 2004).

DNA extraction

DNA was extracted using a Nonorganic DNA Extraction Kit (S4520, Millipore, Billerica, MA). After recovering the cells, 9 mL of wash buffer 1 \times was added to resuspend the pellet. After 15 min of incubation at room temperature, the cells were centrifuged at 1000 \times g for 20 min. The supernatant was discarded and the cells were resuspended in 3 mL of suspension buffer I 1 \times . Lysis Buffer I (800 μ L) and 50 μ L of protein digesting enzyme were added to the suspension. The samples were incubated for 2 h at 50°C. After adding 1 mL of protein precipitating agent, centrifugation at 1000 \times g for 15 min was carried out. The supernatant thus obtained was mixed with two volumes of absolute ethanol. The precipitated DNA was recovered using an inoculating needle, dried for 5 min at room temperature, and dipped in 5 mL 70% ethanol. The DNA was resuspended in 300 μ L of Suspension Buffer II. After vortexing them during 5 min, the samples were left in incubation at 50°C overnight. The quantity of DNA collected as well as the quality of the extraction were then determined by spectrometry using a NanoDrop™ (ND-8000, 8-sample spectrophotometer, NanoDrop Technologies®, Wilmington, DE).

MeDIP

Methylated DNA was immunoprecipitated using the MagMeDIP kit from diagenode according to manufacturer's instructions. DNA shearing optimization was carried out with a Bioruptor (diagenode): 300 μ L of a 0.1 μ g/ μ L DNA solution in 1.5-mL tubes was sheared at "low" power using 15 s on and 15 s off cycles for a total time of 20 min. For each sample, 45 μ L water, 24 μ L MagBuffer A, 6 μ L MagBuffer B, 1.5 μ L methylated DNA (positive control), 1.5 μ L unmethylated DNA (negative control) and 12 μ L sheared DNA (at 0.1 μ g/ μ L) were mixed. Seventy-five microliters of this mix were used for immunoprecipitation (IP) and 7.5 μ L were kept as the "input sample." Samples were incubated at 95°C for 3 min and quickly chilled on ice. For each IP, 11 μ L magnetic bead solution was prepared. Beads were washed twice with a 1:5 dilution of MagBuffer A and resuspended in 22 μ L of the same solution. In each IP tube, 0.15 μ L of anti-5-methylcytidine monoclonal antibody, 0.60 μ L MagBuffer A, 2.25 μ L water, 2 μ L MagBuffer C, and 20 μ L of washed beads were added. Samples were incubated on a rotating wheel at 4°C for 16 h. Beads were washed three times with 100 μ L MagWash Buffer-1 and three times with 100 μ L MagWash Buffer-2. For each IP and input sample, 1 μ L proteinase K was added to 100 μ L DNA Isolation Buffer. The supernatant of IP samples was removed and 100 μ L of the prepared solution was added, while 92.5 μ L were added to input samples. All samples were incubated for 15 min at 55°C and 15 min at 100°C. After centrifugation, samples were stored at -20°C before polymerase chain reaction (PCR) analysis.

PCR

PCR directed at the *BRCA1* exon 1 and the *BRCA2* exon 2 was carried out in a final 15 μ L reaction with 6 μ L of input

DNA at 10 ng/ μ L or 6 μ L immunoprecipitated DNA, 0.06 U/ μ L AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems, Bedford, MA), 600 nM of each primer, 600 μ M dNTP (Applied Biosystems), 1 \times PCR buffer I (Applied Biosystems). Initial denaturation at 94°C for 5 min was followed by 30 cycles of annealing at 54°C for 20 s and extension at 72°C for 30 s. After PCR reaction, products were resolved on 2% agarose gels, stained with Gel Red™ (Biotium, Hayward, CA). The primers used were designed as follows: primers targeting *BRCA1* exon 1 on position chr17: 41277212-41277680 negative strand (GRCh37/hg19 Assembly); Forward: 5'-GTGATGCAATAAGCCGAA-3'; Reverse: 5'-TCGAAATCCACTCTCCAC-3' and for *BRCA2* exon 2 on position chr13: 32890440-32890750 positive strand (GRCh37/hg19 Assembly): Forward: 5'-CCAGGAGATGGGACTGAATTAG-3'; Reverse: 5'-CTGTGACGTACTGGGTTTTAGC-3'. The amplified regions are located near the promoter of the corresponding genes and consequently near the CpG islands.

Western blotting

Proteins were extracted from cells with a lysis buffer containing 20 mM Tris (pH 8), 50 mM EDTA, 0.8% NaCl, 0.1% Triton X-100, and 1% Glycerol. rotease inhibitors (1%) (Protease Inhibitor Cocktail; Sigma) and 1% phosphatase inhibitors (Phosphatase Inhibitor Cocktail 2; Sigma) were added to the basic buffer extemporaneously. Fifty microgram proteins were electrophoresed on a SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. After 1-h blocking in Tris-buffered saline Tween 0.1% (TBST) containing 5% milk, membranes were incubated overnight at 4°C with anti-

BRCA1 [1:150 Mouse (Ab-1); Calbiochem, LaJolla, CA], anti-*BRCA2* [1:50 Rabbit (H-300), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA], or anti-actin [1:120,000 Mouse (Ab-1); Calbiochem] antibodies. Membranes were then washed three times in TBST and incubated for 1 h with alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody [1:2,000 goat antimouse IgG (H&L) AP conjugate; Promega 5372B, Madison, WI; or 1:2,000 goat antirabbit IgG (Fc) AP conjugate; Promega 5373B]. Detection was then performed with the Western Blue detection system (Promega). Relative quantification of immunoblotted proteins was achieved using the Quantity One software (Biorad, Hercules, CA) with local background subtraction method. A ratio between the intensity of the protein of interest and a reference protein (Actin) was then calculated. The relative ratio was then calculated between each condition and the reference condition (DMSO-treated cells).

Immunohistochemistry

Alcohol-formalin-acetic acid-fixed and paraffin-embedded sections (4 μ m) of soy-treated or untreated MCF-7, MDA-MB-231, and MCF-10a cell pellets were cut using a microtome. They were mounted on silanized glass slides (Starfrost, Dui-ven, The Netherlands), and dried overnight at 37°C. Slides were processed on an automated Benchmark XT immunohistochemical instrument (Ventana, Oro Valley, AZ). In particular, sections were deparaffinised and rehydrated using EZ Prep (Ventana) and heat-induced antigen retrieval using CC1 (Ventana) was performed for 30 min. Slides were then incubated at 37°C for 44 min with primary MoAbs anti-*BRCA1* (17F8, GeneTeX, San Antonio, TX) (1:10) or anti-*BRCA2* (5F6,

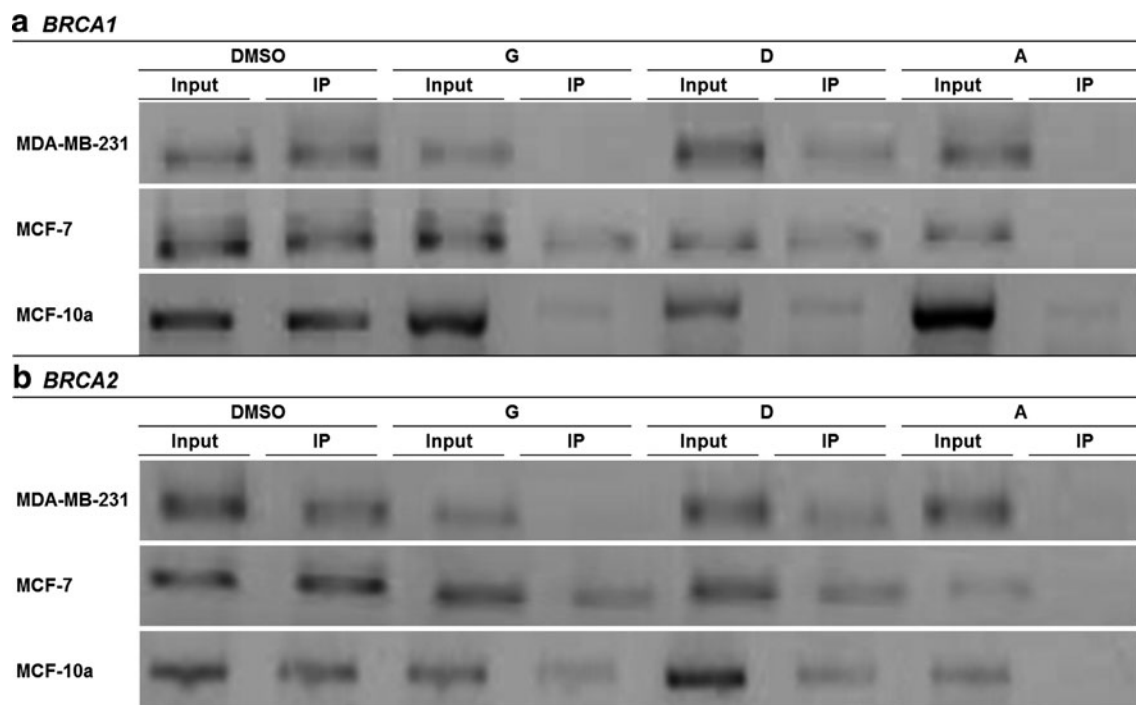


FIG. 1. MeDIP-PCR with *BRCA1*-exon1 (a) or *BRCA2*-exon2 (b) after 48-h exposure to 18.5 μ M genistein (G), 78.5 μ M daidzein (D), or 2 μ M 5-azacytidine (A) in three breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MCF-7, and MCF-10a). The presence of an amplified fragment in immunoprecipitation (IP) sample showed the presence of methylated DNA corresponding to the amplified region and we demonstrated a decrease after treatment with the demethylant substances. Input corresponded to total DNA fragments before MeDIP.

GeneTex) (1:20). For detection, we used the UltraView universal DAB detection kit (Ventana). Signal was amplified using the Ventana amplification kit. Slides were then counterstained with hematoxylin for 3 min, rinsed in distilled water, and coverslipped with an aqueous Faramount mounting media (DAKO, Glostrup, Denmark). The primary polyclonal antibody was omitted and replaced with PBS as a negative control.

Immunofluorescence staining and confocal analysis of DNA methylation and BRCA1 or BRCA2 expression

Staining was realized on MCF-7, MDA-MB-231, and MCF-10a treated during 48 h with genistein (18.5 μ M), daidzein (78.5 μ M), 5-azacytidine (2 μ M), budesonide (2 μ M), or DMSO. To prepare nuclei, cells were scraped with a rubber policeman after addition of dropwise addition of prewarmed (37°C) 0.07 M KCl (3 mL), washed three times with phosphate-buffered saline (PBS). Nuclei were then pelleted by centrifugation at 800 \times g, for 20 min (21°C), resuspended, and fixed by dropwise addition of 10 mL of a solution of fixation [methanol/acetic acid mixture (3:1)] over a period of 20 min at 21°C. After centrifugation at 800 \times g, this step was repeated twice (Koch and Stratling, 2004). The nuclear suspension was resuspended by 5 mL of solution of fixation. A total of 450 μ L of suspension was transferred into slides (4 Chambers Polystyrene Vessel, Becton Dickinson Culture Slides®) and irradiated with ultraviolet light for 3 h (30 cm from UV-C 30W lamp) (Miller et al., 1974). After 3 washing, to saturate nonspecific sites, nuclei were incubated overnight at 4°C with 400 μ L of PBS containing 2% bovine serum albumin. Nuclei were incubated (300 μ L) for 1 h at room temperature with primary antibodies (dilution of 1:50 in PBS), respectively, anti-5-methylcytidine [mouse, monoclonal antibody (MoAb), 33D3, Abcam, Cambridge, MA], anti-MeCP2 [goat, polyclonal antibody (PoAb), N-17, Santa Cruz Biotechnology], anti-BRCA1 (mouse, MoAb, MS 110; Abcam), or anti-BRCA2 (rabbit, PoAb, H-300, Santa Cruz Biotechnology). Incubations with 300 μ L of secondary antibodies (dilution of 1:200 in PBS), respectively, Alexa fluor 488 antimouse IgG (Invitrogen), Alexa fluor 488 antigoat IgG (Invitrogen) or Cy3 antirabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) secondary antibodies were carried out for 30 min in the dark (dilution of 1:200 in PBS). After three washing, slides were mounted with Hoechst (33258 pentahydrate H3569, Invitrogen), and examined using TCS SP5 (Leica, Buffalo Grove, IL) confocal microscope. For a quantitative analysis of intensity of fluorescence, images were subjected to mean gray value measures using the Image J software from the National Institutes of Health (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). For statistical analyses, a Student's *t*-test was performed using the data presented in the table, and $p < 0.05$ was considered statistically significant compared with cells treated with the solvent, DMSO.

Results

Effects of soy phytoestrogens on BRCA1 and BRCA2 methylated DNA

BRCA1 primers targeting to exon1 and BRCA2 primers targeting to exon 2 were used for PCR after the MeDIP because they are near the promoter of the correspondent genes, and hence, near the CpG islands. The BRCA1 was found

methylated in DMSO control conditions as there was an amplification in input (total DNA) and immunoprecipitated DNA. BRCA1 was demethylated after genistein, daidzein, or 5-azacytidine treatment, corresponding here to a decrease in the signal by comparison with the input DNA in MDA-MB-231, MCF-7, and MCF-10a cell lines. Notably, our results showed that genistein is a better demethylant agent than daidzein in MDA-MB-231, MCF-7, and MCF-10a, and 5-azacytidine was found a complete demethylant (Fig. 1a).

The BRCA2 gene was found methylated in DMSO control conditions for the three breast cancer cell lines as they exhibited an amplification in the input and the immunoprecipitated DNA. BRCA2 demonstrated a demethylation after genistein, daidzein, or 5-azacytidine treatment by comparison to the IP band of the input. As expected, 5-azacytidine was strongly demethylant due to the disappearance of the IP band in the three cell lines. Genistein or daidzein treatment exhibited relatively weaker demethylant effect, as the IP band did not completely disappear in these conditions (Fig. 1b).

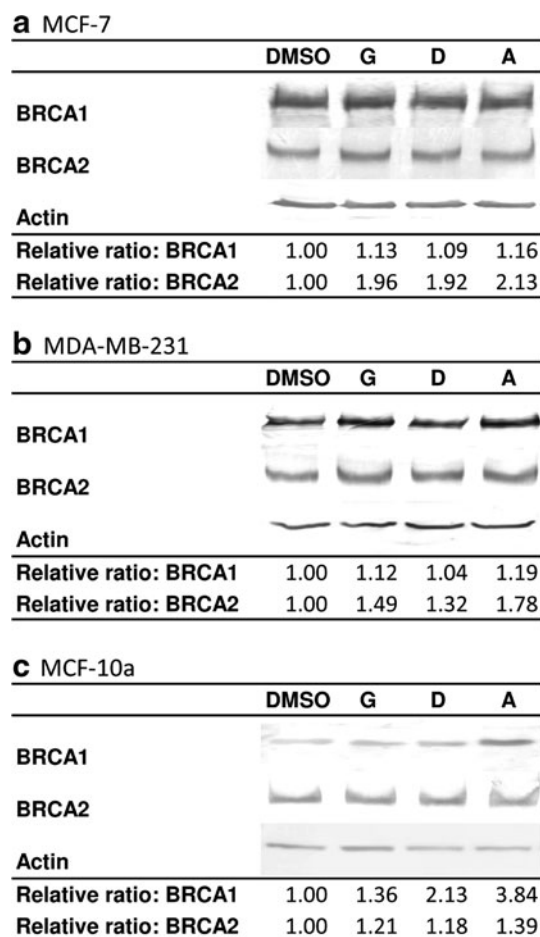


FIG. 2. BRCA1 and BRCA2 protein expression in MCF-7 (a), MDA-MB-231 (b), and MCF-10a (c) cells treated during 48 h with 18.5 μ M genistein (G), 78.5 μ M daidzein (D), 2 μ M 5-azacytidine (A). DMSO is the control condition. The relative ratio is the result of the ratio between the quantification of the protein of interest and the actin relatively to the ratio of the reference (DMSO) condition.

Quantification of BRCA1, BRCA2 protein expression after Western blotting in soy-treated breast cell lines

To demonstrate the impact of isoflavone treatments on expression, we quantified the BRCA1 and BRCA2 proteins after Western blotting with MCF-7 cells treated with these phytoestrogens (Fig. 2a). We found an increase in BRCA1 and BRCA2 protein expression following treatment with 18.5 μ M genistein or 78.5 μ M daidzein or 2 μ M 5-azacytidine (demethylating agent) for 48 h, compared to the control corresponding to the DMSO solvent. In MDA-MB-231 (Fig. 2b) and MCF-10a (Fig. 2c) cells, the relative ratio calculated for BRCA1 and BRCA2 proteins were also increased following treatment with genistein or daidzein or 5-azacytidine.

BRCA1 and BRCA2 protein staining by immunohistochemistry

By immunohistochemistry, we demonstrated that the pattern of staining with the MoAbs against BRCA1 and BRCA2 was modified in MDA-MB-231, MCF-7, and MCF-10a breast cells after 5-azacytidine (a demethylant agent), genistein, or daidzein treatment by comparison to DMSO cells corresponding to soy untreated cells. The demethylant agent was used as control to demonstrate the demethylant action of genistein and daidzein. With all these chemical substances intensive nuclear, nucleolar and cytoplasmic staining were observed (Fig. 3).

Genistein and daidzein decrease DNA methylation and increase BRCA1 and BRCA2 expression

We determined the effects of two isoflavones genistein (18.5 μ M) and daidzein (78.5 μ M) on BRCA1 and BRCA2 expression. After treatments for 48 h with genistein and daid-

zein, intensity of fluorescence of BRCA1 antibody increased significantly in MCF-7, MDA-MB-231, and MCF-10a cells (Fig. 4a); likewise, treatment with a demethylant agent, 5-azacytidine (2 μ M), which is also significant. On the contrary, intensity of fluorescence decreased significantly when cells were treated with budesonide (2 μ M). Similarly, intensity of fluorescence after incubation with BRCA2 antibody and treatments with 5-azacytidine (2 μ M) and isoflavones increased significantly in the three cell lines, whereas treatment with budesonide (2 μ M) showed a significant decrease of intensity of fluorescence (Fig. 4b).

An anti-5-methylcytidine antibody was used to study DNA methylation (Fig. 5a). Further to MCF-7, MDA-MB-231, and MCF-10a treatments during 48 h with daidzein (78.5 μ M) or genistein (18.5 μ M) or 5-azacytidine (2 μ M), intensity of fluorescence with anti-5-methylcytidine antibody decreased significantly. With methylant agent (budesonide 2 μ M), intensity of fluorescence was significantly increased.

MeCP2 protein variation was also investigated for its different deregulation in breast cancer, compared to BRCA1 and BRCA2. The protein decreased following phytoestrogens and 5-azacytidine exposure and increased after budesonide treatment (Fig. 5b). No difference between control and DMSO were observed.

Discussion

Although soy phytoestrogens have been postulated to exert a protective effect against breast cancer, the attendant mechanisms, in particular, epigenetics underpinnings, have remained elusive. We investigated the putative effects on DNA methylation by two naturally occurring isoflavones, genistein and daidzein, in the present study of the BRCA1 and BRCA2 oncosuppressor genes in breast cancer cell lines. In the present

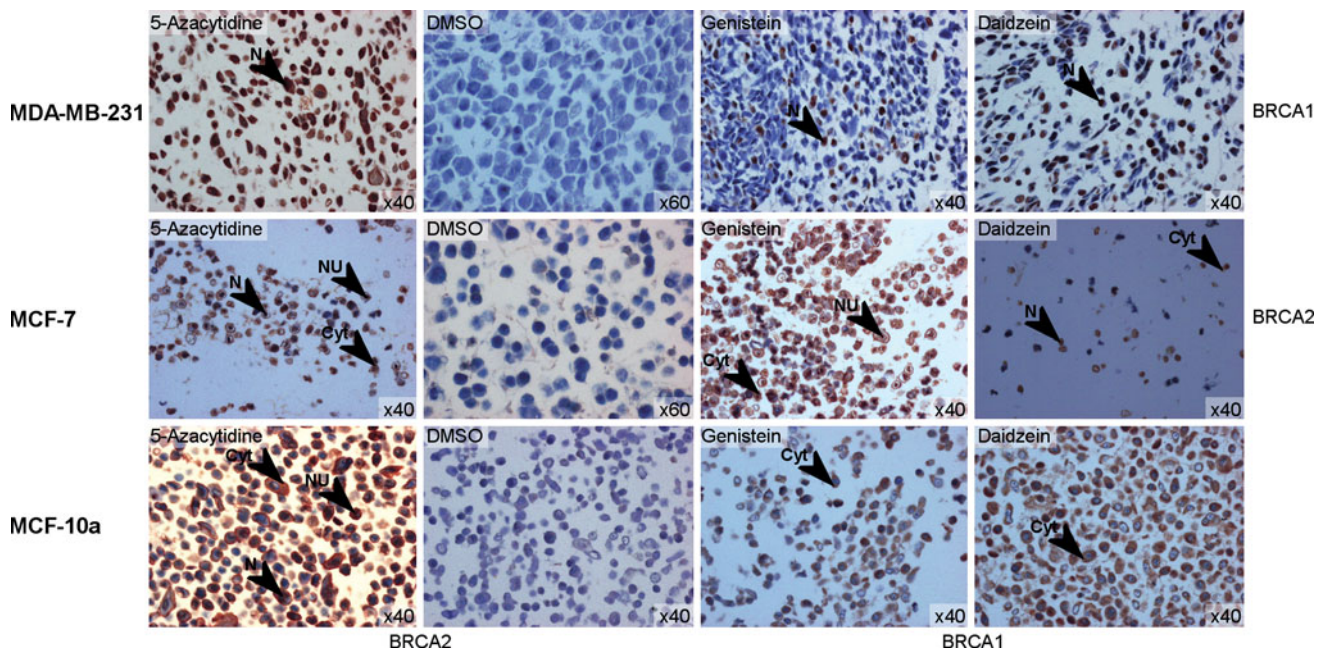


FIG. 3. For BRCA1 and BRCA2 expression in MDA-MB-231, MCF-7, and MCF-10a breast cells, 17F8 anti-BRCA1 and 5F6 anti-BRCA2 MoAbs showed intensive nuclear and cytoplasmic staining (arrowhead) after 2 μ M 5-azacytidine (a demethylant agent), 18.5 μ M genistein, or 78.5 μ M daidzein treatment, compared to DMSO control corresponding to soy untreated cells. Some nucleoli in the nuclei were stained. N, nucleus; Cyt, cytoplasm; NU, nucleoli.

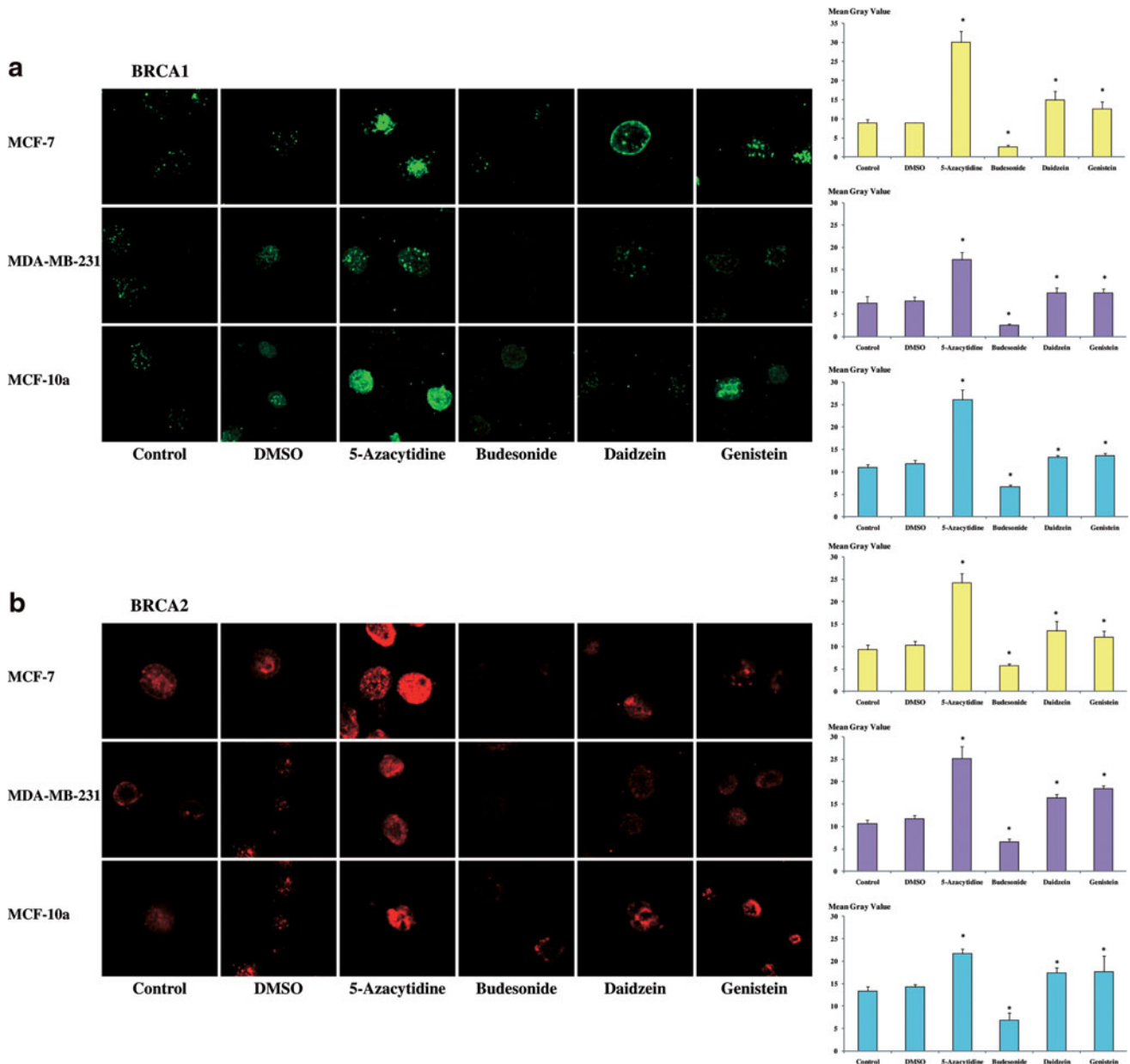


FIG. 4. Effects of daidzein and genistein on BRCA1 and BRCA2 expression in MCF-7, MDA-MB-231, and MCF-10a cell lines. Cells were treated during 48 h with daidzein (78.5 μ M), genistein (18.5 μ M), 5-azacytidine (2 μ M), or budesonide (2 μ M). Cells were also treated with DMSO, solvent in which substances were diluted. Then, cells were immunostained (a) with MoAb anti-BRCA1 (MS110) and revealed with MoAb antimouse (Alexa Fluor 488) or (b) with PoAb anti-BRCA2 (H-300) revealed with PoAc antirabbit (Cy3). Quantification of intensity of fluorescence was realized using Image J software (NIH) ($n=7$, $*p<0.05$).

study, we suggest that genistein and daidzein might reverse DNA hypermethylation and increase the expression of the methylation-impacted genes *BRCA1* and *BRCA2*. These observations, although requiring replication, provide new evidence on potential epigenetic mechanisms by which genistein and daidzein might contribute to regulation of the *BRCA1* and *BRCA2*.

Our MeDIP-PCR results show that genistein and daidzein appear to demethylate *BRCA1* and *BRCA2*. To the best of our knowledge, this has not been reported in the literature previously. Although this demethylation effect is less intense

than with 5-azacytidine, studies with longer exposures to these phytoestrogens should be undertaken for effects on efficiency of the demethylation. The use of techniques such as bisulfite sequencing would allow more precise localization and quantification of the methylation, thus bringing further clarity over the mechanism of action of genistein and daidzein in regard to their putative chemoprevention activity against breast cancer.

We performed Western blot analysis and quantification of BRCA1 and BRCA2 proteins following soy phytoestrogens or 5-azacytidine treatment in the three cell lines. All treatments

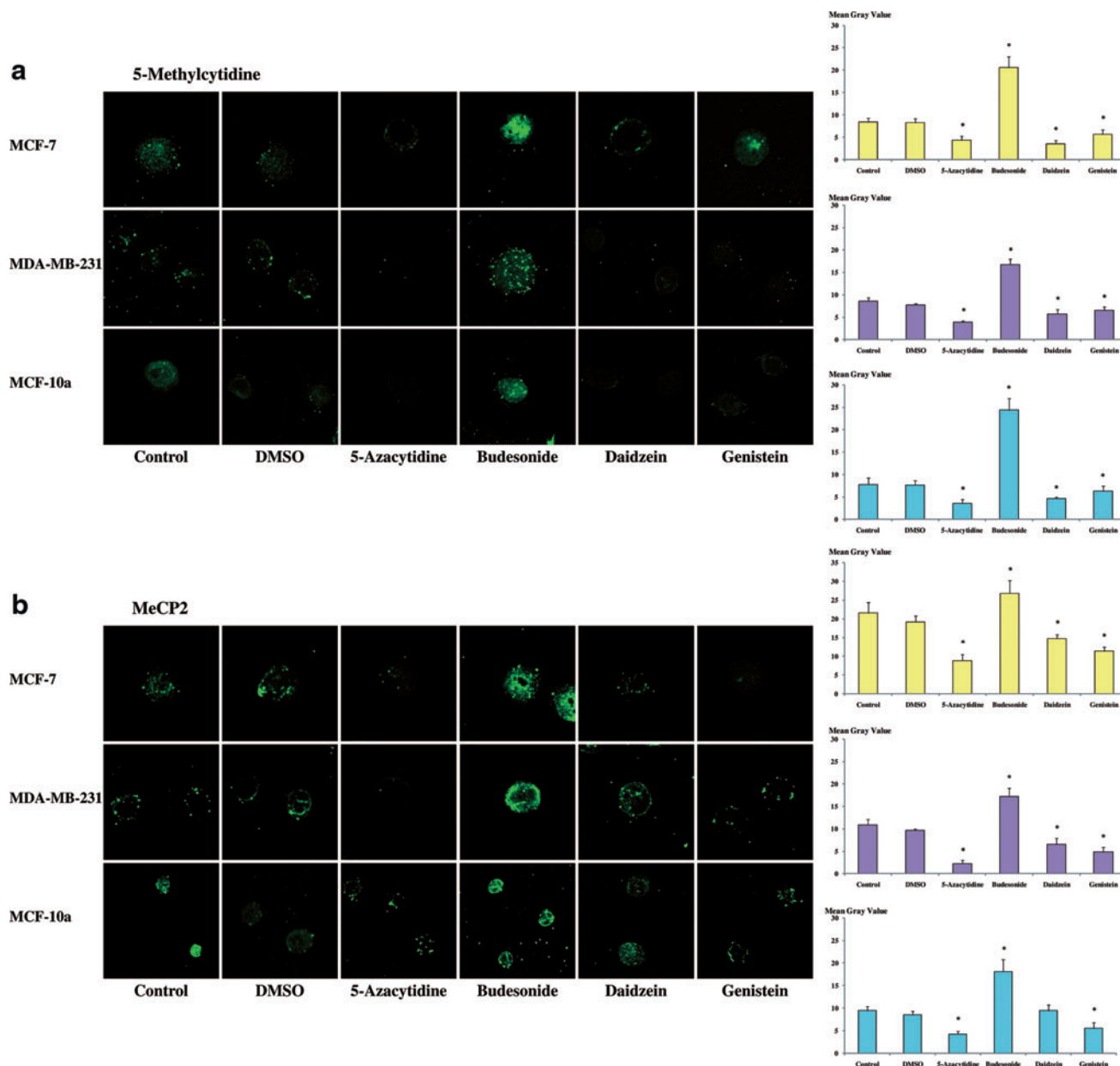


FIG. 5. Effects of daidzein and genistein on DNA methylation in MCF-7, MDA-MB-231, and MCF-10a cell lines. Cells were treated during 48 h with daidzein (78.5 μ M), genistein (18.5 μ M), 5-azacytidine (2 μ M), or budesonide (2 μ M). Cells were also treated with DMSO solvent in which substances were diluted. Then, cells were immunostained (a) with MoAb anti-5-methylcytidine (33D3) and revealed with MoAb anti-mouse (Alexa Fluor 488) or (b) with PoAb anti-MeCP2 (N-17) revealed with PoAc anti-goat (Alexa Fluor 488). Quantification of intensity of fluorescence was realized using Image J software (NIH) ($n=7$, $*p<0.05$).

resulted in a change in the direction of an increase in protein, although the observed effects were slight or moderate in some cases of the two studied proteins. Clearer results, however, were found using immunohistochemistry. Indeed, intensive nuclear, nucleolar, and cytoplasmic staining, corresponding to the BRCA1 and BRCA2 proteins, were observed after soy phytoestrogens or 5-azacytidine treatment. Previous studies had shown that the methylation of *BRCA1* was negatively correlated to mRNA expression (Catteau et al., 1999; Lee et al., 2007; Rice et al., 2000), so association of a demethylation of *BRCA1* and an increase in subsequent protein is consistent

with this data. For *BRCA2*, no data was found for association between methylation of the gene and its expression in the literature, but our results suggest it behaves similarly to *BRCA1* in this respect. Quantification of the mRNA of *BRCA1* and *BRCA2* in our three cell lines following phytoestrogen or 5-azacytidine treatments would be of interest in future studies in order to confirm that the observed demethylation of the genes causes an increase in their mRNA, which would be responsible for an increase in protein synthesis.

Other studies that have been undertaken with other genes and cell lines are of noteworthy in the context of the present

report. In 2005, Fang et al. reported, in human esophageal squamous carcinogenesis, that genistein inhibited DNA methyltransferases, thus reversing the methylation and permitting the reexpression of *RAR β* , *p16*, and *MGMT* (*O⁶-methylguanine methyltransferase*) genes. More recently, King-Batoon et al. (2008) reported that both genistein and lycopene, at very low concentrations that are relevant for the human diet, could mitigate tumorigenic processes via promoter demethylation and increase of gene expression.

Immunofluorescence staining and confocal analysis of BRCA1 and BRCA2 proteins showed the increase of protein expression following phytoestrogens or 5-azacytidine treatments in our study. The quantification allowed us to show the significance of this effect. Related to the analysis of 5-methylcytosine presence in the nucleus, which is reduced following phytoestrogens and 5-azacytidine treatment, it seems that those treatments demethylate globally DNA, including the *BRCA1* and *BRCA2* genes, thus allowing an increase in their expression. The mechanism of action of 5-azacytidine implies the demethylation of all DNA. For genistein and daidzein, the observed demethylation could be the result of the demethylation of a certain number of genes only. This hypothesis could be tested with a precise analysis of the methylation of many loci in DNA, for example, by meDIP-on Chip approaches.

Finally, it is noteworthy that we investigated variations of MeCP2, a methyl binding domain protein, whose deregulation is different from *BRCA1* or *BRCA2* expression in breast cancer, to see how its expression would behave following soy phytoestrogen exposures. Indeed, Billard et al. (2002) has suggested an increase in the MeCP2 mRNA in low-differentiated neoplasia, whereas Müller et al. (2003) clearly showed an increase of MeCP2 mRNA in neoplastic breast tissue. MeCP2 protein expression was decreased following soy phytoestrogens or 5-azacytidine treatments. As 5-azacytidine is a demethylating agent, we suggest MeCP2 expression might be linked to the global amount of methylation in the genome. This hypothesis has to be tested in future studies; our present findings do not allow us to conclude whether soy phytoestrogens change methylation of select candidate genes, or have a more global and genome-wide effect on DNA methylation.

Müller et al. (2003) has pointed out that MeCP2 expression was more important in estrogen receptor positive cells but, despite the fact we used cell lines with different estrogen receptor status, we did not observe any difference.

We wish to underscore that DNA methylation is only a part of broader range of possible epigenetic mechanisms, including histone modifications (Esteller, 2007), which should also be considered in breast cancer chemoprevention studies to obtain a more comprehensive view of the effects of soy phytoestrogens. Studies of gene silencing associated markers, such as H3-K27-me or H3-K9-me or gene-activating markers as H3-K4-me or H3-K9-ac can be pursued as well (Elsheikh et al., 2009).

Interestingly, Li et al. (2009) has reported that genistein could deplete telomerase activity in both precancerous and cancerous cells. They showed that direct regulation of key transcription factors and epigenetic modulation were caused by genistein. This result is challenging, as those two mechanisms might be linked, thus complicating the understanding of phytoestrogens' mode of action.

Conclusions

Our findings in the present study lend evidence for a demethylating effect of genistein and daidzein on *BRCA1* and *BRCA2* oncosuppressor genes, which is associated with an increase in the expression of the encoded proteins. We note that this effect might not be specific to these genes and could be more global in nature, at the scale of the genome, an area that is in need of future investigations. Additionally, the localization and quantification of the methylation of *BRCA1* and *BRCA2* using bisulfite sequencing, extension of the study to a broader set of genes, or use a more global approach such as meDIP-on-Chip are recommended in regard to future line of research to achieve a deeper understanding of phytoestrogen mechanism of action in breast cancer. Finally, as epigenetic mechanisms are often intertwined and may act in concert, we suggest that the study of histone modifications by genistein and daidzein are warranted. Ultimately, this line of research is essential before future clinical chemoprevention studies of phytoestrogens can be justified in humans and grounded on a firm molecular understanding of their putative mechanism of action against breast cancer pathogenesis.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the help of Caroline Vachias and Jean-Louis Couderc for confocal microscopy use. We thank the technical assistance of Christelle Picard, Nicolas Sonnier, Elodie Heinry, Sinda Mabouli, Julie Durif, and Marine Gueugneau. We also thank "La ligue contre le Cancer, comités de la région Auvergne." Rémy Bosviel received a grant from the Auvergne Regional Council/CPER 2008 + FEDER no. 32316-0930FDBG-106NL.

Author Disclosure Statement

The authors declare that no conflicting financial interests exist.

References

- Adlercreutz, H., and Mazur, W. (1997). Phyto-estrogens and Western diseases. *Ann. Med.* 29, 95-120.
- Billard, L.M., Magdinier, F., Lenoir, G.M., Frappart, L., and Dante, R. (2002). MeCP2 and MBD2 expression during normal and pathological growth of the human mammary gland. *Oncogene* 21, 2704-2712.
- Brzezinski, A., and Debi, A. (1999). Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 85, 47-51.
- Cailleau, R., Young, R., Olive, M., and Reeves, W.J., Jr. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 661-674.
- Catteau, A., Harris, W.H., Xu, C.F., and Solomon, E. (1999). Methylation of the *BRCA1* promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene* 18, 1957-1965.
- Cucer, N., Taheri, S., Ok, E., and Ozkul, Y. (2008). Methylation status of CpG islands at sites -59 to +96 in exon 1 of the *BRCA2* gene varies in mammary tissue among women with sporadic breast cancer. *J. Genet.* 87, 155-158.
- Day, J.K., Bauer, A.M., Desbordes, C., Zhuang, Y., Kim, B.E., Newton, L.G., et al. (2002). Genistein alters methylation patterns in mice. *J. Nutr.* 132, 2419S-2423S.

- Dobrovic, A., and Simpfendorfer, D. (1997). Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res.* 57, 3347–3350.
- Dolinoy, D.C., Weidman, J.R., Waterland, R.A., and Jirtle, R.L. (2006). Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ. Health Perspect.* 114, 567–572.
- Elsheikh, S.E., Green, A.R., Rakha, E.A., Powe, D.G., Ahmed, R.A., Collins, H.M., et al. (2009). Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res.* 69, 3802–3809.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat. Rev. Genet.* 8, 286–298.
- Esteller, M., Silva, J.M., Dominguez, G., Bonilla, F., Matias-Guiu, X., Lerma, E., et al. (2000). Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 564–569.
- Fang, M., Chen, D., and Yang, C.S. (2007). Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J. Nutr.* 137, 223S–228S.
- Fang, M.Z., Chen, D., Sun, Y., Jin, Z., Christman, J.K., and Yang, C.S. (2005). Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARBeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin. Cancer Res.* 11, 7033–7041.
- Ferlay, J., Parkin, D.M., and Steliarova-Foucher, E. (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur. J. Cancer* 46, 765–781.
- Hedenfalk, I., Duggan, D., Chen, Y., Radmacher, M., Bittner, M., Simon, R., et al. (2001). Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 344, 539–548.
- King-Batoon, A., Leszczynska, J.M., and Klein, C.B. (2008). Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 36–45.
- Koch, C., and Stratling, W.H. (2004). DNA binding of methyl-CpG-binding protein MeCP2 in human MCF7 cells. *Biochemistry* 43, 5011–5021.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., et al. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863–870.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., Van der Saag, P.T., et al. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252–4263.
- Lee, M.N., Tseng, R.C., Hsu, H.S., Chen, J.Y., Tzao, C., Ho, W.L., et al. (2007). Epigenetic inactivation of the chromosomal stability control genes BRCA1, BRCA2, and XRCC5 in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 832–838.
- Li, Y., Liu, L., Andrews, L.G., and Tollefsbol, T.O. (2009). Genistein depletes telomerase activity through cross-talk between genetic and epigenetic mechanisms. *Int. J. Cancer* 125, 286–296.
- Li, Y., and Tollefsbol, T.O. (2010). Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components. *Curr. Med. Chem.* 17, 2141–2151.
- Liu, Z.H., Kanjo, Y., and Mizutani, S. (2010). A review of phytoestrogens: their occurrence and fate in the environment. *Water Res.* 44, 567–577.
- Lyn-Cook, B.D., Blann, E., Payne, P.W., Bo, J., Sheehan, D., and Medlock, K. (1995). Methylation profile and amplification of proto-oncogenes in rat pancreas induced with phytoestrogens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208, 116–119.
- Majid, S., Dar, A.A., Ahmad, A.E., Hirata, H., Kawakami, K., Shahryari, V., et al. (2009). BTG3 tumor suppressor gene promoter demethylation, histone modification and cell cycle arrest by genistein in renal cancer. *Carcinogenesis* 30, 662–670.
- Mancini, D.N., Rodenhiser, D.I., Ainsworth, P.J., O'Malley, F.P., Singh, S.M., Xing, W., et al. (1998). CpG methylation within the 5' regulatory region of the BRCA1 gene is tumor specific and includes a putative CREB binding site. *Oncogene* 16, 1161–1169.
- Messina, M., and Wu, A.H. (2009). Perspectives on the soy-breast cancer relation. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1673S–1679S.
- Miller, O.J., Schnedl, W., Allen, J., and Erlanger, B.F. (1974). 5-Methylcytosine localised in mammalian constitutive heterochromatin. *Nature* 251, 636–637.
- Mirza, S., Sharma, G., Pandya, P., and Ralhan, R. (2010). Demethylating agent 5-aza-2-deoxycytidine enhances susceptibility of breast cancer cells to anticancer agents. *Mol. Cell. Biochem.* 342, 101–109.
- Muller, H.M., Fiegl, H., Goebel, G., Hubalek, M.M., Widschwendter, A., Muller-Holzner, E., et al. (2003). MeCP2 and MBD2 expression in human neoplastic and non-neoplastic breast tissue and its association with oestrogen receptor status. *Br. J. Cancer* 89, 1934–1939.
- Oseni, T., Patel, R., Pyle, J., and Jordan, V.C. (2008). Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. *Planta Med.* 74, 1656–1665.
- Pfitscher, A., Reiter, E., and Jungbauer, A. (2008). Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 112, 87–94.
- Qin, W., Zhu, W., Shi, H., Hewett, J.E., Ruhlen, R.L., MacDonald, R.S., et al. (2009). Soy isoflavones have an anti-estrogenic effect and alter mammary promoter hypermethylation in healthy premenopausal women. *Nutr. Cancer* 61, 238–244.
- Rice, J.C., Massey-Brown, K.S., and Futscher, B.W. (1998). Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells. *Oncogene* 17, 1807–1812.
- Rice, J.C., Ozcelik, H., Maxeiner, P., Andrulis, I., and Futscher, B.W. (2000). Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis* 21, 1761–1765.
- Rossetto, D., Truman, A.W., Kron, S.J., and Cote, J. (2010). Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair. *Clin Cancer Res* 16, 4543–4552.
- Setchell, K.D. (2001). Soy isoflavones—benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). *J. Am. Coll. Nutr.* 20, 354S–362S; discussion 381S–383S.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1409–1416.
- Soule, H.D., Maloney, T.M., Wolman, S.R., Peterson, W.D., Jr., Brenz, R., McGrath, C.M., et al. (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* 50, 6075–6086.
- Takeuchi, S., Takahashi, T., Sawada, Y., Iida, M., Matsuda, T., and Kojima, H. (2009). Comparative study on the nuclear hormone receptor activity of various phytochemicals and their metabolites by reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 195–202.
- Tost, J. (2010). DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Mol. Biotechnol.* 44, 71–81.
- Vissac-Sabatier, C., Bignon, Y.J., and Bernard-Gallon, D.J. (2003). Effects of the phytoestrogens genistein and daidzein on

- BRCA2 tumor suppressor gene expression in breast cell lines. *Nutr. Cancer* 45, 247–255.
- Wessels, L.F., Van Welsem, T., Hart, A.A., Van't Veer, L.J., Reinders, M.J., and Nederlof, P.M. (2002). Molecular classification of breast carcinomas by comparative genomic hybridization: a specific somatic genetic profile for BRCA1 tumors. *Cancer Res.* 62, 7110–7117.
- Wu, C., and Morris, J.R. (2001). Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* 293, 1103–1105.
- Zhao, Y., Leung, P.C., Woo, K.S., Chen, G.G., Wong, Y.O., Liu, S.X., et al. (2004). Inhibitory effects of budesonide, desloratadine and dexamethasone on cytokine release from human mast cell line (HMC-1). *Inflamm. Res.* 53, 664–669.

Address correspondence to:

Professor Yves-Jean Bignon

Département d'Oncogénétique

Centre Jean Perrin

58 Rue Montalembert, BP 392

63011 Clermont-Ferrand, France

E-mail: Yves-Jean.BIGNON@cjp.fr

Conclusions de la publication N°5 :

Dans cette étude, nous avons analysé les modifications de méthylation des îlots CpG présents dans les promoteurs de *BRCA1* et *BRCA2* en cellules mammaires, suite à leur exposition aux phyto-œstrogènes du soja. Nos résultats de MeDIP-PCR montrent pour la première fois que la génistéine et la daidzéine sont capables de déméthylater les promoteurs de *BRCA1* et *BRCA2*, bien que ces effets soient moins forts que ceux de la 5-azacytidine, un agent déméthylant de synthèse. La quantification des protéines *BRCA1* et *BRCA2* observées par western-blotting révèle que cette déméthylation est accompagnée d'une augmentation des protéines *BRCA1* et *BRCA2*, toutefois ces effets semblent parfois très faibles. Les résultats observés par immunohistochimie montrent bien une augmentation des protéines *BRCA1* et *BRCA2* suite à la déméthylation des oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2* induite par la génistéine ou la daidzéine. Ces résultats sont en accord avec deux études montrant l'absence de protéine *BRCA1* dans les tumeurs méthylées dans le promoteur du gène *BRCA1* [137, 152]. Les résultats de microscopie confocale confirment ceux d'immunohistochimie et permettent également de montrer une diminution de la méthylation globale de l'ADN, qui pourrait être la conséquence de la diminution de méthylation de nombreux gènes. Enfin, la protéine MeCP2, dont l'expression est augmentée dans le cancer [269, 270] est sous-exprimée après traitement par la génistéine, la daidzéine ou la 5-azacytidine. Cette étude montre que la génistéine et la daidzéine ont des effets déméthylants sur les promoteurs des oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2*, associée à une augmentation de leur expression protéique dans des lignées continues de cellules mammaires. Toutefois, elle ne permet pas de conclure sur un effet ciblé sur certains gènes, ou une action plus globale, à l'échelle du génome.

Présentation de la publication N°6 :

Le S-équol, métabolite de la daidzéine est de plus en plus étudié car il posséderait une plus grande affinité pour les récepteurs aux œstrogènes que son précurseur, [187]. Comme pour les phyto-œstrogènes du soja, les études sur un éventuel effet protecteur du S-équol sur le cancer du sein n'aboutissent pas à un consensus [271]. Toutefois, et comme pour les phyto-œstrogènes du soja, le S-équol pourrait agir sur la méthylation de l'ADN dont le dérèglement est un mécanisme de l'oncogenèse [272]. A notre connaissance, une seule étude a montré un effet du S-équol sur la méthylation de l'ADN ; en effet, Lyn-Cook *et al.* (1995) ont montré que les rats nourris avec un régime enrichis en S-équol ont une méthylation plus forte de l'oncogène H-ras dans les cellules d'acini du pancréas que les rats ayant un faible taux circulant de S-équol [203].

Dans cette étude, nous avons examiné les changements dans la méthylation des îlots CpG présents dans les promoteurs de *BRCA1* et *BRCA2* dans des lignées continues de cellules mammaires, après exposition par le S-équol à doses physiologiques et durant 3 semaines par la technique de QAMA. Cette étude doit permettre d'observer une éventuelle action du S-équol, au niveau épigénétique et à des doses physiologiques. Nous avons également observé les conséquences de ce traitement sur l'expression des protéines BRCA1 et BRCA2 par Western-Blotting et Immunohistochimie. Cette étude permettra ainsi de montrer un éventuel effet de doses physiologiques de S-équol sur la méthylation de *BRCA1* et *BRCA2* dans le cancer du sein et, par conséquent, sur l'expression de leurs protéines.

Publication N°6 :

« Modulation of *BRCA1* and *BRCA2* gene expression by equol in breast cancer cell lines. »

Rémy Bosviel, Julie Durif, Pierre Déchelotte, Yves-Jean Bignon, Dominique Bernard-Gallon
Br J Nutr. 2012, 108(7):1187-93.

Epigenetic modulation of *BRCA1* and *BRCA2* gene expression by equol in breast cancer cell lines

Rémy Bosviel^{1,2}, Julie Durif^{1,2}, Pierre Déchelotte^{2,3}, Yves-Jean Bignon^{1,2*} and Dominique Bernard-Gallon^{1,2}

¹Centre Jean Perrin, Département d'Oncogénétique, CBRV, 28 Place Henri Dunant, BP 38, 63001 Clermont-Ferrand, France

²Université d'Auvergne, EA 4233, Nutrition, Cancérogénèse et Thérapie anti-tumorale, 28 Place Henri Dunant, BP 38, 63001 Clermont-Ferrand, France

³CHU, Nouvel Hôpital Estaing, Service d'Anatomie Pathologique, 1 Place Lucie Aubrac, 63100 Clermont-Ferrand, France

(Submitted 20 July 2011 – Final revision received 14 September 2011 – Accepted 14 September 2011 – First published online 5 January 2012)

Abstract

S-Equol is a metabolite resulting from the conversion of daidzein, a soya phyto-oestrogen, by the gut microflora. The potential protective effects of equol in breast cancer are still under debate. Consequently, we investigated the effects of equol on DNA methylation of breast cancer susceptibility genes (*BRCA1* and *BRCA2*) and oncosuppressors in breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7) and in a dystrophic breast cell line (MCF-10a) following exposure to S-equol (2 µM) for 3 weeks. We demonstrated by quantitative analysis of methylated alleles a significant decrease in the methylation of the cytosine phosphate guanine (CpG) islands in the promoters of *BRCA1* and *BRCA2* after the S-equol treatment in MCF-7 and MDA-MB-231 cells and a trend in MCF-10a cells. We also showed that S-equol increases *BRCA1* and *BRCA2* protein expression in the nuclei and the cytoplasm in MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10a cell lines by immunohistochemistry. The increase in *BRCA1* and *BRCA2* proteins was also found after Western blotting in the studied cell lines. In summary, we demonstrated the demethylating effect of S-equol on the CpG islands inside the promoters of *BRCA1* and *BRCA2* genes, resulting in an increase in the level of expressed oncosuppressors in breast cancer cell lines.

Key words: Equol; Breast cancer susceptibility genes 1 and 2; Breast cancer

First found in equine urine⁽¹⁾, equol is a non-steroidal oestrogen. Many years after its discovery, it was found that the soya isoflavone daidzein was a precursor to equol⁽²⁾, and that soya consumption increased the excretion of equol in some, but not all, adults. Studies have shown that gut microflora was responsible for the conversion of daidzein to S-equol⁽³⁾. More recently, particular bacteria capable of this conversion were even isolated⁽⁴⁾. Multiple studies have shown that equol producers were more frequent in Asian countries than in Western countries, which led researchers to ask themselves whether particular diets would not favour equol-producing microflora⁽⁵⁾. Equol is a chiral molecule and two forms can coexist: R- and S-equol. Distinction between these two forms and purification of one of them is complex, so many studies have worked on the effects of racemic equol. Today, it has been shown that only S-equol is synthesised by gut bacteria⁽⁶⁾ and S-equol is commercially available, leading to studies on the effect of S-equol alone.

Breast cancer is the most frequent cancer in women, with 1.38 million new cases and 458 000 deaths in 2008⁽⁷⁾. The incidence of breast cancer is high in Western countries, and low in Asia. This difference has been attributed, at least in part, to the Asian traditional diet, containing larger amounts of soya than the Western diet. Particular chemicals in soya, namely phyto-oestrogens, are supposed to have protective effects on breast cancer, mainly because of their similarity of structure with 17-β-oestradiol, the natural human oestrogen, allowing them to bind and activate oestrogen receptors (ER)^(8–10), with, contrarily to 17-β-estradiol, a higher affinity for ERβ^(9,11). This is also the case for S-equol^(6,12). More recently, special attention has been paid to S-equol, as some studies have shown that equol had a greater affinity for ER than its precursor, daidzein⁽¹²⁾.

Many studies have worked on the potential protective effect of soya over breast cancer, but mixed results have been found^(1,3). Studies on the effects of S-equol on breast

Abbreviations: *BRCA1*, breast cancer susceptibility gene 1; *BRCA2*, breast cancer susceptibility gene 2; CpG, cytosine phosphate guanine; ER, oestrogen receptor; QAMA, quantitative analysis of methylated alleles.

* **Corresponding author:** Y.-J. Bignon, email yves-jean.bignon@cjp.fr

cancer risk have led to the same mixed results. As epigenetic mechanisms are implied in cancer, a growing number of studies have investigated the effect of soya phyto-oestrogens on those mechanisms, particularly DNA methylation⁽¹⁴⁾. In normal tissues, oncogenes and repeated sequences are globally methylated while oncosuppressors are hypomethylated, particularly at the level of cytosine phosphate guanine (CpG) islands found in the promoters of these genes⁽¹⁵⁾. In cancer, an inversion of this methylation profile is found, so it has been stated that soya phyto-oestrogens could have protective effects on cancer by reverting this methylation profile. Moreover, protective effects of breast cancer are observed in women consuming moderate amounts of soya since their childhood but not in women starting soya consumption after the menopause^(16,17). This observation could be the result of a protective epigenetic effect with expression changes of genes implicated in the early events of carcinogenesis. Some studies have shown a demethylating action of genistein and daidzein on oncosuppressors in cancer cells⁽¹⁴⁾. To our knowledge, only one study showed an effect of equol on DNA methylation: Lyn-Cook *et al.*⁽¹⁸⁾ showed that high doses of equol caused the hypermethylation of the *c-H-ras* proto-oncogene in the pancreas cells of neonatal rats. Here, we investigated the effects of equol on the methylation of two major breast cancer oncosuppressors: *BRCA1* and *BRCA2*. The breast cancer susceptibility gene 1 (*BRCA1*) and the breast cancer susceptibility gene 2 (*BRCA2*) are the major high-penetrance genes in which mutations increase susceptibility to breast cancer. Mutations in these genes account together for 2–3% of all breast cancers and about 30–40% of all familial breast cancers⁽¹⁹⁾. The *BRCA1* gene is located on chromosome 17q12-21. *BRCA1* is involved in many transcriptional activation or transcriptional repression processes⁽²⁰⁾. It also plays a role in apoptosis, genomic stability maintenance, and DNA recognition and repair⁽²¹⁾. The *BRCA2* gene is located on chromosome 13q12-13. The gene codes for proteins involved in DNA repair, cell-cycle control and transcription⁽²²⁾, and may have a function in the terminal differentiation of breast epithelial cells⁽²³⁾.

Although somatic mutations of these genes are rarely found in sporadic breast cancers^(22–26), methylation of the promoter of *BRCA1* coupled with a decrease in mRNA⁽²⁷⁾ or lower *BRCA1* protein^(28,29) can be found. *BRCA2* promoter methylation has also been reported in sporadic breast cancer cases⁽³⁰⁾.

As a growing number of studies have shown the effects of soya phyto-oestrogens on DNA methylation^(18,31–35), the protective effects of soya isoflavones on breast cancer could be due, at least in part, to an effect on DNA methylation.

We undertook the present study to examine changes in DNA methylation of the CpG islands in the promoters of *BRCA1* and *BRCA2* in breast cancer cells following exposure to *S*-equol at physiological doses during 3 weeks.

Materials and methods

Cell lines

MCF-7 and MDA-MB-231 breast tumour cell lines came from a pleural effusion of patients with invasive breast

carcinoma^(36,37). The MCF-10a cell line was established from the breast tissue of patients with fibrocystic breast disease⁽³⁸⁾. All three human cell lines were provided by the American Type Culture Collection. MCF-7 were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium supplemented with 2 mM-L-glutamine (Invitrogen), gentamycin (20 µg/ml; Panpharma), 10% fetal bovine serum (Invitrogen) and insulin (1.4 µg/ml; Novo Nordisk) in a humidified atmosphere at 37°C containing 5% CO₂. This cell line has a positive ER status (ERα+/ERβ+). MCF-10a cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (Invitrogen) containing 10% horse serum (Invitrogen), 2 mM-L-glutamine, gentamycin (20 µg/ml; Panpharma), epidermal growth factor (20 ng/ml; Sigma), cholera toxin (100 ng/ml; Sigma), insulin (10 µg/ml; Novo Nordisk) and hydrocortisone (0.5 µg/ml; Sigma) held at 37°C with 5% CO₂. This cell line has a negative oestrogen receptor status (ERα–/ERβ–). MDA-MB-231 cells were grown in Leibovitz L-15 medium with 15% fetal bovine serum (Invitrogen), gentamycin (20 µg/ml; Panpharma) and 2 mM-L-glutamine in a 37°C humidified atmosphere without CO₂. This cell line has a negative ER status (ERα–/ERβ+).

The ER status of the three cell lines has previously been confirmed by immunohistochemistry⁽³⁹⁾.

Cell treatments

Cells (1 × 10⁶ per T75 flask) were seeded in the medium and treated with 2 µM-*S*-equol provided by the ENITA Unité Micronutriments-Reproduction-Santé and dissolved in dimethyl sulfoxide. As controls, the cell lines were also conditioned in the medium with the solvent dimethyl sulfoxide.

During the 3 weeks, each 48 h and just before 80% confluence, cells were trypsinised and cell number scored on a Malassez cell using Trypan blue, and then they were passed into three flasks and the treatments were added again.

DNA extraction

DNA was extracted using Millipore's non-organic DNA extraction kit as follows: after recovering the cells, 9 ml of wash buffer 1X were added to resuspend the pellet. After 15 min of incubation at room temperature, the cells were centrifuged at 1000 g for 20 min. The supernatant was discarded and the cells were resuspended in 3 ml of suspension buffer I 1X. Lysis buffer I (800 µl) and 50 µl of protein-digesting enzyme were added to the suspension. The samples were incubated for 2 h at 50°C. After adding 1 ml of a protein-precipitating agent, a 15 min centrifugation at 1000 g was carried out. The supernatant thus obtained was mixed with two volumes of absolute ethanol. The precipitated DNA was recovered using an inoculating needle, dried for 5 min at room temperature, and dipped in 5 ml of 70% ethanol. DNA was resuspended in 300 µl of suspension buffer II. After vortexing them for 5 min, the samples were left in incubation overnight at 50°C. The quantity of DNA collected as well as the quality of the extraction was then determined by spectrometry using a NanoDrop™ 8-sample spectrophotometer (ND-8000, NanoDrop Technologies®).

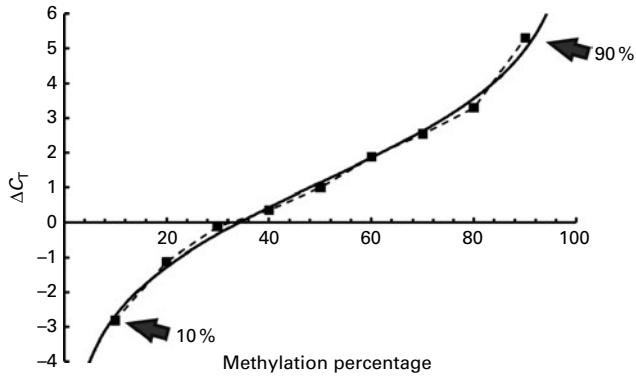


Fig. 1. Example of a standard curve for breast cancer susceptibility gene 2 (*BRCA2*) quantitative analysis of methylated alleles. ΔC_T values obtained for standard samples were plotted against their defined methylation ratio. The methylation ratio of the tested samples was found by plotting the ΔC_T values obtained onto this standard curve. In the case where only one fluorescence signal crossed the threshold, indicating a relative absence of the opposite target, the methylation percentage was set to 0 or 100%, depending on the nature of the fluorescence.

Bisulfite treatment and quantitative analysis of methylated alleles

Conversion of unmethylated cytosines to uracil⁽⁴⁰⁾, leaving methylated cytosines unaltered, was achieved using the methylSEQR™ Bisulfite Modification Kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. We measured the methylation of oncosuppressor promoters with the real-time PCR-based quantitative analysis of methylated alleles (QAMA) assay previously described by Zeschnigk *et al.*⁽⁴¹⁾ and adapted here by Bosviel *et al.*⁽⁴²⁾. PCR was performed using a ninety-six-well optical tray with optical adhesive film at a final reaction volume of 20 μ l. Samples contained 10 μ l of TaqMan® Universal PCR Master Mix II, No AmpErase® UNG (uracil-*N*-glycosylase), 8 μ l of bisulfite-treated DNA, an additional 5U of FastStart Taq DNA Polymerase (Roche), 2.5 μ M each of the primers and 150 nM of the fluorescently labelled methylated and unmethylated *BRCA1* or methylated and unmethylated *BRCA2* probes. Initial denaturation at 95°C for 10 min to activate DNA polymerase was followed by forty cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing and extension at 60°C for 1 min (7900HT, Real-Time PCR System; Applied Biosystems). Primer and probe sequences were selected with the help of Primer Express software (ABI). PCR primers were designed to amplify the bisulfite-converted sense strand of the CpG island *BRCA1* promoter sequence or the antisense strand of the CpG island *BRCA2* promoter sequence, lacking any known nucleotide polymorphisms. The software designs primers with a melting temperature (T_m) of 58–60°C and probes with a T_m value of 68–69°C. The T_m of both primers should be equal. The amplicon sizes were 79 bp for *BRCA1* (located at chromosome 17: 41278096–41278175 on the Ensembl GRCh37/hg19 assembly) and 87 bp for *BRCA2* (located at chromosome 13: 32889345–32889428). Primer and probe sequences are as follows: for *BRCA1*, forward primer – 5'-GGAGTTTGGGGTAAGTAGTTT-GTAAG-3'; reverse primer – 5'-TTCCCTACCCCAAACAATT-3';

methylated probe – 5'-VIC-ACTACGTCCCCGCAA-MGBNFQ-3'; unmethylated probe – 5'-6FAM-ACTACATCCCCACAAAC-MGBNFQ-3'; for *BRCA2*, forward primer – 5'-GTTGGAGTAAA-AAGAAAGGGATGG-3'; reverse primer – 5'-CCTTAAAAATCCC-AAACCACCC-3'; methylated probe – 5'-VIC-AAACCGCCCCCT-ATAC-MGBNFQ-3'; unmethylated probe – 5'-6FAM-AAAACCA-CCCCTATACC-MGBNFQ-3'. The primer binding sites lack CpG dinucleotides and, therefore, the nucleotide sequences in the methylated and unmethylated DNA are identical after the bisulfite treatment. Consequently, it is possible to amplify both alleles in the same reaction tube with one primer pair. Methylation discrimination occurs during probe hybridisation by the use of two different MGB Taqman® probes. The binding site of the *BRCA1* and *BRCA2* MGB Taqman® probes both cover two CpG dinucleotides. We used a VIC-labelled MGB Taqman® probe that specifically hybridises to the sequence derived from the methylated allele, and a 6-carboxyfluorescein (FAM)-labelled MGB

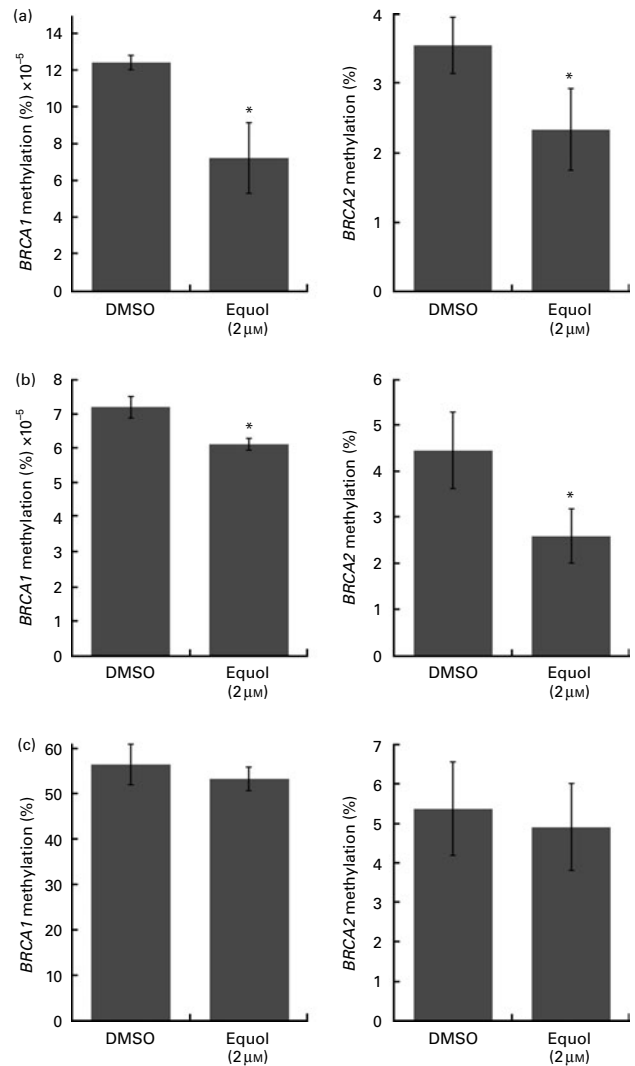


Fig. 2. Breast cancer susceptibility genes (*BRCA1* and *BRCA2*) methylation in (a) MDA-MB-231, (b) MCF-7 or (c) MCF-10a cells treated for 3 weeks with 2 μ M-*S*-equol compared with the dimethyl sulfoxide (DMSO) control. *BRCA1* and *BRCA2* methylation were decreased significantly following the *S*-equol treatment in the MDA-MB-231 and MCF-7 cells ($P < 0.05$).

Taqman[®] probe that binds to the sequence generated from the unmethylated allele. The amount of FAM and VIC fluorescence released during the PCR was measured by the real-time PCR system and is directly proportional to the amount of the PCR product generated. The cycle number at which the fluorescence signal crosses a detection threshold is referred to as C_T and the difference of both C_T values within a sample (ΔC_T) is calculated ($\Delta C_T = C_{T-FAM} - C_{T-VIC}$). All samples were measured in duplicate using the mean for further analysis. For a precise quantification of the ratio of methylated:unmethylated alleles, the ΔC_T value is determined and compared with a standard curve that exhibits a sigmoid shape with a linear part in the range of 10–90% of methylated DNA (Fig. 1). To set up the curve, we mixed bisulfite-treated and methylated control human DNA (EpiTect, ref. 59655; Qiagen) with defined ratios of bisulfite-treated and unmethylated control human DNA (EpiTect, ref. 59665; Qiagen) implemented in each run. From this, we deduced an algorithm to calculate the methylation ratio of

an unknown sample from its ΔC_T value by the Mathematica software package version 5.2 from Wolfram Research (<http://www.wolfram.com>). Student's *t* test was performed using the data obtained with QAMA, and $P < 0.05$ was considered to be statistically significant compared with the cells treated with the solvent dimethyl sulfoxide.

Western blotting

Proteins were extracted from the cells with lysis buffer containing 20 mM-Tris (pH 8), 50 mM-EDTA, 0.8% NaCl, 0.1% Triton X-100 and 1% glycerol. Protease inhibitors (1%, Protease Inhibitor Cocktail; Sigma) and phosphatase inhibitors (1%, Phosphatase Inhibitor Cocktail 2; Sigma) were added to the basic buffer extemporaneously (1% each). Then, 50 μ g proteins were electrophoresed on a SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. After 1 h blocking in Tris-Buffered Saline Tween 0.1% containing 5% milk, membranes were incubated overnight at 4°C with anti-BRCA1 (1:150 Mouse (Ab-1); Calbiochem), anti-BRCA2 (1:50 Rabbit (H-300); Santa Cruz Biotechnology[®]) or anti-actin (1:120,000 Mouse (Ab-1); Calbiochem) antibodies. The membranes were then washed three times in Tris-buffered saline Tween and incubated for 1 h with alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (1:2000 goat anti-mouse IgG (H&L) AP conjugate or 1:2000 goat anti-rabbit IgG (Fc) AP conjugate; Promega). Detection was then performed with the Western Blue detection system (Promega). Relative quantification of immunoblotted proteins was achieved using Quantity One software (Bio-Rad) with the local background subtraction method. A ratio between the intensity of the protein of interest and a reference protein (actin) was then calculated. The relative ratio was then calculated between each condition and the reference condition (dimethyl sulfoxide-treated cells).

Immunohistochemistry

For immunohistochemical analysis, 4 μ m alcohol–formalin–acetic acid-fixed and paraffin-embedded sections of MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10a cell pellets were cut using a microtome. They were mounted on silanised glass slides (Starfrost; Duiven) and dried overnight at 37°C. Slides were processed on an automated Benchmark XT immunohistochemical instrument (Ventana). In particular, sections were deparaffinised and rehydrated using EZ Prep (Ventana), and heat-induced antigen retrieval using CC1 (Ventana) was performed for 30 min. The slides were then incubated at 37°C for 44 min with anti-BRCA1 (1:20 mouse (8F7); GeneTex[®]) or anti-BRCA2 (1:20 mouse (Ab-1); Calbiochem[®]) primary antibodies. For detection, we used the UltraView universal DAB detection kit (Ventana). Signal was amplified using the Ventana amplification kit. The slides were then counterstained with haematoxylin for 3 min, rinsed in distilled water and coverslipped with an aqueous Faramount mounting media (DAKO). The primary polyclonal antibody was omitted and replaced with PBS as a negative control.

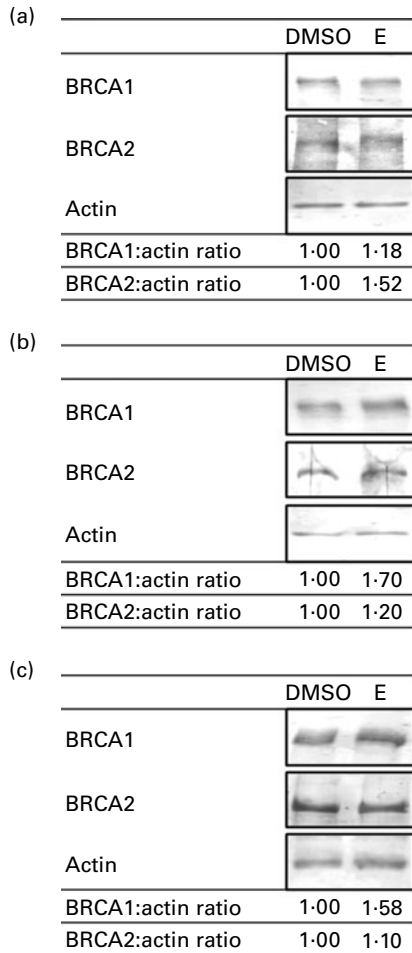


Fig. 3. Western blots with breast cancer susceptibility genes (*BRCA1* and *BRCA2*) and actin proteins extracted from (a) MCF-7, (b) MDA-MB-231 and (c) MCF-10a cells. Ratios shown correspond to relative ratios of optical densities of the bands (measured with Quantity One software; Bio-Rad) from interest proteins over actin, relatively to the control condition (dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated cells). Cells were treated for 3 weeks with DMSO (control condition) or 2 μ M-S-equol (E).

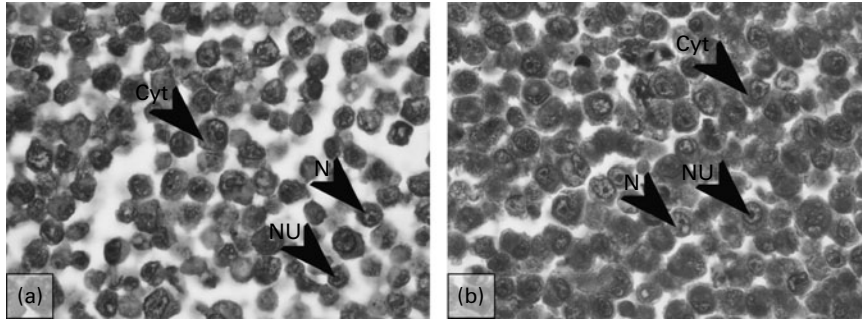


Fig. 4. Immunoperoxidase staining of MDA-MB-231 human breast cancer cell lines on paraffin-embedded sections (60×). (a) Cytoplasmic, nuclear and nucleolar staining were exhibited with 1:20 breast cancer susceptibility gene 2 (*BRCA2*) monoclonal antibody (Ab1), shown by arrowheads in untreated cells. (b) The *BRCA2* staining after 2 μM-*S*-equol treatment was considerably increased. N, nucleus; Cyt, cytoplasm; NU, nucleoli.

Results

Effect of *S*-equol on *BRCA1* and *BRCA2* CpG promoter methylation

QAMA was used to study the effects of *S*-equol on *BRCA1* and *BRCA2* CpG islands. We showed a significant decrease in the methylation of the CpG islands in the promoters of *BRCA1* and *BRCA2* following the 2 μM-*S*-equol treatment during 3 weeks in MDA-MB-231 and MCF-7 cells compared with the control (Fig. 2(a) and (b), respectively). This demethylation was not significant in MCF-10a cells (Fig. 2(c)).

Effect of *S*-equol on *BRCA1* and *BRCA2* protein expression

Western blotting was used to study the effects of *S*-equol on *BRCA1* and *BRCA2* protein expression. We showed an increase in *BRCA1* and *BRCA2* proteins following the 2 μM-*S*-equol treatment for 3 weeks in MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10a cell lines (Fig. 3(a)–(c), respectively). An extensive increase in *BRCA1* staining was found by immunohistochemistry in the nuclei, the cytoplasm and nucleoli in MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10a cell lines after 2 μM-*S*-equol exposure for 3 weeks. For *BRCA2*, the increase in staining was exhibited preferentially in the cytoplasm (Fig. 4). The results of immunohistochemistry are compiled in Table 1.

Discussion

A growing number of studies have revealed the importance of DNA methylation in cancer, with a global hypomethylation of DNA and the hypermethylation of CpG islands of oncosuppressors, leading to chromosomal instability and loss of the expression of oncosuppressors. In breast cancer, hypermethylation of the *BRCA1* and *BRCA2* genes has been found, associated with a decrease in mRNA expression for *BRCA1*. *S*-equol, an intestinal bacterial metabolite of daidzein, is a putative protective molecule for breast cancer. The present study sustains the idea that this protective effect could pass through epigenetic modulation of *BRCA1* and *BRCA2* expression. The mechanism for this effect is not yet clearly known, although studies have shown that *S*-equol can bind and activate ER.

As more and more studies have shown the effects of soya phyto-oestrogens on DNA methylation, we decided to study

the effects of *S*-equol in breast cancer cell lines on *BRCA1* and *BRCA2* methylation and consequent protein expression. We studied the effects of *S*-equol on the expression of the *BRCA1* and *BRCA2* genes that interact together in two human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) and in a fibrocystic cell line (MCF-10a). We chose an exposure of 3 weeks to *S*-equol, because this treatment has been shown to increase the number of cells blocked in the S phase⁽⁴³⁾, and *BRCA1* and *BRCA2* reach their maximal level in the late G1 and S phases in normal and tumour-derived breast epithelial cells⁽⁴⁴⁾.

An important point in the design of the present study is the use of physiological doses of *S*-equol, in the same order of magnitude as plasma concentrations found in post-menopausal women^(45,46). Long exposures were carried out to point out an eventually weak effect due to the use of such doses. The effects observed in the present study thus have better chances to be representative of real-life exposure.

We provide evidence that *S*-equol demethylates the promoters of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines, but not in the MCF-10a cell line. We also showed an increase in the expression of the *BRCA1* and *BRCA2* proteins in the studied cell lines following the *S*-equol treatment. The fact that demethylation occurred in

Table 1. Effects of *S*-equol on breast cancer susceptibility genes (*BRCA1* and *BRCA2*) expression in MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10a cell lines*

	BRCA1 (8F7)			BRCA2 (Ab-1)		
	Cyt	N	Nu	Cyt	N	Nu
MDA-MB-231						
DMSO	+	++	++	+	+	+/-
<i>S</i> -Equol (2 μM)	++	+++	++	+++	+/-	+/-
MCF-7						
DMSO	+	++	++	++	+/-	-
<i>S</i> -Equol (2 μM)	+	+++	+++	+++	+/-	-
MCF-10a						
DMSO	+	++	+	++	+/-	-
<i>S</i> -Equol (2 μM)	+	+++	+	+++	+/-	-

Cyt, cytoplasm; N, nucleus; Nu, nucleoli; DMSO, dimethyl sulfoxide.

* Cells were treated during 3 weeks with *S*-equol (2 μM). Cells were also treated with DMSO, the solvent in which *S*-equol was diluted. Then, the cells were immunostained with MoAb anti-*BRCA1* (8F7) or anti-*BRCA2* (Ab-1). Staining: negative (-); intermediate (+/-); less intensive (+); intensive (++); very intensive (+++).

MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines but not in the MCF-10a cell line whereas protein expression increased in all the three cell lines could suggest that DNA methylation was not the only mechanism regulating *BRCA1* and *BRCA2* expression that can be modulated by *S*-equol, and thus studies on histone mark status following the *S*-equol treatment could be interesting. Indeed, many studies have shown the effects of soya phyto-oestrogens on histone modifications, and *S*-equol could have similar effects^(35,47–50). Hong *et al.*⁽⁵¹⁾ also showed that equol stimulates ER-mediated histone acetyl transferase activity. ER status and, more particularly, ER β status may play a role in the action of *S*-equol on DNA methylation, as the MCF-10a cell line lacks the ER β receptor. To our knowledge, only one study has reported an effect of equol on DNA methylation, showing a rise in the methylation of the proto-oncogene *c-H-ras* in rat pancreatic cells⁽¹⁸⁾, while more data are found for other soya phyto-oestrogens^(14,31,32,34,35,49,52–58). Such effects on oncosuppressors could help prevent cancer by restoring their expression similar to the protein expression of *BRCA1* and *BRCA2* in the present experiment. Studies on whether this demethylating effect is limited to the CpG islands in the promoter of oncosuppressors or whether it also acts on the methylation of other CG sites could be interesting, as demethylating effects on global methylation and, more particularly, repeated elements or transposable elements would be a counter effect for cancer prevention⁽⁵⁹⁾.

In summary, the present study shows that *S*-equol has a demethylating effect on the CpG islands in the promoters of *BRCA1* and *BRCA2* genes. This effect might be linked with the presence of ER but the increase in subsequent protein expression is independent of this parameter. Thus, we suppose that other mechanisms can also be implied, such as effects on histone modifications.

Acknowledgements

We thank Nicolas Sonnier and Christelle Picard for helpful technical assistance. R. B. is the recipient of a grant from the Auvergne Regional Council/CPER 2008 + FEDER no. 32316 – 0930FDBG – 106NL. R. B., P. D., Y.-J. B. and D. B.-G. contributed to the experimental design. R. B. and J. D. were responsible for performing the experiments. R. B., J. D. and P. D. contributed to the data analysis. R. B. and D. B.-G. contributed to manuscript preparation. The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Marrian GF & Haslewood GA (1932) Equol, a new inactive phenol isolated from the ketohydroxyoestrin fraction of mares' urine. *Biochem J* **26**, 1227–1232.
- Axelson M, Kirk DN, Farrant RD, *et al.* (1982) The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)chroman] in human urine. *Biochem J* **201**, 353–357.
- Setchell KD, Borriello SP, Hulme P, *et al.* (1984) Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am J Clin Nutr* **40**, 569–578.
- Setchell KD & Clerici C (2010) Equol: history, chemistry, and formation. *J Nutr* **140**, 1355S–1362S.
- Setchell KD & Cole SJ (2006) Method of defining equol-producer status and its frequency among vegetarians. *J Nutr* **136**, 2188–2193.
- Setchell KD, Brzezinski A, Brown NM, *et al.* (2005) Pharmacokinetics of a slow-release formulation of soybean isoflavones in healthy postmenopausal women. *J Agric Food Chem* **53**, 1938–1944.
- Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**, 69–90.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, *et al.* (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**, 863–870.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, *et al.* (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**, 4252–4263.
- Pfitcher A, Reiter E & Jungbauer A (2008) Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol* **112**, 87–94.
- Takeuchi S, Takahashi T, Sawada Y, *et al.* (2009) Comparative study on the nuclear hormone receptor activity of various phytochemicals and their metabolites by reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Biol Pharm Bull* **32**, 195–202.
- Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, *et al.* (2004) Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of *R*- and *S*-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorg Med Chem* **12**, 1559–1567.
- Satih S, Rabiau N, Bignon YJ, *et al.* (2008) Soy phytoestrogens and breast cancer chemoprevention: molecular mechanisms. *Curr Nutr Food Sci* **4**, 259–264.
- Fang MZ, Jin Z, Wang Y, *et al.* (2005) Promoter hypermethylation and inactivation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in esophageal squamous cell carcinomas and its reactivation in cell lines. *Int J Oncol* **26**, 615–622.
- Das PM & Singal R (2004) DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* **22**, 4632–4642.
- Guha N, Kwan ML, Quesenberry CP, *et al.* (2009) Soy isoflavones and risk of cancer recurrence in a cohort of breast cancer survivors: the Life After Cancer Epidemiology study. *Breast Cancer Res Treat* **118**, 395–405.
- Korde LA, Wu AH, Fears T, *et al.* (2009) Childhood soy intake and breast cancer risk in Asian American women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**, 1050–1059.
- Lyn-Cook BD, Blann E, Payne PW, *et al.* (1995) Methylation profile and amplification of proto-oncogenes in rat pancreas induced with phytoestrogens. *Proc Soc Exp Biol Med* **208**, 116–119.
- Wooster R & Weber BL (2003) Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* **348**, 2339–2347.
- Cable PL, Wilson CA, Calzone FJ, *et al.* (2003) Novel consensus DNA-binding sequence for *BRCA1* protein complexes. *Mol Carcinog* **38**, 85–96.
- Jhanwar-Uniyal M (2003) *BRCA1* in cancer, cell cycle and genomic stability. *Front Biosci* **8**, s1107–s1117.
- Kerr P & Ashworth A (2001) New complexities for *BRCA1* and *BRCA2*. *Curr Biol* **11**, R668–R676.
- Vidarsson H, Mikaelssdottir EK, Rafnar T, *et al.* (2002) *BRCA1* and *BRCA2* bind Stat5a and suppress its transcriptional activity. *FEBS Lett* **532**, 247–252.
- Lambie H, Miremadi A, Pinder SE, *et al.* (2003) Prognostic significance of *BRCA1* expression in sporadic breast carcinomas. *J Pathol* **200**, 207–213.

25. Lerebours F & Lidereau R (2002) Molecular alterations in sporadic breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **44**, 121–141.
26. Venkitaraman AR (2002) Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**, 171–182.
27. Rice JC, Ozcelik H, Maxeiner P, *et al.* (2000) Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis* **21**, 1761–1765.
28. Matros E, Wang ZC, Lodeiro G, *et al.* (2005) BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Res Treat* **91**, 179–186.
29. Tapia T, Smalley SV, Kohen P, *et al.* (2008) Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors. *Epigenetics* **3**, 157–163.
30. Cucer N, Taheri S, Ok E, *et al.* (2008) Methylation status of CpG islands at sites (59 to +96 in exon 1 of the BRCA2 gene varies in mammary tissue among women with sporadic breast cancer. *J Genet* **87**, 155–158.
31. Day JK, Bauer AM, DesBordes C, *et al.* (2002) Genistein alters methylation patterns in mice. *J Nutr* **132**, 2419S–2423S.
32. Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA, *et al.* (2006) Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ Health Perspect* **114**, 567–572.
33. Fang M, Chen D & Yang CS (2007) Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J Nutr* **137**, 223S–228S.
34. King-Batoon A, Leszczynska JM & Klein CB (2008) Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells. *Environ Mol Mutagen* **49**, 36–45.
35. Majid S, Dar AA, Ahmad AE, *et al.* (2009) BTG3 tumor suppressor gene promoter demethylation, histone modification and cell cycle arrest by genistein in renal cancer. *Carcinogenesis* **30**, 662–670.
36. Cailleau R, Young R, Olive M, *et al.* (1974) Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* **53**, 661–674.
37. Soule HD, Vazquez J, Long A, *et al.* (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **51**, 1409–1416.
38. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, *et al.* (1990) Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res* **50**, 6075–6086.
39. Vissac-Sabatier C, Bignon YJ & Bernard-Gallon DJ (2003) Effects of the phytoestrogens genistein and daidzein on BRCA2 tumor suppressor gene expression in breast cell lines. *Nutr Cancer* **45**, 247–255.
40. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, *et al.* (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1827–1831.
41. Zeschnick M, Bohringer S, Price EA, *et al.* (2004) A novel real-time PCR assay for quantitative analysis of methylated alleles (QAMA): analysis of the retinoblastoma locus. *Nucleic Acids Res* **32**, e125.
42. Bosviel R, Michard E, Lavediaux G, *et al.* (2011) Peripheral blood DNA methylation detected in the BRCA1 or BRCA2 promoter for sporadic ovarian cancer patients and controls. *Clin Chim Acta* **412**, 1472–1475.
43. Choi EJ & Kim T (2008) Equol induced apoptosis via cell cycle arrest in human breast cancer MDA-MB-453 but not MCF-7 cells. *Mol Med Report* **1**, 239–244.
44. Bertwistle D & Ashworth A (1998) Functions of the BRCA1 and BRCA2 genes. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 14–20.
45. Mathey J, Lamothe V, Coxam V, *et al.* (2006) Concentrations of isoflavones in plasma and urine of post-menopausal women chronically ingesting high quantities of soy isoflavones. *J Pharm Biomed Anal* **41**, 957–965.
46. Bennetau-Pelissero C, Arnal-Schnebelen B, Lamothe V, *et al.* (2003) ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chem* **82**, 645–658.
47. Jawaid K, Crane SR, Nowers JL, *et al.* (2010) Long-term genistein treatment of MCF-7 cells decreases acetylated histone 3 expression and alters growth responses to mitogens and histone deacetylase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* **120**, 164–171.
48. Kikuno N, Shiina H, Urakami S, *et al.* (2008) Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells. *Int J Cancer* **123**, 552–560.
49. Majid S, Dar AA, Shahryari V, *et al.* (2010) Genistein reverses hypermethylation and induces active histone modifications in tumor suppressor gene B-Cell translocation gene 3 in prostate cancer. *Cancer* **116**, 66–76.
50. Majid S, Kikuno N, Nelles J, *et al.* (2008) Genistein induces the p21WAF1/CIP1 and p16INK4a tumor suppressor genes in prostate cancer cells by epigenetic mechanisms involving active chromatin modification. *Cancer Res* **68**, 2736–2744.
51. Hong T, Nakagawa T, Pan W, *et al.* (2004) Isoflavones stimulate estrogen receptor-mediated core histone acetylation. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 259–264.
52. Berner C, Aumuller E, Gnauck A, *et al.* (2010) Epigenetic control of estrogen receptor expression and tumor suppressor genes is modulated by bioactive food compounds. *Ann Nutr Metab* **57**, 183–189.
53. Guerrero-Bosagna CM, Sabat P, Valdovinos FS, *et al.* (2008) Epigenetic and phenotypic changes result from a continuous pre and post natal dietary exposure to phytoestrogens in an experimental population of mice. *BMC Physiol* **8**, 17.
54. Qin W, Zhu W, Shi H, *et al.* (2009) Soy isoflavones have an antiestrogenic effect and alter mammary promoter hypermethylation in healthy premenopausal women. *Nutr Cancer* **61**, 238–244.
55. Tang WY, Newbold R, Mardilovich K, *et al.* (2008) Persistent hypomethylation in the promoter of nucleosomal binding protein 1 (Nsbp1) correlates with overexpression of Nsbp1 in mouse uteri neonatally exposed to diethylstilbestrol or genistein. *Endocrinology* **149**, 5922–5931.
56. Vanhees K, Coort S, Ruijters EJ, *et al.* (2011) Epigenetics: prenatal exposure to genistein leaves a permanent signature on the hematopoietic lineage. *FASEB J* **25**, 797–807.
57. Vardi A, Bosviel R, Rabiau N, *et al.* (2010) Soy phytoestrogens modify DNA methylation of GSTP1, RASSF1A, EPH2 and BRCA1 promoter in prostate cancer cells. *In vivo* **24**, 393–400.
58. Wang Z & Chen H (2010) Genistein increases gene expression by demethylation of WNT5a promoter in colon cancer cell line SW1116. *Anticancer Res* **30**, 4537–4545.
59. Watanabe Y & Maekawa M (2010) Methylation of DNA in cancer. *Adv Clin Chem* **52**, 145–167.

Conclusions de la publication N°6 :

Nous avons étudié les effets de doses physiologiques de S-équol sur la méthylation de *BRCA1* et *BRCA2* et l'expression des protéines codées par ces gènes dans des lignées continues de cellules mammaires. A dose physiologique, le S-équol semble avoir une action déméthylante au niveau des promoteurs des gènes *BRCA1* et *BRCA2* dans les cellules MDA-MB-231 et MCF-7, mais pas dans les cellules MCF-10a. En revanche, une augmentation de la quantité de protéines BRCA1 et BRCA2 présentes dans les trois lignées est retrouvée après traitement avec le S-équol. Ces résultats suggèrent que le S-équol est capable d'induire une augmentation de la synthèse de BRCA1 et BRCA2 par une déméthylation du promoteur de leur gène dans les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 mais pas dans les cellules MCF-10a, dans lesquelles seule une augmentation de l'expression protéique est observée. Le statut en récepteur aux œstrogènes pourrait avoir un rôle dans l'effet du S-équol sur la méthylation de *BRCA1* et *BRCA2* car parmi les trois lignées utilisées, seule la lignée MCF-10a ne possède pas le récepteur β aux œstrogènes. Toutefois, cette étude soulève la question de comment le S-équol est-il capable d'induire l'augmentation de l'expression des protéines BRCA1 et BRCA2 sans agir sur la méthylation de l'ADN dans les cellules MCF-10a.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le cancer du sein est l'affection tumorale la plus fréquente chez la femme dans le monde. Avec plus de 1,38 millions de nouveaux cas et 458 400 décès dans le monde en 2008 [1], il s'agit d'un problème de Santé Publique majeur. L'étiologie du cancer du sein est complexe et met en jeu des aspects génétiques, environnementaux et hormonaux.

Ce travail est en particulier centré sur les oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2*. La mutation de ces gènes est responsable de 5 à 10% des cancers héréditaires du sein et des ovaires [2, 4] et une diminution, voire une perte d'expression de ces gènes sont fréquemment retrouvés dans les cancers sporadiques du sein et de l'ovaire [3]. L'hyperméthylation du promoteur du gène *BRCA1* a été détectée dans de nombreuses tumeurs, notamment celles de l'ovaire ou du sein, tandis que l'hyperméthylation du promoteur de *BRCA2* n'a été retrouvée que dans des cancers du sein. Cette hyperméthylation est fréquemment associée à la diminution ou la perte d'expression de *BRCA1* et *BRCA2* et pourrait alors être un mécanisme important de l'oncogenèse mammaire sporadique.

Ce travail se découpe en deux parties : l'étude *in vivo* de la méthylation des oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2* dans le sang périphérique de patientes atteintes ou non de cancers de l'ovaire ou du sein et l'étude *in vitro* de la modification de la méthylation de *BRCA1* et *BRCA2* par les phyto-œstrogènes du soja dans des lignées continues de cellules mammaires humaines.

Concernant la première partie de cette étude, la méthylation de *BRCA1* a déjà été décrite dans le plasma ou le sérum de patientes ayant développé une tumeur du sein ou de l'ovaire hyperméthylée au niveau du promoteur de *BRCA1* [134, 137, 167], en revanche, la méthylation de *BRCA2* n'a jamais été analysée dans le sérum ou le plasma de patientes ayant développé une tumeur du sein ou de l'ovaire hyperméthylée au niveau du promoteur de *BRCA2*.

Nous disposons, au sein du laboratoire d'échantillons d'ADN extrait du sang périphérique de patientes recrutées dans deux populations distinctes. La population COSA (Cancer des Ovaires et du Sein en Auvergne) qui regroupe 1000 femmes atteintes de cancer du sein et 54 femmes atteintes de cancer de l'ovaire, sans plus d'un antécédent familial au premier degré de cancer et ne présentant pas de mutation au niveau des gènes *BRCA1* ou *BRCA2*. La population Témoin qui regroupe, pour sa part, 1000 femmes n'ayant pas développé de cancer et sans plus d'un antécédent familial au premier degré de cancer. Des données anthropomorphiques (taille, âge, poids, tour de taille, tour de hanches...) et des données concernant l'exposition aux hormones (âge des premières règles, âge de la

ménopause, prise de contraceptifs oraux...) ont également été recueillies auprès des patientes grâce à un questionnaire [273, 274]. L'ensemble de ces données, ainsi que le prélèvement sanguin ont été obtenus avec le consentement éclairé des femmes incluses dans les deux populations. Enfin, le génotypage de polymorphismes pouvant être impliqués dans la cancérogenèse mammaire et ovarienne a également été réalisé sur les échantillons d'ADN de ces deux populations dans le cadre d'une étude précédente [58, 275].

Nous avons alors quantifié la méthylation de l'ADN dans les promoteurs de *BRCA1* et *BRCA2* grâce à la technique d'Analyse Quantitative des Allèles Méthylés (QAMA) [256]. Trois études différentes ont détecté une hyperméthylation de *BRCA1* dans le plasma ou le sérum et ont utilisé la technique de PCR méthylation spécifique (MSP) [134, 137, 167]. La technique de MSP ne permet de détecter que la présence ou l'absence de méthylation dans l'ADN, au niveau de quelques sites CpG correspondant aux séquences cibles des amorces utilisées. Cependant, dans les cellules du sang, toutes les cellules ne sont pas méthylées ou non méthylées au niveau d'un locus. La technique QAMA, utilisée ici permet alors de quantifier la méthylation de sites CpG précis (localisées au niveau de la séquence cible des sondes utilisées) dans l'ensemble de l'ADN d'un échantillon. Puis, la méthylation mesurée par QAMA est alors représentative du pourcentage d'allèles méthylés présents dans l'échantillon utilisé et permet ainsi d'observer plus finement des variations de niveau de méthylation.

Ainsi, nous avons observé une diminution significative de la méthylation du promoteur de *BRCA1* dans l'ADN extrait du sang périphérique de 51 patientes ayant développé un cancer des ovaires en comparaison avec 349 témoins. Cette diminution n'avait pas été retrouvée par Catteau *et al.* (1999) dans les cellules sanguines de patientes atteintes de cancer des ovaires. La technique utilisée par Catteau *et al.* (1999) reposait sur l'utilisation d'endonucléases agissant uniquement sur l'ADN méthylé et la détection de *BRCA1* par southern blot. Cette technique, comme la MSP permet de ne voir que les variations de méthylation retrouvées dans la grande majorité des cellules d'un échantillon d'ADN [151]. Pour leur part, Ibanes de Caceres *et al.* (2004) ont montré que certaines patientes qui ont développé un cancer de l'ovaire avaient une hyperméthylation de *BRCA1* détectable dans les cellules du plasma [167]. Notre différence avec leurs résultats peut s'expliquer encore par la différence de technique : tout d'abord, nous ne cibons pas les mêmes sites CpG appartenant à l'îlot CpG du promoteur de *BRCA1*, ensuite, si *BRCA1* est légèrement moins méthylé dans la majorité des cellules du sang et ce, chez la majorité des patientes, cela masque l'hyperméthylation retrouvée dans quelques cas uniquement. Ce résultat ouvre la voie à la

recherche d'une hypométhylation faible, mais fréquente de *BRCA1* dans les tumeurs mammaires ou les cellules non-tumorales de patientes ayant développé une tumeur de l'ovaire.

Nous avons également étudié la méthylation du promoteur de *BRCA2* dans la même population de femmes ayant développé ou non un cancer de l'ovaire. Une diminution de la méthylation *BRCA2* a été détectée dans les cellules sanguines de patientes ayant développé un cancer de l'ovaire, mais celle-ci n'était pas significative. Le faible nombre d'échantillons dont nous disposons diminue la puissance statistique de notre étude.

La diminution de méthylation de *BRCA2* a déjà été rapportée par Chan *et al.* (2002) dans certaines tumeurs de l'ovaire [171], toutefois deux autres études, en accord avec nos résultats, ne la retrouvent pas dans le tissu tumoral ovarien, en comparaison avec du tissu sain [175, 258]. Ces trois études ont cependant été réalisées dans l'ADN extrait de tumeurs de l'ovaire et non pas à partir des cellules du sang. Dans ces trois études, la méthylation de *BRCA2* n'est retrouvée que dans un faible nombre de tumeurs.

Ces résultats, qui tendent à montrer une diminution de méthylation de *BRCA1* et *BRCA2* dans les cellules du sang périphérique de patientes ayant développé un cancer de l'ovaire soulèvent des questions importantes : en effet, la diminution de la méthylation des oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2* devrait entraîner leur expression et être en opposition au mécanisme de cancérogenèse. Les mêmes études quantitatives de la méthylation de *BRCA1* et *BRCA2* dans les cellules de tumeurs de l'ovaire permettraient de savoir si cette diminution de méthylation retrouvée dans le sang est d'origine tumorale, ou s'il s'agit d'un effet se produisant en dehors des tumeurs, voire dans les cellules de la lignée leucocytaire.

Nous avons également étudié la méthylation de *BRCA1* puis *BRCA2*, toujours par la technique QAMA, dans l'ADN extrait de cellules sanguines des patientes ayant développé un cancer du sein dans la population COSA et les femmes de la population Témoin. Nous n'avons pas détecté de différence significative de méthylation dans le promoteur de *BRCA1* dans les cellules sanguines de patientes atteintes de cancer du sein, par comparaison avec les témoins. Cette absence de significativité pourrait être le résultat d'une hyperméthylation limitée à certains cas de cancers du sein seulement, et retrouvée encore moins fréquemment dans les cellules sanguines. En accord avec nos résultats, beaucoup d'études ne détectent l'hyperméthylation de *BRCA1* que dans un faible nombre de tumeurs sporadiques du sein [131, 132, 144, 150, 151, 153, 159, 161, 263, 276-278].

De plus et en accord avec l'hypothèse précédente, toutes les études comparant la méthylation de *BRCA1* dans le tissu tumoral et dans les cellules du sang montrent que cette

marque est plus rarement détectée dans le sang [134, 137, 139]. L'étude de la méthylation en liaison avec les différents paramètres disponibles nous a cependant permis d'observer plusieurs sous populations de femmes plus à risque de développer un cancer du sein que la population générale. C'est le cas d'une sous-population de femmes pour lesquelles la méthylation de *BRCA1* est augmentée avec l'âge. De même, nos résultats montrent une augmentation de la méthylation de *BRCA1* avec l'IMC et le RTH dans la population témoin, tandis que les femmes présentant un faible IMC et un faible RTH mais une méthylation importante de *BRCA1* dans les cellules du sang sont plus à risque de développer un cancer du sein.

Nous avons également détecté une augmentation de la méthylation de *BRCA1* dans les cellules du sang périphérique de la population témoin avec la présence de l'allèle ACG du SNP *ESR Thr594Thr*, bien que ce polymorphisme ne semble pas modifier le risque de développer un cancer du sein selon une étude précédente dans la même population [58]. Ce résultat suggère que la méthylation de *BRCA1* apportée par cet allèle ACG ne joue pas de rôle, peut-être parce qu'elle est insuffisante, dans le risque de développer un cancer du sein.

Tout comme pour *BRCA1*, nous n'avons pas observé d'augmentation significative de la méthylation de *BRCA2* dans les cellules sanguines des mêmes populations mais quelques sous-populations se distinguent. Aussi, parmi les femmes de plus de 70 ans, celles dont le pourcentage de méthylation du promoteur de *BRCA2* dans les cellules du sang périphérique est le plus élevé sont plus à risque de développer un cancer du sein. De même pour les femmes ménopausées avant 48 ans et les femmes dont l'IMC est compris entre 20 et 25 ou le RTH entre 81,7 et 87,5. Ces données montrent qu'avec ces paramètres, associés avec la méthylation de *BRCA2*, des sous-populations plus à risque de développer un cancer du sein peuvent être définies.

L'ensemble des données obtenues sur la méthylation de *BRCA1* et *BRCA2* dans les cellules du sang périphérique de patientes ayant développé un cancer du sein ou de l'ovaire, par comparaison avec des femmes saines nous montrent que l'analyse de cette méthylation, plus particulièrement lorsqu'elle est associée à d'autres paramètres (anthropomorphiques, hormonaux ou génétiques) peut permettre la distinction de groupes plus à risque de développer un cancer du sein ou de l'ovaire.

Widschenwendter *et al.* (2008) montrent par ailleurs que sur 49 gènes étudiés (ne comprenant ni *BRCA1*, ni *BRCA2*), seuls 7 ont une méthylation significativement modifiée dans les cellules du sang périphérique de femmes ayant développé un cancer du sein ou de femmes saines. Ils mettent en évidence qu'un diagnostic efficace du cancer du sein par

l'analyse de la méthylation de gènes dans les cellules du sang périphérique n'est possible que par l'utilisation de nombreux gènes [261]. De même, Radpour *et al.* (2011) rapportent que l'analyse de la méthylation de 8 gènes parmi 10 testés dans l'ADN sanguin permet de mettre en place un diagnostic efficace et spécifique à plus de 90% pour le cancer du sein [138].

A la lumière de nos résultats, l'analyse de la méthylation de plusieurs gènes couplé à des données anthropomorphiques, hormonales et génétiques permettrait un diagnostic encore plus efficace. La recherche de gènes dont la méthylation varie dans les cancers du sein et de l'ovaire serait par ailleurs plus exhaustive par l'analyse de la méthylation de l'ensemble des gènes.

Ruike *et al.* (2010) ont réalisé une analyse du méthylome complet par MeDIP couplé à du séquençage dans des lignées continues de cellules mammaires. La comparaison des résultats obtenus dans des lignées tumorales et une lignée de cellules épithéliales indique une hyperméthylation des régions riches en gènes (comprenant les îlots CpG présents dans les promoteurs) et une hypométhylation des dinucléotides CpG ne faisant pas partie d'îlots ou présents dans les séquences télomériques et centromériques ainsi que les séquences répétées [279]. La méthylation de l'ensemble de ces régions est donc susceptible d'être impliquée dans le cancer du sein et par conséquent l'analyse de l'ensemble de ces régions serait intéressante à effectuer.

Une analyse exhaustive du méthylome dans les cellules du sang périphérique serait envisageable par l'utilisation de MeDIP couplée à des puces à ADN ciblant l'ensemble des séquences fortement régulées par la méthylation de l'ADN, comme les puces « human DNA methylation » (Agilent, USA) couvrant l'ensemble des îlots CpG, mais aussi les séquences répétées du génome, ainsi que les régions centromériques et télomériques. L'acquisition récente d'un automate IP-Star (Diagenode, Belgique) couplée à notre plateforme de puces à ADN (Agilent, USA) nous permettrait de réaliser cette analyse.

La seconde partie de mon travail a consisté en l'étude des effets des phyto-œstrogènes du soja sur la méthylation des promoteurs de *BRCA1* et *BRCA2* dans les cancers du sein. L'incidence plus forte des cancers du sein dans les pays industrialisés Occidentaux (Europe, Amérique de Nord), face à l'incidence plus faible observée en Asie (notamment au Japon) a en effet poussé vers la recherche de facteurs à l'origine de ces différences [1]. L'étude de populations migrantes, venues de pays d'Asie s'installer dans des pays Occidentaux ont permis de mettre en évidence une forte influence de l'environnement sur le risque de développer un cancer du sein. L'influence de l'alimentation a notamment été mise en exergue dès la deuxième génération d'immigrés asiatiques, adoptant un régime à l'occidentale [218].

Les recherches se sont particulièrement intéressées à la consommation du soja et de ses produits transformés, beaucoup plus consommés dans les pays asiatiques que dans les pays occidentaux. De par leur structure, similaire au 17- β -œstradiol qui leur permet de se lier et d'activer les récepteurs aux œstrogènes [5], les isoflavones du soja ont en particulier suscité l'intérêt de la communauté scientifique. Plus récemment, un nombre croissant d'études a révélé des effets déméthylants des phyto-œstrogènes du soja au niveau des promoteurs d'oncosuppresseurs [206, 209, 210, 212, 266, 268, 280-283]. Cette déméthylation permet d'augmenter l'expression de ces oncosuppresseurs et pourrait aussi jouer un rôle dans la protection contre les cancers. Nous avons par conséquent voulu étudier les effets des phyto-œstrogènes du soja sur la méthylation de deux oncosuppresseurs fortement impliqués dans les cancers du sein, *BRCA1* et *BRCA2*. Cette étude a été réalisée *in vitro*, à l'aide de trois lignées continues de cellules mammaires : les cellules tumorales MCF-7 et MDA-MB-231 et les cellules non tumorales, MCF-10a.

Dans une première étude, nous avons exposé ces trois lignées continues de cellules mammaires aux deux phyto-œstrogènes les plus présents dans le soja, la génistéine et la daidzéine, mais aussi à un agent déméthylant, la 5-azacytidine, pendant 48 heures. La méthylation de l'ADN a été observée par MeDIP couplée à de la PCR. Les variations de la méthylation de *BRCA1* ou de *BRCA2* étaient visibles par les variations d'intensité des bandes correspondant à l'ADN immunoprécipité de chaque condition. Nous avons observé un effet déméthylant de la génistéine, la daidzéine et la 5-azacytidine au niveau des gènes *BRCA1* et *BRCA2* dans les trois lignées de cellules mammaires par comparaison avec le DMSO. L'efficacité des traitements utilisés n'est toutefois pas identique et l'agent de synthèse, la 5-azacytidine possède une action plus forte que la génistéine, elle-même plus efficace que la daidzéine.

Nous avons ensuite étudié les conséquences de ces traitements sur l'expression des protéines *BRCA1* et *BRCA2*, afin de vérifier que la déméthylation des gènes *BRCA1* et *BRCA2* par les phyto-œstrogènes du soja est bien associée à une augmentation de leur expression dans les cellules mammaires. Les résultats obtenus par Western-Blotting montrent, après quantification à l'aide du logiciel Quantity One (Biorad) et normalisation par l'actine, une augmentation des protéines *BRCA1* et *BRCA2* suite au traitement des trois lignées continues de cellules mammaires par la génistéine, la daidzéine et la 5-azacytidine, par comparaison avec les cellules non traitées (mises en présence de DMSO uniquement). Les variations observées par western blotting sont faibles, mais ces résultats ont été confirmés par l'augmentation des protéines *BRCA1* et *BRCA2* retrouvée en immunohistochimie. Nous

avons observé un marquage nucléaire, nucléolaire ou cytoplasmique intense, correspondant à BRCA1 et BRCA2 dans les trois lignées de cellules mammaires traitées pendant 48 heures avec la génistéine, la daidzéine ou la 5-azacytidine en comparaison avec les cellules contrôles. Ce résultat traduit bien une augmentation de l'expression de BRCA1 et BRCA2, en liaison avec la diminution de méthylation observée précédemment.

Plusieurs études ont par ailleurs déjà observé une diminution des ARNm de *BRCA1* et *BRCA2* ainsi qu'une diminution des protéines BRCA1 et BRCA2 dans des tumeurs mammaires associées à la méthylation du promoteur de ces deux gènes [121, 128, 137, 144, 152, 157, 170, 262, 263, 278, 284-286]. Nos résultats sont en accord avec ces études et montrent que la génistéine et la daidzéine peuvent agir sur ce phénomène.

Enfin, nous avons utilisé la technique de microscopie confocale pour quantifier la présence des protéines BRCA1 et BRCA2 dans les trois lignées de cellules mammaires. Nous obtenons des résultats identiques dans les trois lignées de cellules mammaires, avec, une augmentation significative de l'expression des protéines BRCA1 et BRCA2 suite au traitement par la génistéine, la daidzéine ou la 5-azacytidine. Cette augmentation d'expression est plus forte avec la 5-azacytidine. L'utilisation d'un agent méthylant de l'ADN, la budésonide a pour sa part causé une diminution significative de l'expression de BRCA1 et BRCA2. Le niveau global de méthylation de l'ADN dans les trois lignées continues de cellules mammaires a également été observé par l'utilisation d'un anticorps anti-5-méthylcytosine. Nous avons observé une diminution significative de la méthylation globale de l'ADN suite au traitement des cellules MCF-7, MDA-MB-231 et MCF-10a par la génistéine, la daidzéine et la 5-azacytidine. La 5-azacytidine agissant directement en bloquant les DNMT, son action déméthylante n'est pas localisée à des régions spécifiques de l'ADN. En revanche, les modes d'action de la génistéine et la daidzéine sur la méthylation de l'ADN ne sont pas connus et ce résultat ne permet pas de dire si la déméthylation observée est le fruit d'une déméthylation de tout l'ADN ou seulement de nombreux sites en particulier.

En plus des protéines BRCA1 et BRCA2, nous avons étudié l'expression de la protéine MeCP2 dans les cellules MCF-7, MCF-10a et MDA-MB-231, suite au traitement par la génistéine, la daidzéine, la 5-azacytidine ou la budésonide, et par comparaison avec les cellules contrôle, traitées par le DMSO. Les mutations du gène *MeCP2* sont responsables du syndrome de Rett au niveau du système nerveux [287]. La protéine codée par ce gène possède un domaine de liaison à l'ADN méthylé et un domaine terminal de répression. MeCP2 est ainsi capable de se lier à des régions méthylées de l'ADN et de recruter un complexe de répression mettant en jeu des HDAC. Auriol *et al.* (2005) ont par ailleurs montré que MeCP2

pouvait se lier au promoteur de *BRCA1* lorsque celui-ci est hyperméthylé [288]. De plus, deux études ont montré que MeCP2 est surexprimée dans certaines tumeurs mammaires [269, 270]. Nous avons trouvé une diminution de l'expression de MeCP2 suite au traitement par la génistéine et la daidzéine. Ces résultats montrent que ces deux composés du soja sont capables d'augmenter l'expression de protéines (*BRCA1* et *BRCA2*), par la déméthylation de leur promoteur, et en même temps diminuer l'expression d'autres protéines (MeCP2). Toutefois, cette augmentation de l'expression de *BRCA1* et *BRCA2* associée à une diminution de l'expression de MeCP2 est également trouvée après traitement par la 5-azacytidine. L'agent méthylant utilisé dans notre étude, la budésonide a un effet opposé à la génistéine, la daidzéine et la 5-azacytidine sur l'expression de *BRCA1*, *BRCA2* et MeCP2 dans les trois lignées de cellules mammaires. Ces résultats indiquent que l'expression de MeCP2 pourrait être liée à la méthylation globale de l'ADN. Deux études montrent en effet que l'expression de MeCP2 augmente avec la méthylation de l'ADN [289, 290].

Dans une dernière partie de mon travail, nous nous sommes intéressés aux effets du S-équol, un métabolite de la daidzéine sur la méthylation des promoteurs de *BRCA1* et *BRCA2* dans les trois lignées de cellules mammaires MCF-7, MDA-MB-231 et MCF-10a.

Le S-équol est un phyto-œstrogène obtenu grâce à la métabolisation de la daidzéine par des bactéries intestinales. Tous les individus n'hébergent pas une flore intestinale capable d'effectuer ce métabolisme et une population de « producteurs d'équol » se distingue du reste de la population. Le S-équol est un phyto-œstrogène, il possède une meilleure affinité pour le RE β que la daidzéine, d'où l'intérêt qui lui est consacré dans de nombreuses études [185]. Puisque la génistéine et la daidzéine sont capables d'agir sur la méthylation des promoteurs des gènes *BRCA1* et *BRCA2* dans des cellules mammaires, nous avons voulu vérifier si le S-équol peut agir de la même manière.

Jusqu'à aujourd'hui, une seule étude a montré la capacité du S-équol à agir au niveau de la méthylation de l'ADN [203]. Pour réaliser cette étude, nous avons exposé trois lignées de cellules mammaires (MCF-7, MDA-MB-231 et MCF-10a) à une dose physiologique de S-équol, parallèlement à des cellules contrôle. Une dose de 2 μ M a été utilisée pendant 3 semaines, celle-ci correspond à la dose retrouvée dans le plasma juste après consommation de 20mg de S-équol [291], mais aussi aux plus fortes doses retrouvées dans le sérum de femmes Japonaises [292].

Le pourcentage de méthylation des promoteurs de *BRCA1* et *BRCA2* a été mesuré par la technique QAMA, déjà utilisée dans l'étude de la méthylation de ces deux gènes dans les cellules sanguines de patientes ayant développé une tumeur du sein ou de l'ovaire. Nous

observons une diminution significative de la méthylation des promoteurs de *BRCA1* et *BRCA2* suite au traitement par le S-équol dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231, mais pas dans les cellules MCF-10a. Ce résultat montre que le S-équol est capable, comme la génistéine et la daidzéine, de déméthylater le promoteur des oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2* dans les cellules mammaires. L'absence d'effet dans les cellules MCF-10a pourrait indiquer que cet effet déméthylant est lié à la présence du RE β , puisque parmi les trois lignées utilisées, seules les MCF-10a ne possèdent pas ce récepteur. En comparant ce résultat avec celui de l'étude précédente, montrant un effet déméthylant de la génistéine et de la daidzéine dans les trois lignées de cellules mammaires MCF-7, MDA-MB-231 et MCF-10a, indépendamment de leur statut en RE, il semblerait que les effets déméthylants de la génistéine et de la daidzéine ne passent pas par le même mécanisme que les effets déméthylants du S-équol. Cette différence s'explique peut-être par l'utilisation d'une dose physiologique et prolongée de S-équol, tandis que la génistéine et la daidzéine ont été utilisées à des doses de l'ordre de 10 fois supérieures aux plus fortes doses observées par Morton *et al.* (2002) [292] dans le sérum de femmes Japonaises, et pendant seulement 48 heures.

Nous avons également regardé l'expression des protéines BRCA1 et BRCA2 dans les cellules MCF-7, MDA-MB-231 et MCF-10a, suite à une exposition au S-équol et par comparaison avec des cellules contrôles exposées au DMSO. Pour cela, nous avons utilisé les techniques de Western-Blotting et Immunohistochimie. Nous observons une expression plus forte des protéines BRCA1 et BRCA2 dans les cellules MCF-7, MDA-MB-231 et MCF-10a exposées pendant 3 semaines à une dose physiologique de S-équol, par comparaison avec les cellules contrôle. Ce résultat révèle que si la diminution de la méthylation des promoteurs de *BRCA1* et *BRCA2*, réalisée par le S-équol, peut permettre d'augmenter l'expression des protéines BRCA1 et BRCA2, ce mécanisme n'est pas le seul mis en jeu. En effet, le S-équol n'a pas montré d'effet déméthylant dans les cellules MCF-10a, pourtant une augmentation de l'expression de BRCA1 et BRCA2 y est constatée.

Plusieurs perspectives sont possibles suite à ces résultats observés *in vitro*. L'augmentation de l'expression des protéines BRCA1 et BRCA2 sans diminution de la méthylation des promoteurs des gènes codant pour ces protéines dans les cellules MCF-10a et après traitement avec le S-équol nous conduit à rechercher un autre mécanisme sur lequel pourraient agir les phyto-œstrogènes du soja pour modifier l'expression de *BRCA1* et *BRCA2*. De nombreuses études ont constaté un effet des phyto-œstrogènes du soja au niveau de marques épigénétiques sur les histones [208, 210, 211, 268, 293-296]. La suite de notre étude

devrait consister à rechercher les effets de la génistéine, la daidzéine et le S-équol au niveau des marques épigénétiques sur les histones dans les promoteurs des gènes *BRCA1* et *BRCA2*. Pour cela la technique CHIP couplée à la PCR quantitative pourrait-être utilisée.

Une autre perspective de notre étude part du constat que la méthylation de nombreux oncosuppresseurs, autres que *BRCA1* et *BRCA2* a déjà été observée dans le cancer du sein [297]. De même, une diminution de la méthylation des séquences non codantes est observée dans les cancers [298]. Etendre l'étude des effets des phyto-œstrogènes du soja sur la méthylation de l'ensemble de ces séquences permettrait de savoir si cet effet est limité à des régions spécifiques de l'ADN, ou s'il s'agit d'un effet global. L'étude du méthylome de cellules MCF-7, MDA-MB-231 et MCF-10a exposées aux phyto-œstrogènes du soja et en comparaison avec des cellules non traitées est actuellement en cours au sein de l'équipe Nutrition et Cancer. Pour cela, nous faisons appel à la technique de MeDIP, couplée à l'utilisation de puces à ADN (MeDIP-on-chip) « human DNA methylation » (Agilent, USA).

Ces résultats *in vitro* devront également être confirmés *in vivo*. Nous envisagerons deux études possibles : l'une réalisée à l'aide de souris et l'autre directement au niveau d'une population de femmes dans le cadre d'un accord avec le CPP.

Concernant la première étude *in vivo*, celle-ci consisterait en l'utilisation de souris ovariectomisées (afin d'éviter les interactions entre phyto-œstrogènes et œstrogènes naturels). Plusieurs groupes de souris doivent être créés : le groupe témoin, consommant un régime sans phyto-œstrogènes, et des groupes d'étude, consommant des régimes enrichis en phyto-œstrogènes. Après quatre mois d'élevage, un prélèvement sanguin doit être réalisé sur chaque animal et les glandes mammaires prélevées. Le prélèvement sanguin va permettre le dosage des phyto-œstrogènes et de leurs métabolites chez chaque souris. Les modifications du méthylome dans les glandes mammaires peuvent être analysées par MeDIP-on-chip. La mise en relation des dosages de phyto-œstrogènes du soja et des modifications observées dans le méthylome des glandes mammaires par analyse statistique permettra alors de mettre en évidence l'influence des phyto-œstrogènes du soja sur la méthylation de l'ADN *in vivo*.

Concernant l'étude *in vivo* chez des femmes, le recrutement d'une population de femmes ménopausées (toujours pour éviter les interactions entre phyto-œstrogènes et œstrogènes naturels) devra être effectué. Ces femmes seront réparties en plusieurs groupes : l'un consommant un placebo et les autres consommant des suppléments de phyto-œstrogènes. Après quatre mois de supplémentation, l'analyse du méthylome sera réalisée dans l'ADN extrait du sang prélevé chez chaque femme ayant participé à l'étude. Le dosage des phyto-

œstrogènes pourra également être réalisé dans ce prélèvement. Une analyse statistique permettra enfin de mettre en évidence l'influence des phyto-œstrogènes du soja sur la méthylation de l'ADN *in vivo*.

Ces deux études *in vivo* possèdent des avantages différents : l'utilisation de souris permet une meilleure homogénéité de la population étudiée et l'accès à l'ADN de la glande mammaire, tandis que l'utilisation d'une population de femmes sera plus représentative de l'effet des phyto-œstrogènes chez les femmes.

Les hypothèses actuelles font également état d'un effet potentiellement protecteur des phyto-œstrogènes du soja vis-à-vis du cancer du sein lors d'une exposition précoce et prolongée, tandis qu'une consommation plus tardive, en l'absence d'une consommation précoce serait plutôt délétère [24]. Les effets des phyto-œstrogènes du soja au niveau de la méthylation de l'ADN pourraient alors varier en fonction de l'âge et de la durée de consommation. La création de groupes d'animaux nourris plus ou moins précocement et pendant des périodes plus ou moins longues avec les régimes supplémentés en phyto-œstrogènes permettrait d'intégrer ces deux paramètres dans l'étude *in vivo*.

Enfin, les phyto-œstrogènes du soja pouvant entrer en compétition avec les œstrogènes naturels, il semble important de prendre en compte la présence ou non d'œstrogènes dans les futures études. Ceci peut-être réalisé *in vitro* par l'adjonction de concentrations physiologiques de 17- β -œstradiol dans le milieu de culture de cellules mammaires traitées ou non par les phyto-œstrogènes du soja. Rajah *et al.* (2009) ont réalisé ce type d'expérience afin d'observer les effets de la génistéine sur la croissance de cellules mammaires en la présence ou l'absence d'œstrogènes [299]. *In vivo*, ce paramètre pourrait être pris en compte en comparant des groupes de souris ovariectomisées avec des souris non-ovariectomisées.

CONCLUSIONS

Ce travail nous a permis de mettre en évidence, *in vivo* une augmentation de la méthylation des oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2* dans les cellules du sang de femmes ayant développé un cancer du sein.

Aussi, nous avons observé *in vitro* les effets déméthylants des phyto-œstrogènes du soja au niveau des promoteurs des oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2* dans trois lignées continues de cellules mammaires. Ces effets sont opposés aux changements retrouvés dans le cancer du sein et penchent en faveur d'un effet protecteur des phyto-œstrogènes du soja.

De plus, notre étude révèle que les effets déméthylants des phyto-œstrogènes au niveau de l'ADN ne sont pas cantonnés à ces deux gènes uniquement puisque le niveau global de méthylation observé dans les cellules traitées diminue. La méthylation de nombreux gènes, mais également celle présente au niveau de régions hétérochromatiques (séquences répétées, régions centromériques et télomériques) pourraient être touchées.

L'extension de nos résultats à l'ensemble du méthylome doit être envisagée, ainsi que l'utilisation de modèles *in vivo*, plus représentatifs des effets de la consommation de soja par les femmes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin* 2011, **61**:69-90.
2. van der Groep P, van der Wall E, van Diest PJ: **Pathology of hereditary breast cancer.** *Cell Oncol (Dordr)* 2011, **34**:71-88.
3. Melchor L, Benitez J: **An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes.** *Carcinogenesis* 2008, **29**:1475-1482.
4. Ramus SJ, Gayther SA: **The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer.** *Mol Oncol* 2009, **3**:138-150.
5. Setchell KDR, Adlercreutz H: **Mammalian lignans and phyto-oestrogens: recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease.** In *Role of gut flora in toxicity and cancer.* Edited by R. RI. San Diego, CA: Academic Press; 1988: 315-345
6. Vissac-Sabatier C, Coxam V, Dechelotte P, Picherit C, Horcajada MN, Davicco MJ, Lebecque P, Bignon YJ, Bernard-Gallon D: **Phytoestrogen-rich diets modulate expression of Brca1 and Brca2 tumor suppressor genes in mammary glands of female Wistar rats.** *Cancer Res* 2003, **63**:6607-6612.
7. Satih S, Savinel H, Rabiau N, Fontana L, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ: **Expression analyses of nuclear receptor genes in breast cancer cell lines exposed to soy phytoestrogens after BRCA2 knockdown by TaqMan Low-Density Array (TLDA).** *J Mol Signal* 2009, **4**:3.
8. Satih S, Chalabi N, Rabiau N, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ: **Transcriptional profiling of breast cancer cells exposed to soy phytoestrogens after BRCA1 knockdown with a whole human genome microarray approach.** *Nutr Cancer* 2010, **62**:659-667.
9. Espié M, Gorins A: *Le sein.* 3e éd. edn. Paris: Éd. Eska; 2007.
10. Brettes JP, Mathelin C, Gairard B, Belloq JP: *Cancer du sein avec la collaboration de Olivier Acker, Rosemary Ancelle-Park, Isabelle Barillot... [et al.] dessins de Sophie Jacopin.* Issy-les-Moulineaux: Elsevier-Masson; 2007.
11. Morère JF, Penault-Llorca F, Mattis A, Salmon R: *Le cancer du sein.* Paris: Springer; 2007.
12. Anisimov VN: **Biology of aging and cancer.** *Cancer Control* 2007, **14**:23-31.
13. Chen C, Ma X, Zhong M, Yu Z: **Extremely low-frequency electromagnetic fields exposure and female breast cancer risk: a meta-analysis based on 24,338 cases and 60,628 controls.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **123**:569-576.

14. Erren TC: **A meta-analysis of epidemiologic studies of electric and magnetic fields and breast cancer in women and men.** *Bioelectromagnetics* 2001, **Suppl 5**:S105-119.
15. Telle-Lamberton M: **[Epidemiologic data on radiation-induced breast cancer].** *Rev Epidemiol Sante Publique* 2008, **56**:235-243.
16. Darbre PD, Charles AK: **Environmental oestrogens and breast cancer: evidence for combined involvement of dietary, household and cosmetic xenoestrogens.** *Anticancer Res* 2010, **30**:815-827.
17. Friedenreich CM, Neilson HK, Lynch BM: **State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention.** *Eur J Cancer* 2010, **46**:2593-2604.
18. Terry PD, Thun MJ, Rohan TE: **Does tobacco smoke cause breast cancer?** *Womens Health (Lond Engl)* 2011, **7**:405-408.
19. Oyesanmi O, Snyder D, Sullivan N, Reston J, Treadwell J, Schoelles K: **Alcohol Consumption and Cancer Risk: Understanding Possible Causal Mechanisms for Breast and Colorectal Cancers.** In *Evidence Report/Technology Assessment*. Plymouth Meeting, PA: ECRI Institute Evidence-based Practice Center; 2010.
20. Clement Y: **Can green tea do that? A literature review of the clinical evidence.** *Prev Med* 2009, **49**:83-87.
21. Ogunleye AA, Xue F, Michels KB: **Green tea consumption and breast cancer risk or recurrence: a meta-analysis.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **119**:477-484.
22. Arab L: **Epidemiologic evidence on coffee and cancer.** *Nutr Cancer* 2010, **62**:271-283.
23. Nkondjock A: **Coffee consumption and the risk of cancer: an overview.** *Cancer Lett* 2009, **277**:121-125.
24. Velentzis LS, Woodside JV, Cantwell MM, Leathem AJ, Keshtgar MR: **Do phytoestrogens reduce the risk of breast cancer and breast cancer recurrence? What clinicians need to know.** *Eur J Cancer* 2008, **44**:1799-1806.
25. Khan QJ, Kimler BF, Fabian CJ: **The relationship between vitamin D and breast cancer incidence and natural history.** *Curr Oncol Rep* 2010, **12**:136-142.
26. Patrick L: **Iodine: deficiency and therapeutic considerations.** *Altern Med Rev* 2008, **13**:116-127.
27. Grossmann ME, Ray A, Nkhata KJ, Malakhov DA, Rogozina OP, Dogan S, Cleary MP: **Obesity and breast cancer: status of leptin and adiponectin in pathological processes.** *Cancer Metastasis Rev* 2010, **29**:641-653.
28. Stevens RG: **Working against our endogenous circadian clock: Breast cancer and electric lighting in the modern world.** *Mutat Res* 2009, **680**:106-108.

29. Parsa P, Parsa B: **Effects of reproductive factors on risk of breast cancer: a literature review.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2009, **10**:545-550.
30. MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, Salber EJ, Valaoras VG, Yuasa S: **Age at first birth and breast cancer risk.** *Bull World Health Organ* 1970, **43**:209-221.
31. Britt K, Ashworth A, Smalley M: **Pregnancy and the risk of breast cancer.** *Endocr Relat Cancer* 2007, **14**:907-933.
32. Yang L, Jacobsen KH: **A systematic review of the association between breastfeeding and breast cancer.** *J Womens Health (Larchmt)* 2008, **17**:1635-1645.
33. Cibula D, Gompel A, Mueck AO, La Vecchia C, Hannaford PC, Skouby SO, Zikan M, Dusek L: **Hormonal contraception and risk of cancer.** *Hum Reprod Update* 2010, **16**:631-650.
34. Lech MM, Ostrowska L: **Risk of cancer development in relation to oral contraception.** *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2006, **11**:162-168.
35. Nelson H, Haney E, Humphrey L, Miller J, Nedrow A, Nicolaidis C, Vesco K, Walker M, Bougatsos C, Nygren P: **Management of Menopause-Related Symptoms.** In *Evidence Report/Technology Assessment.* Rockville, MD: Oregon Evidence-based Practice Center; 2005.
36. Beral V: **Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study.** *Lancet* 2003, **362**:419-427.
37. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, et al: **Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial.** *JAMA* 2002, **288**:321-333.
38. Shook LL: **An update on hormone replacement therapy: health and medicine for women: a multidisciplinary, evidence-based review of mid-life health concerns.** *Yale J Biol Med* 2011, **84**:39-42.
39. Afssaps: **Mise au point sur le traitement hormonal de la ménopause (THM).** Afssaps; 2006.
40. Claus EB, Schildkraut J, Iversen ES, Jr., Berry D, Parmigiani G: **Effect of BRCA1 and BRCA2 on the association between breast cancer risk and family history.** *J Natl Cancer Inst* 1998, **90**:1824-1829.

41. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al.: **A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1.** *Science* 1994, **266**:66-71.
42. Scully R, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J, Livingston DM: **Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage.** *Cell* 1997, **90**:425-435.
43. Wu J, Huen MS, Lu LY, Ye L, Dou Y, Ljungman M, Chen J, Yu X: **Histone ubiquitination associates with BRCA1-dependent DNA damage response.** *Mol Cell Biol* 2009, **29**:849-860.
44. Wu J, Lu LY, Yu X: **The role of BRCA1 in DNA damage response.** *Protein Cell* 2010, **1**:117-123.
45. Fabbro M, Savage K, Hobson K, Deans AJ, Powell SN, McArthur GA, Khanna KK: **BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage.** *J Biol Chem* 2004, **279**:31251-31258.
46. Yu X, Chen J: **DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:9478-9486.
47. Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC: **BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage.** *Nat Genet* 2002, **30**:285-289.
48. Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, Merajver S, Thorlacius S, Offit K, Stoppa-Lyonnet D, et al: **The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds.** *Nat Genet* 1996, **12**:333-337.
49. Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, Zheng N, Chen PL, Lee WH, Pavletich NP: **BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure.** *Science* 2002, **297**:1837-1848.
50. Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL, Venkitaraman AR: **Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex.** *Nature* 2002, **420**:287-293.
51. Jensen RB, Carreira A, Kowalczykowski SC: **Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination.** *Nature* 2010, **467**:678-683.

52. Liu J, Doty T, Gibson B, Heyer WD: **Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA.** *Nat Struct Mol Biol* 2010, **17**:1260-1262.
53. Thorslund T, McIlwraith MJ, Compton SA, Lekomtsev S, Petronczki M, Griffith JD, West SC: **The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA.** *Nat Struct Mol Biol* 2010, **17**:1263-1265.
54. Shuen AY, Foulkes WD: **Inherited mutations in breast cancer genes--risk and response.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011, **16**:3-15.
55. Hakem R, de la Pompa JL, Mak TW: **Developmental studies of Brca1 and Brca2 knock-out mice.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998, **3**:431-445.
56. Narod SA, Foulkes WD: **BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:665-676.
57. Ramel C: **Mini- and microsatellites.** *Environ Health Perspect* 1997, **105 Suppl 4**:781-789.
58. Delort L, Satih S, Kwiatkowski F, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ: **Evaluation of breast cancer risk in a multigenic model including low penetrance genes involved in xenobiotic and estrogen metabolisms.** *Nutr Cancer* 2010, **62**:243-251.
59. Coin F, Marinoni JC, Rodolfo C, Fribourg S, Pedrini AM, Egly JM: **Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH.** *Nat Genet* 1998, **20**:184-188.
60. Costa S, Pinto D, Pereira D, Vasconcelos A, Afonso-Lopes C, Osorio T, Lopes C, Medeiros R: **Importance of xeroderma pigmentosum group D polymorphisms in susceptibility to ovarian cancer.** *Cancer Lett* 2007, **246**:324-330.
61. Justenhoven C, Hamann U, Pesch B, Harth V, Rabstein S, Baisch C, Vollmert C, Illig T, Ko YD, Bruning T, Brauch H: **ERCC2 genotypes and a corresponding haplotype are linked with breast cancer risk in a German population.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004, **13**:2059-2064.
62. Tang D, Cho S, Rundle A, Chen S, Phillips D, Zhou J, Hsu Y, Schnabel F, Estabrook A, Perera FP: **Polymorphisms in the DNA repair enzyme XPD are associated with increased levels of PAH-DNA adducts in a case-control study of breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2002, **75**:159-166.
63. Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, Bell DA: **XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency.** *Carcinogenesis* 2000, **21**:551-555.

64. Gilbert SF: *Developmental biology*. 6th ed. edn. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates ; Basingstoke : Macmillan; 2000.
65. Giraud JR, Rotten D, Brémond A, Poulain P: *Gynécologie connaissance et pratique*. 4e éd. edn. Issy-les-Moulineaux: Elsevier-Masson; 2002.
66. Guastalla J-P, Ray-Coquard I: *Les cancers ovariens*. Paris Berlin Heidelberg [etc.]: Springer; 2005.
67. Camargo MC, Stayner LT, Straif K, Reina M, Al-Alem U, Demers PA, Landrigan PJ: **Occupational Exposure to Asbestos and Ovarian Cancer: A Meta-analysis**. *Environ Health Perspect* 2011, **119**:1211-1217.
68. Langseth H, Hankinson SE, Siemiatycki J, Weiderpass E: **Perineal use of talc and risk of ovarian cancer**. *J Epidemiol Community Health* 2008, **62**:358-360.
69. Reid A, de Klerk N, Musk AW: **Does exposure to asbestos cause ovarian cancer? A systematic literature review and meta-analysis**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011, **20**:1287-1295.
70. Jordan SJ, Whiteman DC, Purdie DM, Green AC, Webb PM: **Does smoking increase risk of ovarian cancer? A systematic review**. *Gynecol Oncol* 2006, **103**:1122-1129.
71. Boehm K, Borrelli F, Ernst E, Habacher G, Hung SK, Milazzo S, Horneber M: **Green tea (Camellia sinensis) for the prevention of cancer**. *Cochrane Database Syst Rev* 2009:CD005004.
72. Cook LS, Neilson HK, Lorenzetti DL, Lee RC: **A systematic literature review of vitamin D and ovarian cancer**. *Am J Obstet Gynecol* 2010, **203**:70 e71-78.
73. Yin L, Grandi N, Raum E, Haug U, Arndt V, Brenner H: **Meta-analysis: Circulating vitamin D and ovarian cancer risk**. *Gynecol Oncol* 2011, **121**:369-375.
74. Kulie T, Slattengren A, Redmer J, Counts H, Eglash A, Schragger S: **Obesity and women's health: an evidence-based review**. *J Am Board Fam Med* 2011, **24**:75-85.
75. Sayasneh A, Tsivos D, Crawford R: **Endometriosis and ovarian cancer: a systematic review**. *ISRN Obstet Gynecol* 2011, **2011**:140310.
76. Salehi F, Dunfield L, Phillips KP, Krewski D, Vanderhyden BC: **Risk factors for ovarian cancer: an overview with emphasis on hormonal factors**. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2008, **11**:301-321.
77. Sueblinvong T, Carney ME: **Current understanding of risk factors for ovarian cancer**. *Curr Treat Options Oncol* 2009, **10**:67-81.
78. Grimbizis GF, Tarlatzis BC: **The use of hormonal contraception and its protective role against endometrial and ovarian cancer**. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2010, **24**:29-38.

79. Devesa M, Barri PN, Coroleu B: **Assisted reproductive technology and ovarian cancer.** *Minerva Endocrinol* 2010, **35**:247-257.
80. Morch LS, Lokkegaard E, Andreasen AH, Kruger-Kjaer S, Lidegaard O: **Hormone therapy and ovarian cancer.** *JAMA* 2009, **302**:298-305.
81. MacLennan AH, Baber R: **Hormone therapy use and risk of ovarian cancer.** *JAMA* 2009, **302**:2203; author reply 2204.
82. Pearce CL, Chung K, Pike MC, Wu AH: **Increased ovarian cancer risk associated with menopausal estrogen therapy is reduced by adding a progestin.** *Cancer* 2009, **115**:531-539.
83. Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL: **Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2.** *Genet Med* 2010, **12**:245-259.
84. Fasching PA, Gayther S, Pearce L, Schildkraut JM, Goode E, Thiel F, Chenevix-Trench G, Chang-Claude J, Wang-Gohrke S, Ramus S, et al: **Role of genetic polymorphisms and ovarian cancer susceptibility.** *Mol Oncol* 2009, **3**:171-181.
85. Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD: *Epigenetic mechanisms of gene regulation.* Cold Spring Harbor: Cold Spring harbor laboratory press; 1996.
86. Muller H: **Types of visible variations induced by X-rays in Drosophila.** *J Genet* 1930, **22**:299-334.
87. Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D: *Epigenetics.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2006.
88. Klar AJ: **An epigenetic hypothesis for human brain laterality, handedness, and psychosis development.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2004, **69**:499-506.
89. Kornberg RD: **Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA.** *Science* 1974, **184**:868-871.
90. Vaquero A, Loyola A, Reinberg D: **The constantly changing face of chromatin.** *Sci Aging Knowledge Environ* 2003, **2003**:RE4.
91. Baek SH, Rosenfeld MG: **Nuclear receptor coregulators: their modification codes and regulatory mechanism by translocation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **319**:707-714.
92. Vettese-Dadey M, Grant PA, Hebbes TR, Crane- Robinson C, Allis CD, Workman JL: **Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro.** *EMBO J* 1996, **15**:2508-2518.
93. Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL: **Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions.** *Science* 2006, **311**:844-847.

94. Kurdستاني SK, Grunstein M: **Histone acetylation and deacetylation in yeast.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**:276-284.
95. Yang XJ, Seto E: **Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression.** *Curr Opin Genet Dev* 2003, **13**:143-153.
96. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T: **Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain.** *Nature* 2001, **410**:120-124.
97. Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T: **Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins.** *Nature* 2001, **410**:116-120.
98. Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI: **Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly.** *Science* 2001, **292**:110-113.
99. Chen Y, Olopade OI: **MYC in breast tumor progression.** *Expert Rev Anticancer Ther* 2008, **8**:1689-1698.
100. Razin A, Riggs AD: **DNA methylation and gene function.** *Science* 1980, **210**:604-610.
101. Bird AP: **DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA.** *Nucleic Acids Res* 1980, **8**:1499-1504.
102. Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A: **The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites.** *Nature* 1999, **401**:301-304.
103. Lindahl T, Nyberg B: **Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid.** *Biochemistry* 1974, **13**:3405-3410.
104. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C: **Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells.** *Nucleic Acids Res* 1982, **10**:2709-2721.
105. Bird AP: **DNA methylation--how important in gene control?** *Nature* 1984, **307**:503-504.
106. Wolf SF, Dintzis S, Toniolo D, Persico G, Lunnen KD, Axelman J, Migeon BR: **Complete concordance between glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and hypomethylation of 3' CpG clusters: implications for X chromosome dosage compensation.** *Nucleic Acids Res* 1984, **12**:9333-9348.
107. Bruniquel D, Schwartz RH: **Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process.** *Nat Immunol* 2003, **4**:235-240.
108. Jones PA, Laird PW: **Cancer epigenetics comes of age.** *Nat Genet* 1999, **21**:163-167.

109. Jones PA, Baylin SB: **The fundamental role of epigenetic events in cancer.** *Nat Rev Genet* 2002, **3**:415-428.
110. Herman JG, Baylin SB: **Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.** *N Engl J Med* 2003, **349**:2042-2054.
111. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**:57-70.
112. Knudson AG: **Two genetic hits (more or less) to cancer.** *Nat Rev Cancer* 2001, **1**:157-162.
113. Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE, Menounos PG: **DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent.** *Hum Genet* 2002, **111**:115-127.
114. Narayan A, Ji W, Zhang XY, Marrogi A, Graff JR, Baylin SB, Ehrlich M: **Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas.** *Int J Cancer* 1998, **77**:833-838.
115. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R: **Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation.** *Science* 2003, **300**:489-492.
116. Feinberg AP, Vogelstein B: **Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts.** *Nature* 1983, **301**:89-92.
117. Feinberg AP: **Alterations in DNA methylation in colorectal polyps and cancer.** *Prog Clin Biol Res* 1988, **279**:309-317.
118. Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP: **Relaxation of imprinted genes in human cancer.** *Nature* 1993, **362**:747-749.
119. Rideout WM, 3rd, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA: **5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes.** *Science* 1990, **249**:1288-1290.
120. Atlas E, Stramwasser M, Mueller CR: **A CREB site in the BRCA1 proximal promoter acts as a constitutive transcriptional element.** *Oncogene* 2001, **20**:7110-7114.
121. DiNardo DN, Butcher DT, Robinson DP, Archer TK, Rodenhiser DI: **Functional analysis of CpG methylation in the BRCA1 promoter region.** *Oncogene* 2001, **20**:5331-5340.
122. Mancini DN, Rodenhiser DI, Ainsworth PJ, O'Malley FP, Singh SM, Xing W, Archer TK: **CpG methylation within the 5' regulatory region of the BRCA1 gene is tumor specific and includes a putative CREB binding site.** *Oncogene* 1998, **16**:1161-1169.

123. Dworkin AM, Huang TH, Toland AE: **Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment.** *Semin Cancer Biol* 2009, **19**:165-171.
124. Rennstam K, Ringberg A, Cunliffe HE, Olsson H, Landberg G, Hedenfalk I: **Genomic alterations in histopathologically normal breast tissue from BRCA1 mutation carriers may be caused by BRCA1 haploinsufficiency.** *Genes Chromosomes Cancer* 2010, **49**:78-90.
125. Wong EM, Southey MC, Fox SB, Brown MA, Dowty JG, Jenkins MA, Giles GG, Hopper JL, Dobrovic A: **Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer.** *Cancer Prev Res (Phila)* 2011, **4**:23-33.
126. Bean GR, Ibarra Drendall C, Goldenberg VK, Baker JC, Jr., Troch MM, Paisie C, Wilke LG, Yee L, Marcom PK, Kimler BF, et al: **Hypermethylation of the breast cancer-associated gene 1 promoter does not predict cytologic atypia or correlate with surrogate end points of breast cancer risk.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, **16**:50-56.
127. Honrado E, Osorio A, Milne RL, Paz MF, Melchor L, Cascon A, Urioste M, Cazorla A, Diez O, Lerma E, et al: **Immunohistochemical classification of non-BRCA1/2 tumors identifies different groups that demonstrate the heterogeneity of BRCAX families.** *Mod Pathol* 2007, **20**:1298-1306.
128. Tapia T, Smalley SV, Kohen P, Munoz A, Solis LM, Corvalan A, Faundez P, Devoto L, Camus M, Alvarez M, Carvallo P: **Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors.** *Epigenetics* 2008, **3**:157-163.
129. Chen Y, Zhou J, Xu Y, Li Z, Wen X, Yao L, Xie Y, Deng D: **BRCA1 promoter methylation associated with poor survival in Chinese patients with sporadic breast cancer.** *Cancer Sci* 2009, **100**:1663-1667.
130. Flanagan JM, Pependikyte V, Pozdniakovaite N, Sobolev M, Assadzadeh A, Schumacher A, Zangeneh M, Lau L, Virtanen C, Wang SC, Petronis A: **Intra- and interindividual epigenetic variation in human germ cells.** *Am J Hum Genet* 2006, **79**:67-84.
131. Dobrovic A, Simpfendorfer D: **Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer.** *Cancer Res* 1997, **57**:3347-3350.
132. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, et al: **Promoter hypermethylation and BRCA1**

- inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000, **92**:564-569.**
133. Wei M, Grushko TA, Dignam J, Hagos F, Nanda R, Sveen L, Xu J, Fackenthal J, Tretiakova M, Das S, Olopade OI: **BRCA1 promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced BRCA1 copy number and chromosome 17 aneusomy.** *Cancer Res* 2005, **65**:10692-10699.
134. Al-Moghrabi N, Al-Qasem AJ, Aboussekhra A: **Methylation-related mutations in the BRCA1 promoter in peripheral blood cells from cancer-free women.** *Int J Oncol* 2011, **39**:129-135.
135. Iwamoto T, Yamamoto N, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S: **BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with BRCA1 promoter methylation.** *Breast Cancer Res Treat* 2011, **129**:69-77.
136. Jing F, Zhang J, Tao J, Zhou Y, Jun L, Tang X, Wang Y, Hai H: **Hypermethylation of tumor suppressor genes BRCA1, p16 and 14-3-3sigma in serum of sporadic breast cancer patients.** *Onkologie* 2007, **30**:14-19.
137. Mirza S, Sharma G, Prasad CP, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD, Ralhan R: **Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ERalpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients.** *Life Sci* 2007, **81**:280-287.
138. Radpour R, Barekati Z, Kohler C, Lv Q, Burki N, Diesch C, Bitzer J, Zheng H, Schmid S, Zhong XY: **Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer.** *PLoS One* 2011, **6**:e16080.
139. Sharma G, Mirza S, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD, Pandya P, Ralhan R: **Clinical significance of promoter hypermethylation of DNA repair genes in tumor and serum DNA in invasive ductal breast carcinoma patients.** *Life Sci* 2010, **87**:83-91.
140. Butcher DT, Mancini-DiNardo DN, Archer TK, Rodenhiser DI: **DNA binding sites for putative methylation boundaries in the unmethylated region of the BRCA1 promoter.** *Int J Cancer* 2004, **111**:669-678.
141. Butcher DT, Rodenhiser DI: **Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3B) in some sporadic breast tumours.** *Eur J Cancer* 2007, **43**:210-219.
142. Hachana M, Trimeche M, Ziadi S, Amara K, Korbi S: **Evidence for a role of the Simian Virus 40 in human breast carcinomas.** *Breast Cancer Res Treat* 2009, **113**:43-58.

143. Jin W, Chen L, Chen Y, Xu SG, Di GH, Yin WJ, Wu J, Shao ZM: **UHRF1 is associated with epigenetic silencing of BRCA1 in sporadic breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **123**:359-373.
144. Birgisdottir V, Stefansson OA, Bodvarsdottir SK, Hilmarsdottir H, Jonasson JG, Eyfjord JE: **Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2006, **8**:R38.
145. Jing F, Jun L, Yong Z, Wang Y, Fei X, Zhang J, Hu L: **Multigene methylation in serum of sporadic Chinese female breast cancer patients as a prognostic biomarker.** *Oncology* 2008, **75**:60-66.
146. Matros E, Wang ZC, Lodeiro G, Miron A, Iglehart JD, Richardson AL: **BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles.** *Breast Cancer Res Treat* 2005, **91**:179-186.
147. Xu X, Gammon MD, Zhang Y, Bestor TH, Zeisel SH, Wetmur JG, Wallenstein S, Bradshaw PT, Garbowski G, Teitelbaum SL, et al: **BRCA1 promoter methylation is associated with increased mortality among women with breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2009, **115**:397-404.
148. Xu X, Gammon MD, Zhang Y, Cho YH, Wetmur JG, Bradshaw PT, Garbowski G, Hibshoosh H, Teitelbaum SL, Neugut AI, et al: **Gene promoter methylation is associated with increased mortality among women with breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **121**:685-692.
149. Karray-Chouayekh S, Trifa F, Khabir A, Boujelbane N, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R: **Clinical significance of epigenetic inactivation of hMLH1 and BRCA1 in Tunisian patients with invasive breast carcinoma.** *J Biomed Biotechnol* 2009, **2009**:369129.
150. Singh AK, Pandey A, Tewari M, Shukla HS, Pandey HP: **Epigenetic silencing of BRCA1 gene associated with demographic and pathologic factors in sporadic breast cancer: a study of an Indian population.** *Eur J Cancer Prev* 2011, **20**:478-483.
151. Catteau A, Harris WH, Xu CF, Solomon E: **Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics.** *Oncogene* 1999, **18**:1957-1965.
152. Galizia E, Giorgetti G, Piccinini G, Santinelli A, Lorelli C, Bianchi F, Gagliardini D, Carbonari G, Pisa E, Belvederesi L, et al: **BRCA1 expression in triple negative sporadic breast cancers.** *Anal Quant Cytol Histol* 2010, **32**:24-29.

153. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, Meltzer P, Gusterson B, Esteller M, Kallioniemi OP, et al: **Gene-expression profiles in hereditary breast cancer.** *N Engl J Med* 2001, **344**:539-548.
154. Lips EH, Mulder L, Hannemann J, Laddach N, Vrancken Peeters MT, van de Vijver MJ, Wesseling J, Nederlof PM, Rodenhuis S: **Indicators of homologous recombination deficiency in breast cancer and association with response to neoadjuvant chemotherapy.** *Ann Oncol* 2011, **22**:870-876.
155. Stefansson OA, Jonasson JG, Olafsdottir K, Hilmarsdottir H, Olafsdottir G, Esteller M, Johannsson OT, Eyfjord JE: **CpG island hypermethylation of BRCA1 and loss of pRb as co-occurring events in basal/triple-negative breast cancer.** *Epigenetics* 2011, **6**:638-649.
156. Vollebergh MA, Lips EH, Nederlof PM, Wessels LF, Schmidt MK, van Beers EH, Cornelissen S, Holtkamp M, Froklage FE, de Vries EG, et al: **An aCGH classifier derived from BRCA1-mutated breast cancer and benefit of high-dose platinum-based chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients.** *Ann Oncol* 2011, **22**:1561-1570.
157. Joosse SA, Brandwijk KI, Mulder L, Wesseling J, Hannemann J, Nederlof PM: **Genomic signature of BRCA1 deficiency in sporadic basal-like breast tumors.** *Genes Chromosomes Cancer* 2011, **50**:71-81.
158. Krop I, Maguire P, Lahti-Domenici J, Lodeiro G, Richardson A, Johannsdottir HK, Nevanlinna H, Borg A, Gelman R, Barkardottir RB, et al: **Lack of HIN-1 methylation in BRCA1-linked and "BRCA1-like" breast tumors.** *Cancer Res* 2003, **63**:2024-2027.
159. Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM, Springall RJ, Ryder K, Steele D, Savage K, Gillett CE, Schmitt FC, Ashworth A, Tutt AN: **BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer.** *Oncogene* 2007, **26**:2126-2132.
160. Bae YK, Brown A, Garrett E, Bornman D, Fackler MJ, Sukumar S, Herman JG, Gabrielson E: **Hypermethylation in histologically distinct classes of breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**:5998-6005.
161. Lee JS, Fackler MJ, Lee JH, Choi C, Park MH, Yoon JH, Zhang Z, Sukumar S: **Basal-like breast cancer displays distinct patterns of promoter methylation.** *Cancer Biol Ther* 2010, **9**:1017-1024.
162. Moelans CB, Verschuur-Maes AH, van Diest PJ: **Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer.** *J Pathol* 2011, **225**:222-231.

163. Osin P, Lu YJ, Stone J, Crook T, Houlston RS, Gasco M, Gusterson BA, Shipley J: **Distinct genetic and epigenetic changes in medullary breast cancer.** *Int J Surg Pathol* 2003, **11**:153-158.
164. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, Wang ZC, Szallasi Z, Li Q, Juul N, Leong CO, Calogrias D, Buraimoh A, et al: **Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer.** *J Clin Oncol* 2010, **28**:1145-1153.
165. Drew Y, Mulligan EA, Vong WT, Thomas HD, Kahn S, Kyle S, Mukhopadhyay A, Los G, Hostomsky Z, Plummer ER, et al: **Therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor AG014699 in human cancers with mutated or methylated BRCA1 or BRCA2.** *J Natl Cancer Inst* 2011, **103**:334-346.
166. Xu J, Huo D, Chen Y, Nwachukwu C, Collins C, Rowell J, Slamon DJ, Olopade OI: **CpG island methylation affects accessibility of the proximal BRCA1 promoter to transcription factors.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **120**:593-601.
167. Ibanez de Caceres I, Battagli C, Esteller M, Herman JG, Dulaimi E, Edelson MI, Bergman C, Ehya H, Eisenberg BL, Cairns P: **Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients.** *Cancer Res* 2004, **64**:6476-6481.
168. Press JZ, De Luca A, Boyd N, Young S, Troussard A, Ridge Y, Kaurah P, Kalloger SE, Blood KA, Smith M, et al: **Ovarian carcinomas with genetic and epigenetic BRCA1 loss have distinct molecular abnormalities.** *BMC Cancer* 2008, **8**:17.
169. Cucer N, Taheri S, Ok E, Ozkul Y: **Methylation status of CpG islands at sites -59 to +96 in exon 1 of the BRCA2 gene varies in mammary tissue among women with sporadic breast cancer.** *J Genet* 2008, **87**:155-158.
170. Pal R, Srivastava N, Chopra R, Gochhait S, Gupta P, Prakash N, Agarwal G, Bamezai RN: **Investigation of DNA damage response and apoptotic gene methylation pattern in sporadic breast tumors using high throughput quantitative DNA methylation analysis technology.** *Mol Cancer* 2010, **9**:303.
171. Chan KY, Ozcelik H, Cheung AN, Ngan HY, Khoo US: **Epigenetic factors controlling the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic ovarian cancer.** *Cancer Res* 2002, **62**:4151-4156.
172. An J, Wei Q, Liu Z, Lu KH, Cheng X, Mills GB, Wang LE: **Messenger RNA expression and methylation of candidate tumor-suppressor genes and risk of ovarian cancer-a case-control analysis.** *Int J Mol Epidemiol Genet* 2010, **1**:1-10.

173. Dhillon VS, Shahid M, Husain SA: **CpG methylation of the FHIT, FANCF, cyclin-D2, BRCA2 and RUNX3 genes in Granulosa cell tumors (GCTs) of ovarian origin.** *Mol Cancer* 2004, **3**:33.
174. Goodheart MJ, Rose SL, Hattermann-Zogg M, Smith BJ, De Young BR, Buller RE: **BRCA2 alteration is important in clear cell carcinoma of the ovary.** *Clin Genet* 2009, **76**:161-167.
175. Gras E, Cortes J, Diez O, Alonso C, Matias-Guiu X, Baiget M, Prat J: **Loss of heterozygosity on chromosome 13q12-q14, BRCA-2 mutations and lack of BRCA-2 promoter hypermethylation in sporadic epithelial ovarian tumors.** *Cancer* 2001, **92**:787-795.
176. Afssa: **Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations.** 2005.
177. Rowland I, Faughnan M, Hoey L, Wahala K, Williamson G, Cassidy A: **Bioavailability of phyto-oestrogens.** *Br J Nutr* 2003, **89 Suppl 1**:S45-58.
178. Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE: **Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability.** *Am J Clin Nutr* 2002, **76**:447-453.
179. Atkinson C, Frankenfeld CL, Lampe JW: **Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2005, **230**:155-170.
180. Heinonen S, Wahala K, Adlercreutz H: **Identification of isoflavone metabolites dihydrodaidzein, dihydrogenistein, 6'-OH-O-dma, and cis-4-OH-equol in human urine by gas chromatography-mass spectroscopy using authentic reference compounds.** *Anal Biochem* 1999, **274**:211-219.
181. Kelly GE, Nelson C, Waring MA, Joannou GE, Reeder AY: **Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine.** *Clin Chim Acta* 1993, **223**:9-22.
182. Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E: **The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones.** *J Nutr* 2002, **132**:3577-3584.
183. Setchell KD: **Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones.** *Am J Clin Nutr* 1998, **68**:1333S-1346S.
184. Setchell KD, Cassidy A: **Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health.** *J Nutr* 1999, **129**:758S-767S.

185. Setchell KD, Clerici C: **Equol: pharmacokinetics and biological actions.** *J Nutr* 2010, **140**:1363S-1368S.
186. Leclercq G, Heuson JC: **Physiological and pharmacological effects of estrogens in breast cancer.** *Biochim Biophys Acta* 1979, **560**:427-455.
187. Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, Williams LD, Doerge DR, Katzenellenbogen BS, Helferich WG, Katzenellenbogen JA: **Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta.** *Bioorg Med Chem* 2004, **12**:1559-1567.
188. Peeters PH, Slimani N, van der Schouw YT, Grace PB, Navarro C, Tjonneland A, Olsen A, Clavel-Chapelon F, Touillaud M, Boutron-Ruault MC, et al: **Variations in plasma phytoestrogen concentrations in European adults.** *J Nutr* 2007, **137**:1294-1300.
189. Kushnir MM, Rockwood AL, Bergquist J, Varshavsky M, Roberts WL, Yue B, Bunker AM, Meikle AW: **High-sensitivity tandem mass spectrometry assay for serum estrone and estradiol.** *Am J Clin Pathol* 2008, **129**:530-539.
190. Cowley SM, Parker MG: **A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999, **69**:165-175.
191. Liu J, Knappenberger KS, Kack H, Andersson G, Nilsson E, Dartsch C, Scott CW: **A homogeneous in vitro functional assay for estrogen receptors: coactivator recruitment.** *Mol Endocrinol* 2003, **17**:346-355.
192. Pearce ST, Jordan VC: **The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2004, **50**:3-22.
193. Bai Z, Gust R: **Breast cancer, estrogen receptor and ligands.** *Arch Pharm (Weinheim)* 2009, **342**:133-149.
194. Pilsakova L, Riecanaky I, Jagla F: **The physiological actions of isoflavone phytoestrogens.** *Physiol Res* 2010, **59**:651-664.
195. Gustafsson JA: **Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action.** *J Endocrinol* 1999, **163**:379-383.
196. Patel RP, Barnes S: **Isoflavones and PPAR Signaling: A Critical Target in Cardiovascular, Metastatic, and Metabolic Disease.** *PPAR Res* 2010, **2010**:153252.
197. Huang RQ, Fang MJ, Dillon GH: **The tyrosine kinase inhibitor genistein directly inhibits GABAA receptors.** *Brain Res Mol Brain Res* 1999, **67**:177-183.
198. Jefferson WN, Couse JF, Padilla-Banks E, Korach KS, Newbold RR: **Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER)alpha expression and**

- multioocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions.** *Biol Reprod* 2002, **67**:1285-1296.
199. Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA, Jirtle RL: **Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome.** *Environ Health Perspect* 2006, **114**:567-572.
200. Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL: **Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:13056-13061.
201. Vanhees K, Coort S, Ruijters EJ, Godschalk RW, van Schooten FJ, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S: **Epigenetics: prenatal exposure to genistein leaves a permanent signature on the hematopoietic lineage.** *FASEB J* 2011, **25**:797-807.
202. Guerrero-Bosagna CM, Sabat P, Valdovinos FS, Valladares LE, Clark SJ: **Epigenetic and phenotypic changes result from a continuous pre and post natal dietary exposure to phytoestrogens in an experimental population of mice.** *BMC Physiol* 2008, **8**:17.
203. Lyn-Cook BD, Blann E, Payne PW, Bo J, Sheehan D, Medlock K: **Methylation profile and amplification of proto-oncogenes in rat pancreas induced with phytoestrogens.** *Proc Soc Exp Biol Med* 1995, **208**:116-119.
204. Day JK, Bauer AM, DesBordes C, Zhuang Y, Kim BE, Newton LG, Nehra V, Forsee KM, MacDonald RS, Besch-Williford C, et al: **Genistein alters methylation patterns in mice.** *J Nutr* 2002, **132**:2419S-2423S.
205. Tang WY, Newbold R, Mardilovich K, Jefferson W, Cheng RY, Medvedovic M, Ho SM: **Persistent hypomethylation in the promoter of nucleosomal binding protein 1 (Nsbp1) correlates with overexpression of Nsbp1 in mouse uteri neonatally exposed to diethylstilbestrol or genistein.** *Endocrinology* 2008, **149**:5922-5931.
206. Matsukura H, Aisaki K, Igarashi K, Matsushima Y, Kanno J, Muramatsu M, Sudo K, Sato N: **Genistein promotes DNA demethylation of the steroidogenic factor 1 (SF-1) promoter in endometrial stromal cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2011, **412**:366-372.
207. Sato N, Yamakawa N, Masuda M, Sudo K, Hatada I, Muramatsu M: **Genome-wide DNA methylation analysis reveals phytoestrogen modification of promoter methylation patterns during embryonic stem cell differentiation.** *PLoS One* 2011, **6**:e19278.

208. Li Y, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO: **Genistein depletes telomerase activity through cross-talk between genetic and epigenetic mechanisms.** *Int J Cancer* 2009, **125**:286-296.
209. Fang MZ, Chen D, Sun Y, Jin Z, Christman JK, Yang CS: **Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:7033-7041.
210. Majid S, Dar AA, Shahryari V, Hirata H, Ahmad A, Saini S, Tanaka Y, Dahiya AV, Dahiya R: **Genistein reverses hypermethylation and induces active histone modifications in tumor suppressor gene B-Cell translocation gene 3 in prostate cancer.** *Cancer* 2010, **116**:66-76.
211. Hong T, Nakagawa T, Pan W, Kim MY, Kraus WL, Ikehara T, Yasui K, Aihara H, Takebe M, Muramatsu M, Ito T: **Isoflavones stimulate estrogen receptor-mediated core histone acetylation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **317**:259-264.
212. Qin W, Zhu W, Shi H, Hewett JE, Ruhlen RL, MacDonald RS, Rottinghaus GE, Chen YC, Sauter ER: **Soy isoflavones have an antiestrogenic effect and alter mammary promoter hypermethylation in healthy premenopausal women.** *Nutr Cancer* 2009, **61**:238-244.
213. Messina MJ, Persky V, Setchell KD, Barnes S: **Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data.** *Nutr Cancer* 1994, **21**:113-131.
214. Basa GF, Hirayama T, Cruz-Basa AG: **Cancer epidemiology in the Philippines.** *Natl Cancer Inst Monogr* 1977, **47**:45-56.
215. Dunn JE: **Cancer epidemiology in populations of the United States--with emphasis on Hawaii and California--and Japan.** *Cancer Res* 1975, **35**:3240-3245.
216. Gray GE, Pike MC, Henderson BE: **Breast-cancer incidence and mortality rates in different countries in relation to known risk factors and dietary practices.** *Br J Cancer* 1979, **39**:1-7.
217. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** *Int J Cancer* 2010, **127**:2893-2917.
218. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, Wu-Williams AH, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF, Hyer MB: **Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women.** *J Natl Cancer Inst* 1993, **85**:1819-1827.
219. Bouker KB, Hilakivi-Clarke L: **Genistein: does it prevent or promote breast cancer?** *Environ Health Perspect* 2000, **108**:701-708.

220. Taylor CK, Levy RM, Elliott JC, Burnett BP: **The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: a review of in vitro, preclinical, and clinical studies.** *Nutr Rev* 2009, **67**:398-415.
221. Hargreaves DF, Potten CS, Harding C, Shaw LE, Morton MS, Roberts SA, Howell A, Bundred NJ: **Two-week dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast.** *J Clin Endocrinol Metab* 1999, **84**:4017-4024.
222. McMichael-Phillips DF, Harding C, Morton M, Roberts SA, Howell A, Potten CS, Bundred NJ: **Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast.** *Am J Clin Nutr* 1998, **68**:1431S-1435S.
223. Nikander E, Kilkkinen A, Metsa-Heikkila M, Adlercreutz H, Pietinen P, Tiitinen A, Ylikorkala O: **A randomized placebo-controlled crossover trial with phytoestrogens in treatment of menopause in breast cancer patients.** *Obstet Gynecol* 2003, **101**:1213-1220.
224. Van Patten CL, Olivotto IA, Chambers GK, Gelmon KA, Hislop TG, Templeton E, Wattie A, Prior JC: **Effect of soy phytoestrogens on hot flashes in postmenopausal women with breast cancer: a randomized, controlled clinical trial.** *J Clin Oncol* 2002, **20**:1449-1455.
225. Sartippour MR, Rao JY, Apple S, Wu D, Henning S, Wang H, Elashoff R, Rubio R, Heber D, Brooks MN: **A pilot clinical study of short-term isoflavone supplements in breast cancer patients.** *Nutr Cancer* 2004, **49**:59-65.
226. Enderlin CA, Coleman EA, Stewart CB, Hakkak R: **Dietary soy intake and breast cancer risk.** *Oncol Nurs Forum* 2009, **36**:531-539.
227. Trock BJ, Hilakivi-Clarke L, Clarke R: **Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk.** *J Natl Cancer Inst* 2006, **98**:459-471.
228. Wu AH, Yu MC, Tseng CC, Pike MC: **Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk.** *Br J Cancer* 2008, **98**:9-14.
229. Lamartiniere CA, Moore J, Holland M, Barnes S: **Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer.** *Proc Soc Exp Biol Med* 1995, **208**:120-123.
230. Constantinou AI, Lantvit D, Hawthorne M, Xu X, van Breemen RB, Pezzuto JM: **Chemopreventive effects of soy protein and purified soy isoflavones on DMBA-induced mammary tumors in female Sprague-Dawley rats.** *Nutr Cancer* 2001, **41**:75-81.
231. Warri A, Saarinen NM, Makela S, Hilakivi-Clarke L: **The role of early life genistein exposures in modifying breast cancer risk.** *Br J Cancer* 2008, **98**:1485-1493.

232. Li Y, Ahmed F, Ali S, Philip PA, Kucuk O, Sarkar FH: **Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells.** *Cancer Res* 2005, **65**:6934-6942.
233. Mohammad RM, Banerjee S, Li Y, Aboukameel A, Kucuk O, Sarkar FH: **Cisplatin-induced antitumor activity is potentiated by the soy isoflavone genistein in BxPC-3 pancreatic tumor xenografts.** *Cancer* 2006, **106**:1260-1268.
234. Gong L, Li Y, Nedeljkovic-Kurepa A, Sarkar FH: **Inactivation of NF-kappaB by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells.** *Oncogene* 2003, **22**:4702-4709.
235. Li Y, Ellis KL, Ali S, El-Rayes BF, Nedeljkovic-Kurepa A, Kucuk O, Philip PA, Sarkar FH: **Apoptosis-inducing effect of chemotherapeutic agents is potentiated by soy isoflavone genistein, a natural inhibitor of NF-kappaB in BxPC-3 pancreatic cancer cell line.** *Pancreas* 2004, **28**:e90-95.
236. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y: **Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases.** *J Biol Chem* 1987, **262**:5592-5595.
237. Cho KH, Pezzuto JM, Bolton JL, Steele VE, Kelloff GJ, Lee SK, Constantinou A: **Selection of cancer chemopreventive agents based on inhibition of topoisomerase II activity.** *Eur J Cancer* 2000, **36**:2146-2156.
238. Magee PJ, Rowland IR: **Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer.** *Br J Nutr* 2004, **91**:513-531.
239. Okura A, Arakawa H, Oka H, Yoshinari T, Monden Y: **Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1988, **157**:183-189.
240. Choi YH, Lee WH, Park KY, Zhang L: **p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells.** *Jpn J Cancer Res* 2000, **91**:164-173.
241. Wei H, Wei L, Frenkel K, Bowen R, Barnes S: **Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein.** *Nutr Cancer* 1993, **20**:1-12.
242. Fan S, Meng Q, Auburn K, Carter T, Rosen EM: **BRCA1 and BRCA2 as molecular targets for phytochemicals indole-3-carbinol and genistein in breast and prostate cancer cells.** *Br J Cancer* 2006, **94**:407-426.
243. Jeune MA, Kumi-Diaka J, Brown J: **Anticancer activities of pomegranate extracts and genistein in human breast cancer cells.** *J Med Food* 2005, **8**:469-475.

244. Caetano B, Le Corre L, Chalabi N, Delort L, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ: **Soya phytonutrients act on a panel of genes implicated with BRCA1 and BRCA2 oncosuppressors in human breast cell lines.** *Br J Nutr* 2006, **95**:406-413.
245. Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG: **Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo.** *Cancer Res* 1998, **58**:3833-3838.
246. Kinjo J, Tsuchihashi R, Morito K, Hirose T, Aomori T, Nagao T, Okabe H, Nohara T, Masamune Y: **Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine.** *Biol Pharm Bull* 2004, **27**:185-188.
247. Le Bail JC, Varnat F, Nicolas JC, Habrioux G: **Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids.** *Cancer Lett* 1998, **130**:209-216.
248. Liu B, Edgerton S, Yang X, Kim A, Ordonez-Ercan D, Mason T, Alvarez K, McKimmey C, Liu N, Thor A: **Low-dose dietary phytoestrogen abrogates tamoxifen-associated mammary tumor prevention.** *Cancer Res* 2005, **65**:879-886.
249. Schwartz JA, Liu G, Brooks SC: **Genistein-mediated attenuation of tamoxifen-induced antagonism from estrogen receptor-regulated genes.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **253**:38-43.
250. Seo HS, DeNardo DG, Jacquot Y, Laios I, Vidal DS, Zambrana CR, Leclercq G, Brown PH: **Stimulatory effect of genistein and apigenin on the growth of breast cancer cells correlates with their ability to activate ER alpha.** *Breast Cancer Res Treat* 2006, **99**:121-134.
251. Allred CD, Allred KF, Ju YH, Goepfing TS, Doerge DR, Helferich WG: **Soy processing influences growth of estrogen-dependent breast cancer tumors.** *Carcinogenesis* 2004, **25**:1649-1657.
252. Limer JL, Parkes AT, Speirs V: **Differential response to phytoestrogens in endocrine sensitive and resistant breast cancer cells in vitro.** *Int J Cancer* 2006, **119**:515-521.
253. Santell RC, Kieu N, Helferich WG: **Genistein inhibits growth of estrogen-independent human breast cancer cells in culture but not in athymic mice.** *J Nutr* 2000, **130**:1665-1669.
254. Ju YH, Allred CD, Allred KF, Karko KL, Doerge DR, Helferich WG: **Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice.** *J Nutr* 2001, **131**:2957-2962.

255. Snell C, Krypuy M, Wong EM, Loughrey MB, Dobrovic A: **BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype.** *Breast Cancer Res* 2008, **10**:R12.
256. Zeschnigk M, Bohringer S, Price EA, Onadim Z, Masshofer L, Lohmann DR: **A novel real-time PCR assay for quantitative analysis of methylated alleles (QAMA): analysis of the retinoblastoma locus.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:e125.
257. Teodoridis JM, Hall J, Marsh S, Kannall HD, Smyth C, Curto J, Siddiqui N, Gabra H, McLeod HL, Strathdee G, Brown R: **CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer.** *Cancer Res* 2005, **65**:8961-8967.
258. Collins N, Wooster R, Stratton MR: **Absence of methylation of CpG dinucleotides within the promoter of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 in normal tissues and in breast and ovarian cancers.** *Br J Cancer* 1997, **76**:1150-1156.
259. Jones PA, Baylin SB: **The epigenomics of cancer.** *Cell* 2007, **128**:683-692.
260. Choi JY, James SR, Link PA, McCann SE, Hong CC, Davis W, Nesline MK, Ambrosone CB, Karpf AR: **Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer.** *Carcinogenesis* 2009, **30**:1889-1897.
261. Widschwendter M, Apostolidou S, Raum E, Rothenbacher D, Fiegl H, Menon U, Stegmaier C, Jacobs IJ, Brenner H: **Epigenotyping in peripheral blood cell DNA and breast cancer risk: a proof of principle study.** *PLoS One* 2008, **3**:e2656.
262. Rice JC, Massey-Brown KS, Futscher BW: **Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells.** *Oncogene* 1998, **17**:1807-1812.
263. Rice JC, Ozcelik H, Maxeiner P, Andrulis I, Futscher BW: **Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens.** *Carcinogenesis* 2000, **21**:1761-1765.
264. Bieche I, Nogues C, Lidereau R: **Overexpression of BRCA2 gene in sporadic breast tumours.** *Oncogene* 1999, **18**:5232-5238.
265. Fang M, Chen D, Yang CS: **Dietary polyphenols may affect DNA methylation.** *J Nutr* 2007, **137**:223S-228S.
266. King-Batoon A, Leszczynska JM, Klein CB: **Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells.** *Environ Mol Mutagen* 2008, **49**:36-45.
267. Li Y, Tollefsbol TO: **Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components.** *Curr Med Chem* 2010, **17**:2141-2151.
268. Majid S, Dar AA, Ahmad AE, Hirata H, Kawakami K, Shahryari V, Saini S, Tanaka Y, Dahiya AV, Khatri G, Dahiya R: **BTG3 tumor suppressor gene promoter**

- demethylation, histone modification and cell cycle arrest by genistein in renal cancer. *Carcinogenesis* 2009, **30**:662-670.
269. Billard LM, Magdinier F, Lenoir GM, Frappart L, Dante R: **MeCP2 and MBD2 expression during normal and pathological growth of the human mammary gland.** *Oncogene* 2002, **21**:2704-2712.
270. Muller HM, Fiegl H, Goebel G, Hubalek MM, Widschwendter A, Muller-Holzner E, Marth C, Widschwendter M: **MeCP2 and MBD2 expression in human neoplastic and non-neoplastic breast tissue and its association with oestrogen receptor status.** *Br J Cancer* 2003, **89**:1934-1939.
271. Satih S, Rabiau N, Bignon YJ, Bernard-Gallon D: **Soy Phytoestrogens and Breast Cancer Chemoprevention: Molecular Mechanisms.** *Curr Nutr Food Sci* 2008, **4**:259-264(256).
272. Das PM, Singal R: **DNA methylation and cancer.** *J Clin Oncol* 2004, **22**:4632-4642.
273. Delort L, Kwiatkowski F, Chalabi N, Satih S, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ: **Risk factors for early age at breast cancer onset--the "COSA program" population-based study.** *Anticancer Res* 2007, **27**:1087-1094.
274. Delort L, Kwiatkowski F, Chalabi N, Satih S, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ: **Central adiposity as a major risk factor of ovarian cancer.** *Anticancer Res* 2009, **29**:5229-5234.
275. Delort L, Chalabi N, Satih S, Rabiau N, Kwiatkowski F, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ: **Association between genetic polymorphisms and ovarian cancer risk.** *Anticancer Res* 2008, **28**:3079-3081.
276. Bianco T, Chenevix-Trench G, Walsh DC, Cooper JE, Dobrovic A: **Tumour-specific distribution of BRCA1 promoter region methylation supports a pathogenetic role in breast and ovarian cancer.** *Carcinogenesis* 2000, **21**:147-151.
277. Kontorovich T, Cohen Y, Nir U, Friedman E: **Promoter methylation patterns of ATM, ATR, BRCA1, BRCA2 and p53 as putative cancer risk modifiers in Jewish BRCA1/BRCA2 mutation carriers.** *Breast Cancer Res Treat* 2009, **116**:195-200.
278. Staff S, Isola J, Tanner M: **Haplo-insufficiency of BRCA1 in sporadic breast cancer.** *Cancer Res* 2003, **63**:4978-4983.
279. Ruike Y, Imanaka Y, Sato F, Shimizu K, Tsujimoto G: **Genome-wide analysis of aberrant methylation in human breast cancer cells using methyl-DNA immunoprecipitation combined with high-throughput sequencing.** *BMC Genomics* 2010, **11**:137.

280. Fang MZ, Jin Z, Wang Y, Liao J, Yang GY, Wang LD, Yang CS: **Promoter hypermethylation and inactivation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in esophageal squamous cell carcinomas and its reactivation in cell lines.** *Int J Oncol* 2005, **26**:615-622.
281. Jha AK, Nikbakht M, Parashar G, Shrivastava A, Capalash N, Kaur J: **Reversal of hypermethylation and reactivation of the RARbeta2 gene by natural compounds in cervical cancer cell lines.** *Folia Biol (Praha)* 2010, **56**:195-200.
282. Raynal NJ, Momparler L, Charbonneau M, Momparler RL: **Antileukemic activity of genistein, a major isoflavone present in soy products.** *J Nat Prod* 2008, **71**:3-7.
283. Vardi A, Bosviel R, Rabiau N, Adjakly M, Satih S, Dechelotte P, Boiteux JP, Fontana L, Bignon YJ, Guy L, Bernard-Gallon DJ: **Soy phytoestrogens modify DNA methylation of GSTP1, RASSF1A, EPH2 and BRCA1 promoter in prostate cancer cells.** *In Vivo* 2010, **24**:393-400.
284. Ali AB, Iau PT, Sng JH: **Cancer-specific methylation in the BRCA1 promoter in sporadic breast tumours.** *Med Oncol* 2011, **28**:64-66.
285. Miyamoto K, Fukutomi T, Asada K, Wakazono K, Tsuda H, Asahara T, Sugimura T, Ushijima T: **Promoter hypermethylation and post-transcriptional mechanisms for reduced BRCA1 immunoreactivity in sporadic human breast cancers.** *Jpn J Clin Oncol* 2002, **32**:79-84.
286. Niwa Y, Oyama T, Nakajima T: **BRCA1 expression status in relation to DNA methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast cancers.** *Jpn J Cancer Res* 2000, **91**:519-526.
287. Adkins NL, Georgel PT: **MeCP2: structure and function.** *Biochem Cell Biol* 2011, **89**:1-11.
288. Auriol E, Billard LM, Magdinier F, Dante R: **Specific binding of the methyl binding domain protein 2 at the BRCA1-NBR2 locus.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**:4243-4254.
289. Wang Y, Liu C, Guo QL, Yan JQ, Zhu XY, Huang CS, Zou WY: **Intrathecal 5-azacytidine inhibits global DNA methylation and methyl-CpG-binding protein 2 expression and alleviates neuropathic pain in rats following chronic constriction injury.** *Brain Res* 2011.
290. Zhao M, Gao F, Wu X, Tang J, Lu Q: **Abnormal DNA methylation in peripheral blood mononuclear cells from patients with vitiligo.** *Br J Dermatol* 2010, **163**:736-742.
291. Setchell KD, Clerici C, Lephart ED, Cole SJ, Heenan C, Castellani D, Wolfe BE, Nechemias-Zimmer L, Brown NM, Lund TD, et al: **S-equal, a potent ligand for**

- estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am J Clin Nutr* 2005, **81**:1072-1079.
292. Morton MS, Arisaka O, Miyake N, Morgan LD, Evans BA: **Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age.** *J Nutr* 2002, **132**:3168-3171.
293. Jawaid K, Crane SR, Nowers JL, Lacey M, Whitehead SA: **Long-term genistein treatment of MCF-7 cells decreases acetylated histone 3 expression and alters growth responses to mitogens and histone deacetylase inhibitors.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010, **120**:164-171.
294. Kikuno N, Shiina H, Urakami S, Kawamoto K, Hirata H, Tanaka Y, Majid S, Igawa M, Dahiya R: **Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells.** *Int J Cancer* 2008, **123**:552-560.
295. Majid S, Kikuno N, Nelles J, Noonan E, Tanaka Y, Kawamoto K, Hirata H, Li LC, Zhao H, Okino ST, et al: **Genistein induces the p21WAF1/CIP1 and p16INK4a tumor suppressor genes in prostate cancer cells by epigenetic mechanisms involving active chromatin modification.** *Cancer Res* 2008, **68**:2736-2744.
296. Pong RC, Roark R, Ou JY, Fan J, Stanfield J, Frenkel E, Sagalowsky A, Hsieh JT: **Mechanism of increased coxsackie and adenovirus receptor gene expression and adenovirus uptake by phytoestrogen and histone deacetylase inhibitor in human bladder cancer cells and the potential clinical application.** *Cancer Res* 2006, **66**:8822-8828.
297. Jovanovic J, Ronneberg JA, Tost J, Kristensen V: **The epigenetics of breast cancer.** *Mol Oncol* 2010, **4**:242-254.
298. Brait M, Sidransky D: **Cancer epigenetics: above and beyond.** *Toxicol Mech Methods* 2011, **21**:275-288.
299. Rajah TT, Du N, Drews N, Cohn R: **Genistein in the presence of 17beta-estradiol inhibits proliferation of ERbeta breast cancer cells.** *Pharmacology* 2009, **84**:68-73.

REFERENCES INTERNET

- a. www.e-cancer.fr/component/docman/doc_download/6035-la-situation-du-cancer-en-france-en-2010
consulté le 3/10/2011
- b. <http://www.embryology.ch/>
consulté le 14/09/2011
- c. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/breast.asp>
consulté le 3/10/2011

RESUME

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et la principale cause de mortalité par cancer chez la femme. Il s'agit d'un cancer hormono-dépendant, tout comme le cancer des ovaires. Ce dernier est le huitième au rang des cancers et le septième concernant la mortalité par cancer chez la femme. Environ 5% des cas héréditaires de cancer du sein ou de l'ovaire seraient liés à des mutations dans les oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2*. Dans les cas sporadiques, une diminution de l'expression de ces deux gènes pourrait être due à des mécanismes épigénétiques telle que la méthylation de l'ADN. Des études ont révélé que les cancers du sein sont plus rares dans les pays asiatiques, où la consommation de soja est élevée. L'objectif de mon travail a été d'analyser la méthylation des promoteurs de *BRCA1* et *BRCA2* dans les cancers du sein ou de l'ovaire et son association avec différents facteurs de risque *in vivo*. Les effets des principaux phyto-œstrogènes du soja sur cette méthylation, ont également été étudiés *in vitro*. Une méthylation moins importante du promoteur de *BRCA1* a été observée dans le sang périphérique de patientes ayant développé un cancer de l'ovaire par rapport à une population témoin, tandis qu'une méthylation plus importante de *BRCA1* et *BRCA2* est observée dans des sous-populations de patientes ayant développé un cancer du sein. *In vitro*, les phyto-œstrogènes du soja ont eu un effet déméthylant, associé à une augmentation de protéines pour les oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2*. Ces résultats démontrent que l'effet protecteur des phyto-œstrogènes du soja peut passer par une action déméthylante au niveau du promoteur d'oncosuppresseurs.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer and the leading cancer mortality cause in women. It is a hormone-dependent cancer, like ovarian cancer. The latter is the eighth cancer, and the seventh cancer mortality cause in women. About 5% of hereditary breast and ovarian cancers may be linked to mutations in *BRCA1* and *BRCA2* oncosuppressors. In sporadic cases, a decrease in these two genes' expression could be due to epigenetic mechanisms such as DNA methylation. Studies have shown that breast cancer is less frequent in Asian countries, where soy consumption is important. The objective of my work was to analyze *BRCA1* and *BRCA2* promoter methylation in breast or ovarian cancers and its association with risk factors *in vivo*. The effects of the main soy phyto-estrogens on this methylation were also studied *in vitro*. A lower methylation of the promoter of *BRCA1* was observed in peripheral blood cells of ovarian cancer patients compared to control population, whereas an increased *BRCA1* and *BRCA2* methylation was found in sub-populations of breast cancer patients. *In vitro*, soy phyto-estrogens had a demethylating effect, associated with a raise in related protein expression, on the *BRCA1* and *BRCA2* genes. These results show that the protective effect of soy phyto-estrogens can be due to a demethylation activity over the promoters of oncosuppressors.