



**HAL**  
open science

# Implication des bisphénols dans la régulation et la tumorigenèse des cellules souches mammaires via une interaction entre les signalisations ERalpha36 et BMP2

Nora Jung

► **To cite this version:**

Nora Jung. Implication des bisphénols dans la régulation et la tumorigenèse des cellules souches mammaires via une interaction entre les signalisations ERalpha36 et BMP2. Cancer. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1213 . tel-03432947v1

**HAL Id: tel-03432947**

**<https://theses.hal.science/tel-03432947v1>**

Submitted on 17 Nov 2021 (v1), last revised 24 Nov 2021 (v2)

**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.



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1213

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

réalisée au sein de  
**L'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale 340**  
**Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (ED BMIC)**

**Spécialité de doctorat** : *Cancérologie*  
**Discipline** : *Biologie moléculaire et cellulaire*

Soutenue publiquement le 09/11/2020, par :

**Nora JUNG**

---

# **Implication des bisphénols dans la régulation et la tumorigenèse des cellules souches mammaires via une interaction entre les signalisations ER $\alpha$ 36 et BMP2**

---

Devant le jury composé de :

Pr. Ulrich VALCOURT, Professeur des Universités, LBTI, Lyon – *Président du jury*

Dr. Hélène DUMOND, Maître de conférences, Université de Lorraine, Nancy – *Rapporteuse*  
PR. Jean-Marc RICORT, Professeur des Universités, ENS Paris-Saclay, Paris – *Rapporteur*

Dr. Laurence LAFANECHERE, Directeur de Recherche CNRS, IAB Grenoble – *Examinatrice*  
Dr. Muriel LE ROMANCER, Directrice de Recherche INSERM, CRCL Lyon – *Examinatrice*  
Dr. Françoise LENFANT, Directrice de Recherche INSERM, I2MC Toulouse – *Examinatrice*

Dr. Véronique MAGUER-SATTA, Directrice de Recherche, CRCL Lyon – *Directrice de thèse*  
Dr. Boris GUYOT, Chargé de Recherche, CRCL Lyon – *Co-Directeur de thèse*

## Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

### COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

### COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

---

---

---

# PREAMBULE

---

---

---

---

## REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury de thèse, le Dr Hélène Dumond et le Pr Jean-Marc Ricort qui ont effectué une lecture préalable et constructive de mon travail de thèse. Je remercie aussi, le Dr Laurence Lafanechère d'avoir évalué mon travail lors de ma soutenance. Je souhaite aussi remercier le Dr Françoise Lenfant pour sa double implication, dans mon jury et dans mon comité de suivi de thèse et ses conseils pertinents qui m'ont permis d'avancer dans ma réflexion scientifique. Un grand merci au Dr Muriel Le Romancer pour sa bienveillance, pour son suivi actif de mes résultats sur ER $\alpha$ 36, pour les discussions qui m'ont permis de mieux comprendre la complexité du sujet, pour sa participation à mon jury de thèse en plus de mon CST. Je tiens aussi à remercier le Pr Ulrich Valcourt d'avoir accepté de présider ce jury.

Véronique, je veux te remercier sincèrement pour la confiance que tu as placée en moi. En m'accueillant dans ton équipe pour mon dernier stage de M2, tu as partagé ton optimisme, ton soutien et ta combativité, ce qui m'a permis d'obtenir une bourse de thèse. Tu m'as soutenue jusqu'au bout, en t'investissant à 100% suivant ton habitude, et si tu as fait un pari sur moi, j'espère ne pas t'avoir déçu. Durant mes 3 années de thèse, tes conseils et ton suivi m'ont permis d'aborder puis clarifier toutes ces données et ces traitements, pour avancer dans mon projet sans m'y noyer. Ce fut un très grand plaisir de t'avoir comme cheffe et je te suis reconnaissante de m'avoir offert l'opportunité de participer à des congrès. Ton dynamisme et ta détermination ont soutenu ma motivation, ta pensée positive à toute épreuve m'a fait garder espoir dans ce projet, semé d'embûches et de mycoplasmes.

Boris, je tiens à te remercier pour m'avoir fait grandir et murir scientifiquement à travers ton expertise et tes réflexions brillantes. Nos échanges scientifiques ont été d'excellentes bases pour me lancer dans le monde de la recherche.

Par qui commencer ensuite, il y a bien du monde à remercier parmi ceux qui m'ont soutenu au quotidien au laboratoire. Pour n'oublier personne, je vais faire par ordre géographique du labo puis par les anciens du labo.

Tout d'abord toi, Kévin. Je veux te remercier pour ton immense gentillesse et tes doses de chocobons, kinders, bonbons et chocolats en tout genre pour lesquelles je me suis laissée tenter à maintes reprises et qui m'ont forcé à faire des pauses. Par ailleurs, tu as toujours été disponible pour mes éternelles questions de calcul et pour me rendre service. Pour tout ça, je te dis un très grand merci.

Kawtar, retrouver tes rires et ta bonne humeur tous les jours au laboratoire a été inestimable pour moi. Comment fais-tu pour toujours être joyeuse et transmettre cette joie de vivre alors que tu croules aussi sous les soucis. Très sincèrement, un grand merci pour ce petit bonheur que je suis sûr de trouver au labo quand tu es là et qui m'a permis de garder le sourire malgré les coups de blues. Tu es une belle personne, généreuse et pleine de vie et je te remercie de m'avoir tiré vers le haut, notamment en me motivant pour m'inscrire à la salle. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse mais je sais que tout se passera bien parce que tu es une battante !

Léa, ma collègue pour « un petit café » postprandial. Je te remercie pour ton écoute et ton empathie. Tu as su m'écouter, me soutenir et râler avec moi dans les moments où je pétais des câbles à cause de

ma thèse. Je te remercie très sincèrement de ces échanges qui m'ont permis d'évacuer mon stress. Tu as aussi su me comprendre et me conseiller, ce qui m'a aidé à relativiser et à prendre du recul sur certaines situations. Tu es une boule d'énergie communicative ! Nos nombreuses discussions vont me manquer, même si je sais qu'on se reverra. Je te souhaite une super thèse ; canalise ton stress, respire et tout va rouler !

Simon, que j'ai rencontré en fin de thèse, et dont j'aurais souhaité profiter plus longuement. Nos dialogues remplis d'humour vont me manquer, de même que les discussions et réflexions plus sérieuses sur les cancers du sein et les concepts de cellules souches. Tu as apporté quelques réponses à mes interrogations, mais aussi pleins d'autres questions qui sont passionnantes à creuser. Je te remercie pour ta jovialité et tes conseils en orthographe. Ton amour pour la langue française m'a permis de découvrir des règles de grammaire jusque-là inconnues... Je te souhaite une bonne continuation à Nancy et, je l'espère, à Lyon pour une thèse.

Florence, que ta présence m'a manqué durant cette dernière année de thèse ! Ta sympathie, nos rendez vous à 7h du matin en tenue de sport « très chic », maintenus malgré tes longues journées de manip/rédaction/lecture d'articles et rush de fin de thèse ! Maintenant, les glaces kinder buenos n'ont plus la même saveur. J'espère très sincèrement que tu t'épanouis dans ta poursuite de parcours, et qu'il sera possible de se revoir, soit dans ta Normandie, soit à Lyon.

Irene, je pensai rédiger en espagnol mais ça fait longtemps que tu n'as pas pratiqué ton français alors voici un avant-gout pour te préparer à 200 pages de français. Pour être vraiment honnête avec toi, c'est surtout que, malgré tes leçons privées d'espagnol, je n'en parle toujours pas un mot, quoique, Mlle Braguilla. Je te remercie du fond du cœur de tous ces moments passés ensemble, de ton aide précieuse, de m'avoir tenu compagnie pendant les longues heures de microscope, de nos longues discussions en anglais sur des sujets très divers et variés qui ont améliorés ma pratique dans cette langue. Si tu te poses la question de savoir si je fais exprès d'utiliser des mots compliqués, la réponse c'est oui, évidemment ! Mais surtout, ne soit pas déçue s'il te plait. On se voit en novembre, le plus beau des mois, n'est-ce pas ?, et si le COVID-19 nous en empêche, ce ne sera que partie remise ! Je compte bien venir me dorser au soleil espagnol un de ces jours !

Pour les moments qu'on a passés ensemble, votre bonne humeur et les rires partagés, je veux également remercier le Dr Mario, le Dr Diana (tes histoires farfelues mais captivantes vont me manquer), la future Dr Razan, pour ces précieux conseils, et aussi le Dr HPK, qui s'est tout autant que moi arraché les cheveux sur ER $\alpha$ 36 (souvenirs, souvenirs ?). J'espère qu'on ne perdra pas trop contact avec le temps. Quentin, je te remercie aussi pour avoir égayé mes journées au labo grâce à tes références cinématographiques, au plaisir de se revoir, très probablement pas au badminton, mais plutôt autour d'un verre ! Cristina, avec toi, ce sont aussi des fous rires qui sont venus au labo pendant quelques mois. Je te souhaite d'avoir un financement pour ta thèse et de rapporter ton rire et tes patatas bravas à Lyon.

Thibault, Sylvain, Eve-Isabelle et Sandrine, je vous remercie également pour votre présence au quotidien qui a permis la bonne humeur au laboratoire.

Je tiens aussi à te remercier, Julien, pour toutes les « tu as 5 min ? » qui finissent par faire des heures, que tu m'as accordé et pour ton aide précieuse concernant mes innombrables questions sur le PLA. A bientôt au prochain LOTR !

Un très grand merci aussi à vous, Agathe, Solène et Raph, pour ces petits et longs weekends qui m'ont permis de m'échapper du stress de la thèse. Me voilà prochainement libre pour plus d'aventures, prochaine escapade Londres ? A très vite !

Je tiens également à remercier ma belle-famille, Claudy, Mélo, Joël ainsi que vous Mathilde et José, vous m'avez accueillie et je vous suis reconnaissante pour tous ces moments joyeux passés en votre compagnie.

Frérot, tes week-end raclette et jeux m'ont permis de me libérer l'esprit de la thèse, et je te remercie pour ces moments chaleureux, mais aussi d'avoir pu compter sur toi pour prendre soin de mes poissons et de Microbe durant mes vacances. Une pensée également à toi Aude, et à ma nièce toute chou qui grandit de jour en jour !

Je te remercie, maman, pour ton intérêt et toutes tes questions naïves sur la biologie et toi, papa, tu as été un exemple pour moi par ton ardeur au travail. Je vous remercie aussi du fond du cœur pour votre soutien et vos encouragements qui m'ont permis d'arriver là où je suis. Vous avez toujours su accepter mes choix et me conseiller. Maintenant que vous avez plus de temps libre et moi aussi, prochainement, j'espère qu'on pourra se voir plus souvent, à l'occasion de petites bouffes ou en venant faire bronzette sur le balcon.

Pour finir, je tiens à remercier quelqu'un sans qui je n'aurais jamais pu réussir à accomplir tout ça. Chris, tu as été mon soutien et ma bouffée d'oxygène durant ces longues années. Tu as toujours été là pour moi, aux petits soins, subissant ma fatigue, ma mauvaise humeur, les week-end et soirées boulot, mais tu as été compréhensif alors même qu'il faut le vivre pour comprendre. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu m'as apporté, pour ton amour, ta patience, ton écoute et tes conseils, tout ceci m'a permis de tenir dans les moments difficiles, je t'en suis sincèrement reconnaissante. Entre la PACES, les pizzas du soir, le master et la thèse, tu m'as toujours connu dans le rush, mais ne t'inquiète plus, maintenant je compte bien profiter de tout ce qu'on a construit ensemble, et de pleins d'autres choses à venir..., comme un deuxième chat ?

Je te dédie ce travail et j'espère que tu es fier de moi.

## Implication des bisphénols dans la régulation et la tumorigenèse des cellules souches mammaires via une interaction entre les signalisations ER $\alpha$ 36 et BMP2

### RÉSUMÉ :

Les cellules souches sont entre autres régulées par leur microenvironnement qui peut participer à leur transformation lorsqu'il est perturbé. Le laboratoire a montré que BMP2 (B2) peut induire la transformation de cellules souches mammaires et qu'il est produit en quantités anormalement élevées par le microenvironnement des tumeurs mammaires lumineales. Une des origines de cette surproduction est l'exposition à des polluants environnementaux œstrogénomimétiques comme le BPA, également impliqué dans le développement de cancer du sein via son effet sur le récepteur alpha des œstrogènes, ER $\alpha$ 66. De nombreuses études ont mis en évidence les effets délétères du BPA sur la santé humaine, ce qui a conduit à son remplacement par des substituts présentant une faible affinité pour ER $\alpha$ 66, comme le BPS ou le BPF. Cependant, des données de la littérature, suggérant que ces substituts du BPA pourraient également être des perturbateurs endocriniens, en passant entre autres par l'activation de ER $\alpha$ 36, un isoforme de ER $\alpha$ 66, remettent ainsi en question leur innocuité et les critères de contrôles utilisés pour évaluer leurs effets sur la santé humaine. L'ensemble de ces données nous a conduit à proposer un modèle de travail postulant une implication des bisphénols via une coopération entre la signalisation BMP2 et celle d'ER $\alpha$ 36 dans la dérégulation des cellules souches mammaires. Nous avons suivi l'effet d'une exposition chronique à l'E2, au BPA, au BPS et au BPF, seuls ou en combinaison avec B2, sur l'activité et la transformation des cellules souches dans un modèle de progéniteur bipotentiel épithélial mammaire humain ER $\alpha$ 66-/ER $\alpha$ 46-/ER $\alpha$ 36+. Nous avons ainsi trouvé qu'une exposition chronique au BPS ou au BPF agit en collaboration avec B2 en faveur d'un enrichissement du compartiment souche dont le mécanisme d'action pourrait potentiellement passer par l'induction d'une hyper-sensibilité au B2 aboutissant à une potentialisation de sa voie canonique. Par ailleurs, nous avons identifié pour la première fois l'existence d'une interaction physique entre ER $\alpha$ 36 et deux acteurs de la voie B2 : BMPR1B et SMAD1. De plus nous avons mis en évidence qu'une exposition chronique aux différents bisphénols ou à l'E2, que ce soit seul ou en combinaison avec BMP2 conduit à une perte d'interaction entre ER $\alpha$ 36/BMPR1b. Ce travail permet une meilleure compréhension des relations existantes entre la voie initiée par BMP2 et celle par ER $\alpha$ 36, chacune d'elle étant décrite comme déterminante dans l'apparition des tumeurs mammaires et permet également de mieux comprendre comment les signaux hormonaux, endogènes ou issus de notre environnement, s'intègrent pour modifier notre organisme. Outre son importance fondamentale, cette étude permet de s'interroger sur l'innocuité des molécules utilisées en remplacement du bisphénol A.

**Mots clés :** *BMP, bisphénol, ER $\alpha$ 36, microenvironnement, interaction, cancer du sein.*

## Bisphenols involvement in transformation and mammary stem cell properties by crosstalk between ER $\alpha$ 36 and BMP2 signalling pathway.

### ABSTRACT :

Stem cells are regulated by several cues from their microenvironment and it is becoming increasingly clear that perturbations of these signals can participate to transformation. Previously, our lab showed that BMP2 (B2) was able to induce the transformation of breast epithelial stem cells and that it was overproduced in luminal breast cancer microenvironment. It was also found that a potential source of this B2 over-expression was the exposure to oestrogens (E2)-mimetic environmental pollutants such as BPA, which is also involved in breast cancer development due to its effect on oestrogen receptor ER $\alpha$ 66. Several studies have already reported the dangerous effects of BPA on human health, leading to its replacement by other bisphenols, such as BPS and BPF, showing a lower affinity for ER $\alpha$ 66. However, some studies suggest that these BPA's alternatives could also be endocrine disruptors via ER $\alpha$ 36 activation, an ER $\alpha$ 66 isoform, calling into question their innocuity and the audit criteria used to evaluate their effect on human health. All these data led us to postulate a bisphenols involvement in stem cells properties dysregulation and transformation, through a cooperation between BMP2 signalling and ER $\alpha$ 36. We had followed the effect of a chronical exposure to E2, BPA, BPS, BPF, alone or in combination with B2, in the ER $\alpha$ 66- / ER $\alpha$ 46- / ER $\alpha$ 36+ immature human mammary epithelial cell line's activity and transformation. We found that chronical exposure to BPS or BPF act in collaboration with B2 in favour of a stem cell compartment enrichment. One molecular mechanism could be the induction of a hypersensitivity to B2, leading to a potentiation of its canonical pathway. Moreover, we also identify for the first time the existence of a physical interaction between ER $\alpha$ 36 and two major actors of the B2 pathway: BMPR1B and SMAD1. Furthermore, we highlight that the ER $\alpha$ 36/BMPR1B interaction is lost after chronical exposure to bisphenols or E2, with as well as without B2, suggesting the existence of a crosstalk between ER $\alpha$ 36 and B2 signalling pathways. This work allowed a better understanding of the relation existing between ER $\alpha$ 36 and B2 pathways, two important pathways previously independently involved in breast cancers development. Linking these two signalling allows to better understand how hormonal signals, endogen or from our environment, collaborate together to modify physiological cell regulations. In addition to its fundamental significance, this work strongly emphasizes the necessity to go further on the study of the innocuity and regulation of these E2-mimetic environmental pollutants.

**Keywords:** *BMP, bisphenol, ER $\alpha$ 36, microenvironment, crosstalk, breast cancer.*

## COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES :

- **Congrès GDR Micronit**, Décembre 2019, Croisic – *communication orale*
- **Journées « Ecole doctorale BMIC (EDMBIC) »**, Novembre 2019, Lyon – *communication orale*
- **Journée scientifique annuelle de la SFR**, Novembre 2019, Lyon – *communication orale*
- **Symposium international du CRCL**, Septembre 2019, Lyon – *poster*
- **Congrès Aurastem**, Juillet 2019, Lyon – *poster*

## PUBLICATION :

“*Early Steps of Mammary Stem Cell Transformation by Exogenous Signals; Effects of Bisphenol Endocrine Disrupting Chemicals and Bone Morphogenetic Proteins*”. **Jung N**, Maguer-Satta V, Guyot B. Revue publiée en 2019 dans *Cancers (Basel)*. DOI: 10.3390/cancers11091351

## LABORATOIRE :

Département Initiation du cancer et identité de la cellule tumorale  
BMP, Ecosystème, Cellules Souches & Dynamique du Cancer  
Equipe Véronique Maguer-Satta, Cheney D, 4ème étage  
Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon  
CNRS/UMR 5286- INSERM U1052  
28 Rue Laennec, 69008 Lyon  
France

## Table des matières

### PREAMBULE

Remerciements.....	4
Résumé.....	7
Abstract.....	8
Communications et publication.....	9
Table des matières.....	10
Liste des figures et tableau.....	13
Liste des abréviations.....	15
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	18
Chapitre 1 : La glande mammaire .....	19
A. Composition .....	19
B. Hiérarchie mammaire.....	21
1. Les cellules souches et les cellules souches mammaires .....	291
2. Les progéniteurs mammaires.....	25
C. Développement et dynamique de la glande mammaire.....	29
1. Stade embryonnaire.....	29
2. Puberté et âge adulte.....	31
3. Grossesse et lactation .....	40
4. Ménopause.....	46
Chapitre 2 : Les cancers du sein .....	48
A. Généralités .....	48
B. Facteurs de risque .....	48
1. Facteurs extrinsèques .....	48
2. Facteurs intrinsèques .....	53
C. Classifications des cancers du sein.....	54
1. Classification histologique.....	55
2. Classification anatomique .....	56
3. Classification moléculaire.....	56
D. Les thérapies .....	61
1. La chirurgie .....	61
2. La radiothérapie .....	61
3. La chimiothérapie.....	62
4. L'hormonothérapie .....	62
5. Les thérapies ciblées .....	65

E.	Résistance aux traitements et rechute .....	67
1.	Adaptabilité et/ou évolution de la tumeur .....	67
2.	Notion de cellules souches cancéreuses .....	69
3.	Métastases .....	71
Chapitre 3 : les œstrogènes et les récepteurs aux œstrogènes .....		73
A.	Les œstrogènes.....	73
1.	Physiologie des œstrogènes .....	73
2.	Biosynthèse et métabolisme.....	73
B.	Récepteurs aux œstrogènes (ER).....	75
1.	ER $\alpha$ 66 (ER $\alpha$ ) .....	76
2.	ER $\alpha$ 46.....	78
3.	ER $\alpha$ 36.....	79
4.	ER $\beta$ .....	82
5.	GPER .....	82
6.	Estrogen-related receptors (ERR) .....	84
7.	Connexion entre les différentes isoformes.....	84
C.	Signalisations .....	85
1.	Voies génomiques.....	85
2.	Voie non génomique.....	87
Chapitre 4 : Les bisphénols.....		89
A.	Généralités : Notions de dose, de fenêtre d'exposition et d'effets cocktail.....	89
1.	Notion de dose .....	89
2.	Notion de fenêtre d'exposition .....	92
3.	Notion d'effets cocktail .....	94
B.	Le bisphénol A (BPA) .....	94
1.	Origine, distribution et législation.....	94
2.	Structure, métabolisme et fixation .....	96
3.	Implication dans la tumorigenèse mammaire .....	97
C.	Les bisphénols S et F (BPS, BPF) .....	101
1.	Structure et métabolites du BPS et du BPF .....	102
2.	Remise en question de l'innocuité du BPS et du BPF.....	103
Chapitre 5 : La famille des bone morphogenetic proteins (BMP) .....		105
A.	Généralités .....	105
B.	Structure des ligands et des récepteurs.....	105
1.	Les ligands .....	105
2.	Les récepteurs au BMP.....	107
C.	Signalisation des BMP .....	109
1.	La voie canonique.....	111

2.	La voie non-canonique .....	111
3.	Les régulations de la voie des BMP .....	112
D.	Implication dans les cancers.....	114
1.	Initiation et progression tumorale .....	115
2.	Métastases, résistance aux traitements et rechutes .....	118
	Chapitre 6 : Le trio IL6/ERs/BMP .....	119
A.	Généralités sur l'interleukine 6 (IL6) .....	119
1.	Structure et production.....	119
2.	Rôles, signalisations et régulations .....	119
3.	Implication dans les cancers.....	122
B.	<i>Crosstalks</i> avec IL6.....	124
1.	IL6 et ERs .....	124
2.	IL6 et BMP .....	125
C.	<i>Crosstalk</i> ER/voie BMP .....	127
1.	ER $\alpha$ 66 et SMADs.....	127
2.	ER $\alpha$ 36 et voie des BMP .....	128
3.	Convergence entre les voies ER $\alpha$ 36 et BMP .....	129
	THEMATIQUE DU GROUPE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS DE THESE.....	132
	RESULTATS.....	136
	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	178
	ANNEXE.....	198
	REFERENCES BIBLIORAPHIQUES.....	217

## Liste des figures et tableau

Figure 1 : Localisation et structure de la glande mammaire.....	20
Figure 2 : Hiérarchie de l'épithélium mammaire.....	22
Figure 3 : Les différents types de cellules souches.....	24
Figure 4 : Méthodes d'étude des cellules souches utilisées au laboratoire.....	26
Figure 5 : Test clonogénique <i>in vitro</i> de E-CFC mettant en évidence les trois types de cellules progénitrices : mixte, luminale et myoépithéliale.....	27
Figure 6 : Localisation et développement de la glande mammaire durant le stade embryonnaire.....	30
Figure 7 : Structure et composition des bourgeons terminaux.....	32
Figure 8 : Effets des œstrogènes sur le développement de la glande mammaire lors de la puberté....	35
Figure 9 : Communications cellulaires induites par les œstrogènes .....	37
Figure 10 : Effets de la progestérone sur le développement de la glande mammaire lors de la puberté et à l'âge adulte et au moment de la grossesse.....	42
Figure 11 : Boucle réflexe mise en place au moment de la tétée du nouveau-né pour la production et l'excrétion du lait maternel.....	45
Figure 12 : Complexité de la régulation de la glande mammaire .....	47
Figure 13: Origines et impacts des facteurs de risques extrinsèques.....	49
Figure 14 : Classification histologique des cancers du sein.....	55
Figure 15 : Classification anatomique des cancers du sein selon la classification TNM et SBR.....	57
Figure 16 : Hypothèse sur l'origine des tumeurs mammaires en fonction des sous-types fondée sur la classification moléculaire.....	59
Figure 17 : Mode d'action des molécules thérapeutiques agissant au niveau des récepteurs aux œstrogènes.....	64
Figure 18 : Mode d'action des anticorps conjugués.....	66
Figure 19 : Mécanismes de résistance appliqués par exemple au tamoxifène.....	68
Figure 20 : Concept de cellules souches cancéreuses appliqué à la thérapie.....	69
Figure 21 : Hypothèses sur l'origine des cellules souches cancéreuses mammaires.....	70
Figure 22 : Les différentes étapes permettant un développement de métastases.....	72
Figure 23 : Rôles physiologiques et pathologiques des œstrogènes dans l'ensemble du corps humain et leur biosynthèse.....	74
Figure 24 : Les différentes isoformes protéiques du récepteur aux œstrogènes alpha et bêta.....	75
Figure 25 : Structure du gène ESR1 et de son domaine DBD codant pour la protéine ER $\alpha$ 66 et la conformation de cette protéine en fonction de la nature du ligand.....	77

Figure 26 : Structure du gène ESR1 et de son ARN messenger codant pour la protéine ER $\alpha$ 36 et structure tridimensionnelle théorique de la poche de liaison au ligand de ER $\alpha$ 66et de ER $\alpha$ 36.....	80
Figure 27 : Voies de signalisation des œstrogènes.....	86
Figure 28 : Mécanisme d'action de l'œstradiol sur ER $\alpha$ 36.....	88
Figure 29 : Concept de l'effet dose-réponse utilisé en toxicologie.....	90
Figure 30 : Hypothèses sur les mécanismes moléculaires sous-tendant un effet dose-réponse non monotone.....	91
Figure 31 : Effets générationnels des perturbateurs endocriniens pouvant être dû à plusieurs mécanismes.....	93
Figure 32 : Les différentes formes du BPA et son impact sur l'environnement.....	95
Figure 33 : Influence d'une exposition au BPA sur les cellules tout au long de la vie.....	99
Figure 34 : Comparaison structurale entre les différents types de bisphénols, BPA, BPS et BPF.....	103
Figure 35 : Implication des BMP dans la régulation des processus biologiques et leur classification...106	
Figure 36 : Mécanismes de production et de sécrétion des BMP et leur structure protéique.....	108
Figure.37 : Biosynthèse, oligomérisation, localisation des récepteurs aux BMP et induction des différentes voies de signalisation.....	110
Figure 38 : Régulation de la voie des BMP par les récepteurs.....	112
Figure 39 : Autres niveaux de régulation des voies de signalisation des BMP.....	114
Figure 40 : Implication de BMP2 et BMP4 dans la régulation des cellules souches mammaires ou hématopoïétiques dans un contexte normal et tumoral.....	116
Figure 41 : Les différentes signalisations de l'IL6.....	120
Figure 42 : Implication de l'IL6 dans la tumorigenèse.....	121
Figure 43 : Relation entre l'œstradiol et l'IL6 mise en place entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales.....	125
Figure 44 : Coopération entre les voies initiées par les BMP et par l'IL6.....	126
Figure 45 : Co-régulation entre ER $\alpha$ 36 et les BMP.....	129
Figure 46 : Convergence entre la voie des SMAD initiée par les BMP et la voie ERK, pouvant être induite par ER $\alpha$ 36.....	130
Figure 47 : Objectifs de thèse .....	135
Figure 48: Hypothèses du rôle des bisphénols.....	196
Tableau 1 : Classification moléculaire des cancers du sein fondé sur le statut ER, PR et HER2 des tumeurs.....	59

## Liste des abréviations

### A

ABC transporteur: Transporteur à ATP Binding Cassette  
ALDH: Aldehyde deshydrogenase  
ALK: Anaplastic lymphoma kinase  
ANSES: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail  
AP-1: Activator protein 1  
AREG: Amphiregulin  
ATM: Ataxia telangiectasia mutated

### B

BCL-2: B-cell lymphoma 2  
BISC: BMP-induced signaling complexes  
BMP : Bone morphogenetic protein  
BMPR: Bone morphogenetic protein receptor  
BMSC: Bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells  
BPA, BPS, BPF: Bisphenol A, S, F

### C

CAF: Cancer-associated fibroblasts  
CCL2: C-C motif chemokine ligand 2  
CCR2: C-C motif chemokine receptor 2  
CD: Cluster differentiation  
CREB: C-AMP response element-binding protein  
CXCL: Chemokine (C-X-C motif) ligand  
CXCR4: Chemokine (C-X-C motif) receptor

### D

DBD: DNA binding domain

### E

E1: Estrone  
E2: Estrogen  
E3: Estriol  
E-CFC: Epithelial-Colony Forming Cell  
ECHA: European Chemicals Agency  
EGFR: Epidermal growth factor receptor  
EMT: Epithelial-mesenchymal transition  
EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule  
ER: estrogen receptor  
ERE: Estrogen response element  
ERK: Extracellular signal-regulated kinase  
ERR : Estrogen related receptor

### F

FAK: Focal adhesion kinase  
FGF: Fibroblast growth factor

FOX: Forkhead box  
FSH : Follicule-stimulating hormone

## G

GATA-3: GATA Binding Protein 3  
GDNF: Glial derived neurotrophic factors  
GH : Growth hormone  
GnRH: Gonadotropin-releasing hormone  
GP130: Glycoprotein 130  
GP96: Glycoprotein 96  
GPER/GPR30 : G protein-coupled estrogen receptor

## H

HDAC: Histone deacetylase  
HIF1 $\alpha$ : Hypoxia-inducible factor 1-alpha  
Hsp90: heat shock protein 90

## I

ID: Inhibitor of Differentiation  
IGF: Insulin-like Growth Factor  
IGFR: Insulin-like Growth Factor receptor  
IL6: Interleukin 6  
iPS: Induced Pluripotent Stem Cells

## J

JAK: Janus kinase  
klf4: Kruppel-like factor 4

## K

KO: Knock down

## L

LBD: Lingand binding domain  
LH: Luteinizing hormone

## M

MH1 et MH2: Mad homolog domain 1 et 2  
MKP3: Mitogen-activated protein kinase 3  
mTOR: mechanistic target of rapamycin

## N

NES: Nuclear export signal  
NF $\kappa$ B: nuclear factor-kappa B  
NLS: Nuclear localization signal

NOAEL: No-observed-adverse-effect level

## O

oct-4: octamer-binding transcription factor 4

## P

PFC: Preformed complexe

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PIAS: Protein Inhibitors of Activated STAT

PKA: Protein kinase A

PKC: Protein kinase C

PR : Progesterone receptor

PRF: prolactin releasing factor

PTEN: Phosphatase and TENsin homolog

PTHrP: parathyroid-hormone-related peptide

## R

RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

RUNX: Runt-related transcription factor

## S

SERD: Selective estrogen receptor degrader

SERM: Selective estrogen receptor modulator

SMA: smooth muscle actin

SMAD: Small Mother Against Decapentaplegic

SOCS: Suppressor of Cytokine Signaling

STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription

## T

TDLU : Terminal Duct Lobular Unit

TEB : Terminal end buds

TGFβ: Transforming growth factor betta

TNF: Tumor necrosis factors

## V

VEGF: Vascular endothelial growth factor

## Y

YAP: Yes-associated protein

---

---

---

# ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

---

---

## Chapitre 1: La glande mammaire

Les glandes mammaires sont des organes propres aux mammifères, dont le nombre et la localisation varient en fonction de l'espèce. La glande mammaire est une glande exocrine qui a pour fonction d'assurer la nutrition par la sécrétion de lait. Ce lait apporte également des éléments contribuant à la protection immunitaire du nouveau-né (Ballard and Morrow, 2013). C'est un organe dynamique qui subit de nombreux changements morphologiques au cours de la vie de la femelle.

### A. Composition

L'espèce humaine possède deux glandes mammaires localisées dans la partie antérosupérieure du thorax, de part et d'autre du sternum, chacune enveloppées dans un coussin adipeux et reposant sur le muscle pectoral. Chez la Femme, cette glande mammaire forme une arborescence composée par une vingtaine de lobes qui convergent et se rassemblent via les canaux galactophores de premier ordre (ou canaux interlobaires) au niveau du mamelon (*figure 1*). Chaque lobe est constitué de ramifications : les canaux galactophores de second ordre également appelés canaux interlobulaires, qui se terminent par les lobules. Ces lobules sont eux-mêmes constitués par plusieurs bourgeons creux appelés acini ou alvéoles, drainés par les canaux intralobulaires (également appelés canaux alvéolaires ou de troisième ordre). L'alvéole sécrète le lait lors de la lactation, constituant ainsi l'unité fonctionnelle de la glande mammaire et est nommée Terminal Duct Lobular Unit (TDLU) chez la femme ou structure lobulo-alvéolaire chez la souris. L'épithélium formant la glande mammaire est un épithélium pseudostratifié composé de deux types de cellules : les cellules luminales, situées au contact de la lumière des canaux et lobules et les cellules myoépithéliales, formant une assise pour les cellules luminales et les séparant de la lame basale. Le long des canaux, les cellules myoépithéliales forment une couche presque continue, empêchant tout contact entre les cellules luminales et les éléments de la lame basale. Au niveau des alvéoles, les cellules myoépithéliales sont plus espacées les unes des autres, permettant ainsi une interaction entre les cellules luminales et la lame basale. Ce sont les cellules luminales localisées au niveau des alvéoles qui vont produire et sécréter le lait, aidées par les cellules myoépithéliales qui vont faciliter son excrétion en se contractant. Les cellules luminales expriment les kératines 8 et 18, l'E-cadhérine ainsi que les récepteurs hormonaux aux œstrogènes, à la progestérone et à la prolactine. Cependant, un autre type de cellules luminales n'exprimant pas ces récepteurs

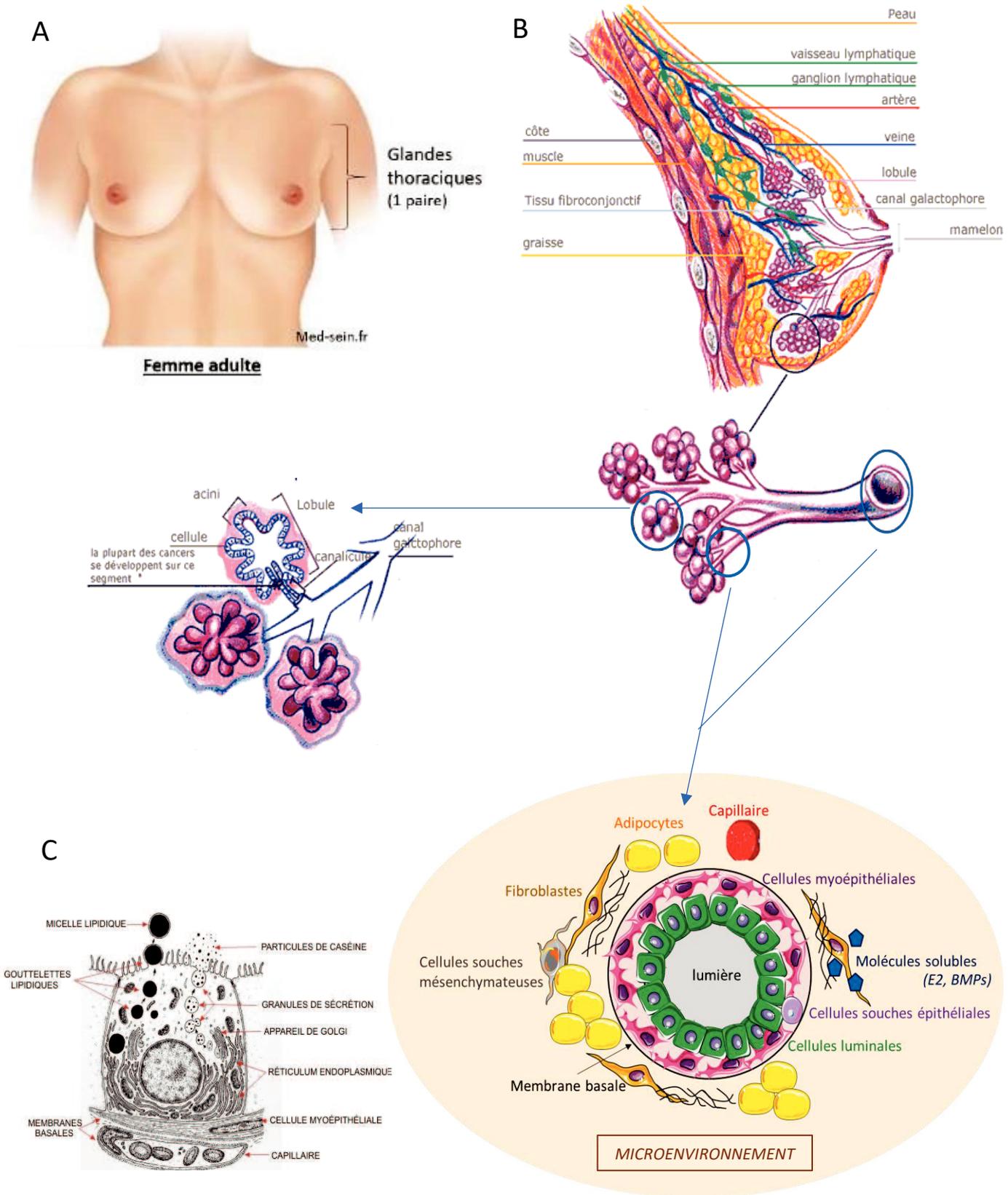


Figure 1 : Localisation anatomique (a) et organisation schématique (b) à l'âge adulte de la glande mammaire chez l'Homme. c) Schéma d'une cellule luminaire mature productrice de lait. (Source: centre-des-coteaux et audilab).

hormonaux a également été mis en évidence. Les cellules myoépithéliales possèdent des caractéristiques de cellules épithéliales, via l'expression de marqueurs spécifiques des cellules épithéliales, tel que les kératines 5 et 14 ou des cadhérines (P-cadhérine, desmocolline-3 ou desmogléine-3) mais possèdent également des marqueurs de cellules musculaires lisses comme le marqueur smooth muscle actin (SMA), la calponine et CD10 ((Foschini et al., 2000; Lazard et al., 1993; Moritani et al., 2002; Runswick et al., 2001; Taylor-Papadimitriou et al., 1989). Les cellules myoépithéliales jouent un rôle crucial dans le maintien de la structure de l'épithélium mammaire (Glukhova et al., 1995) via leurs étroites interactions avec les cellules luminales d'une part (Gudjonsson et al., 2002, 2005), et avec la lame basale d'autre part. Cette lame basale, composée principalement de laminines, de nidogène, de protéoglycanes et de collagène IV (Gusterson et al., 1982; Sekiguchi and Yamada, 2018) permet d'isoler l'épithélium mammaire du stroma. Chez la femme, la composition du stroma est très variable en fonction de l'âge et de sa localisation dans l'arborescence de la glande mammaire (interlobulaire ou intralobulaire). Plusieurs composants constituent ce stroma : des adipocytes, des fibroblastes, des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des cellules immunitaires.

## B. Hiérarchie mammaire

La glande mammaire est un organe très dynamique et plastique qui subit des cycles d'évolution et d'involution tout au long de la vie de la femme, suggérant ainsi l'existence de capacités d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation des cellules la constituant. Une hypothèse largement acceptée postule une hiérarchie entre différents types de cellules mammaires responsables de cette plasticité. Au sommet de la hiérarchie, un petit nombre de cellules souches quiescentes, qui sous l'effet de signaux complexes entrent en division et différenciation, génère le compartiment des progéniteurs. Ces progéniteurs vont proliférer de façon importante et poursuivre leur différenciation pour donner des cellules matures fonctionnelles, non prolifératives et différenciées (*figure 2*).

### 1. Les cellules souches et les cellules souches mammaires

#### a. Concept de cellules souches

Les cellules souches ont d'abord été découverte dans le système hématopoïétique chez la souris (McCulloch and Till, 1960). Par la suite, des cellules souches ont également été identifiées dans d'autres tissus et notamment dans la glande mammaire, via une technique de greffe de fragments de tissus

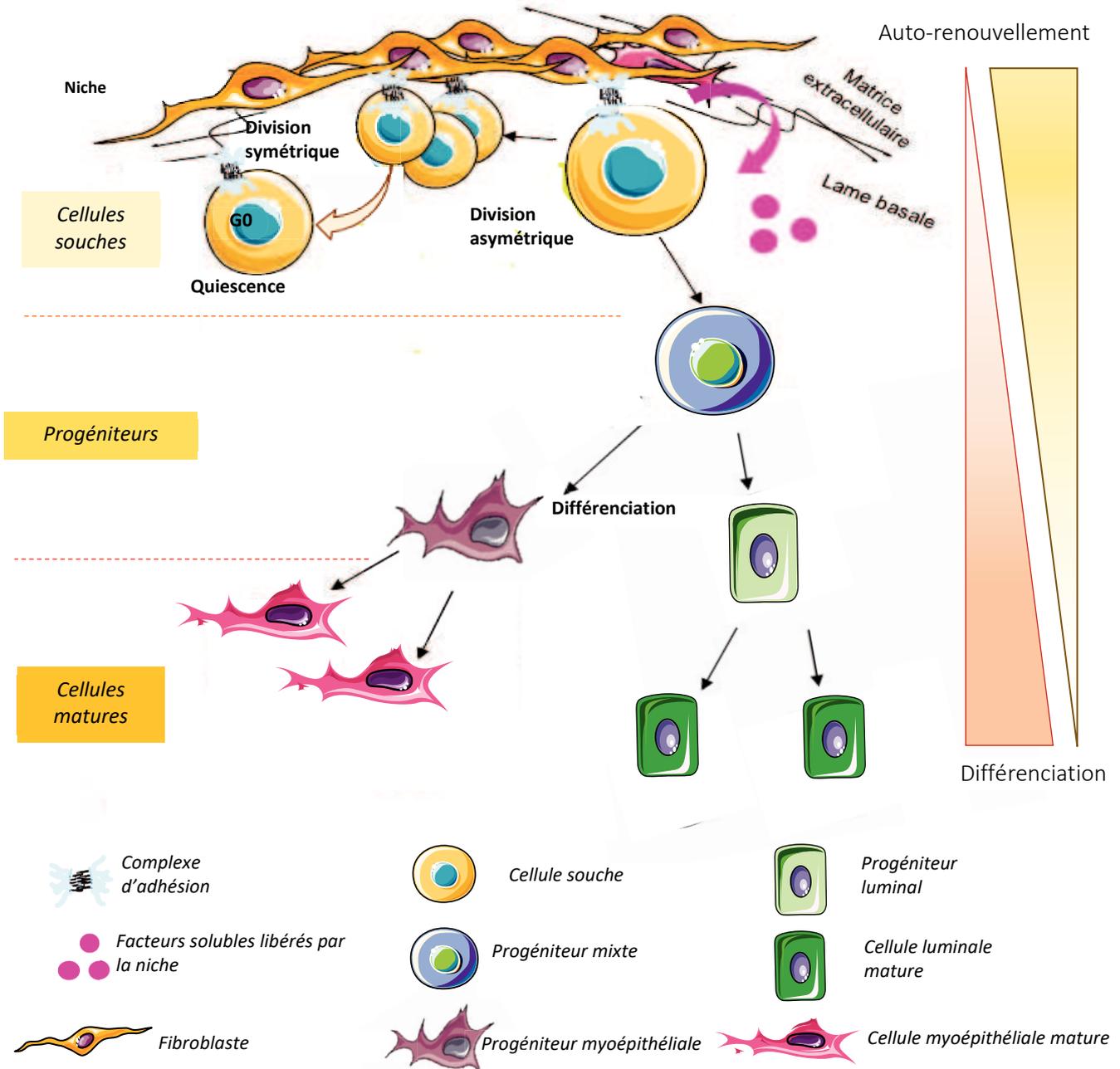


Figure 2 : Hiérarchie de l'épithélium mammaire.

Les cellules souches, localisées dans leur niche, peuvent sortir de leur quiescence et s'autorenouveler pour maintenir leur pool via une division symétrique ou entrer en différenciation par une division asymétrique pour donner une cellule progénitrice qui donnera, en poursuivant sa différenciation, les cellules matures.

mammaires dans un coussin adipeux vierge d'épithélium mammaire qui après plusieurs semaines, a reformé une arborescence mammaire complète (Deome et al., 1959). Différents types de cellules souches ont été décrits en fonction de leur potentiel de différenciation (*figure 3*). Les cellules souches totipotentes sont capables de générer toutes les cellules d'un organisme ainsi que les annexes embryonnaires. On retrouve l'œuf fécondé, obtenu lors de la fusion entre les gamètes mâle et femelle, et les cellules filles issues des premières divisions. Au stade embryonnaire on retrouve également les cellules pluripotentes capables de donner toutes les cellules de l'organisme mais pas les annexes embryonnaires. Après la naissance, seules des cellules souches dites multipotentes sont présentes au niveau des différents organes, assurant le maintien de ces tissus via le renouvellement des types cellulaires qui les composent.

Le concept de cellule souche a beaucoup évolué ces dernières années, et tend de plus en plus à être défini comme un « état » souche, fondé sur des fonctions biologiques et des marqueurs spécifiques plutôt que comme une caractéristique fixe. Des études sur la reprogrammation cellulaire ont montrées qu'une activation d'un programme génétique incluant les gènes *oct-4*, *nanog*, *sox2*, *c-myc* et *klf4*, permet à une cellule différenciée de réacquérir les caractéristiques d'une cellule souche pluripotente (cellules iPS) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ces études supportent le concept d'une capacité souche fluide puisque toute cellule, même différenciée, peut réacquérir cette capacité. Ainsi, lors d'un déséquilibre de l'homéostasie tissulaire, des cellules différenciées pourraient donner d'autres types cellulaires pour restaurer l'intégrité du tissu. Cependant ce mécanisme n'a pour l'instant été observé que lors de déséquilibres non physiologiques de l'homéostasie (Merrell and Stanger, 2016).

#### *b. Caractérisation des cellules souches mammaires*

Des combinaisons spécifiques de marqueurs cellulaires exprimés par les cellules souches mammaires ont été identifiés. Ainsi une forte expression des intégrines  $\alpha 6$  (CD49f) et  $\beta 1$  (CD29) est associée à une population de cellules mammaires très immatures. D'autres molécules ont également été décrites comme marqueurs de cellules souches mammaires humaines comme des pompes à efflux tel que les transporteurs ABC, la protéine ALDH1 ainsi que son activité enzymatique ou encore la métalloprotéase CD10. Par ailleurs les cellules souches mammaires sont négatives pour EpCAM. (Alvi et al., 2003; Bachelard-Cascales et al., 2010; Ding et al., 2010; Eirew et al., 2008; Ginestier et al., 2007; Linnemann et al., 2015; Taddei et al., 2008a; Zhou et al., 2001). Certains de ces marqueurs seraient impliqués dans le maintien d'un état indifférencié, comme ceci a été décrit pour CD29 et CD10 qui y participent ensemble (Bachelard-Cascales et al., 2010). La sous-population cellulaire  $\text{Lin}^- \text{CD29}^{++} \text{CD24}^+$  chez la souris et  $\text{CD49f}^{++} \text{CD24}^-$  chez l'Homme contient une forte proportion de cellules souches qui, après

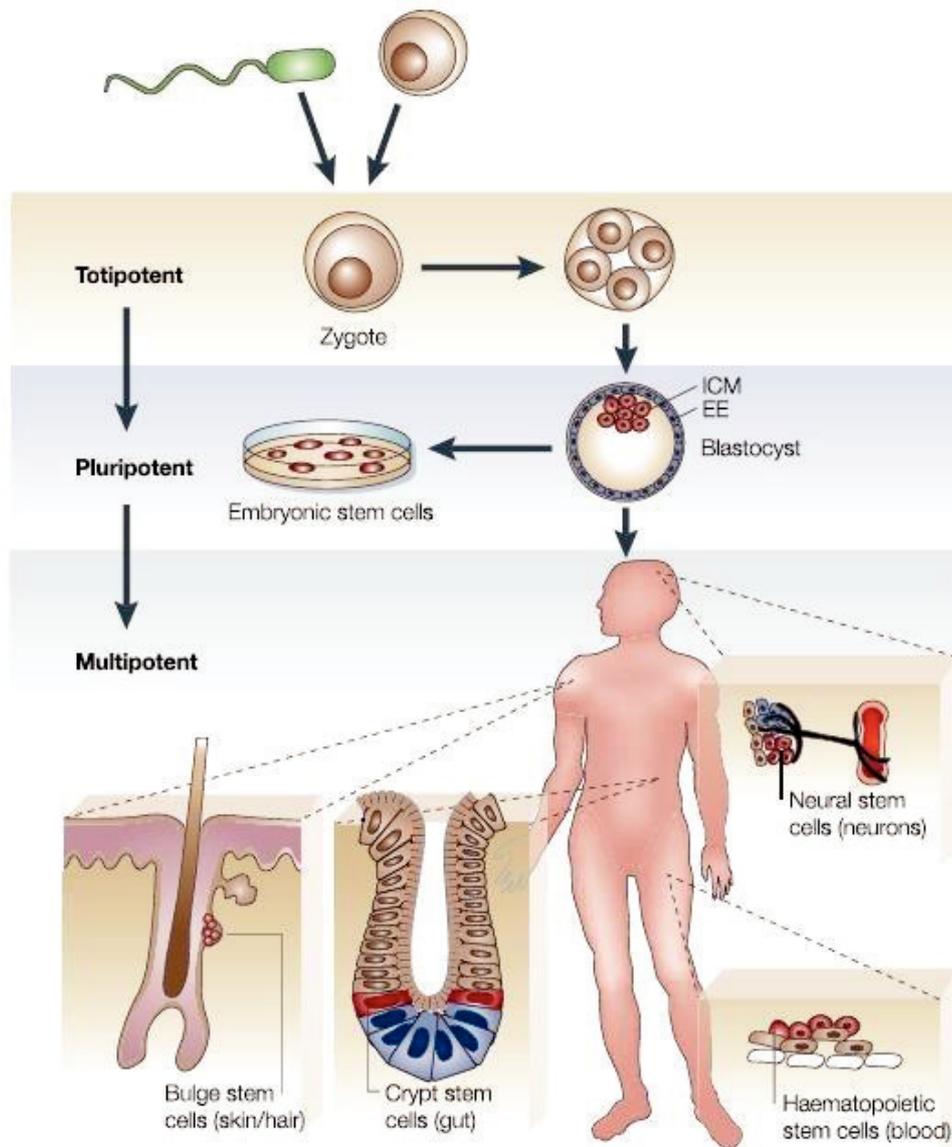


Figure 3 : Les différents types de cellules souches.

Plusieurs types de cellules souches existent : les cellules souches totipotentes capables de générer toutes les cellules d'un organisme ainsi que les annexes embryonnaires, les cellules souches pluripotentes capables de donner toutes les cellules de l'organisme mais pas les annexes embryonnaires, et les cellules souches multipotentes retrouvées à l'âge adulte au niveau des différents organes qui assurent le renouvellement des types cellulaires qui les composent.

transplantation chez la souris, peuvent reconstituer une glande mammaire complète *in vivo* en générant à la fois des cellules luminales et myoépithéliales, former des unités fonctionnelles et se maintenir après plusieurs séries de transplantations (Shackleton et al., 2006; Visvader, 2009).

### c. Méthodes d'étude des cellules souches mammaires

Plusieurs méthodes d'études de ces cellules souches ont été développées et notamment une approche *in vitro* que j'ai largement utilisée lors de ma thèse (Dontu et al., 2003) (figure 4). L'ensemencement de cellules mammaires primaires ou de lignées cellulaires à faible densité dans un milieu sans sérum et sur des plastiques empêchant l'adhérence peut aboutir à la formation de masses cellulaires clonales appelés mammosphères, formées à partir de cellules souches ou progénitrices très immatures. Ces mammosphères contiennent des cellules luminales et myo-épithéliales. Ces caractéristiques suggèrent que la cellule à l'origine de la mammosphère possédait une forte capacité proliférative et une bipotentialité luminale/myoépithéliale, marquant une cellule très immature. Par ailleurs, dissocier des mammosphères pour utiliser les cellules les constituant dans un nouvel essai permet d'observer la génération de mammosphères secondaires, démontrant ainsi l'existence de cellules capables d'auto-renouvellement. Un autre test de culture en trois dimensions existe, le test des TDLU (Terminal Ductal and Lobular Unit), reposant sur la capacité des cellules souches à générer une descendance capable de proliférer, se différencier et d'adopter une organisation ultrastructurale physiologique (Villadsen et al., 2007). Il permet d'étudier la capacité des cellules à former les différentes structures d'une glande mammaire dans un gel contenant des éléments de la matrice.

## 2. Les progéniteurs mammaires

Les cellules souches peuvent se diviser de deux façons, soit subir une division symétrique, permettant ainsi de donner deux cellules filles identiques à la cellule mère et d'amplifier le pool de cellules souches, ou de donner deux cellules différenciées, soit se diviser de façon asymétrique, conduisant alors à deux cellules filles différentes, l'une identique à la cellule souche mère, qui va entrer en quiescence afin de maintenir le pool souche et l'autre qui va amorcer un processus de différenciation (Santoro et al., 2016).

Le premier niveau de différenciation est le stade des progéniteurs. A ce stade, les cellules vont proliférer de façon importante pour ensuite s'engager un peu plus dans la différenciation et finalement aboutir à des cellules complètement différenciées, non prolifératives, constituant ainsi le dernier compartiment, celui des cellules matures. Dans le modèle de la glande mammaire, le test clonogénique *in vitro* des E-CFC (Epithelial-Colony Forming Cell) a mis en évidence l'existence de trois types

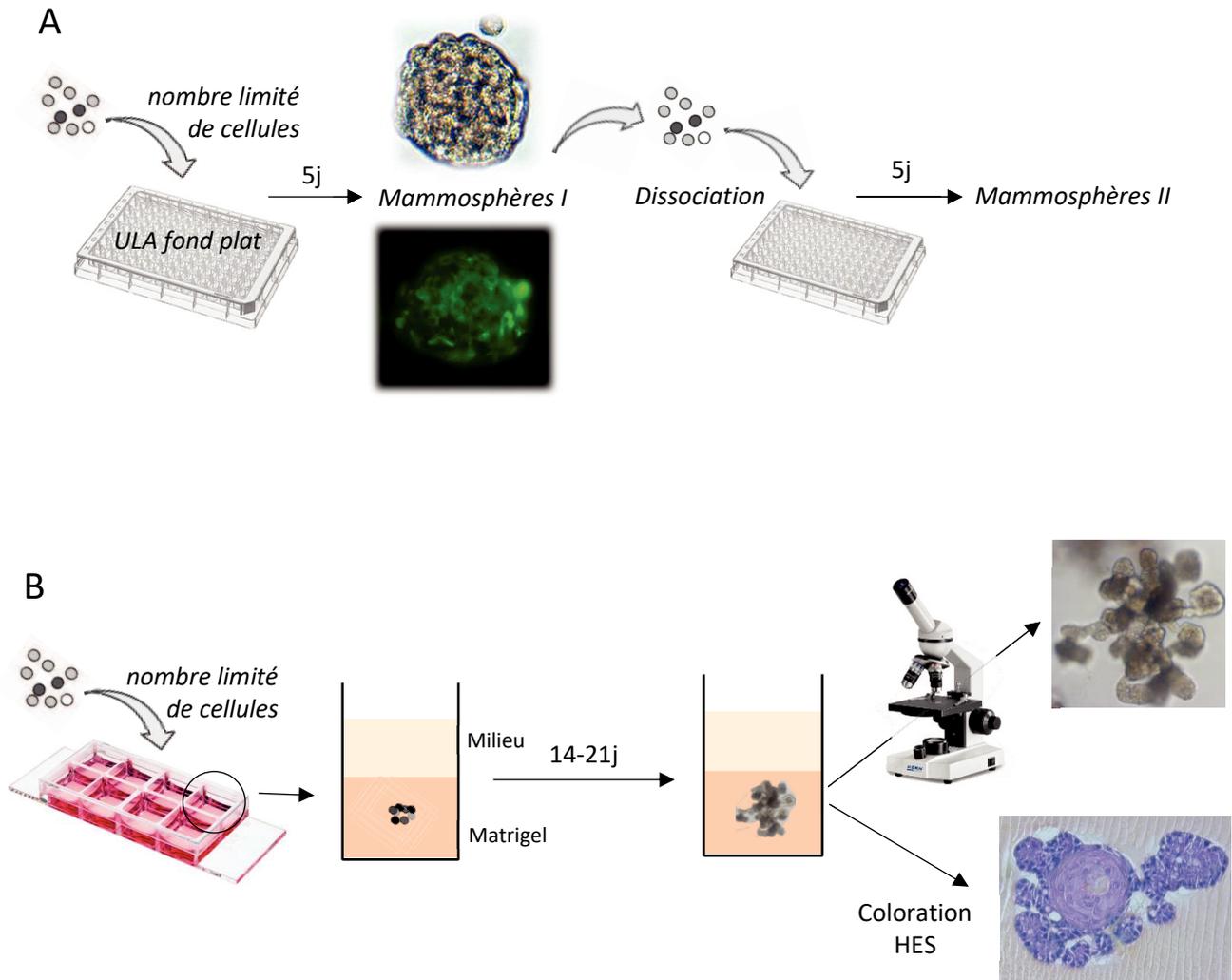


Figure 4 : Méthodes d'étude des cellules souches utilisées au laboratoire. a) Mammosphères: test mesurant la fréquence et la capacité d'auto-renouvellement des cellules capables de former des sphères en suspension, considérées comme des cellules souches. B) TDLU: Test mesurant la capacité des cellules souches ou très immatures à assurer la néo-morphogénèse de l'unité fonctionnelle de base de la glande mammaire.

de cellules progénitrices en fonction de la morphologie des colonies et de leurs marqueurs : des progéniteurs myoépithéliaux, à l'origine des cellules myoépithéliales, des progéniteurs luminaux, qui se différencient en cellules luminales, ainsi que des progéniteurs capables de générer les deux lignages : les progéniteurs bipotents (*figure 5*) (Stingl et al., 2001).

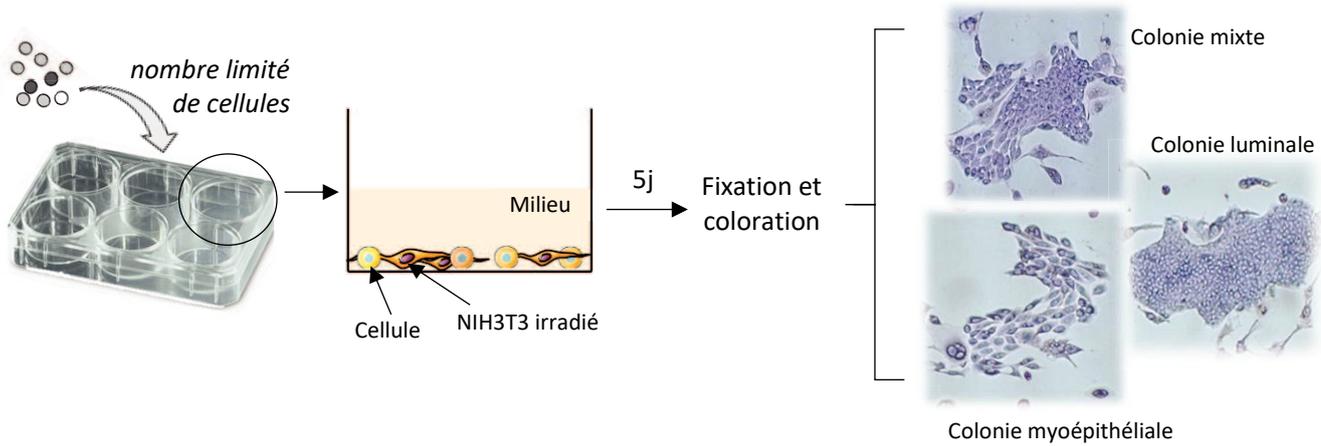


Figure 5 : Test clonogénique *in vitro* de E-CFC mettant en évidence les trois types de cellules progénitrices: mixte, luminale et myoépithéliale.

#### a. Les progéniteurs bipotents

Ces progéniteurs sont des cellules très immatures avec un potentiel de différenciation important, ce rapprochant plus des cellules souches que des progéniteurs. Ainsi, comme les cellules souches, ils expriment CD49f, CD29, ALDH1 et CD10 mais expriment en plus des marqueurs partagés avec les cellules myoépithéliales tels que la kératine 14 et d'autres spécifiques des cellules luminales comme les kératines 18 et 19. Par ailleurs, ces cellules expriment les facteurs de transcription *foxc1*, *bmi-1*, *nanog* et *oct4* (Stingl et al., 2001).

#### b. Les progéniteurs myoépithéliaux

Les progéniteurs myoépithéliaux mammaires humains expriment CD49f, CD10, la glycoprotéine Thy1 (CD90), la protéine SMA et les kératines 5 et 14 mais sont négatifs pour EpCAM, ER et PR (Bachelard-Cascales et al., 2010; Lim et al., 2009). La différenciation en progéniteurs myoépithéliaux impliquerait p63, une protéine de la famille de p53, et plus précisément son isoforme tronquée  $\Delta Np63$ . Plusieurs études décrivent l'implication de  $\Delta Np63$  dans l'auto-renouvellement des cellules souches épithéliales mais également, dans le modèle de l'épithélium cutané, son rôle dans la prolifération de progéniteurs et leur engagement dans la différenciation (Barbieri and Pietenpol, 2006). Par ailleurs,  $\Delta Np63$  a été retrouvé principalement dans un compartiment riche en cellules souches mammaires et en

progéniteurs myoépithéliaux et son expression est associée aux cellules avec un phénotype myoépithélial (Barbareschi et al., 2001; Li et al., 2008; Yalcin-Ozuysal et al., 2010). Les kératines K5 et K14 sont impliquées dans l'ancrage à la matrice extracellulaire grâce à des jonctions de type hémidesmosome. Ces progéniteurs vont par la suite poursuivre leur différenciation pour donner les cellules myoépithéliales contractiles. Outre leur rôle dans l'excrétion du lait, les cellules myoépithéliales jouent un rôle crucial dans le développement et l'homéostasie de la glande mammaire. D'une part via la sécrétion de molécules solubles agissant aussi bien sur les cellules luminales que sur celles du stroma, jouant ainsi le rôle d'un médiateur de la communication entre ces deux compartiments afin d'assurer la morphogénèse et la fonctionnalité de la glande. D'autre part, en jouant un rôle de soutien structurel permettant la polarisation correcte des cellules luminales et également en agissant sur le *turnover* de la matrice extracellulaire et sur la synthèse de la membrane basale (Faraldo et al., 2005; Gudjonsson et al., 2002, 2005).

### c. Les progéniteurs luminaux

Les voies de signalisation Notch et Hedgehog sont impliquées dans la différenciation des cellules souches en progéniteurs luminaux. Contrairement aux progéniteurs myoépithéliaux ou aux cellules souches, les progéniteurs luminaux mammaires humains n'expriment pas CD10 mais sont positifs pour CD49f, EpCAM et les glycoprotéines CD24 et Muc (Lim et al., 2009; Sleeman et al., 2006). De plus, ils expriment les kératines 18 et 19. Deux types de progéniteurs luminaux ont été décrits : les progéniteurs canaux à l'origine des cellules luminales canaux, composant de la couche interne des canaux, et les progéniteurs luminaux alvéolaires à l'origine des cellules luminales alvéolaires localisées dans les TDLU et qui vont produire et sécréter le lait. Différents facteurs vont être impliqués lors de la différenciation des progéniteurs luminaux en cellules canaux ou alvéolaires. Un des facteurs cruciaux est GATA-3. En effet, des expériences sur des souris déficientes pour *Gata-3* ont montré un arrêt de la différenciation des progéniteurs luminaux en cellules luminales matures, conduisant à leur accumulation puis à leur mort (Asselin-Labat et al., 2007; Kouros-Mehr et al., 2006). Contrairement à GATA-3 qui semble être commun aux deux types de différenciation luminale, d'autres facteurs semblent être spécifiques de la différenciation canalaire ou alvéolaire. C'est le cas du facteur de transcription de la famille ETS Elf-5 qui est spécifiquement impliqué dans la différenciation luminale alvéolaire (Chakrabarti et al., 2012; Oakes et al., 2008). En effet, une déficience dans ce facteur conduit à un défaut de développement des cellules alvéolaires alors que la morphogénèse et le développement des canaux ne sont pas affectés. A l'opposé, BRCA-1 est quant à lui impliqué dans la différenciation en cellules canaux (Lim et al., 2009; Liu et al., 2008).

## C. Développement et dynamique de la glande mammaire

Le développement de la glande mammaire commence dès le stade prénatal et est similaire chez le mâle et la femelle jusqu'au stade de la puberté, au moment où les hormones sexuelles vont réguler la mise en place des caractères sexuels secondaires. Le stroma joue un rôle important dans le développement de la glande mammaire tout au long de ses différentes étapes. En effet, le stroma de la glande mammaire d'une souris nullipare favorise le développement des branches et leur élongation, le stroma d'une souris gestante promeut la différenciation des alvéoles tandis que celui d'une souris âgée entraîne l'involution des glandes mammaires en induisant l'apoptose des cellules épithéliales (Sakakura et al., 1976).

### 1. Stade embryonnaire

Dans l'espèce humaine, les ébauches des futures glandes mammaires commencent à apparaître aux alentours de la 5<sup>ème</sup> semaine de grossesse à la suite de l'expansion de l'ectoderme sous la forme de deux lignes appelées crêtes mammaires (*figure 6*). Ces crêtes vont involuer et seule persiste une masse épithéliale au niveau de la région pectorale, constituant le bourgeon mammaire primaire. Sous l'effet de facteurs sécrétés par le mésenchyme, ce bourgeon primaire va croître et s'élargir dans le mésenchyme pour former le bourgeon mammaire secondaire. Ceci repose sur une étroite communication entre le mésenchyme et les cellules épithéliales du bourgeon mammaire. La complexité de ces échanges est encore mal comprise mais certains facteurs clés ont été identifiés à partir d'expériences réalisées chez la souris. L'un de ces facteurs est l'hormone parathyroïdienne (PTHrP), libérée par les cellules épithéliales, qui va agir sur les cellules mésenchymateuses grâce à son récepteur PTHR1 et conduire à l'activation de deux voies de signalisations, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et la voie des BMP. La libération de PTHrP permettrait de sensibiliser les cellules mésenchymateuses au BMP4 environnant en entraînant une augmentation de l'expression de l'un de ses récepteurs, BMPR1a, ainsi qu'en mettant en place une signalisation autocrine et paracrine via la sécrétion de BMP4 par les cellules mésenchymateuses. (Dunbar and Wysolmerski, 1999; Hens et al., 2007). En réponse à cette signalisation BMP4, les cellules mésenchymateuses vont libérer la métalloprotéinase MMP2 qui participe à la croissance du bourgeon (Hens et al., 2009). En parallèle, l'induction de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les cellules mésenchymateuses entraîne l'activation de Lef1. Ce dernier, va agir sur les cellules mésenchymateuses en mettant en place une boucle amplifiant la signalisation Wnt, contribuant ainsi à la différenciation du mésenchyme mammaire (Hiremath et al., 2012).

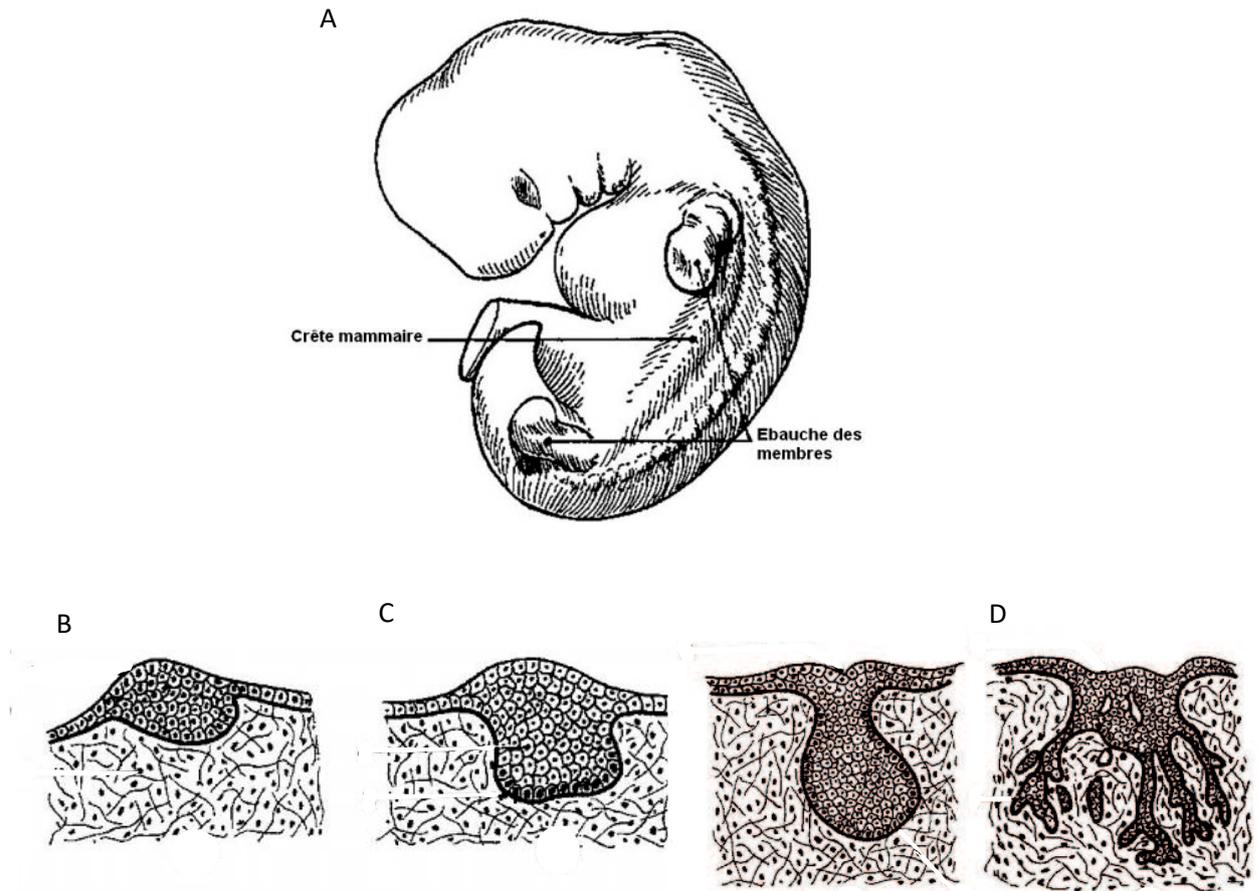


Figure 6: Localisation et développement de la glande mammaire durant le stade embryonnaire. (source : univ.ency)

Les ébauches des futures glandes mammaires commencent à apparaître sous la forme de deux lignes appelées crêtes mammaires (a). Puis ces crêtes vont involuer pour former une masse épithéliale au niveau de la région pectorale, constituant le bourgeon mammaire primaire (b). Sous l'effet de facteurs sécrétés par le mésenchyme, ce bourgeon primaire va croître et s'élargir dans le mésenchyme pour former le bourgeon mammaire secondaire (c), puis d'autres bourgeons épithéliaux adjacents vont se former autour du bourgeon mammaire secondaire et s'étirer dans le mésenchyme sous forme de fins canaux terminés par une extrémité bulbeuse constituant ainsi les canaux galactophores (d).

D'autres facteurs cruciaux pour la maturation des bourgeons et/ou du mésenchyme existent, tels que IGF-1R et p190-B, pour lesquels une interaction a été décrite. En effet, une perturbation dans l'expression du récepteur à l'IGF-1 (IGF-1R) conduit à un bourgeon épithélial plus petit. En revanche, IGF-1 ne semble pas influencer le développement du mésenchyme. Par ailleurs, une délétion du facteur p190-B a montré des effets similaires à ceux observés avec l'IGF-1R sur le bourgeon, avec en

plus un défaut dans la prolifération et la différenciation des cellules mésenchymateuses (Heckman et al., 2007). Par la suite, d'autres bourgeons épithéliaux adjacents vont se former autour du bourgeon mammaire secondaire. Ces bourgeons vont s'étirer dans le mésenchyme sous formes de fins canaux terminés par une extrémité bulbeuse (TEB pour « terminal end buds ») constituant ainsi les canaux galactophores. A l'approche de la naissance, d'autres canaux apparaissent et l'ensemble des canaux convergent vers la zone du futur mamelon où l'épiderme s'invagine. Le mamelon se forme à partir de la différenciation du mésoderme en fibres musculaires lisses tandis que l'aréole a pour origine l'ectoderme. A ce stade, la glande mammaire n'est composée que d'un système rudimentaire de canaux. (Javed and Lteif, 2013). A ce stade, une différence majeure existe entre l'espèce humaine et murine. Tandis que chez l'Homme, la glande mammaire est similaire entre les deux genres, chez la souris, un dysmorphisme sexuel entre le male et la femelle se met en place. En effet, chez le male, l'expression du récepteur aux androgènes (AR) va permettre une sensibilité des cellules à la testostérone pour aboutir à la condensation du mésenchyme bloquant ainsi le développement (McNally and Stein, 2017).

## 2. Puberté et âge adulte

Même si après la naissance la glande mammaire va subir quelques modifications au cours du stade prépubère, ce n'est qu'à partir de la puberté qu'elle va évoluer sous l'effet des hormones sexuelles avec son développement uniquement chez la femme. Deux hormones féminines majeures sont impliquées : les œstrogènes et la progestérone. A la puberté, l'hypothalamus va sécréter la gonadolibérine (GnRH pour gonadotropin-releasing hormone) qui va agir sur l'hypophyse (également nommé glande pituitaire), stimulant la production de différentes hormones tels que l'hormone de croissance (GH pour growth hormone) et les hormones gonadotrophines : l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). A leur tour, ces hormones vont agir sur leurs tissus cibles comme les ovaires qui vont alors sécréter des œstrogènes, de la progestérone ainsi que de la GH. Les œstrogènes vont contrôler la croissance des canaux à partir des TEB et entraîner une accumulation du tissu adipeux (Daniel et al., 1987; Feng et al., 2007; Silberstein et al., 1994) tandis que la progestérone va agir sur la formation des branches latérales et le développement de bourgeons alvéolaires (Fernandez-Valdivia et al., 2008; Lydon et al., 2000; Shyamala, 1999) .

### a. Les bourgeons terminaux (*Terminal end buds* ou TEB)

Les TEBs sont des structures composées d'une partie bulbeuse et d'une partie plus rétrécie qui fait le lien avec le canal (*figure 7*). Au niveau de la partie bulbeuse on retrouve 2 compartiments cellulaires :

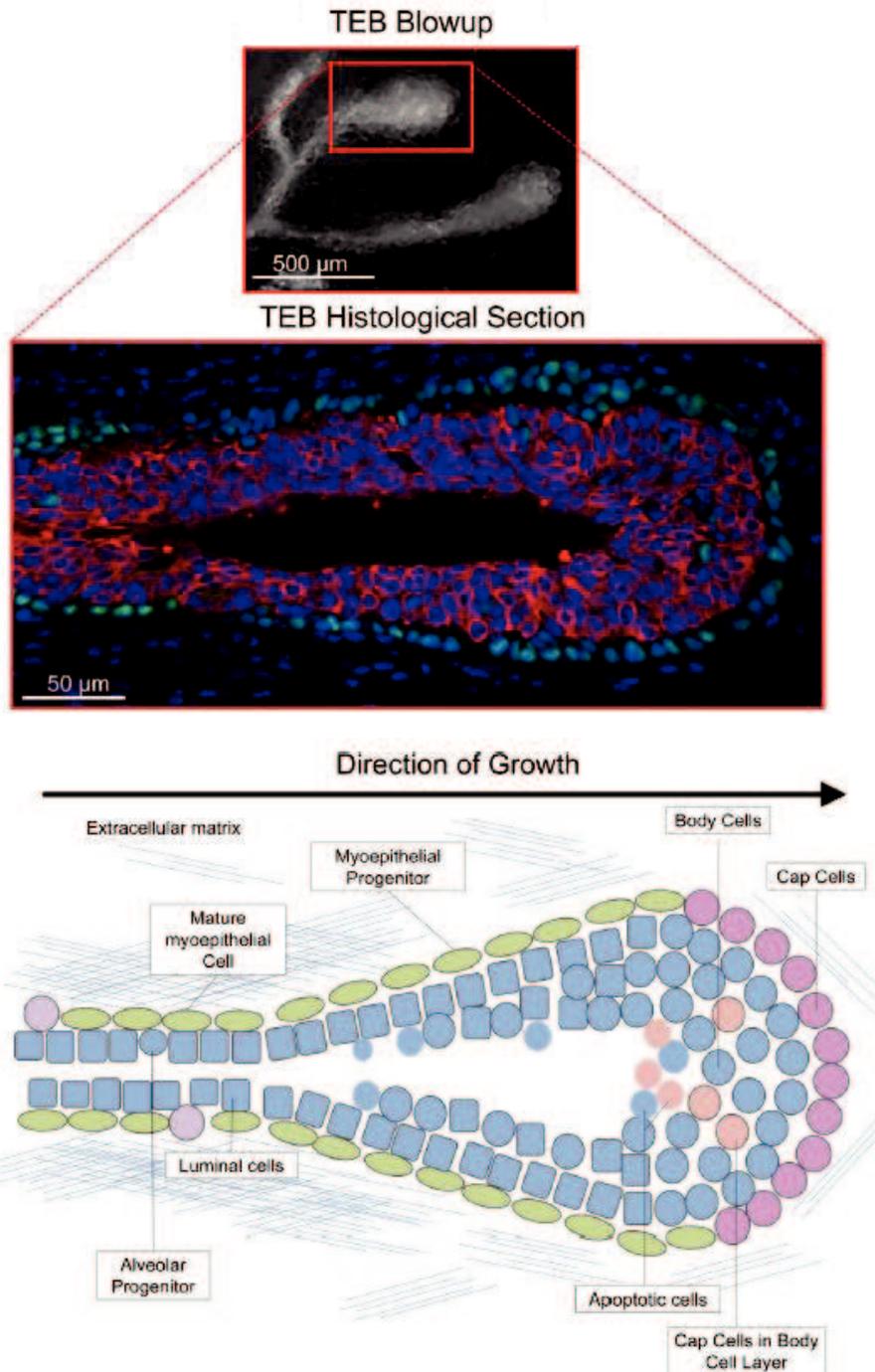


Figure 7: Structure et composition des bourgeons terminaux (Paine and Lewis, 2017).

les cellules de la cape à l'extrémité du bourgeon et les cellules du corps formant une masse cellulaire. Ces deux parties du bourgeon ont été décrites comme moins différenciées (Daniel and Silberstein, 2000; Srinivasan et al., 2003) par rapport à la région qui fait le lien avec le canal où l'on retrouve les

cellules différenciées et matures. Il semblerait que les cellules de la cape soient à l'origine des cellules myoépithéliales (Deugnier et al., 2002; Williams and Daniel, 1983). Cependant, il a également été suggéré que les cellules de la cape contribueraient à donner des cellules luminales puisqu'elles peuvent migrer vers les cellules du corps qui se différencient elles en cellules luminales. L'hypothèse que les cellules de la cape seraient des cellules souches pluripotentes a été suggérée. Cependant plusieurs études de transplantation de cellules uniques et de marquage de lignage cellulaire ont abouti à des conclusions contradictoires (Rios et al., 2014; Van Keymeulen et al., 2011).

#### *b. Hypothalamus/hypophyse/ovaires/glande mammaire : une étroite communication*

À la puberté puis à l'âge adulte, un cycle estrien/menstruel régulier va se mettre en place, alternant la phase folliculaire et la phase lutéale, durant lesquelles la production d'œstrogènes et de progestérone va varier. Cette fluctuation hormonale mise en place au cours du cycle estrien par les ovaires va préparer les différents organes (notamment utérus et glande mammaire) à une éventuelle grossesse. Ainsi, au début de la phase folliculaire, la faible concentration d'œstradiol va exercer un rétro-contrôle négatif sur la sécrétion des hormones hypothalamo-hypophysaires (GnRH, LH et FSH). Au fur et à mesure de la phase folliculaire, le taux d'œstradiol va augmenter jusqu'à atteindre une concentration seuil à partir duquel l'œstradiol va passer d'un rétro-contrôle négatif à un rétro-contrôle positif de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ceci entraîne alors un pic de LH qui va conduire à l'ovulation. Le follicule ovarien va alors se transformer en corps jaune pour conduire à la production de progestérone sous l'influence de la LH. On parle alors de phase lutéale. Outre une production de progestérone, ce corps jaune va également produire de l'œstradiol. Ensemble, la progestérone et l'œstradiol vont exercer un rétro-contrôle négatif et conduire à une diminution de la sécrétion de LH. S'il n'y a pas d'implantation et de nidation, le niveau de progestérone va chuter, pour permettre un nouveau cycle, débutant par la desquamation de la muqueuse utérine.

De manière intéressante, il semble que la structure de la glande mammaire évolue, certes tout au long de la vie de la femme en fonction d'événements majeurs (puberté, grossesse, ménopause), mais également durant les cycles estriens. En effet, il a été avancé que la glande mammaire ne va jamais revenir à l'état dans lequel elle se trouvait au début de chaque cycle estrien, puisqu'à chaque cycle de nouvelles structures vont se développer (Russo and Russo, 2004). De plus, au moment de la chute de la progestérone à la suite de l'absence de nidation, une régression des branches latérales et des alvéoles a été rapporté (Andres and Strange, 1999; Silberstein et al., 2006). Plusieurs niveaux de maturation des alvéoles existent (type I à IV) en fonction du stade de développement et du cycle

estrien. Les types I, II et III sont retrouvés exclusivement hors grossesse, avec une proportion plus importante de type I (type le plus immature) chez la femme nullipare, et plus importante des types II et III chez la femme ayant eu une grossesse (Arendt et al., 2014; Russo and Russo, 2004). Par ailleurs, il a été montré que le niveau d'expression nucléaire de ER et PR varie en fonction du degré de développement des alvéoles et de leurs types. Une expression plus importante est retrouvée dans les alvéoles de type I que dans celles de type II, III et IV. Ceci démontre qu'une diminution progressive de l'expression de ces deux récepteurs se produit lorsque les alvéoles deviennent plus différenciées (Russo and Russo, 2004). C'est seulement une grossesse qui permettra d'amplifier le développement des branches latérales, d'augmenter le nombre d'alvéoles et de conduire à leur maturation pour former les TDLU nécessaires à la production du lait.

### c. Effets des œstrogènes dans le développement de la glande mammaire.

Les œstrogènes vont agir sur les cellules exprimant leur récepteur alpha (ER) en induisant sa dimérisation et sa translocation dans le noyau où il va agir sur la transcription de gènes cibles. Le détail de leur fonctionnement sera décrit dans le chapitre 3. Mallpel *et al.* ont suggéré que les œstrogènes ne stimulaient pas directement la prolifération des cellules ER positives mais agissaient de manière paracrine (*figure 8*) (Mallepell et al., 2006; Stingl, 2011). En effet, il a été démontré que les cellules ER positives et les cellules prolifératives étaient distinctes (Clarke et al., 1997; Zeps et al., 1998). Cette hypothèse est supportée par les études d'Asselin-Labat *et al.* qui ont démontré un effet indirect des œstrogènes sur des cellules souches mammaires murines ER négatives (Asselin-Labat et al., 2010). La fixation des œstrogènes sur leur récepteur va induire l'expression d'Amphiréguline (Areg) à la membrane des cellules épithéliales lumineales ER+PR+ (Ciarloni et al., 2007; LaMarca and Rosen, 2007). Il a été montré que la progestérone pouvait également induire l'expression de Areg (Aupperlee et al., 2013). Sous l'effet de la métalloprotéinase ADAM17, la protéine Areg, de la famille de l'EGF, va être clivée et libérée dans le microenvironnement. Une communication complexe et essentielle va alors s'établir entre les cellules épithéliales et les cellules du microenvironnement. En effet, à la suite de sa libération, Areg va agir sur les cellules stromales et les cellules souches/progénitrices ER négatives, en se fixant sur son récepteur EGFR. L'interaction Areg/EGFR initie alors une signalisation dans les cellules stromales aboutissant à la libération de facteurs de croissance comme le FGF. L'axe ADAM17/Areg/EGFR joue un rôle clé dans le développement des canaux comme montré *in vivo* grâce à des modèles de souris déficientes pour Areg ou pour ADAM17 mais également *in vitro* (Sternlicht et al., 2005). En retour, le FGF va agir de manière paracrine sur les cellules souches/progénitrices ER négatives et conduire à leur prolifération, puis à leur différenciation en cellules lumineales, notamment via son récepteur FGFR2 (Parsa et al., 2008; Pond et al., 2013; Zhang et al., 2014b).

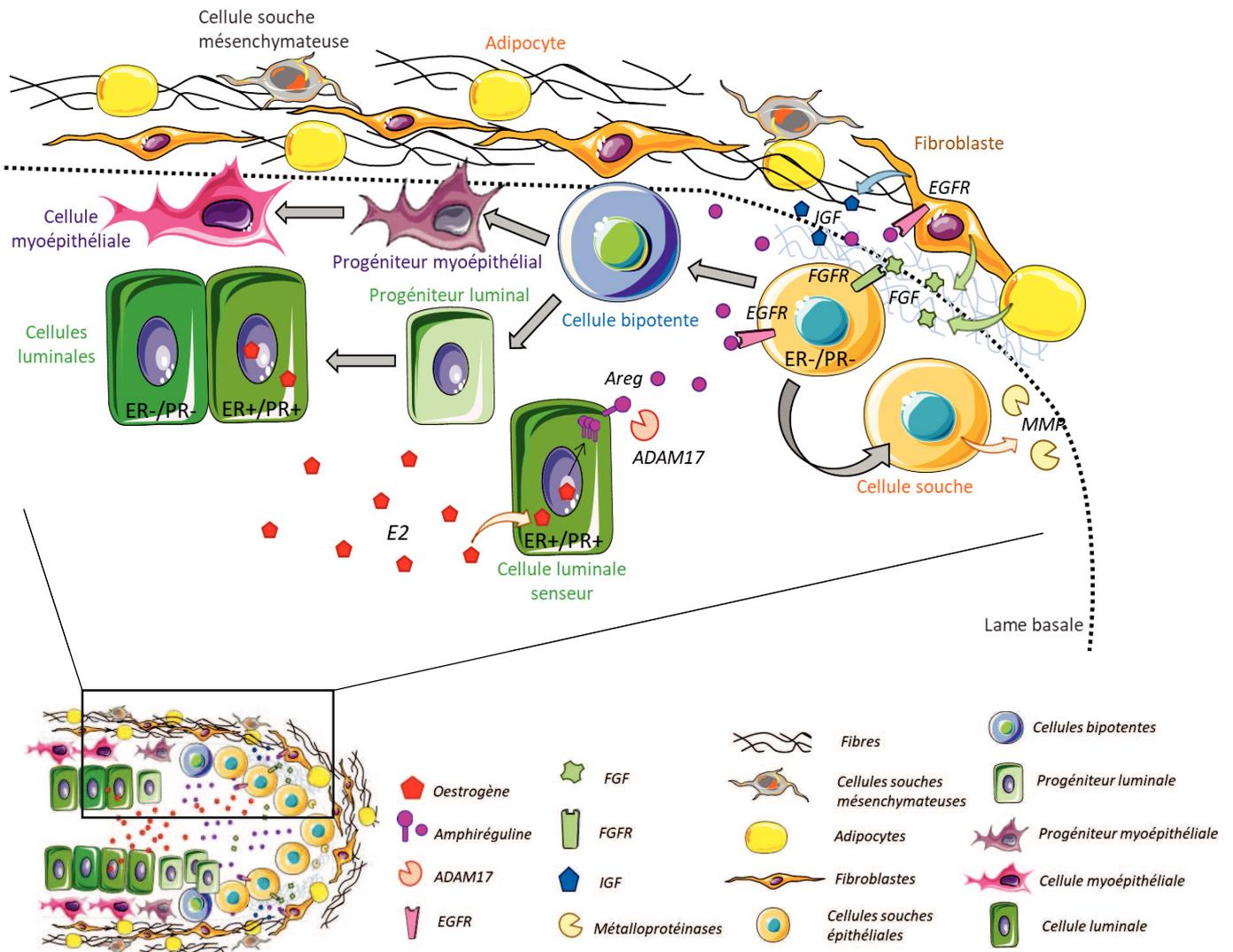


Figure 8: Représentation globale des effets des œstrogènes (E2) sur le développement de la glande mammaire lors de la puberté. Une étroite communication entre les cellules épithéliales et les cellules du microenvironnement se met en place pour conduire à la prolifération et à la différenciation des cellules souches épithéliales mammaires. Une description plus précise des acteurs moléculaires impliqués est détaillée en figure 9. (adapté de Brisken and Duss, 2007).

En plus de son action paracrine sur les cellules épithéliales, le FGF va également agir de manière autocrine sur les fibroblastes (*figure 9*). En effet, un article récent a décrit le rôle du FGF dans les fibroblastes mammaires murins qui expriment les récepteurs FGFR1 et FGFR2 (Sumbal and Koledova, 2019). Par ailleurs, les auteurs démontrent qu'une stimulation au FGF2 ou au FGF9 conduit à l'activation des voies de signalisation ERK et AKT et promeut leur prolifération et leur migration. De plus, FGF2 agit également sur les fibroblastes afin d'entraîner un remodelage des fibres de collagènes et la production de matrice extra cellulaire. En effet, le rôle des fibroblastes dans la production de composants de la matrice est essentiel dans le développement de la glande mammaire (Lühr et al., 2012).

Outre le rôle des œstrogènes sur les cellules épithéliales ER positives, il semble qu'ils agissent également en collaboration avec l'IGF sur les cellules stromales pour stimuler la formation des TEB. En effet, l'IGF est un facteur sécrété par les cellules stromales en réponse à la GH, et a été décrit crucial dans le développement de la glande mammaire, aussi bien à la puberté pour la croissance des TEB et des canaux qu'au moment de la grossesse en agissant avec d'autres facteurs lors de la formation des alvéoles. Ainsi, dans un modèle murin déficient pour IGF-1, la formation des TEB est inhibée, ceci même après un traitement par l'œstradiol, tandis que l'ajout d'IGF-1 permet leur développement. En revanche, l'œstradiol et l'IGF-1 agissent en synergie, aboutissant à une augmentation importante du nombre de TEB (Kleinberg and Barcellos-Hoff, 2011; Kleinberg et al., 2000; Ruan et al., 1995). L'implication de l'IGF-1 dans le développement des TEB semble mettre en jeu son récepteur IGFR-1 puisqu'une dérégulation de l'expression de ce récepteur entraîne une perturbation de la formation de la glande mammaire. Il semblerait que la signalisation IGF-1/IGFR-1 encourage la prolifération cellulaire, en favorisant notamment la survie des cellules (Bonnette and Hadsell, 2001). Il est intéressant de remarquer qu'une étude a mis en évidence dans des fibroblastes une interaction entre IFGR-1 et ER $\alpha$  qui est dépendante de la signalisation des MAK (Kahlert et al., 2000). En plus d'induire la libération d'IGF dans les cellules stromales, il a été montré chez le rat que la GH était capable d'augmenter l'expression de ER alpha par les cellules stromales de la glande mammaire, favorisant ainsi cette communication inter-cellulaire (Feldman et al., 1999; Trott et al., 2008).

Ainsi, les œstrogènes, à travers le contrôle de nombreux facteurs dont la production est permise par une étroite communications entre les cellules épithéliales et les cellules stromales, vont participer à la prolifération et à la différenciation des cellules du TEB en cellules épithéliales luminales ou myoépithéliales. Cependant, d'autres éléments du micro-environnement sont également cruciaux pour le développement et la croissance des TEB.

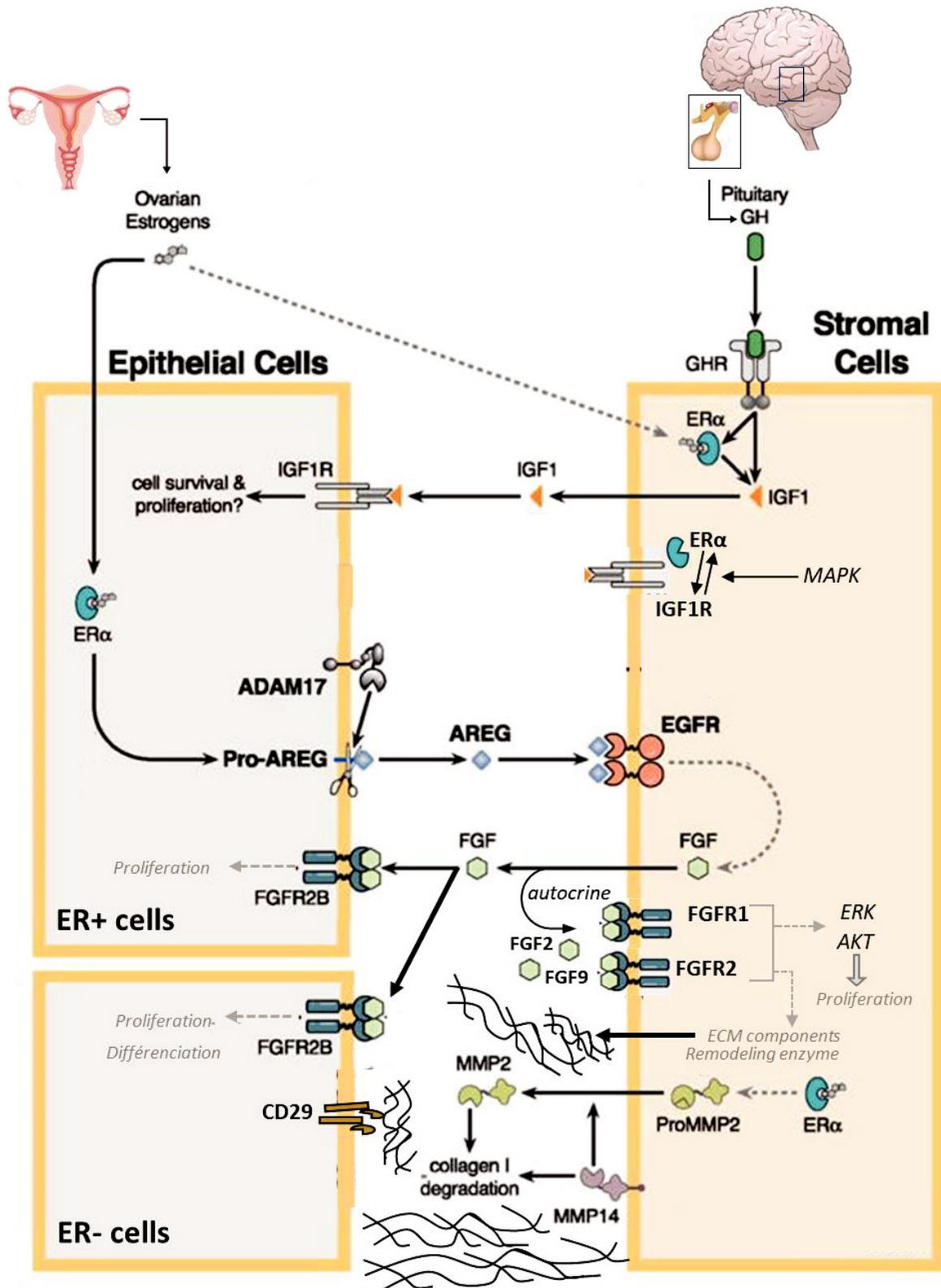


Figure 9: Communications moléculaires entre les cellules épithéliales et les cellules stromales. Les œstrogènes vont agir aussi bien sur les cellules du microenvironnement par l'intermédiaire de l'amphiréguline que sur les cellules épithéliales pour conduire à la différenciation des cellules souches et à la dégradation de la matrice aboutissant ainsi à l'élongation des TEB. (adapté de Sternlicht et al., 2005, d'après Ciarloni et al., 2007; LaMarca and Rosen, 2007, Parsa et al., 2008; Pond et al., 2013; Zhang et al., 2014, Sumbal and Koledova, 2019, Kahlert et al., 2000, Paine and Lewis, 2017 et Mori et al., 2013.

*d. La matrice extra-cellulaire et son remodelage : une étape essentielle au développement*

En plus de l'élongation et de la croissance des canaux sous l'effet des œstrogènes, la glande mammaire va également subir un remodelage de son microenvironnement. En effet, l'élongation des canaux est permise par une migration du TEB associée à une dégradation de la matrice qui l'entoure.

Plusieurs éléments composent cette matrice et notamment des protéines fibrillaires extra-cellulaires et des protéines de jonctions, comme le collagène, la fibronectine, la laminine, les intégrines, les cadhérines. Le détail de chacun de ces éléments ne sera pas exposé dans ce manuscrit, mais l'implication de certains de ces facteurs dans le développement de la glande mammaire sera en revanche abordée. L'ensemble de ces molécules joue un rôle primordial, d'une part pour la cohésion et le soutien des structures et d'autre part pour l'initiation de signalisations dans les cellules environnantes. Il a été montré que le collagène de type I, le collagène majeur de la glande mammaire, joue un rôle de guidage et permet une bonne organisation de la structure des TEB (Brownfield et al., 2013; Fleury and Watanabe, 2002; Ingman et al., 2006). Comme exposé dans le paragraphe sur les cellules souches mammaires, un des critères utilisés pour les identifier est la forte expression de l'intégrine  $\beta 1$  (CD29). Des études réalisées chez la souris ont montré qu'une extinction ou inhibition de cette protéine conduit à une diminution importante du nombre de TEB et de l'arborescence des canaux, notamment en impactant des voies de signalisations liées à l'adhérence mais également en conduisant à la perte de la capacité de régénération de la glande mammaire (Klinowska et al., 1999; Taddei et al., 2008b). Par ailleurs, une étude a rapporté que les intégrines  $\alpha 2$ ,  $\beta 6$  et  $\beta 1$  modulent la réponse des cellules épithéliales aux œstrogènes, en partie via le maintien de l'expression de ER $\alpha$  (Novaro et al., 2003). Ceci démontre bien que, outre les communications autocrines et paracrines entre les cellules épithéliales et les cellules stromales, les interactions avec la matrice sont également cruciales.

Lors du développement des TEB, un remodelage de cette matrice va créer un espace facilitant leur croissance mais également permettre la libération d'éléments essentiels à une signalisation régulant ce développement. Ainsi des cellules de la cape ou/et du microenvironnement vont libérer des « matrix metalloproteinases » (MMP) et des héparanases qui vont dégrader la matrice extracellulaire directement au contact de l'extrémité du TEB (Paine and Lewis, 2017). Parmi les MMP, MMP2 est impliquée dans l'élongation des canaux. Cependant, une régulation fine de sa production est nécessaire pour permettre à la fois le développement correct de l'arborescence mammaire et également une structure matricielle organisée afin de maintenir l'intégrité des structures (Wiseman et al., 2003). Une autre MMP, MMP14, participe à la croissance des TEB. De manière intéressante, l'action

de cette enzyme semble dépendre de la densité du collagène environnant. En cas de forte densité, MMP14 semble favoriser l'invasion dans le collagène 1 pour favoriser la croissance des canaux en libérant de l'espace. En revanche, dans un environnement de faible densité en collagène I, elle semble également favoriser la croissance mais cette fois-ci, son activité catalytique n'est pas nécessaire pour son activité. Un autre de ses domaines semble être impliqué et agirait plutôt sur la régulation de l'expression de l'intégrine  $\beta 1$  (Mori et al., 2013).

#### *e. Implication de la progestérone.*

En plus de la croissance des canaux sous l'effet principal de des œstrogènes, la glande mammaire va également développer son réseau de branches latérales et former des bourgeons alvéolaires. Ces alvéoles seront presque matures à la fin du cycle estrien, attendant seulement les hormones et facteurs libérés durant la grossesse pour finir leur maturation et produire du lait. Cependant, la chute brutale de progestérone à la fin du cycle bloque leur maturation. Dans cette partie, seuls les effets de la progestérone sur le développement des canaux et des structures alvéolaires avant la grossesse seront abordés. La progestérone va agir en synergie avec les œstrogènes et avec d'autres facteurs, afin de permettre la prolifération cellulaire (Beleut et al., 2010). Il a été montré que la progestérone joue un rôle crucial dans le développement des alvéoles. En effet, en absence du récepteur à la progestérone, le développement des canaux est moins important et il y a une absence de structures alvéolaires complètes (Humphreys et al., 1997; Lydon et al., 1995). Le récepteur à la progestérone (PR) est présent aussi bien dans des cellules stromales que dans certaines cellules épithéliales. La progestérone va agir de deux manières différentes entre le développement des branches latérales à la puberté et à l'âge adulte et le développement des alvéoles matures au moment de la grossesse. Ainsi durant la puberté la progestérone agit de façon directe ou paracrine sur les cellules stromales et épithéliales PR+ (Briskin and Duss, 2007; Briskin et al., 1998; Humphreys et al., 1997; Joshi et al., 2010). Ces cellules ER+/PR+ vont jouer un rôle de senseur des hormones circulantes. Ainsi, l'expérience de Humphreys et al utilisant un modèle de souris KO pour PR dans l'épithélium mammaire mais avec un stroma PR+/+ a montré un développement normal de la glande mammaire et des canaux à l'âge adulte mais une absence de formation des alvéoles après un traitement aux hormones stéroïdiennes. A l'inverse, ils observent une croissance déficiente des canaux et des TEBs anormaux mais la présence de cellules alvéolaires dans des souris dont le stroma est inactivé pour PR mais PR+/+ pour l'épithélium. Cette étude suggère que la progestérone va agir de façon paracrine, en se fixant d'abord sur les cellules stromales PR+ qui vont alors sécréter des facteurs agissant sur les cellules épithéliales PR- et ainsi permettre la croissance des branches et le bon développement des TEB. En revanche, lors de la différenciation des cellules épithéliales luminales en cellules alvéolaires, la progestérone va avoir une

action directe sur les cellules épithéliales PR+. Une autre étude est en accord avec cette action paracrine de la progestérone mais il semblerait cependant que cette communication intercellulaire se ferait entre des cellules épithéliales PR+ et non pas des cellules stromales (Briskin et al., 1998). Un peu plus tard une autre équipe a détaillé plus précisément le mécanisme d'action de la progestérone (Beleut et al., 2010). Ils ont montré qu'elle était capable d'induire l'expression de la cyclineD1 conduisant à la prolifération de ces cellules épithéliales PR+ qui dans le cas d'une fécondation vont persister pour ensuite, en début de grossesse, et toujours sous l'effet de la progestérone, sécréter des facteurs conduisant à la prolifération et à la différenciation de cellules PR-.

### 3. Grossesse et lactation

Durant la grossesse, la glande mammaire va se développer et accroître son arborescence via la formation des branches secondaires et tertiaires et se différencier pour former des alvéoles fonctionnelles assurant la synthèse et la sécrétion de lait en fin de grossesse. Ce processus est divisé en trois grandes étapes : une première étape de prolifération et maturation pour atteindre un état fonctionnel, une deuxième étape de lactogénèse I, en milieu de grossesse, qui prépare la synthèse du lait, pour finir par l'étape de lactogénèse II juste après l'accouchement, caractérisée par la sécrétion du colostrum puis du lait. De nombreuses hormones, telles que l'insuline, l'hydrocortisone, les œstrogènes, la progestérone, la GH ou encore la prolactine, sont impliquées et vont collaborer pour aboutir à cette synthèse de lait. Par exemple, les œstrogènes jouent un rôle important dans la lactation, en permettant d'avoir un taux suffisant de prolactine qui par la suite conduira à maintenir une sécrétion de progestérone suffisante (Bocchinfuso et al., 2000; Scully et al., 1997). La maturation complète des alvéoles avec production de lait requiert des processus et des communications intercellulaires complexes qui ne pourront pas être toutes décrites dans ce manuscrit. Cependant, certaines des principales seront tout de même abordées.

#### *a. Passage à un état fonctionnel.*

Le maintien de la production de la progestérone par le corps jaune et le placenta conduit à une deuxième action de sa part avec un mécanisme différent de celui observé pendant la puberté et le cycle estrien lors du développement des branches latérales et des bourgeons alvéolaires. Cette seconde vague essentielle d'activation par la progestérone lors de la grossesse va conduire à un développement complet de l'arborescence mammaire et permettre la maturation des cellules alvéolaires (Fernandez-Valdivia et al., 2009). Beleut et al. ont montré que la progestérone agissait par

deux mécanismes différents et en deux temps (*figure 10*) (Beleut et al., 2010). Dans un premier temps, à la fin du cycle estrien, elle a une action directe en se fixant sur des cellules épithéliales luminales PR+ pour induire leur prolifération de façon cycline D1 dépendante. Par la suite, durant la grossesse et grâce à son maintien via le placenta, ces cellules épithéliales ER+/PR+ vont libérer RANKL ainsi que Wnt4, qui vont agir de façon paracrine sur des cellules épithéliales luminales ER-/PR-, décrites comme des cellules progénitrices luminales, et sur les cellules myoépithéliales (Joshi et al., 2015; Rajaram et al., 2015). L'interaction RANKL/RANK à la surface des cellules luminales ER-/PR- va conduire à l'expression de RFPO1. Par la suite, RFPO1 va agir de manière autocrine sur ces cellules progénitrices et va, avec Wnt4, conduire à l'expansion de ces cellules progénitrices. De manière intéressante, la communication entre les cellules luminales ER+/PR+ et ER-/PR- ne se fait pas uniquement dans le sens ER+/PR+ vers ER-/PR- (Geng et al., 2020). En effet, RFPO1 n'agit pas seulement de manière autocrine sur les cellules ER-/PR- mais va également aller se fixer sur son récepteur LGR4 localisé au niveau des cellules luminales ER+/PR+. Par ailleurs, cette interaction va initier une signalisation inhabituelle puisqu'elle ne fera pas intervenir la voie Wnt mais la voie cAMP/PKA. De plus, il est intéressant de noter que ceci va entraîner l'expression de *Esr1*. Ainsi, cette étude démontre l'existence d'une communication entre les cellules luminales ER-/PR- et celles ER+/PR+, qui favoriserait l'expression de ER dans ces cellules ER+. L'expansion des cellules ER-/PR- par l'axe RANKL/RANK est indépendante de la cyclineD1, contrairement à celle des cellules ER+/PR+ durant la première vague de progestérone mais est également plus importante (Beleut et al., 2010; Joshi et al., 2015). D'autres études confirment l'implication de RANKL lors de la grossesse (Fata et al., 2000; Fernandez-Valdivia et al., 2009; Mukherjee et al., 2010). Chez des souris déficientes pour RANKL, Fata *et al.* ont observé une élongation et une croissance normale des canaux et des branches latérales ainsi qu'un début de différenciation des cellules alvéolaires et des bourgeons mais une déficience de la différenciation et de l'expansion de ces bourgeons en structures alvéolaires matures et fonctionnelles. En revanche, un développement complet est restauré par apport exogène de RANKL. Ceci démontre l'implication de RANKL, non pas au début de la différenciation des cellules alvéolaires mais plus tard lors de la maturation des bourgeons alvéolaires en TDLU. Par ailleurs, l'expression de RANKL se fait dans les cellules épithéliales du bourgeon alvéolaire et non dans les cellules épithéliales canalaire. En plus d'être impliqué dans la prolifération des cellules épithéliales alvéolaires, RANKL est également impliqué dans leur survie. En effet une déficience en RANKL conduit à une diminution de la phosphorylation activatrice de PKB/Akt, facteur anti-apoptotique, dans les cellules épithéliales alvéolaires tandis que l'apport de RANKL exogène restaure cette activation. L'ensemble de ces données démontrent l'importance de RANKL dans la maturation de la glande mammaire. En plus de la progestérone, d'autres hormones libérées pendant la grossesse, telles que la prolactine ou la PTHrP, sont susceptibles d'induire la libération de RANKL (Aupperlee et al., 2013; Fata et al., 2000; Tanos et al., 2013).

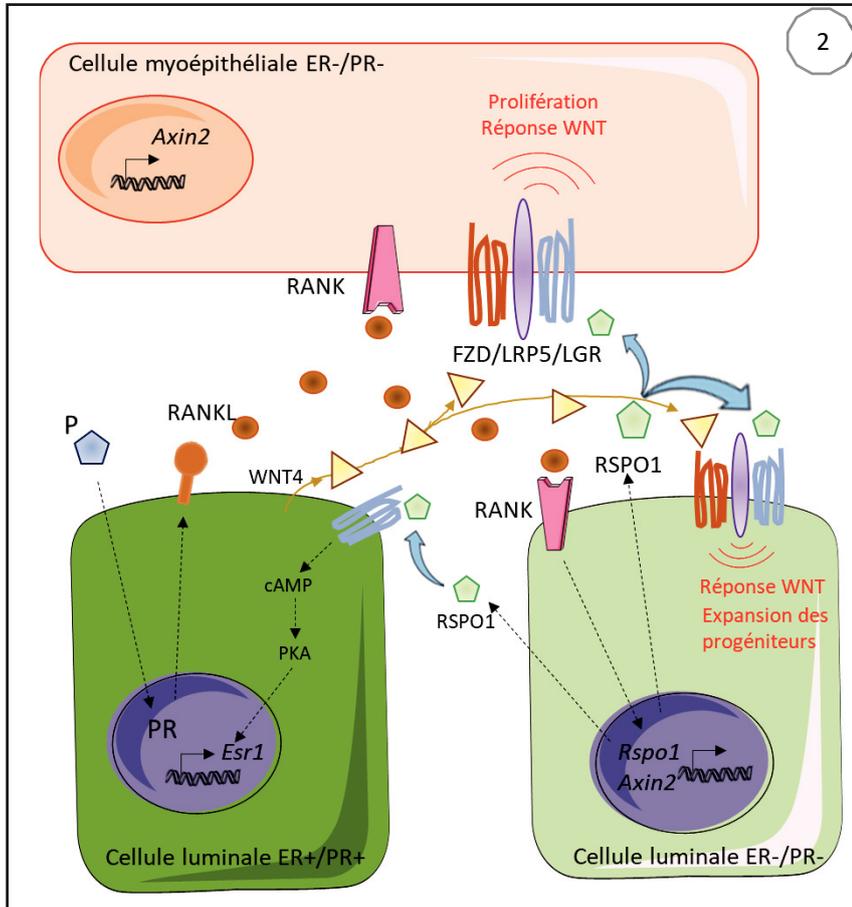
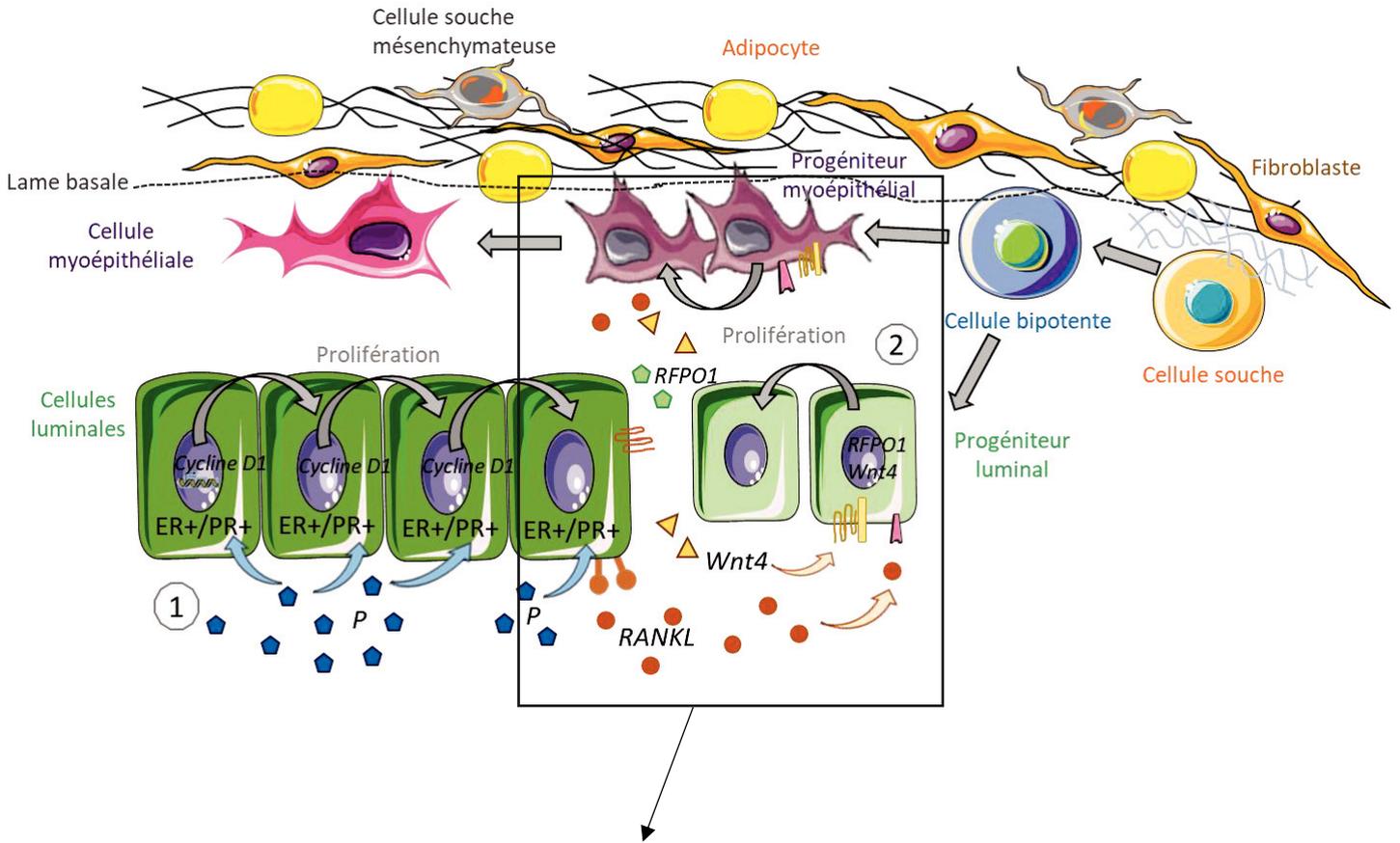


Figure 10: Effets de la progestérone (P) sur le développement de la glande mammaire lors de la puberté et à l'âge adulte et au moment de la grossesse. (adapté Brisken and Duss, 2007, Joshi et al. 2015, Beleut et al. 2010, Rajaram et al., 2015 et Geng et al., 2020 ). La progestérone va agir dans un premier temps sur les cellules luminales et induire leur prolifération de manière cycline D1 dépendante (1), puis dans un deuxième temps va permettre une prolifération plus importante de ces cellules de manière RANKL-dépendant (2).

Outre la progestérone, d'autres hormones vont être impliquées dans le développement de la glande mammaire lors de la grossesse, notamment la prolactine qui va y jouer un rôle crucial. Cette hormone, sécrétée par l'hypophyse, mais également par d'autres tissus tel que le placenta, l'utérus, ou l'épithélium mammaire, va agir lors de la deuxième phase de maturation en synergie avec la progestérone pour soutenir l'expansion de l'arborescence mammaire ainsi que la différenciation des cellules alvéolaires (Briskin et al., 1999). En effet, la prolactine va jouer un rôle notamment via la signalisation Jak2/STAT5a afin d'induire l'expression de RANKL (Srivastava et al., 2003).

### *b. Lactogénèse, lactation et sevrage*

En milieu de grossesse et peu avant l'accouchement, le taux important d'œstrogènes, de progestérone et de lactogène va entraîner la libération de la PRF (Prolactin Releasing Factor) par l'hypothalamus, qui agit sur l'adénohypophyse en stimulant la sécrétion de la prolactine. L'augmentation de la production de prolactine conduit alors à la maturation complète des cellules alvéolaires et à l'expression de gènes initiateurs de la synthèse du lait. Cependant, durant la grossesse, la production de lait est bloquée par la présence des œstrogènes et de la progestérone. Durant cette phase, les cellules alvéolaires vont commencer à synthétiser un précurseur de lait : le colostrum. Cette forme de lait contient moins de lactose et de matière grasse que le lait véritable mais est riche en anticorps, en protéines, en acides aminés, en vitamines et minéraux ainsi qu'en facteurs de croissance. Il a été rapporté que les cellules exprimant fortement les récepteurs ER $\alpha$  et PR exprimaient également celui de la prolactine. Par ailleurs, il semblerait que l'effet de la prolactine se ferait également de manière paracrine à travers sa fixation sur son récepteur localisé sur des cellules senseurs. Outre une production hypophysaire de la prolactine, une étude a rapporté que les cellules épithéliales mammaires pouvaient elles-mêmes produire de la prolactine via la signalisation Pten/PI3K/Akt pour agir de manière autocrine (Chen et al., 2012). La fixation de la prolactine sur son récepteur permet l'initiation de la voie Jak2/STAT5 ainsi que d'un facteur essentiel, ELF-5, pour aboutir à la synthèse d'éléments du lait, tel que la  $\beta$ -caséine, à la prolifération des cellules luminales et à leur maturation en cellules alvéolaires (Choi et al., 2009; Sleeman et al., 2007). En plus de ces différents facteurs, il a également été rapporté que l'intégrine  $\beta$ 1 jouait un rôle permissif dans la signalisation de la prolactine (Naylor et al., 2005). Comme décrit précédemment, l'IGF joue un rôle crucial durant la puberté. Il a également été montré que ce facteur participe aussi au développement des alvéoles durant la grossesse. Une étude a montré que la prolactine peut induire l'expression de l'IGF-2 qui permettra par la suite d'initier la transcription de la cycline D1 pour conduire à la prolifération des cellules (Briskin et al., 2002).

Outre IGF-2, IGF-1 semble également participer, mais plutôt de façon tardive, en agissant sur la synthèse de lait. Ce facteur est exprimé dans les cellules stromales en fin de grossesse (Loladze et al., 2006). Par ailleurs, une diminution de son expression en début de grossesse aboutie à un retard dans le développement des alvéoles. De manière surprenante, il semblerait également que l'IGF-1 n'agisse pas sur l'expression transcriptionnelle de gènes impliqués dans la synthèse du lait mais aurait plutôt un effet au niveau protéique, notamment en agissant en collaboration avec la prolactine pour induire la traduction de la  $\beta$ -caséine et probablement d'autres protéines du lait (Loladze et al., 2006). Ainsi, associé à d'autres facteurs comme l'insuline et l'IGF1, la prolactine va induire des modifications intracellulaires des cellules alvéolaires, avec une augmentation du nombre des organites pour supporter la synthèse des différents éléments du lait.

L'accouchement et la perte du placenta entraînent un arrêt de la libération de certaines hormones placentaires, dont l'hormone placentaire lactogène, et une diminution de la progestérone et des œstrogènes. De même, la sécrétion de prolactine va progressivement diminuer après l'accouchement pour n'être plus sécrétée que sous forme de pics sous l'effet de la stimulation mécanique du mamelon exercée par la tétée. En effet, à la naissance et en cas d'allaitement une boucle réflexe va se mettre en place, initiée par des stimulus extérieurs tels que le son, la vue, les odeurs et par la tétée du nouveau-né qui va stimuler les mécanorécepteurs situés à la base du mamelon entraînant alors des influx nerveux en direction de l'hypothalamus (*figure 11*). Ceci va aboutir à une libération de PRF, provoquant alors un pic de sécrétion de prolactine et la production du lait pour la prochaine tétée. Parallèlement à cela, l'hypothalamus va également sécréter de l'ocytocine qui va agir sur les cellules myoépithéliales et permettre leur contraction, expulsant ainsi le lait des acini et le conduisant le long des canaux galactophores (Reversi et al., 2005). On parle de réflexe d'éjection. En plus d'agir sur les cellules épithéliales mammaires, la prolactine et l'ocytocine vont agir sur l'arbre vasculaire, d'une part pour augmenter le débit sanguin en direction du sein et d'autre part pour augmenter l'irrigation de la glande mammaire. De nombreux composants du lait sont issus du plasma de la mère et diffusent vers les cellules acineuses à travers la membrane des capillaires. L'arrêt durable de l'allaitement entraîne un arrêt de la production de prolactine et une accumulation du lait dans la glande mammaire aboutissant à une inhibition de l'activité sécrétrice des cellules alvéolaires. La glande mammaire va alors involuer, mettant en jeu des processus apoptotiques. La stagnation du lait dans les canaux conduit à la libération des facteurs LIF et TGF $\beta$ 3, tous deux à l'origine de l'initiation d'un programme d'apoptose dans les cellules épithéliales (McCready et al., 2010). Ainsi, une infiltration de leucocytes et de macrophages, associée à un taux important de cellules épithéliales apoptotiques, a été retrouvée dans des glandes mammaires de femmes dont la production de lait s'est arrêtée (Jindal et al., 2014). L'ensemble de ces éléments immunitaires vont être à l'origine d'une production importante de cytokines tels que les

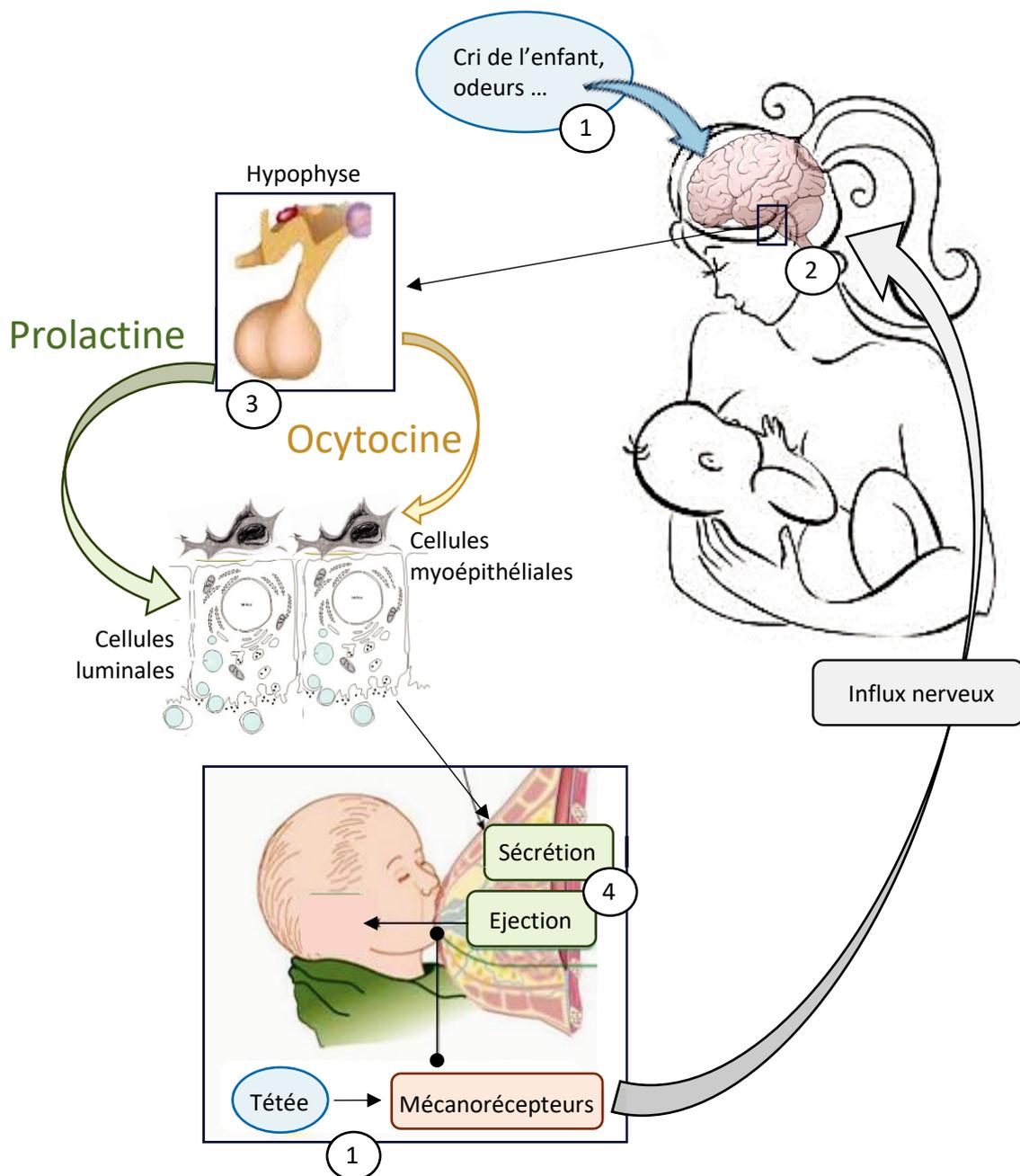


Figure 11: Boucle réflexe mise en place au moment de la tétée du nouveau-né pour la production et l'excrétion du lait maternel.

Des stimulus extérieurs et/ou la stimulation mécanique du mamelon exercée par la tétée (1), sont réceptionnés par le cerveau de la mère (2). L'hypophyse va alors conduire à la sécrétion de prolactine et d'ocytocine (3) qui agissent respectivement sur les cellules luminales pour la synthèse de lait et sur les cellules myoépithéliales pour leur contraction, aboutissant alors à la sécrétion et à l'éjection du lait (4).

interleukines 6 et 10 et à une protéolyse importante des fibres de collagène 1 par les MMPs, aboutissant à une accumulation de collagène non fibrillaire qui favorise alors le recrutement de macrophages. (McCready et al., 2010; O'Brien et al., 2010). Par ailleurs, d'autres facteurs sont également impliqués dans ces mécanismes d'involution, comme p53, Bax et Bcl2, FasL, IGFBP-5 ou encore l'augmentation de la production de MMP comme MMP3 (Flint et al., 2005; McCready et al., 2010). L'involution de la glande mammaire comporte plusieurs étapes dont la première est réversible. En revanche, la seconde étape d'involution est quant à elle irréversible du fait d'un remodelage drastique des structures alvéolaires et de son stroma. Certaines études rapportent que l'involution de la glande mammaire à la suite de l'arrêt de la lactation ne conduit pas à un retour exact de la glande à son état d'avant la grossesse. En effet, le potentiel prolifératif des cellules des structures persistantes ne serait pas le même que celui observé chez la femme nullipare. De plus, les alvéoles de types I présentent un index de prolifération deux fois moins important que celles retrouvées chez la femme nullipare (Russo and Russo, 2004). Cependant, ces résultats ne sont pas similaires à ceux observés dans une autre étude montrant l'absence de différences dans la surface totale des alvéoles et dans leur composition entre les femmes nullipares et celles ayant eu une grossesse (Jindal et al., 2014). Cependant, dans cette étude, aucune analyse de l'expression de facteurs de différenciation n'a été effectuée. Ces observations contradictoires pourraient être dues à la complexité du développement de la glande mammaire et à son hétérogénéité, en fonction de l'âge, du statut hormonal ou encore du nombre de grossesses ou de l'âge à laquelle elles se produisent.

#### 4. Ménopause

A la ménopause, le cycle ovarien va se modifier progressivement pour aboutir à un arrêt de l'ovulation, entraînant des changements hormonaux et physiologiques importants. Ainsi, les ovaires vont arrêter de produire des œstrogènes et de la progestérone qui seront alors synthétisés de manière très limitée par d'autres organes tels que les glandes surrénales, la glande mammaire ou le tissu adipeux. A la ménopause, la principale forme d'œstrogènes produite est l'estrone. Ce changement dans le profil hormonal conduit à une involution importante de la glande mammaire en termes de nombre et de taille des alvéoles. Par ailleurs, il est intéressant de noter que le nombre de cellules ER+ augmente passant d'environ 10% de cellules épithéliales positives en préménopause à 90% des cellules en postménopause (Shoker et al., 1999). En plus d'une modification du tissu épithélial, une autre conséquence de la ménopause est une prise de poids avec une réorganisation du tissu graisseux notamment au niveau des seins (Tonkelaar et al., 2004). Ainsi, il a été montré que la composition du sein changeait, avec une diminution du stroma au profit du tissu fibreux, contenant du collagène

dense, et du tissu adipeux (McCready et al., 2010). Ainsi, une étude a rapporté qu'un niveau plus important d' IGF-I pendant la préménopause augmente la densité du sein au moment de la ménopause(Verheus et al., 2007). Cette augmentation de la densité va conduire à une modification des facteurs sécrétés et du métabolisme (Abrahamsson et al., 2017).

La glande mammaire est un organe très complexe, en perpétuelle évolution en fonction des signaux qu'elle reçoit (*figure 12*). En plus des informations provenant des autres organes de l'organisme, une étroite communication s'opère entre les cellules épithéliales mammaires et les cellules stromales, mais également avec les nombreux éléments qui composent son microenvironnement. Cette multitude de facteurs va permettre de réguler finement son développement et son évolution (Briskin and O'Malley, 2010). Ainsi, un déséquilibre dans la production de certains de ces facteurs conduit à des dérégulations pouvant entrainer l'apparition de maladie, tels que l'apparition de cancers du sein.

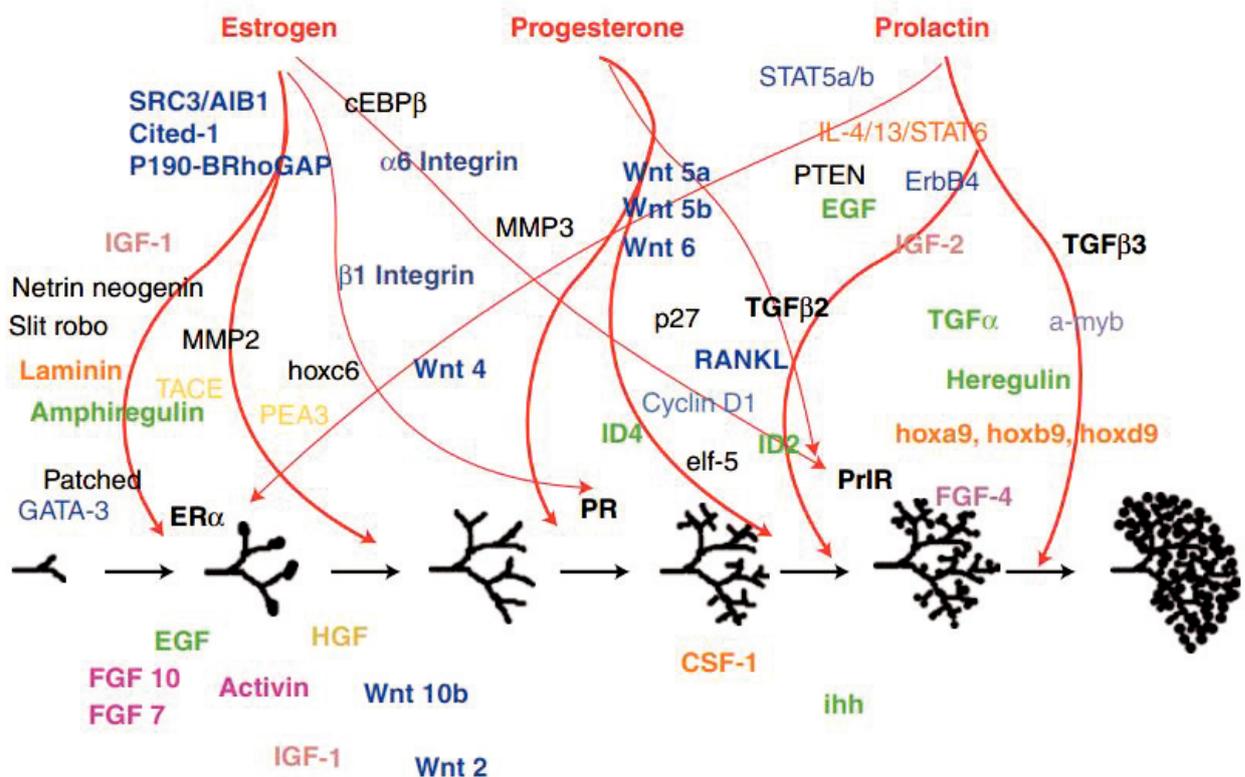


Figure 12: Illustration de la complexité de la régulation de la glande mammaire (Briskin and O'Malley, 2010).

## Chapitre 2: Les cancers du sein

### A. Généralités

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme, représentant la seconde cause de mortalité par cancer dans le monde. Il touche principalement les femmes âgées de 50 à 65 ans mais peut également survenir, dans une plus faible proportion, chez des femmes plus jeunes (DeSantis et al., 2014). L'incidence du cancer du sein en France a fortement augmentée depuis 50 ans. En 2018, presque 60 000 nouveaux cas de cancers du sein ont été recensés contre 30 000 en 1990, soit deux fois plus en 30 ans. Malgré cette augmentation importante de l'incidence, le taux de mortalité à quant à lui baissé de 1,5% par an en moyenne entre 2005 et 2012 (source : e-cancer.fr). Cette augmentation de l'incidence et cette baisse de la mortalité peut être expliquée d'une part par une évolution dans les méthodes de dépistages associée à un diagnostic plus précoce et d'autre part à l'amélioration des traitements. Cependant, plus de 12 000 décès suite à un cancer du sein ont été rapportés en 2018, faisant de cette maladie un enjeu majeur de santé publique.

### B. Facteurs de risque

Les causes impliquées dans le développement du cancer du sein sont très souvent floues du fait de son origine multifactorielle et de son hétérogénéité inter- et intra-tumorale. Cependant, un certain nombre d'études a mis en avant des facteurs de risques (Key et al., 2001). Les facteurs de risques du cancer du sein sont des éléments susceptibles d'augmenter le risque de développer ce cancer et peuvent être divisés en deux types : les facteurs de risques extrinsèques liés à notre comportement et à notre environnement, pouvant pour certains être évités et les facteurs de risques intrinsèques qui eux sont propres à l'individu (*figure 13*).

#### 1. Facteurs extrinsèques

##### a. Expositions environnementales – quelques exemples

L'organisme est en interaction avec son environnement et est donc soumis à diverses agressions d'origine naturelle ou anthropique qui peuvent être impliquées dans le développement de cancers et notamment des tumeurs du sein.

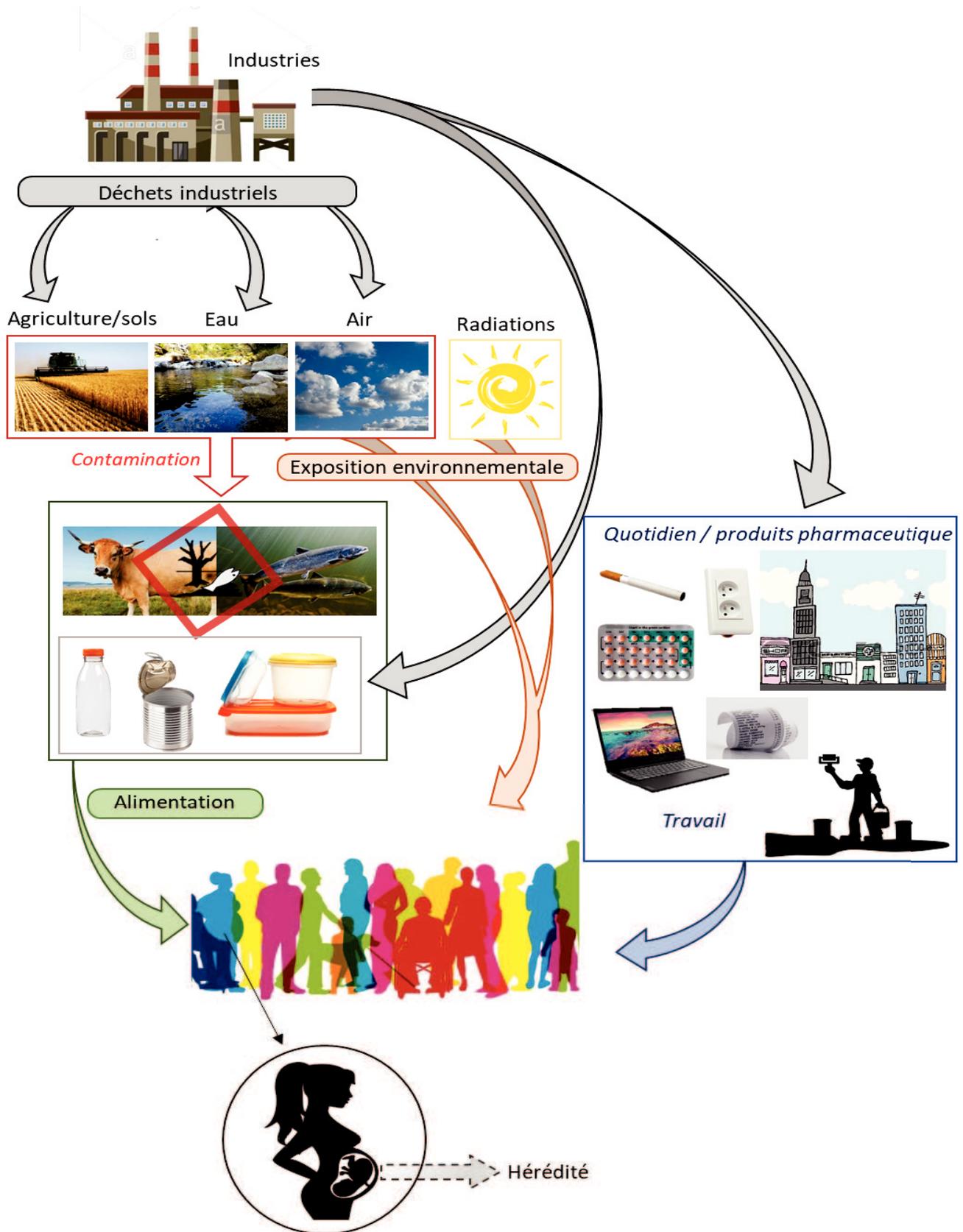


Figure 13: Origine et impact des facteurs de risques extrinsèques. L'Homme est soumis à plusieurs éléments susceptibles d'augmenter le risque de cancer à travers notamment son environnement et son quotidien.

### Les radiations ionisantes :

La glande mammaire est un tissu particulièrement sensible aux radiations ionisantes. Des analyses sur les conséquences de l'explosion des bombes atomiques de Hiroshima et de Nagasaki ont montré une augmentation de l'apparition de cancers du sein dans la population exposée aux radiations (Land *et al.*, 2003). Ces études et d'autres (Aisenberg *et al.*, 1997) ont mis en lumière l'implication des radiations ionisantes sur le développement de cancers du sein, particulièrement lors d'une exposition durant la puberté. Ces radiations induisent des dommages à l'ADN, induisant une instabilité génomique favorisant le développement tumoral. En plus d'un effet sur l'instabilité génomique, il a été décrit dans un modèle murin que les rayonnements ionisants augmentaient le taux d'estradiol circulant, le niveau de ER $\alpha$  et favorisaient la prolifération des cellules mammaires via l'activation des voies PI3K/Akt et mTOR (Suman *et al.*, 2012).

### Le benzo(a)pyrène :

Outre les radiations ionisantes, d'autres facteurs de risque environnementaux ont été décrits, comme l'exposition à des polluants chimiques. Par exemple, une exposition au benzo(a)pyrene (BaP), formé lors d'une combustion incomplète comme celle produisant la fumée de cigarette ou le gaz d'échappement des moteurs à combustion, conduit au développement de cancer du sein (Huggins and Yang, 1962; Sadikovic and Rodenhiser, 2006). Le BaP agirait à plusieurs niveaux dans la tumorigenèse. En effet, une étude a montré qu'il pouvait agir sur les étapes très précoces de transformation en augmentant la sensibilité des cellules souches mammaires aux effets pro-tumoraux des BMPs (Clément *et al.*, 2017). D'autres études ont montré son rôle dans l'émergence de cellules souches cancéreuses et l'induction de l'EMT (epithelio-mesenchymal transition) qui a été décrit comme un marqueur de transformation et d'agressivité (Pluchino and Wang, 2014; Shim and Song, 2015). Par ailleurs, tout comme les radiations ionisantes, le BaP favoriserait l'instabilité génomique en perturbant la transcription de BRCA1, molécule majeure du système de réparation de l'ADN, dans les cellules ER positives (Jeffy *et al.*, 2002).

### Les perturbateurs endocriniens :

Les perturbateurs endocriniens sont des molécules définies comme : « *une substance ou un mélange de substances, qui altère les fonctions du système endocrinien et de ce fait induit des effets néfastes dans un organisme intact, chez sa progéniture ou au sein de (sous)- populations* » (source : OMS2002). Même si certains perturbateurs endocriniens sont des analogues ou des antagonistes des hormones stéroïdiennes sexuelles, de nombreux perturbateurs endocriniens ont été décrits comme ayant des effets œstrogéniques via leur fixation sur les récepteurs aux œstrogènes, mimant ainsi l'action de ce

dernier (Combarnous and Nguyen, 2019). De ce fait, ils sont également appelés œstrogénomimétiques. Différents types de perturbateurs endocriniens sont présents dans l'environnement, d'origine naturelle comme les phytoestrogènes retrouvés dans le soja ou dans les fèves, considérés comme ayant des effets plutôt protecteurs (Brenner et al., 2016; Dagdemir et al., 2013) ou artificielle, comme des biocides (DTT) ou des polluants industriels (bisphénols et alkylphénols) dont la majorité sont des carcinogènes connus ou suspectés.

*Mon sujet de thèse portant sur l'implication des bisphénols A, S et F dans la régulation des cellules souches mammaires et leur transformation, un chapitre est consacré à ces molécules et à leur rôle dans la carcinogénèse (chapitre 4).*

#### *b. Mode de vie*

Outre les facteurs de risque liés à notre environnement, notre mode de vie participe également à augmenter ou diminuer les risques de cancer du sein. Ainsi, 25% des cas de cancer du sein en France sont attribués à l'alcool, à l'obésité et à l'inactivité physique (Pizot et al., 2016).

#### Tabagisme et alcool :

L'augmentation du tabagisme chez la femme depuis ces dernières décades a coïncidé avec celle de l'incidence de cancer du poumon en France (source : [e-cancers.fr](http://e-cancers.fr)). En plus de son effet délétère dans le cas du poumon, la fumée du tabac a également été décrite comme un facteur de risque du cancer du sein. En effet, parmi les milliers de substances chimiques présentes dans la fumée, une vingtaine d'entre elles ont été classées comme carcinogènes avérés ou suspectés pour la glande mammaire (Johnson et al., 2011; Reynolds, 2013). Nombre de ces composés sont des mutagènes qui induisent une instabilité génétique propice à la transformation (Hecht, 2002). L'impact du tabac sur la glande mammaire dépend de différents facteurs et notamment de la période à laquelle la femme a commencé à fumer. En effet des études ont montré un risque plus élevé de développer un cancer du sein pour les femmes ayant longtemps fumé avant leur première grossesse (Catsburg et al., 2015; Gram et al., 2005; Reynolds, 2013). Outre l'effet nocif du tabac, une consommation importante d'alcool favorise aussi l'apparition de cancers du sein, notamment lors d'une consommation régulière à la puberté, au moment où la glande mammaire se développe (Liu et al., 2015b; Shield et al., 2016). L'alcool agirait en augmentant le niveau d'expression des hormones ou facteurs endogènes circulants comme les œstrogènes, l'androgène ou l'IGF, modifiant alors les voies de signalisations associées qui sont notamment impliquées dans la prolifération des cellules épithéliales mammaires

(Al-Sader et al., 2009; Denduluri et al., 2015), conduisant ainsi à un risque accru de développer un cancer du sein hormono-dépendant (Liu et al., 2013, 2015b; Shield et al., 2016).

#### Sédentarité et obésité :

Actuellement, une grande majorité des emplois impliquent une position assise et/ou statique, conduisant à une diminution importante de l'activité physique et à une augmentation du nombre de personnes en surpoids ou obèses. Avant la ménopause un indice de masse corporelle supérieur à 35, correspondant au seuil de l'obésité, a un effet protecteur vis-à-vis du cancer du sein. En revanche, après la ménopause cet effet protecteur s'inverse pour conduire à un risque 2 fois plus élevé (McPherson et al., 2000). Ceci peut être expliqué par le rôle dans le métabolisme et le stockage des hormones stéroïdiennes du tissu adipeux. Un tissu adipeux abondant entraîne une augmentation d'œstrogènes dans le microenvironnement mammaire mais également une surexpression de cytokines pro-inflammatoires, un stress oxydatif important ainsi que l'altération de la voie de l'insuline ou de la balance leptine-adiponectine (Engin, 2017; Grossmann and Cleary, 2012). L'ensemble de ces altérations étant impliqué dans le développement tumoral mammaire. À l'inverse une activité physique régulière est un facteur protecteur contre le cancer du sein, mais diminue également le taux de récurrence et augmente le taux de survie (de Boer et al., 2017)(Delrieu et al., 2018; Volaklis et al., 2013).

#### Contraceptifs et traitements :

Comme décrit dans le chapitre 1, les œstrogènes et la progestérone jouent un rôle majeur dans le développement de la glande mammaire, entre autres via leurs effets prolifératifs sur les cellules épithéliales et la régulation de la sécrétion de nombreux facteurs solubles par les cellules du microenvironnement mammaire. Ainsi, des traitements hormonaux composés d'œstrogènes et de progestérone, comme les contraceptifs oraux ou les traitements hormonaux substitutifs, utilisés pour réduire les troubles liés à la ménopause, contribuent à augmenter le risque de cancer du sein (Cogliano et al., 2005; Daubisse-Marliac et al., 2011; Shapiro, 2005; Wunderle et al., 2019). Une étude épidémiologique a montré une augmentation du risque de cancer du sein de 10 à 30 % suite à la prise d'un contraceptif oral par rapport aux femmes n'en n'ayant jamais pris (Parsa and Parsa, 2009). D'autres composés oestrogéniques ont été utilisés en traitement comme par exemple le Diéthylstilbestrol, administré aux femmes enceintes dans les années 40 afin de réduire le risque d'avortements. Ce n'est que des années plus tard qu'il a été montré que ce composé avait des effets multigénérationnels, induisant des troubles de la fertilité mais également un risque plus important de cancer du sein chez les filles dont la mère avait été traitée pendant leur gestation (Hilakivi-Clarke, 2014).

### La dérégulation du cycle circadien :

Depuis l'industrialisation et le développement croissant des technologies numériques, notre organisme est de plus en plus soumis à la lumière électrique et notamment à la lumière bleue. De plus en plus d'études suggèrent un effet délétère de la lumière bleue sur notre organisme et sur la qualité du sommeil (Tosini et al., 2016; Zhao et al., 2018). Ainsi, une perturbation du cycle circadien serait un facteur de risque de cancer du sein. Une étude menée sur des femmes travaillant de nuit a révélé un risque accru de cancer du sein (Straif et al., 2007). Il semblerait qu'une privation de sommeil ou une dérégulation dans le cycle normal augmenterait l'activité inflammatoire avec notamment une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telle que l'interleukine 6 et diminuerait l'immunité (Besedovsky et al., 2012; Shearer et al., 2001).

## 2. Facteurs intrinsèques

### *a. L'âge*

Majoritairement, les cancers se mettent en place très lentement et apparaissent principalement après de longues années, provoqués par une accumulation de mutations génétiques dans une cellule saine, conduisant à sa transformation. Cependant, pour qu'une tumeur se développe, un certain nombre de barrières doivent être franchies, impliquant notamment le système immunitaire. Tout ceci faisant de l'âge un facteur de risque de cancer. Dans le cas du cancer du sein, il touche majoritairement les femmes à partir de 50 ans et presque la moitié des cas concerne des femmes de plus de 65 ans. Par ailleurs, il est rare chez les femmes de moins de 35 ans (Colditz et al., 2014; DeSantis et al., 2011).

### *b. Les changements hormonaux*

La glande mammaire est finement régulée tout au long de la vie de la femme par la production d'hormones qui varie en fonction du stade de développement de la glande et du cycle reproducteur. Les œstrogènes jouent un rôle important dans le développement des tumeurs mammaires, entre autres par leur effet prolifératif ou par la formation de métabolites carcinogènes qui favoriseraient ainsi l'apparition d'altérations génétiques (Russo and Russo, 2006; Russo et al., 2003). De ce fait, une exposition prolongée à cette hormone augmente le risque de cancer du sein. Ainsi, l'âge de la ménarche, celui de la ménopause, le nombre de grossesses, l'âge au premier enfant et l'allaitement sont autant de facteurs qui vont jouer sur l'exposition de la glande mammaire aux œstrogènes et donc sur le risque de cancer du sein. Depuis de nombreuses années, la maturité sexuelle chez la femme est de plus en plus précoce (Berkey et al., 2000; Karapanou and Papadimitriou, 2010; Parent et al., 2003),

augmentant la période d'exposition aux œstrogènes. Avec une ménopause tardive, ces deux éléments contribuent à augmenter le risque de cancer du sein du type hormono-dépendant (Colditz et al., 2014; Parsa and Parsa, 2009). A l'opposé, une ménarche tardive et une précocité de la ménopause confèrent un effet protecteur (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012; Karapanou and Papadimitriou, 2010). Il a également été suggéré qu'une longue durée d'allaitement pouvait aussi avoir un effet protecteur, probablement dû au fait de l'absence du cycle menstruel, résultant en un faible taux d'œstrogènes (Kwan et al., 2015; Layde et al., 1989; Lipworth et al., 2000). Une autre hypothèse est que l'allaitement conduit à la différenciation et à la maturation complète de la glande mammaire, diminuant ainsi les possibles effets de carcinogènes sur la prolifération et la transformation de progéniteurs ou de cellules souches mammaires. En effet, des études ont démontré qu'une réduction de l'allaitement conduisait à un risque accru de cancer du sein de type triple-négatif et basal-like, dont certaines propriétés sont partagées avec celles des cellules souches (Kwan et al., 2015; Millikan et al., 2008; Shinde et al., 2010). De même, une première naissance précoce permet une maturation de la glande mammaire plus tôt et donc un risque diminué de cancer du sein (Britt et al., 2007; Li et al., 2008).

### c. Facteurs génétiques

Des mutations héréditaires ont été décrites pour augmenter drastiquement le risque de cancer du sein. Les plus connues sont les mutations dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2*, qui codent des protéines jouant un rôle majeur dans la réparation de l'ADN et le maintien de l'intégrité du génome (Welch and King, 2001). De 45 à 80% des femmes porteuses de l'une de ces mutations développent un cancer du sein, majoritairement un cancer de type basal, qui est un cancer très agressif et de mauvais pronostic (Foulkes et al., 2003; Zhong et al., 2015). Ces cancers d'origines génétiques touchent des femmes nettement plus jeunes, typiquement avant 40 ans, que les autres cancers du sein. Cependant, des solutions de préventions existent consistant en des mastectomies préventives. D'autres mutations génétiques sont également impliquées, comme des mutations des gènes *TP53*, *PTEN* ou *ATM* (Bernstein et al., 2017; Choi et al., 2016; Euhus and Robinson, 2013; Rousset-Jablonski and Gompel, 2017).

## C. Classifications des cancers du sein

Les cancers du sein présentent une très forte hétérogénéité inter-tumorale mais également intra-tumorale, rendant difficile leur classification. De ce fait, différents critères sont utilisés, fondés sur les

caractéristiques histologiques et anatomiques de la tumeur mais aussi sur l'expression de marqueurs ou de gènes (Pourteimoor et al., 2016).

### 1. Classification histologique

Pour la plupart (95%), les cancers du sein se développent à partir des cellules épithéliales localisées soit au niveau des canaux, on parle alors d'adénocarcinomes canauxaires qui sont les plus fréquents (85%), soit au niveau des lobules, alors nommé adénocarcinome lobulaire, représentant 15% des adénocarcinomes. Lorsque la membrane basale est intacte on parle d'adénocarcinome *in situ*, plutôt de bon pronostic mais lorsque les cellules tumorales franchissent cette membrane et envahissent le micro-environnement on parle alors d'adénocarcinome infiltrant (Weigelt and Reis-Filho, 2009) (figure 14). Ce dernier est moins favorable puisque les risques de métastases sont plus importants.

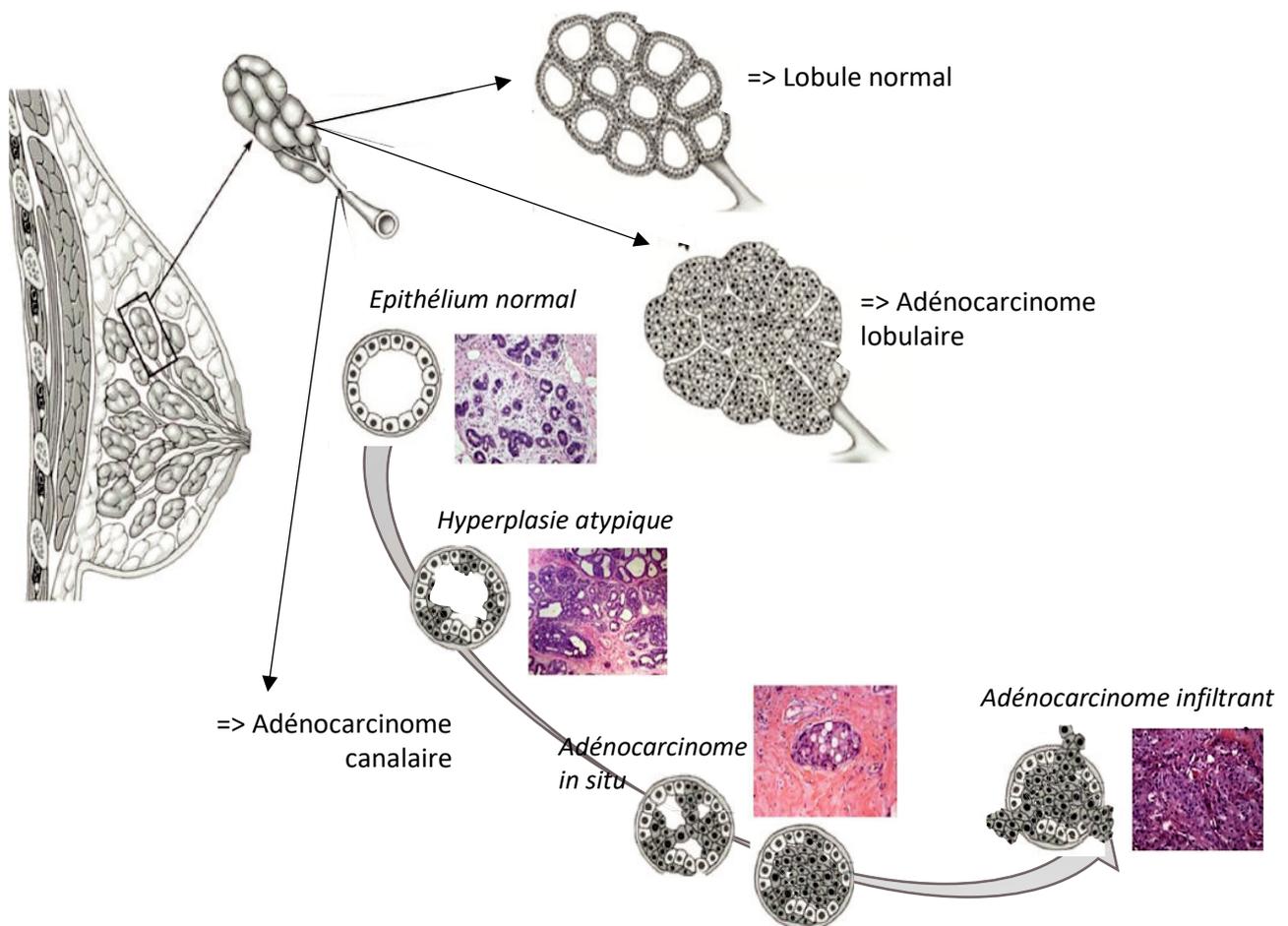


Figure 14: Classification histologique des cancers du sein.

Les cancers du sein peuvent se développer à partir des cellules épithéliales retrouvées au niveau des canaux (carcinome canalaire) ou au niveau des lobules (carcinome lobulaire). En fonction de l'état de la membrane basale, on parle de *in situ* si les cellules cancéreuses sont restreintes au tissu ou *infiltrant* si elles ont traversé la lame basale.

## 2. Classification anatomique

Deux classifications majeures existent. La classification TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*), établie par l'Union Internationale contre le Cancer et l'*American Joint Committee on Cancer*, repose sur la taille de la tumeur, l'invasion des ganglions lymphatiques et la présence ou non de métastases. Elle distingue sur ces critères 5 stades, dont les stades 4 et 5 sont de mauvais pronostics (*figure 15*). L'autre classification est la classification SBR (Scarff, Bloom and Richardson) permettant d'évaluer l'agressivité de la tumeur et qui repose sur 3 grades en fonction de la surface tumorale, de l'atypie cellulaire et de l'activité mitotique.

## 3. Classification moléculaire

Afin d'optimiser les traitements, la classification des tumeurs mammaires a évolué avec l'identification et la quantification de marqueurs moléculaires permettant ainsi de guider le choix de la stratégie thérapeutique à adopter et d'évaluer la sensibilité ou la résistance de la tumeur à ces traitements.

### a. Les marqueurs moléculaires

#### Les récepteurs hormonaux : aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR) :

Il existe 2 variants principaux du récepteur aux œstrogènes : ER $\alpha$  et ER $\beta$  et plusieurs isoformes. Leur structure et leur implication dans la transformation de la glande mammaire seront décrits en détails dans le chapitre n°3. Quant au récepteur à la progestérone, il possède deux isoformes : PR-A et PR-B. Le récepteur le plus important dans la classification des cancers du sein est l'isoforme ER $\alpha$ 66 qui est utilisé depuis les années 1970 dans la caractérisation des cancers du sein et l'orientation du traitement vers une thérapie endocrinienne. En effet de nombreuses études mettent en avant l'importance de ce biomarqueur (Dai et al., 2014; Perou et al., 2000; Sørli et al., 2001). Les tumeurs ER $\alpha$ -positives représentent 70 à 75% des cancers du sein (Anderson et al., 2002; Stendahl et al., 2006) et sont plutôt associées à un bon pronostic du fait de leur profil différencié et moins agressif que les tumeurs ER $\alpha$ -négatives (Dunnwald et al., 2007; Putti et al., 2005). PR est également retrouvé dans 60-65% des cancers du sein (Rakha et al., 2007; Stendahl et al., 2006).

#### Le récepteur HER2 :

Ce récepteur membranaire appartient à la famille des récepteurs de l'EGF et possède une activité tyrosine kinase impliquée dans la régulation de la croissance, de la différenciation et du

A

<b>T : Taille de la tumeur</b>	
<b>Tx</b>	La taille de la tumeur ne peut pas être évaluée
<b>T0</b>	Pas d'identification de tumeur primaire
<b>Tis</b>	Carcinome in situ
<b>Tis (DCIS)</b>	Carcinome <i>in situ</i> canalaire
<b>Tis (LCIS)</b>	Carcinome <i>in situ</i> lobulaire
<b>Tis (Paget's)</b>	Maladie de Paget du mamelon sans tumeur sous-jacente
<b>T1</b>	Tumeur inférieure ou égale à deux centimètres dans sa plus grande dimension
<b>T1mi</b>	Tumeur dont la taille est inférieure ou égale à 0,1cm dans sa plus grande dimension
<b>T1a</b>	Tumeur dont la taille est comprise entre 0,1cm et 0,5cm dans sa plus grande dimension
<b>T1b</b>	Tumeur dont la taille est comprise entre 0,5cm et 1cm dans sa plus grande dimension
<b>T1c</b>	Tumeur dont la taille est comprise entre 1cm et 2cm dans sa plus grande dimension
<b>T2</b>	Tumeur dont la taille est comprise entre 2cm et 5cm dans sa plus grande dimension
<b>T3</b>	Tumeur dont la taille est supérieure à 5cm dans sa plus grande dimension
<b>T4</b>	Tumeur de toute taille avec une extension directe dans la paroi thoracique ou la peau
<b>T4a</b>	Extension à la paroi thoracique
<b>T4b</b>	Ulcération ou œdème (incluant peau d'orange) ou nodules satellites
<b>T4c</b>	A la fois T4a et T4b
<b>T4d</b>	Carcinome inflammatoire
<b>N : Envahissement ganglionnaire régional</b>	
<b>Nx</b>	L'envahissement ganglionnaire ne peut pas être évalué
<b>N0</b>	Pas d'envahissement ganglionnaire régional
<b>N1</b>	Ganglions axillaires homolatéraux mobiles
<b>N2</b>	Ganglions axillaires homolatéraux fixés entre eux ou à d'autres structures
<b>N3</b>	Ganglions mammaires internes homolatéraux
<b>M : Métastases à distance</b>	
<b>Mx</b>	Pas d'information clinique ou radiologique indiquant des métastases à distance
<b>M0</b>	Pas de métastase à distance
<b>M1</b>	Présence de métastases à distance

<b>Stade 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Stade IA</b>	T1	N0	M0
<b>Stade IB</b>	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
<b>Stade IIA</b>	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
<b>Stade IIB</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>Stade IIIA</b>	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
<b>Stade IIIB</b>	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
<b>Stade IIIC</b>	T4	N2	M0
	Any T	N3	M0
<b>Stade IV</b>	Any T	Any N	M1

B

<b>Architecture tumorale :</b>	
proportion de canaux ou glandes dans la tumeur (en % de surface tumorale)	
>75 % : Tumeur bien différenciée	1
10-75 % : Tumeur moyennement différenciée	2
<10 % : Tumeur peu différenciée	3
<b>Atypies = Forme et taille du noyau (apprécié sur la population tumorale prédominante)</b>	
Noyaux petits, réguliers, uniformes	1
Pléomorphisme modéré	2
Variations marquées de taille, de forme, avec nucléoles proéminents	3
<b>Activité mitotique :</b>	
compter 10 champs au grossissement x400, valeurs définies pour un champ de 0,48mm de diamètre	
0 à 6 mitoses	1
7 à 12 mitoses	2
>12 mitoses	3
<b>TOTAL</b>	
<b>Grade I :</b> Tumeurs bien différenciées, de bon pronostic	3, 4, 5
<b>Grade II :</b> Tumeurs moyennement différenciées, pronostic moyen	6, 7
<b>Grade III :</b> Tumeurs peu différenciées, mauvais pronostic	8, 9

Figure 15: Classification anatomique des cancers du sein selon la classification TNM (a), reposant sur la taille de la tumeur, l'envahissement ganglionnaire et la présence ou non de métastase, ou la classification SBR (b), basée sur le niveau de différenciation de la tumeur, la forme et la taille des noyaux et l'activité mitotique.

fonctionnement des cellules mammaires normales mais aussi cancéreuses. Certains cancers du sein possèdent une amplification du gène *ErbB2* ou une surexpression de la protéine HER2. Presque 20% des cancers du sein invasifs présentent une surexpression de HER2, faisant de ce biomarqueur un facteur associé à un mauvais pronostic (Bartlett et al., 2003; Chia et al., 2008; Quénel et al., 1995; Slamon et al., 1987).

#### KI67 :

La protéine Ki67 est un marqueur de prolifération exprimé au cours du cycle cellulaire durant la mitose (Cuylen et al., 2016; Gerdes et al., 1983). Une faible expression de ce marqueur est associée à une meilleure efficacité des traitements et donc à un meilleur pronostic (Delpech et al., 2012; Reyat et al., 2013)

#### *b. Classification fondée sur ces marqueurs moléculaires*

En 2000, une première classification moléculaire, publiée par Perou et al. (Perou et al., 2000), a mis en évidence 4 sous-groupes de tumeurs du sein : les tumeurs lumineuses, HER2-enrichies, « basal-like » et les tumeurs « normal like ». Par la suite, d'autres études ont ajouté à cette classification un 5<sup>ème</sup> sous-type, celui des tumeurs « claudin-low » (*tableau 1, figure 16*) (Lim et al., 2009).

#### Les tumeurs lumineuses A et B :

Ces tumeurs présentent des caractéristiques communes avec les cellules lumineuses épithéliales des canaux mammaires comme l'expression des cytokératines 8 et 18 et une forte expression du récepteur alpha aux œstrogènes et de celui de la progestérone. On distingue 2 sous-groupes : les tumeurs lumineuses A et les lumineuses B. Contrairement aux lumineuses A qui expriment faiblement HER2 et Ki67, les lumineuses B présentent un taux de prolifération plus important avec une expression accrue de Ki67 (>14%) et de la cycline B1. Par ailleurs, ce sous-type B peut présenter une surexpression ou une amplification de HER2. Ainsi, le sous-groupe luminal A est associé à un bon pronostic avec un grade histologique faible et montre un taux de survie à 5 ans de 95%. En revanche, le sous-type luminal B est plus agressif avec un taux de survie à 5 ans de 50% seulement (Dai et al., 2016; Eroles et al., 2012; Prat and Perou, 2011; Zhang et al., 2014a).

#### Les tumeurs HER2-enrichies :

Ce sous-type tumoral doit son nom à l'amplification du gène *ErbB2* conduisant à une surexpression de la protéine HER2. Il est généralement négatif pour l'expression des récepteurs hormonaux ER $\alpha$  et PR

Sous-type moléculaire	Fréquence	Statut ER/PR/HER2	Prolifération	Pronostic
Luminal A	50-60%	ER+/PR+/HER2-	Faible	Bon
Luminal B	10-20%	ER±/PR±/HER2±	Elevée	Intermédiaire/mauvais
HER2-enrichie	10-15%	ER-/PR-/HER2+	Elevée	Mauvais
Basal-like	10-20%	ER-/PR-/HER2-	Elevée	Mauvais
Claudin-low	10-15%	ER-/PR-/HER2-	Elevée	Mauvais
Normal-like	5-10%	ER±/PR-/HER2-	Faible	Intermédiaire/mauvais

Tableau 1 : Classification moléculaire des cancers du sein fondé sur le statut ER, PR et HER2 des tumeurs. (D'après Eroles et al., 2012; Prat and Perou, 2011)

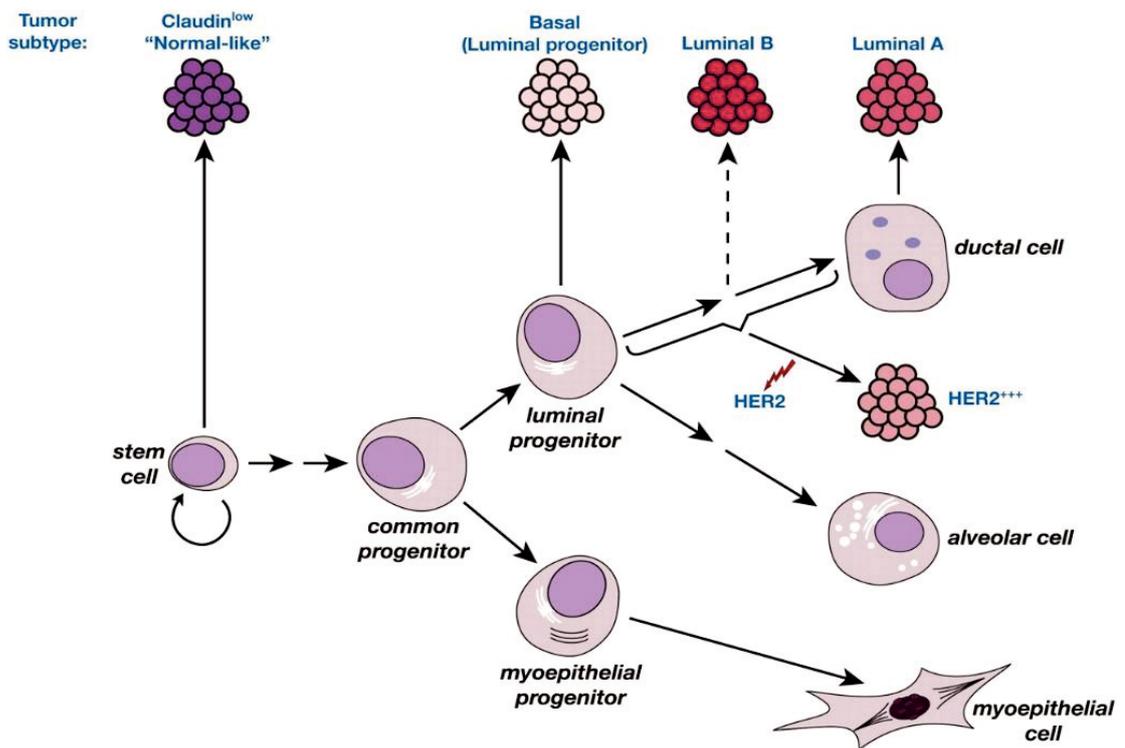


Figure 16: Hypothèse sur l'origine des tumeurs mammaires en fonction des sous-types fondés sur la classification moléculaire (Visvader, 2009)

mais présente une forte expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Il est associé à un mauvais pronostic avec un risque de métastases important (Dai et al., 2016; Eroles et al., 2012; Pourteimoor et al., 2016).

#### Les tumeurs « basal-like » :

Les tumeurs dites « basal like » sont caractérisées par une forte expression des kératines 5 et 6 et sont négatives pour ER $\alpha$ , PR et HER2. Tout comme le sous-type HER enrichi, ce sous-type tumoral est associé à un mauvais pronostic avec un taux de prolifération très élevé. Par ailleurs, les tumeurs basal-like présentent un fort taux de mutation de TP53. Les tumeurs d'origine génétique avec mutation dans le gène BRCA1, présentent ce profil « basal-like » (Eroles et al., 2012; Turner and Reis-Filho, 2006)

#### Les tumeurs « claudin-low » :

Mis en évidence par l'équipe du Dr Visvader, cette sous-catégorie possède des caractéristiques communes avec les tumeurs de type basal like (ER $\alpha$ -/PR-/HER-) mais est caractérisée en plus par une perte de l'expression des protéines impliquées dans les jonctions et l'adhésion cellulaire. De plus ces tumeurs présentent une signature génique liée à l'EMT et possèdent des propriétés de cellules souches. Elles sont de mauvais pronostic et très souvent invasives (Prat and Perou, 2011; Prat et al., 2010; Visvader, 2009).

#### Les tumeurs « normal-like » :

Ce dernier sous-groupe de cancer du sein est encore peu caractérisé. Il présente un profil similaire à des cellules normales avec une expression génique très caractéristique des cellules basales ou du tissu adipeux et sont négatives pour ER.

Ces trois derniers types de tumeurs (basal-like, claudin-low et normal-like) sont considérées comme des tumeurs triples négatives car elles sont négatives pour ER $\alpha$ , PR et HER2. Cependant, il est important de noter ici que l'identification du statut ER de la tumeur repose seulement sur l'identification de l'isoforme ER $\alpha$ 66 détectée dans le noyau et non d'autres récepteurs ou isoformes pouvant être membranaires, tels que GPER ou ER $\alpha$ 36. Ces autres formes seront décrites dans le chapitre n°3.

Par la suite, d'autres études (Curtis et al., 2012; Docquier et al., 2010; Lapierre et al., 2015) ont conduit à ajouter des biomarqueurs supplémentaires afin de préciser et d'enrichir cette classification. Ainsi, l'analyse des mutations somatiques, des polymorphismes ou encore des modifications épigénétiques, a par exemple mené à l'identification d'une surexpression de HDAC9 dans le sous-type basal-like

(Lapierre et al., 2016) ou de deux sous-catégories de tumeurs basal-like, celles immunoréactives et celles immunosuppressives (Burstein et al., 2015). Tout ceci illustre l'hétérogénéité très importante des tumeurs du sein et la difficulté à définir une classification. Cependant, l'identification d'un plus grand nombre de biomarqueurs permettrait potentiellement d'étendre les possibilités thérapeutiques en s'orientant vers des thérapies ciblées adaptées à la patiente et au type de tumeur et d'augmenter ainsi l'efficacité des traitements.

## D. Les thérapies

Le choix de la thérapie va se faire en fonction de l'aspect histologique de la tumeur, de son grade et de son stade anatomopathologique mais va également s'appuyer sur les critères moléculaires. Plusieurs types de traitements existent, pouvant être utilisés seuls ou combinés.

### 1. La chirurgie

La chirurgie est la première approche, avec pour objectif l'ablation de la tumeur. En fonction de l'étendue de la tumeur, plus ou moins de tissu sera enlevé. Ainsi, une tumeur peu étendue conduira à une simple tumorectomie qui permettra de conserver la majorité de la glande mammaire, mais en cas de développement tumoral plus important, une mastectomie partielle ou complète peut être nécessaire. De plus, au moment de la chirurgie, une vérification des ganglions est faite afin d'évaluer l'envahissement du système lymphatique. Si c'est le cas, une ablation des ganglions est également effectuée. En vue de diminuer au maximum la taille de la tumeur afin de faciliter la chirurgie, un premier traitement (radiothérapie, chimiothérapie, hormonothérapie) dit néo-adjuvant peut être mis en place. Par la suite, après l'intervention, une poursuite de ce traitement, alors qualifié de thérapie adjuvante, permettra de réduire les risques de récurrence et d'augmenter l'efficacité de la chirurgie.

### 2. La radiothérapie

La radiothérapie se base sur l'utilisation de rayonnements ionisants afin de détruire les cellules cancéreuses. C'est une méthode qui cible la zone tumorale en tentant de préserver les tissus et organes sains avoisinants. La radiothérapie la plus fréquente dans le cadre des cancers du sein est la radiothérapie externe, à l'opposé de la curiethérapie, peu utilisée dans les cancers du sein, qui va utiliser une source radioactive à l'intérieur du corps, directement au contact de la zone à traiter.

### 3. La chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement ayant pour but de détruire les cellules cancéreuses en prolifération. De ce fait les cellules en prolifération normales vont également être touchées, ce qui est à l'origine des effets secondaires observés lors des chimiothérapies. Par son effet systémique et le fait qu'elle cible les cellules prolifératives, la chimiothérapie peut être utilisée dans le cas des cancers infiltrants, ceux présentant des métastases et ceux à fort taux prolifératif. Elle est donc utilisée comme traitement pour les tumeurs de type basal-like, HER2 ou certaines tumeurs luminal B qui présentent un niveau de KI67 élevé. Plusieurs types de molécules sont classiquement utilisées dans le cadre du cancer du sein. Le paclitaxel provoque une catastrophe mitotique due à l'inhibition de la dépolymérisation des microtubules. Le cyclophosphamide, qui est un agent alkylant de l'ADN, entraînent une inhibition de la réplication. La doxorubicine inhibe la topoisomérase I et induit des cassures doubles brins de l'ADN, un arrêt du cycle et l'apoptose des cellules. Le cisplatine interfère avec la réplication et la réparation de l'ADN. Le Méthotrexate induit lui un arrêt du cycle cellulaire en phase S.

### 4. L'hormonothérapie

L'efficacité de l'hormonothérapie repose sur l'expression des récepteurs aux hormones (ER et PR) au niveau de la tumeur. En effet, les tumeurs exprimant ces récepteurs sont dites hormonosensibles car leur croissance va être dépendante de la production et de la fixation de ces hormones endogènes qui vont stimuler la prolifération des cellules cancéreuses. Ce sont donc les tumeurs de sous-type luminal qui seront la cible de l'hormonothérapie. Le but de l'hormonothérapie est soit de stopper la production d'œstrogènes endogènes de manière non médicamenteuse (ovariectomie ou radiothérapie des ovaires, pratiquement plus utilisées actuellement en France) ou par des médicaments, soit en bloquant l'activité des œstrogènes au niveau de son récepteur.

#### *a. Suppression de la synthèse d'œstrogènes*

##### Agonistes de la LH-RH :

Ces molécules vont agir au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire en stimulant et en saturant les récepteurs de la LH-RH hypophysaire. Ceci va conduire à l'inhibition de la production de FSH et de LH et donc de la synthèse d'œstrogènes et de progestérone par les ovaires. Plusieurs molécules existent,

notamment la leuproréline ou la goséréline, utilisées dans le cas des cancers du sein hormono-dépendants métastatiques chez la femme en préménopause.

#### Les progestatifs :

Un rétrocontrôle négatif existe au niveau de l'hypothalamus. Ainsi une forte production d'œstrogènes et/ou de progestérone va inhiber l'axe hypothalamo-hypophysaire conduisant à une diminution de la production des hormones sexuelles par l'ovaire. Les progestatifs vont agir sur ce principe en augmentant le niveau de progestérone et donc en stimulant ce rétrocontrôle négatif. Une des molécules utilisée est l'acétate de mégestrol, pouvant être utilisée chez les patientes ménopausées avec un cancer hormono-dépendant métastatique.

#### Les anti-aromatases :

La biosynthèse des différentes formes d'œstrogènes nécessite une étape d'aromatase catalysée par les aromatases. Une description plus précise de cette synthèse d'œstrogènes est décrite dans le chapitre n°3. Ainsi les traitements contre les cancers du sein hormono-sensibles peuvent se faire par des molécules qui inhibent l'aromatase, diminuant ainsi le niveau d'œstrogènes. Plusieurs générations d'anti-aromatases ont été développées depuis quelques années. Actuellement deux sous-groupes existent : d'une part les anti-aromatases stéroïdiens, qui vont agir comme compétiteurs des précurseurs des œstrogènes et se fixer de manière irréversible sur le site actif de l'aromatase, conduisant alors à l'inactivation complète de cette dernière et d'autre part les anti-aromatases non stéroïdiens, qui vont également se fixer sur le site actif de l'aromatase mais de façon réversible. Cette classe de médicaments est utilisée en traitement adjuvant chez la femme ménopausée.

#### *b. Action au niveau des récepteurs aux œstrogènes : les SERM et les SERD*

Il existe 2 types de molécules qui vont agir au niveau des récepteurs aux œstrogènes: les SERM et les SERD (*figure17*).

#### Les SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators) :

Ce sont des molécules non stéroïdiennes qui vont entrer en compétition avec les œstrogènes en se fixant spécifiquement sur le site de fixation du LBD (Ligand Binding Domain) du récepteur aux œstrogènes. Cette fixation ne va pas empêcher la dimérisation du récepteur ni sa fixation sur des éléments de réponses aux œstrogènes, mais va conduire à l'inactivation du domaine AF2, empêchant ainsi son activité. En revanche le domaine AF1 reste fonctionnel ce qui est à l'origine d'une inactivation partielle. Ainsi, les SERM vont avoir des effets antagonistes ou agonistes de manière tissu spécifique.

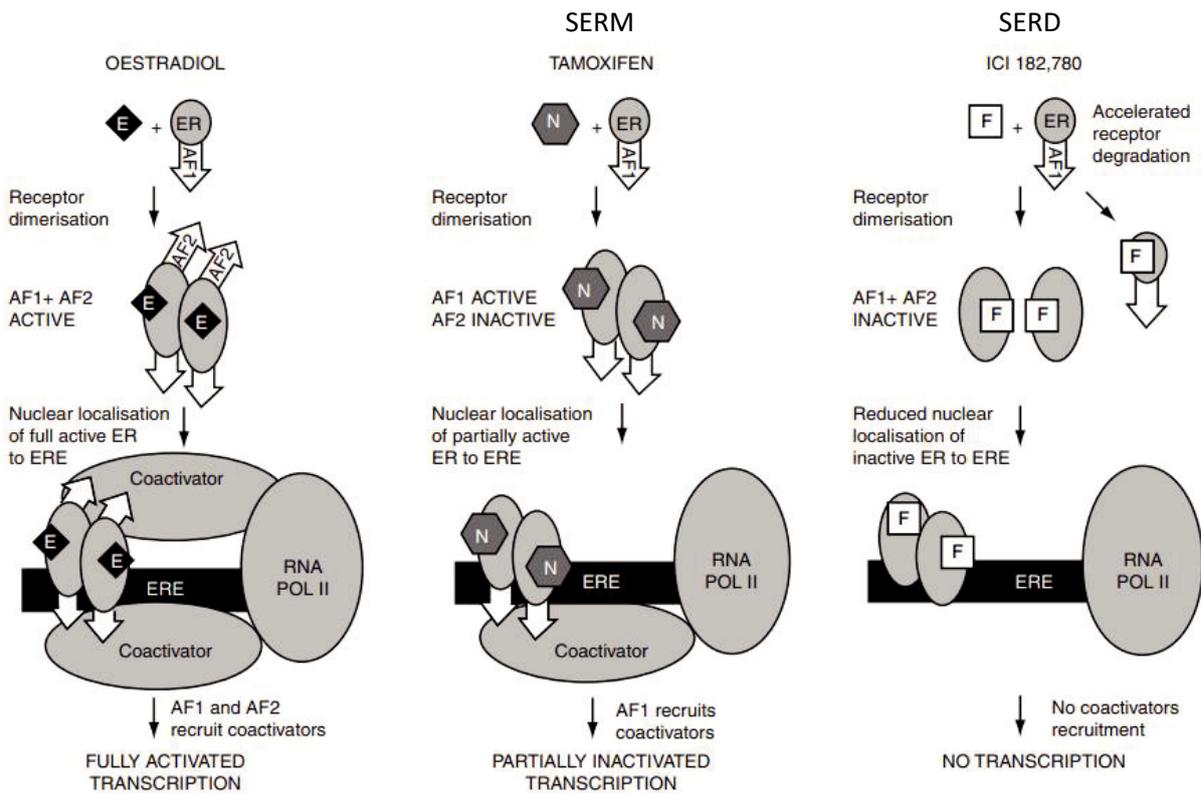


Figure 17: Mode d'action des molécules thérapeutiques agissant au niveau des récepteurs aux œstrogènes. L'œstradiol active les domaines de transactivation AF1 et AF2 de ER. Les SERM comme le tamoxifène inactivent seulement l'action du domaine AF2 conduisant alors à une activation partielle de la transcription. En revanche, les SERD, comme le Fulvestrant (ICI 182,780) inactivent aussi bien le domaine AF1 que le domaine AF2 aboutissant à une absence totale de transcription. (Robertson, 2001)

En effet leur effet va dépendre de la nature du récepteur, de la séquence promotrice des gènes régulés mais également des cofacteurs mis en jeu (McDonnell et al., 2002; Riggs and Hartmann, 2003). Le plus utilisé dans les cancers du sein est le tamoxifène. Cette molécule synthétisée dans les années 1960 a été utilisée dans les années 70 pour son action anti-proliférative dans le cas des cancers du sein de type hormono-dépendant. Actuellement, il reste le traitement adjuvant favorisé chez les femmes non-ménopausées. Le tamoxifène peut se lier à ER $\alpha$  et ER $\beta$ , avec un effet d'antagoniste pur dans le cas de ce dernier (Barkhem et al., 1997). Concernant ER $\alpha$ , son action va être variable selon la cible cellulaire en fonction de l'implication des domaines AF1 ou AF2 (Smith and O'Malley, 2004). Ainsi dans le cas de l'épithélium mammaire, la fonction AF2 est nécessaire pour l'activation transcriptionnelle de ER $\alpha$ , faisant alors tamoxifène un antagoniste pur. En revanche, dans l'utérus la fonction AF1 est suffisante et le tamoxifène va agir en tant qu'agoniste partiel, c'est pourquoi un suivi rigoureux est requis chez les femmes traitées au tamoxifène afin de prévenir un éventuel cancer de l'endomètre

(McDonnell et al., 2002; Watanabe et al., 1997). Comme décrit dans le chapitre 3, ER $\alpha$  peut avoir une signalisation initiée à la membrane et présente d'autres isoformes. Il est intéressant de noter que le tamoxifène peut également inhiber la formation du complexe ER $\alpha$ /PI3K/Scr, décrit comme une étape clé dans l'initiation de plusieurs voies initiées à la membrane. En revanche, il a été montré que le tamoxifène avait un rôle d'agoniste sur le variant ER $\alpha$ 36 (voir chapitre 3). L'ensemble de ces études montre l'intérêt de la caractérisation des différents types de récepteurs aux œstrogènes pour l'utilisation du tamoxifène.

#### Les SERD (*Selective Estrogen Receptor Disruptors*) :

Tout comme les composés précédents, les SERD vont se fixer spécifiquement aux récepteurs aux œstrogènes mais contrairement aux SERM, ils vont inhiber leur dimérisation et induire une dégradation par le protéasome, résultant en une absence totale de transcription et donc agissant comme des régulateurs négatifs stricts. Un des SERD utilisé est le fulvestrant, permettant de viser les cancers du sein hormono-dépendant qui présentent une résistance au tamoxifène. Ce composé va altérer la dimérisation du récepteur et avoir un effet antagoniste complet en inactivant les fonctions AF1 et AF2 (McDonnell et al., 2002; Robertson, 2001; Wakeling et al., 1991; Wijayaratne and McDonnell, 2001). De ce fait, il apparaît comme un antagoniste pur pour les tissus cibles des œstrogènes comme le sein ou l'utérus (Wakeling and Bowler, 1992). Concernant les signalisations membranaires de ER $\alpha$ , il a été montré que le fulvestrant était capable d'inhiber la grande majorité de ces signalisations. En revanche il semblerait que ce composé montre une plus faible affinité pour ER $\alpha$ 46, autre variant de ER $\alpha$ , que le tamoxifène (Lin et al., 2013).

## 5. Les thérapies ciblées

Les progrès dans la caractérisation moléculaire des cancers du sein ont permis d'identifier certains facteurs clés dans le développement et la régulation de ces tumeurs. Ainsi, de nouvelles thérapies tentent de cibler spécifiquement la tumeur via ces molécules.

### *a. Les anticorps monoclonaux*

Étant donné que les cancers du sein de sous-type HER2 sont négatifs pour les récepteurs hormonaux, un traitement par hormonothérapie n'est pas possible. Des thérapies ciblées contre HER2 ont été développées en conséquence (Trastuzumab, Lapatinib). Ainsi, l'anticorps monoclonal Trastuzumab va

agir en se fixant sur le domaine extracellulaire de HER2, permettant ainsi sa dimérisation, son internalisation et sa dégradation. Le Trastuzumab inhibe en conséquence les voies de signalisation PI3K/Akt et MAPK, entraînant alors un arrêt du cycle cellulaire. Le Lapatinib est une petite molécule qui inhibe les domaines intra-cellulaires de HER2. D'autres anticorps monoclonaux vont cibler des molécules ou des voies de signalisations impliquées dans la progression tumorale et dans le développement de métastases. C'est le cas du Bevacizumab qui va cibler le VEGF, molécule très importante dans l'angiogenèse. Ainsi une combinaison du Bevacizumab avec de la chimiothérapie montrerait une meilleure survie dans les cas de cancers du sein métastatiques (Gerber and Ferrara, 2005). On retrouve également des anticorps monoclonaux qui vont inhiber le réseau de signalisation PI3K/Akt/mTOR, dérégulé dans un très grand nombre de cancers du sein (Lee et al., 2015).

*b. Les anticorps conjugués ou ADC (Antibody Drug Conjugated)*

Cette thérapie consiste en un couplage entre une drogue cytotoxique ou un agent radioactif et un anticorps spécifique d'un antigène tumoral, qui sera reconnu à la surface des cellules tumorales, fixé puis endocytosé. Ainsi une fois internalisé la drogue sera libérée dans la cellule cancéreuse (*figure 18*). (Beck et al., 2010; Haeuw et al., 2009). Même si certaines de ces thérapies n'ont pas été poursuivies du fait d'un manque d'apport bénéfique, plusieurs autres traitements ainsi générés sont actuellement en phase I, II ou III dans le cas des cancers du seins (Nagayama et al., 2020).

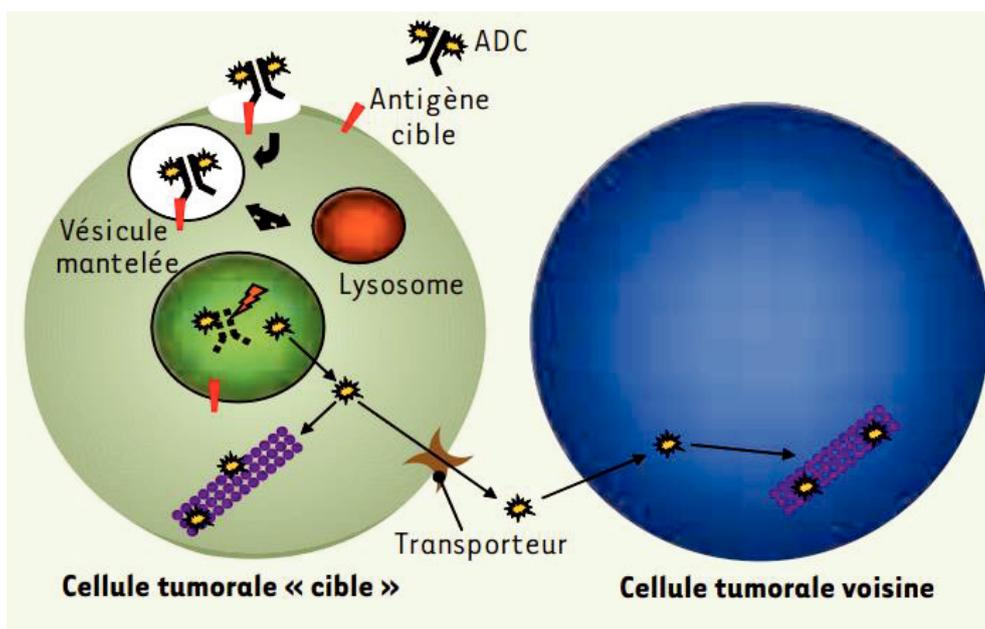


Figure 18: Mode d'action des anticorps conjugués (Haeuw et al., 2009)

## E. Résistance aux traitements et rechute

En dépit des progrès thérapeutiques, l'existence de résistances aux différents traitements sont la cause de rechutes. La majeure partie de la mortalité observée dans les cas de cancers de sein est consécutive à ces rechutes. Les mécanismes impliqués dans ces résistances ne sont pas encore tous bien définis mais font l'objet d'une recherche approfondie.

### 1. Adaptabilité et/ou évolution de la tumeur

Les traitements peuvent induire une pression de sélection sur les cellules tumorales. Lorsque la tumeur répond bien aux traitements, la majorité des cellules cancéreuses qui constituent cette tumeur va être éliminée. Cependant, si certains clones cellulaires étaient porteurs d'altérations leur permettant de résister aux thérapies, l'avantage sélectif résultant leur permettra de reformer à terme une nouvelle tumeur. On parle alors de résistances acquises qui peuvent jouer sur plusieurs tableaux (*figure 19*).

Dans le cas des cancers hormono-sensibles, une thérapie possible consiste à cibler le récepteur aux œstrogènes, afin de bloquer sa signalisation impliquée dans la prolifération des cellules tumorales. Les cellules cancéreuses peuvent perdre l'expression de ER $\alpha$  et ainsi devenir indépendantes aux œstrogènes, ou subir des mutations au niveau de ER $\alpha$  empêchant la fixation des drogues sur celui-ci (Kuukasjärvi et al., 1996; Le Romancer et al., 2011). D'autres mécanismes ont également été décrits comme par exemple un dysfonctionnement dans les co-régulateurs de ER $\alpha$  ou dans le métabolisme du tamoxifène, ou encore la mise en place d'une production autocrine d'œstrogènes par les cellules tumorales (Badia et al., 2007; Johnson et al., 2004). De plus, l'activation de voies de signalisation alternatives est également impliquée dans les résistances. Ainsi, la résistance au tamoxifène peut être médiée par les récepteurs HER2 et EGFR, activant une signalisation MAPK/Akt qui induit l'activation de ER $\alpha$ , ou encore par l'augmentation de l'activité de IGF1R (Shou et al., 2004; Zhang et al., 2011). Par ailleurs, des résistances à d'autres traitements que le tamoxifène, comme celles aux traitements anti-aromatases, qui découlent d'une activation constitutive de la voie PI3K/Akt (Vilquin et al., 2013).

Les cancers hormono-sensibles ne sont pas les seuls à mettre en place des résistances aux différents traitements. En effet de nombreuses résistances aux inhibiteurs de mTOR ont été décrites dans le cas des cancers du sein de sous type HER2, conduisant au développement de nouvelles générations d'inhibiteurs (Lee et al., 2015). Ces résistances peuvent résulter de l'expression d'une nouvelle forme de HER2 tronquée au niveau du domaine de fixation de la drogue, de l'expression d'autres membres de la famille de HER2, comme par exemple HER1 ou HER3, d'autres types de récepteurs qui vont s'associer à HER2 comme par exemple l'IGF1R (Nahta et al., 2005), ou encore de mutations de

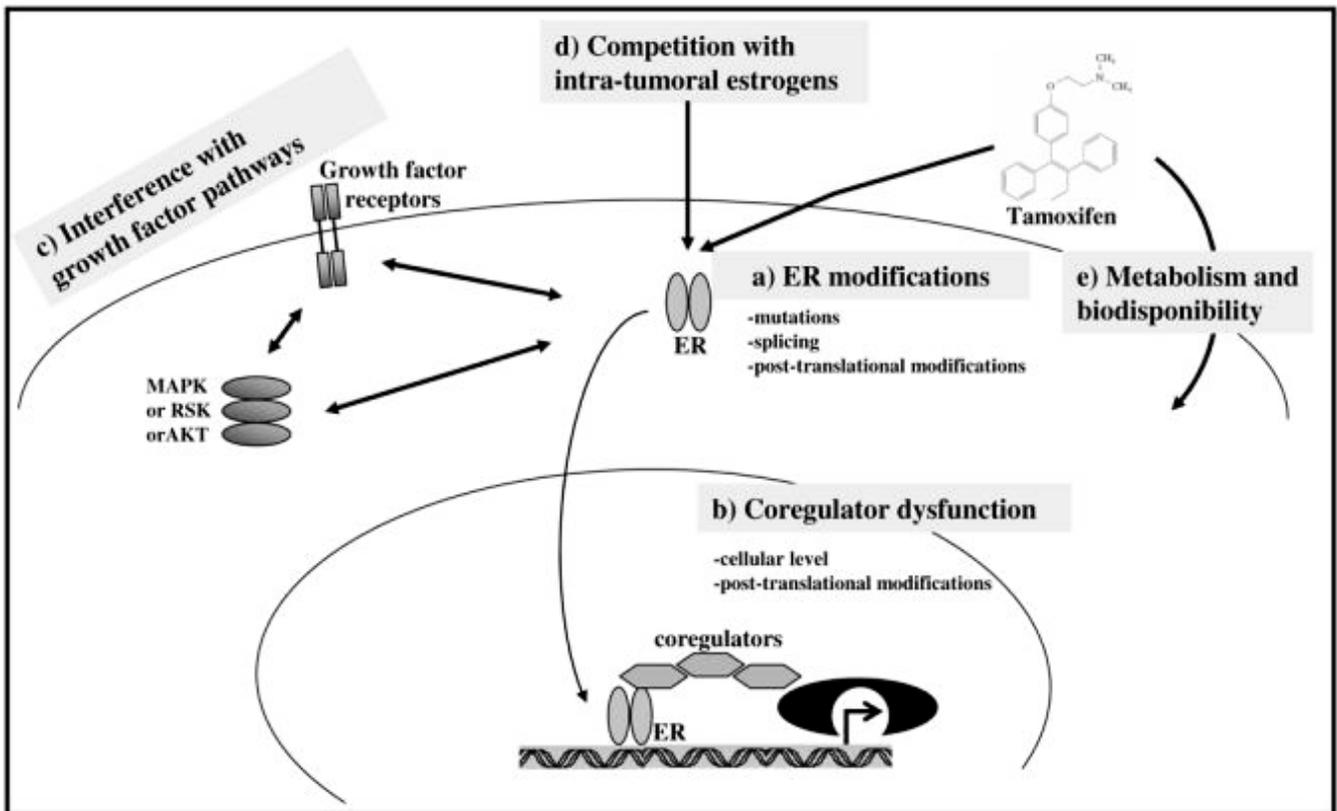


Figure 19: Mécanismes de résistance appliqués par exemple au tamoxifène (Badia et al., 2007)

régulateurs de voies de signalisations activées par HER2, comme par exemple une mutation inhibitrice sur *PTEN*. En effet, une perte d'expression de *PTEN* est associée à une résistance au trastuzumab et à un risque de rechute important (Berns et al., 2007; Gallardo et al., 2012; Nagata et al., 2004; Ning et al., 2016; Pandolfi, 2004).

Par ailleurs, en plus de développer des résistances aux traitements, les cancers du sein peuvent aussi évoluer et se transformer en un autre sous-type comme par exemple le passage d'un sous-type HER2 à un sous-type triple négatif, qui est plus agressif et dépourvu de cibles thérapeutiques (Burnett et al., 2015). Une tumeur est un écosystème complexe constitué de plusieurs sous-populations cellulaires avec des phénotypes et des caractéristiques très hétérogènes. La caractérisation d'une tumeur se base principalement sur la ou les populations cellulaires majoritairement représentées dans la tumeur. Ainsi, la mise en place d'une thérapie sera en accord avec cette/ces sous-populations mais pas forcément avec les autres sous-populations tumorales minoritaires qui elles pourront se maintenir, voire même, en absence de la première sous-population et/ou sous l'effet de la thérapie, se développer, proliférer et former une nouvelle tumeur. Ainsi, une sous-population minoritaire de

cellules souche cancéreuses (*figure20*), résistantes à la chimiothérapie et exprimant des propriétés très similaires à celles des cellules souches mammaires normales a été identifiée et son rôle dans le développement et les rechutes de cancers du sein est largement envisagé (Fillmore and Kuperwasser, 2007; Reya et al., 2001; Tanei et al., 2009).

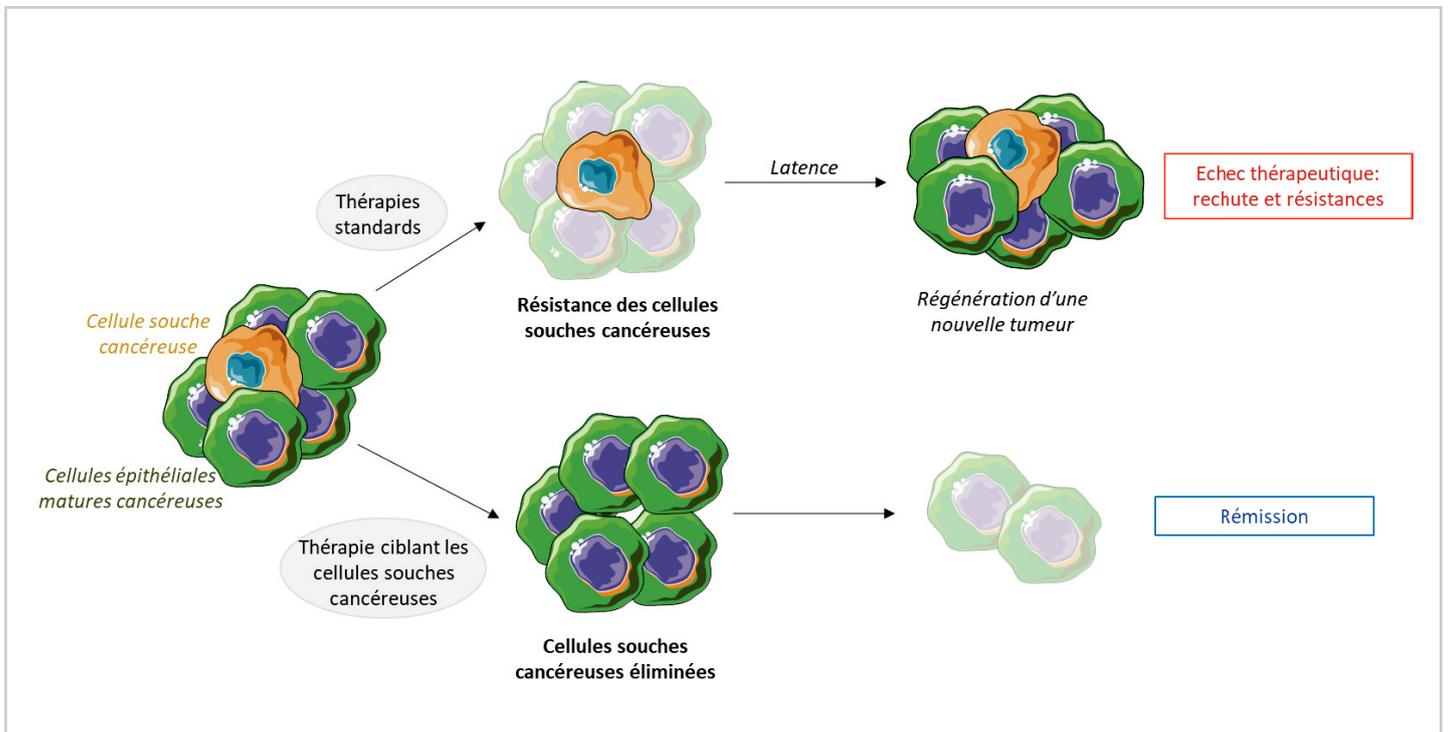


Figure 20: Concept de cellules souches cancéreuses appliqué à la thérapie. (d'après Reya et al., 2001)

## 2. Notion de cellules souches cancéreuses

Le concept de cellule souche cancéreuse a émergé dans les années 90 avec leur identification dans le modèle hématopoïétique de la Leucémie Aiguë Myéloïde (Lapidot et al., 1994), puis a été étendu au cancer du sein dans les années 2000 (Al-Hajj et al., 2003). A partir de la greffe, dans le coussin adipeux d'une souris immunodéficiente, d'un très faible nombre de cellules humaines issues d'une fraction cellulaire représentant 2% de la tumeur globale et caractérisées par les marqueurs souches Lin-CD44+CD24, Al-Hajj et al. ont observé que ces cellules étaient capables de reformer une tumeur hétérogène identique à la tumeur d'origine issue de la patiente, et ceci même après plusieurs cycles de greffe. L'origine de ces cellules souches cancéreuses est encore discutée mais deux hypothèses ont été avancées. La première envisage une transformation de cellules souches normales suite à des dommages génétiques ou épigénétiques (Morel et al., 2008) ou à des modifications dans son microenvironnement (Chapellier et al., 2015; Li and Neaves, 2006) conduisant alors à une dérégulation dans des voies de signalisation clés impliquées dans la tumorigenèse. Cette hypothèse est confortée

par l'exemple de la Leucémie Myéloïde Chronique, causée par l'expression d'une protéine de fusion BCR-ABL dans les cellules immatures qui conduit à un blocage de la différenciation et à une accumulation de ces cellules immatures. La seconde hypothèse envisage des mécanismes de dédifférenciation à partir de cellules transformées différenciées qui pourraient réacquérir des propriétés et des marqueurs de cellules souches (*figure21*) (Bjerkvig et al., 2005). Les cellules souches cancéreuses ont avec les cellules souches normales de nombreuses caractéristiques en commun, qui peuvent être favorables au développement et au maintien de la tumeur. Ainsi, la multipotence peut avoir pour conséquence l'hétérogénéité tumorale, la quiescence peut être à l'origine de la résistance à certains traitements antimitotiques et l'auto-renouvellement peut être la cause d'un maintien de cellules souches cancéreuses dans l'organisme et donc conduire à des rechutes plusieurs années après un traitement. De plus, l'expression membranaire de pompes à efflux peut conduire à des résistances à certains traitements. Enfin, une forte expression de molécules d'adhésion ou de facteurs de l'EMT va souvent être liée à une résistance aux traitements anti-cancéreux et favoriser l'invasion des cellules tumorales et l'apparition de métastases (Theodoropoulos et al., 2010). De ce fait, les cellules souches cancéreuses sont un réel obstacle au traitement des cancers du sein et certaines thérapies actuelles tentent de les viser, notamment via des stratégies de différenciation en visant leur microenvironnement qui confère une niche favorable à leur survie (Li and Neaves, 2006).

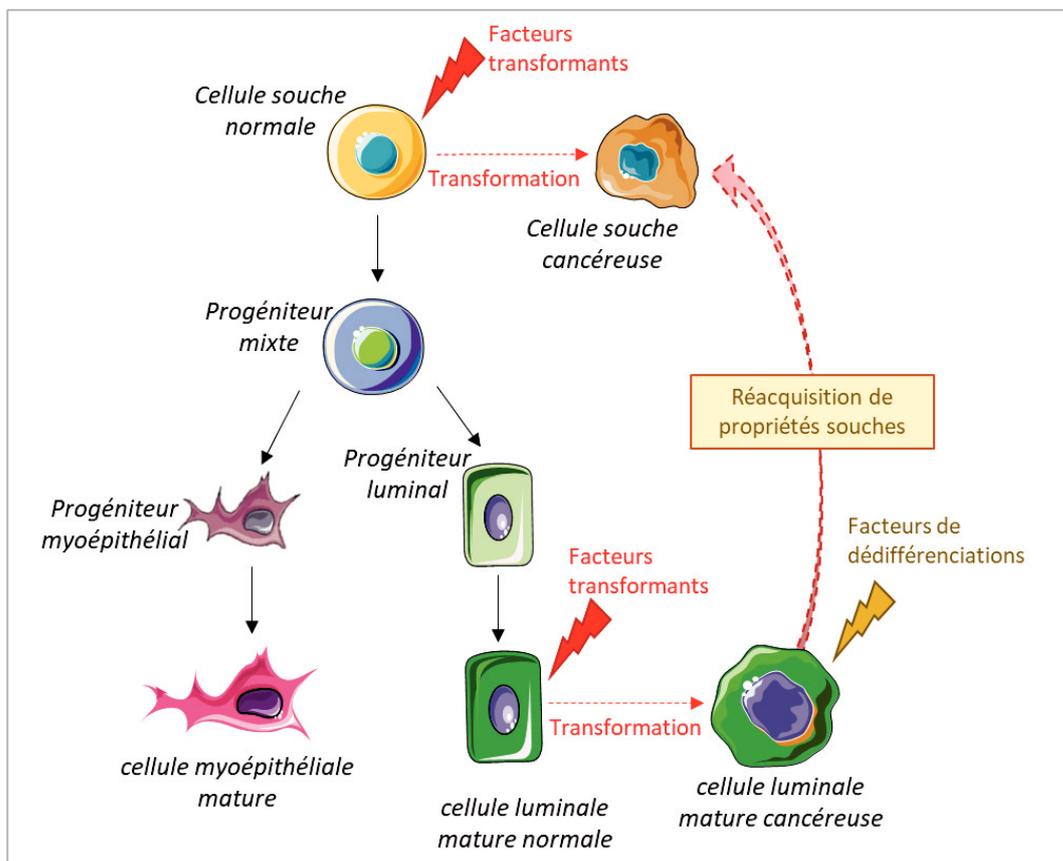


Figure 21: Hypothèses sur l'origine des cellules souches cancéreuses mammaires

### 3. Métastases

Malgré les améliorations dans l'efficacité des traitements et dans la caractérisation des cancers du sein, certains sous-types de tumeurs restent actuellement de mauvais pronostic faute de traitements ciblés et à cause du statut agressif de la tumeur. C'est le cas de la plus grande majorité des cancers du sein « triple négatifs » et notamment ceux du sous-type « claudin-low » dont les cellules cancéreuses présentent des caractéristiques de transition épithélio-mésenchymateuse et de cellules souches (Prat et al., 2010). Le développement de métastases est la cause principale de mortalité liée au cancer du sein. En effet, la présence de métastase est critique et le pronostic chute drastiquement avec un taux de survie à 5 ans passant de 80% à 20% environ. Les sites préférentiels de métastases dans le cas des cancers du sein sont les os, le foie, le cerveau et les poumons. La dissémination métastatique nécessite plusieurs étapes facilitées par l'expression et la libération de différents facteurs aussi bien par les cellules tumorales que par les cellules du micro-environnement (Katt et al., 2018). L'une des premières étapes est le détachement des cellules et leur invasion dans la matrice extra-cellulaire, permit par le mécanisme de l'EMT et la sécrétion de métalloprotéinases. L'étape suivante est l'étape d'intravasation où les cellules vont entrer dans la circulation et vont devoir y survivre, puis l'étape d'extravasation, où les cellules tumorales quittent la circulation pour s'établir au niveau du site métastatique. Une fois dans le nouveau tissu, la formation d'une métastase nécessitera la survie et la prolifération de ces cellules métastatiques (*figure 22*) (Gómez-Cuadrado et al., 2017). Certaines études ont montré que la chimiothérapie pouvait avoir un rôle dans les rechutes et le développement de métastases, notamment par la mise en place de niches pro-métastatiques et la libération de cytokines et de facteurs angiogéniques qui favoriseraient la survie, la migration et l'induction de l'EMT (D'Alterio et al., 2020; Liu et al., 2015a). En effet, comme décrit précédemment, la chimiothérapie est un traitement systémique qui va agir sur les cellules cancéreuses mais également sur les autres organes et cellules saines, dont celles du microenvironnement. Suite à une chimiothérapie néoadjuvante, les cellules cancéreuses pouvaient libérer des vésicules extracellulaires circulantes conduisant à la formation d'une niche pré-métastatique via l'activation de cellules endothéliales qui augmentent alors leur expression de facteurs chimio-attractant tel que CCL2 (Keklikoglou et al., 2019). De plus, une population spécifique de monocytes inflammatoires est recrutée, aussi bien au site tumoral suite à la destruction des cellules cancéreuses par la chimiothérapie qu'au site pré-métastatique via l'expression du récepteur à CCL2 : CCR2, et favoriserait le processus d'extravasation grâce à la libération de VEGFA (D'Alterio et al., 2020; Kitamura et al., 2015; Qian et al., 2011).

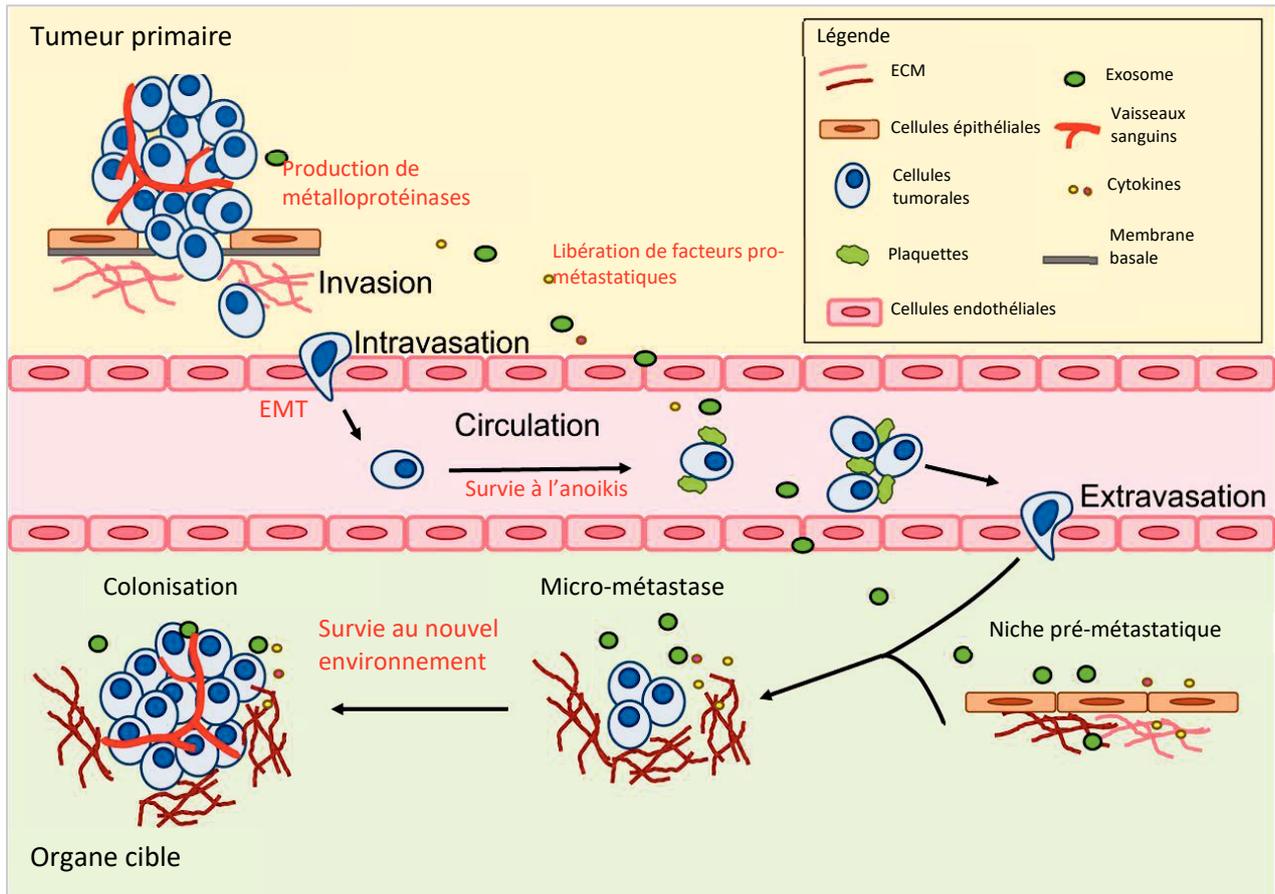


Figure 22: Les différentes étapes permettant un développement de métastases. (Adapté de (Gómez-Cuadrado et al., 2017))

## Chapitre 3: les œstrogènes et les récepteurs aux œstrogènes

### A. Les œstrogènes

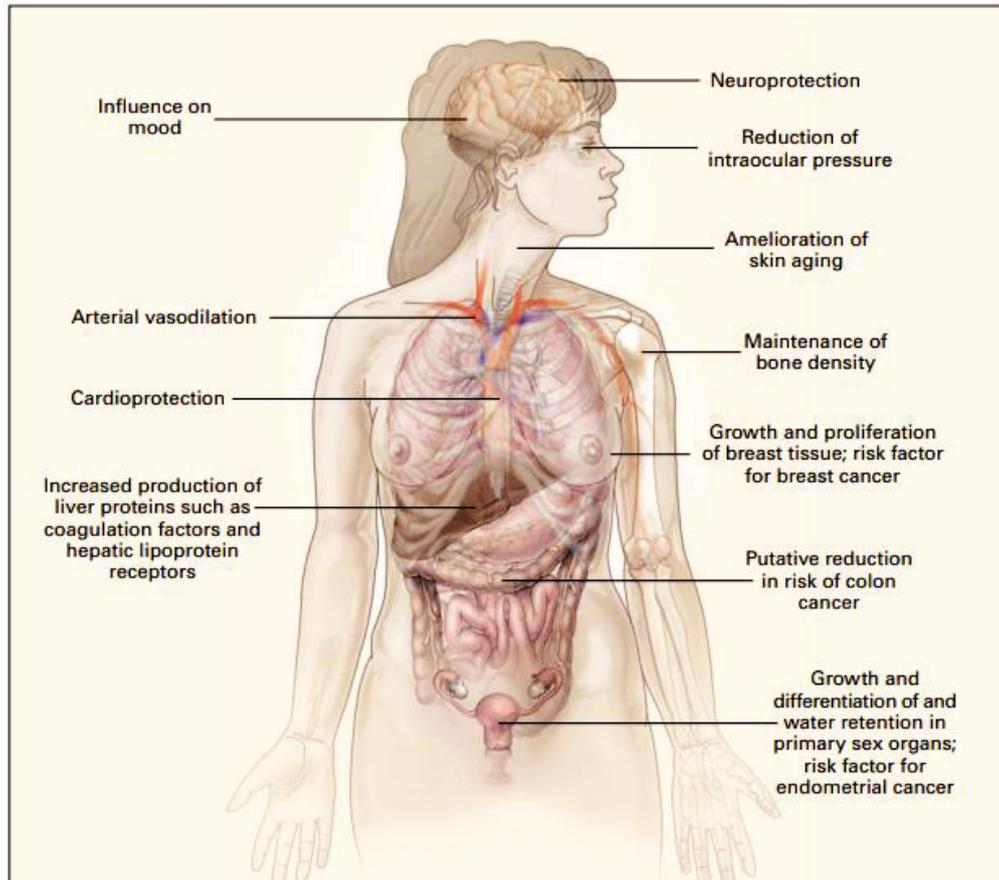
#### 1. Physiologie des œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones sexuelles majeures chez la femme, impliquée dans de nombreux processus biologiques, tels que le développement des caractères sexuels secondaires (Carpenter and Korach, 2006) dont celui de la glande mammaire (précédemment décrit dans le chapitre 1) ou la régulation du cycle menstruel. Les œstrogènes jouent également un rôle important dans l'homéostasie tissulaire et le métabolisme d'autres organes, avec notamment une action sur le métabolisme des lipides et glucides ainsi que sur les os, la peau, le foie, le système cardio-vasculaire et le système nerveux central (*figure23*) (Gruber et al., 2002; Jia et al., 2015; Lee et al., 2012). En plus de ces fonctions biologiques dans l'organisme, les œstrogènes sont impliqués dans diverses pathologies en cas de dérégulations ou de déficit. Un déficit en œstrogènes entrainerait des maladies cardiovasculaires (Hamilton et al., 2016), un risque accru d'Alzheimer (Yue et al., 2005) ainsi que de l'ostéoporose et une réorganisation de la localisation des lipides, qui peuvent être observés à la ménopause (Stevenson, 2011). A l'inverse, du fait de son effet pro-prolifératif, les œstrogènes sont également impliqués dans l'apparition de tumeurs mammaire (précédemment décrit dans le chapitre 2 et prochainement détaillé dans la suite) et de l'endomètre.

#### 2. Biosynthèse et métabolisme

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes lipophiles dérivées du cholestérol et sont synthétisées majoritairement par les ovaires mais aussi, en plus faible proportion par la glande mammaire, le foie, le tissu adipeux et le cortex surrénalien. Elles sont composées d'un squelette de 4 cycles aromatiques et existe sous trois formes différentes principales : l'œstrone (E1), le 17 $\beta$ -œstradiol (E2), et l'œstriol (E3) (Samavat and Kurzer, 2015). Chez la femme non gestante, l'E2 est la forme majoritaire obtenue par aromatisation de la testostérone et est sécrétée par les ovaires de manière croissante au cours de la phase folliculaire afin de préparer l'endomètre pour une éventuelle nidation. Durant la grossesse, la production d'œstrogène majeure est l'E3 par le placenta. Au moment de la ménopause, le cycle ovarien est arrêté, conduisant à un arrêt de la sécrétion d'œstrogènes par les ovaires. De ce fait, la source d'œstrogènes sera alors issue des autres organes producteurs et se fera sous la forme de E1.

A



B

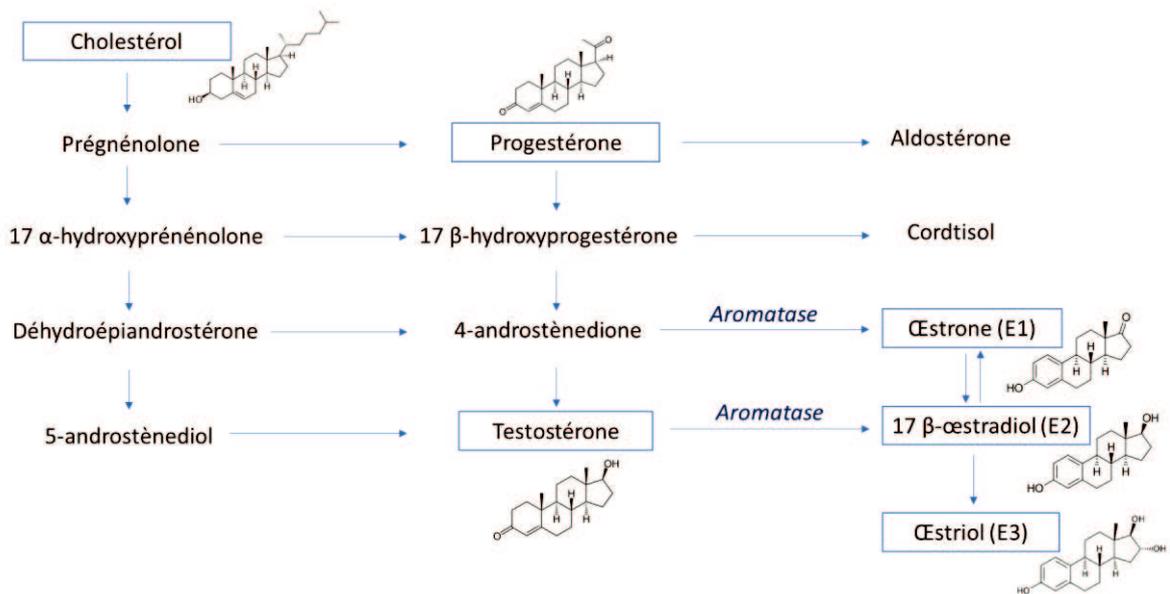


Figure 23: a) Rôles physiologiques et pathologiques des œstrogènes dans l'ensemble du corps humain (Gruber et al., 2002). b) Biosynthèse des œstrogènes (d'après Fontaine, 2014)

Les œstrogènes sont synthétisées par une succession d'étapes enzymatiques dont la première est un clivage du cholestérol pour former la prégnénolone qui sera par la suite convertie en progestérone puis en testostérone. L'étape finale est une étape d'aromatisation catalysée par un complexe enzymatique comprenant le cytochrome P450.

### B. Récepteurs aux œstrogènes (ER)

Une fois les œstrogènes synthétisées, ces hormones vont circuler dans le sang pour rejoindre ses tissus cibles et agir sur les cellules via leur récepteur : le récepteur aux œstrogènes (ER). Plusieurs types et sous type de ce récepteur existent dont ER $\alpha$ 66 et ses isoformes ER $\alpha$ 46 et ER $\alpha$ 36, ER $\beta$ , ainsi que le récepteur membranaire aux œstrogènes couplé aux protéines G (GPER), qui seront décrits dans cette partie (figure 24). Excepté GPER, ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires de type 1 même si à l'état basal ils sont retrouvés hors du noyau (source : uniprot). Outre les œstrogènes naturels, d'autres ligands synthétiques ou non peuvent interagir avec les récepteurs aux œstrogènes, comme par exemple le BPA, dont l'action sera détaillée dans le chapitre 4, ou le tamoxifène.

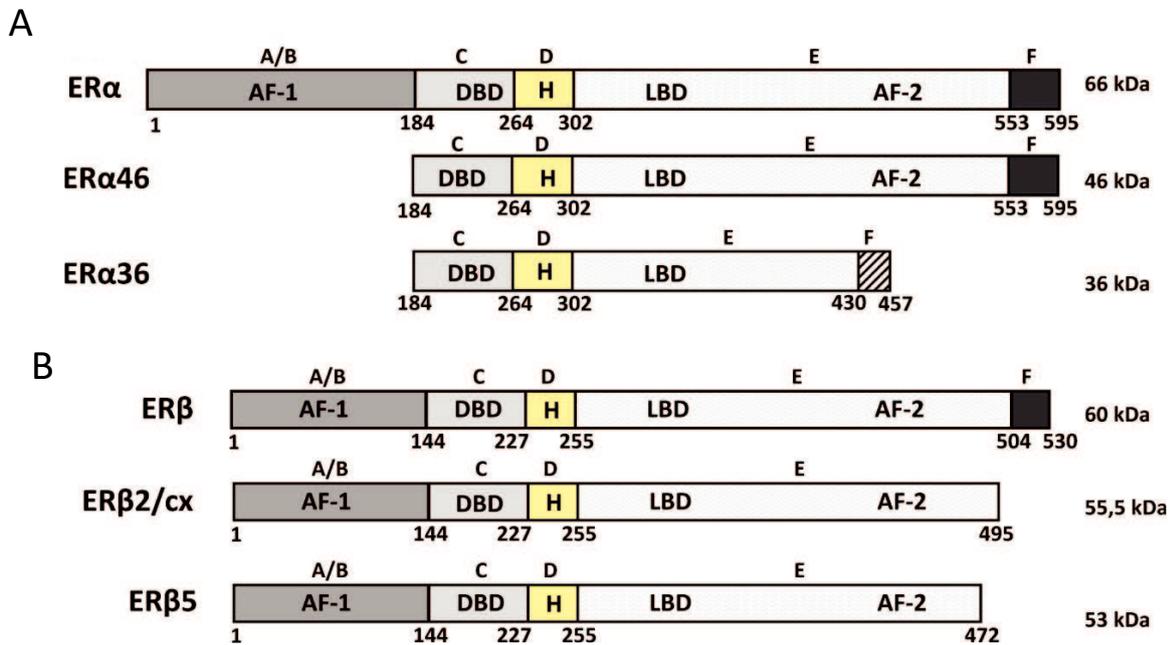


Figure 24: Les différentes isoformes protéiques du récepteur aux œstrogènes alpha (a) et bêta (b). (Le Romancer et al., 2011)

## 1. ER $\alpha$ 66 (ER $\alpha$ )

Ce récepteur est le premier à avoir été identifié puis cloné dans les années 80 (Greene et al., 1986). À la suite de l'identification d'un autre récepteur aux œstrogènes, ce premier récepteur a été nommé ER $\alpha$  et le second ER $\beta$  (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996).

### a. Structure du gène et de la protéine

Le gène codant pour ER $\alpha$  est localisé sur le chromosome 6 (6q25.1) et est appelé *ESR1*. Il comporte 9 exons, dont le 9<sup>ème</sup> a récemment été découvert et n'est pas codant, et 8 introns pour une taille de 140 kb (Chamkasem and Toniti, 2015; Ponglikitmongkol et al., 1988; Wang et al., 2005). Il présente de multiples promoteurs activés différemment en fonction du contexte et du tissu. Un changement de promoteur est observé entre les cellules de la glande mammaire saine et celles cancéreuses (Kos et al., 2001; Reid et al., 2002). *ESR1* code une protéine de 66 kDa composée de 595 acides aminés (Reid et al., 2002). Comme la plupart des récepteurs nucléaires, ER $\alpha$  est un facteur de transcription qui va agir au niveau de l'ADN après fixation de son ligand mais il peut également agir par des voies non génomiques. Ces voies de signalisations seront décrites ultérieurement. Il possède 4 domaines : A/B, C, D et E/F de l'extrémité amino-terminale vers la carboxy-terminale (*figure 25*) (Heldring et al., 2007; Kumar et al., 2011). Dans le domaine A/B, on trouve le domaine de transactivation ligand-indépendant AF-1 (*Activation Function 1*) dont l'activité peut être indépendante de la fixation du ligand. Le domaine C comprend le DBD (*DNA Binding Domain*) constitué par une structure en double doigts de zinc permettant d'une part la reconnaissance et la liaison à l'ADN au niveau des séquences spécifiques ERE (*Estrogen Responsive Elements*) via le premier doigt de zinc qui constitue la boîte proximale P (P-box), et d'autre part l'homo- ou l'hétérodimérisation du récepteur grâce à la boîte distale D (D-box) formée par le 2<sup>ème</sup> doigt de zinc (Aranda and Pascual, 2001; Kumar and Thompson, 1999; Ponglikitmongkol et al., 1988). Le domaine D est une région charnière très flexible permettant des changements de conformation du récepteur. ER $\alpha$ 66 possède des séquences de translocations nucléaires (NLS) qui, à la suite de la fixation du ligand, vont être révélées pour permettre la translocation dans le noyau. Le domaine E/F porte les régions responsables de la liaison au ligand hydrophobe (LDB pour *Ligand Binding Domain*) et de la transactivation ligand-dépendante AF-2 (Bourguet et al., 2000).

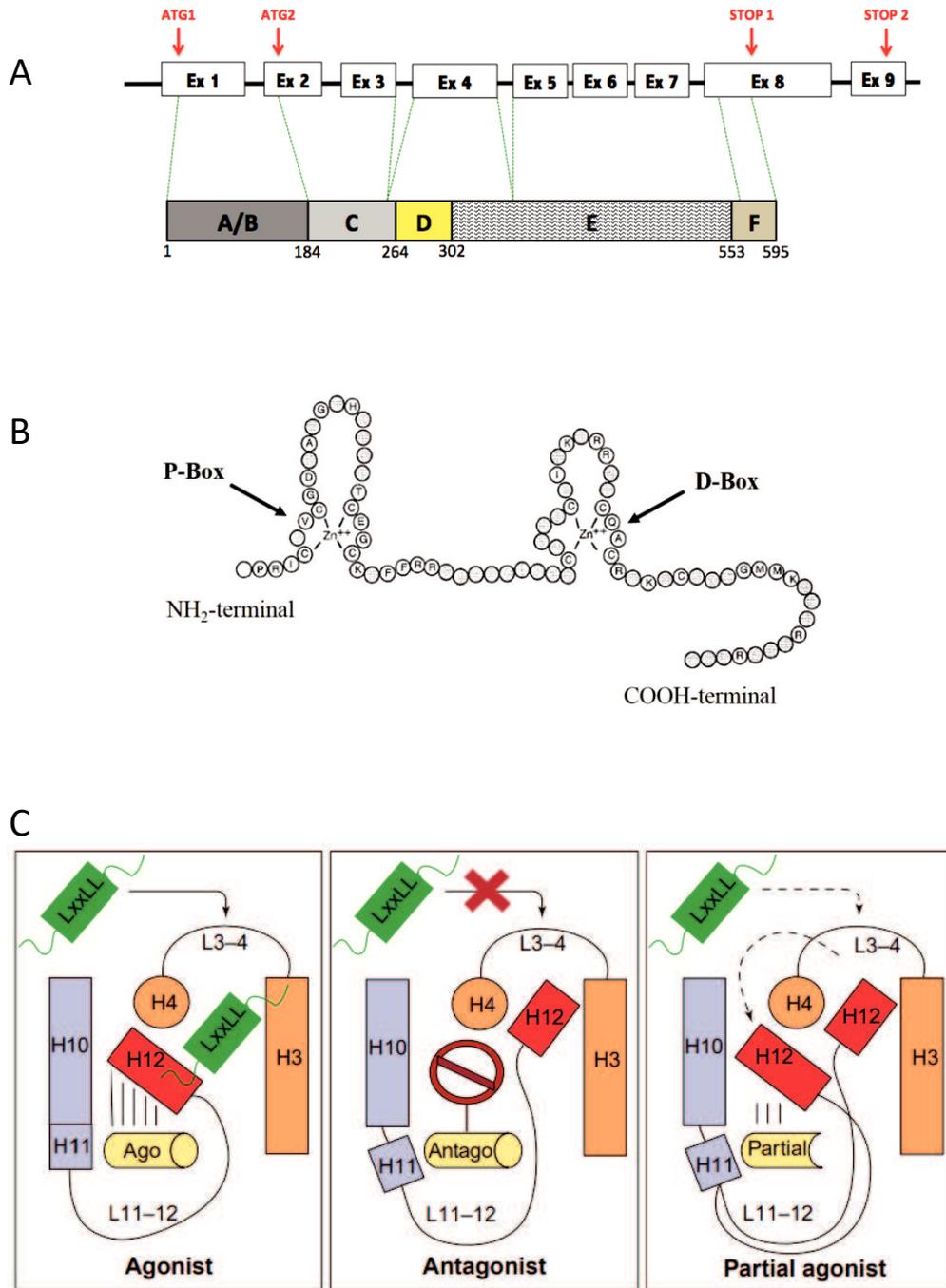


Figure 25: a) Structure du gène ESR1 codant pour la protéine ERα66, composée de 4 domaines dont le domaine C qui contient le DBD, formé par deux structures en doigt de zinc (b) (Aranda and Pascual, 2001). c) Conformation de ERα66 en fonction de la nature du ligand (Bourguet et al., 2000).

### *b. Implication dans les cancers du sein*

ER $\alpha$ 66 est impliqué dans le développement normal de la glande mammaire comme ceci a été présenté dans le chapitre 1. Cependant il a aussi été démontré qu'il jouait un rôle crucial dans la tumorigenèse mammaire suite à sa dérégulation, qui favorise l'expression d'un grand nombre de protéines oncogéniques comme la cycline D1 et c-Myc ainsi que l'inhibition de facteurs impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire tel que la protéine P21, conduisant à une prolifération non contrôlée des cellules (Cariou et al., 2000; Wong et al., 2001). Par ailleurs des modifications post-traductionnelles d'ER $\alpha$ 66 influencent la tumorigenèse mammaire et la résistance aux traitements, et notamment au tamoxifène (Le Romancer et al., 2011; Tecalco-Cruz and Ramírez-Jarquín, 2018; Yang et al., 2018).

### 2. ER $\alpha$ 46

Comme ER $\alpha$ 66, cette isoforme ER $\alpha$ 46 est transcrite à partir du même gène *ESR1* mais via un promoteur alternatif situé sur l'exon 2. Cela conduit à la synthèse d'une protéine de 46 kDa identifiée initialement dans des cellules d'une tumeur mammaire (Trivedi et al., 1996). Du fait de sa transcription et de sa traduction à partir de l'exon 2, cette protéine est tronquée de 173 acides aminés dans sa partie N-terminale et ne possède donc pas le domaine AF-1, mais dispose de l'ensemble des autres domaines (DBD, LBD, AF-2) décrits dans le paragraphe précédent. L'épissage alternatif conduisant à la synthèse de ce variant pourrait être dû à l'action de l'oncoprotéine HMGA1a qui conduit à l'augmentation de l'expression de l'ARNm de ER $\alpha$ 46 dans les lignées cancéreuses mammaires MCF7 (Ohe et al., 2018). Peu de données existent concernant son implication dans le développement de la glande mammaire normale ou dans les cancers du sein. Dans une cohorte de tumeurs mammaires ER $\alpha$ -positives, ER $\alpha$ 46 est exprimée dans 70% des échantillons mais est prédominante par rapport à ER $\alpha$ 66 dans seulement 10%. Par ailleurs, il semblerait que l'expression de ER $\alpha$ 46 soit associée à un faible grade et inversement corrélée à la taille de la tumeur (Chantalat et al., 2016). Quelques études suggèrent que ER $\alpha$ 46 pourrait inhiber la prolifération des cellules tumorales. En effet, ER $\alpha$ 46 contrebalance la prolifération induite par l'activation de ER $\alpha$ 66 par les œstrogènes en provoquant un arrêt du cycle en phase G0/G1, inhibition proportionnelle à l'expression de ER $\alpha$ 46 (Chantalat et al., 2016; Flouriot et al., 2000; Penot et al., 2005). Dans le contexte de la résistance au tamoxifène, restaurer l'expression d'ER $\alpha$ 46 resensibilise les cellules au tamoxifène et induit une diminution de leur prolifération (Klinge et al., 2010).

### 3. ER $\alpha$ 36

#### a. Structure et de la protéine et régulation de son expression

Ceci fait une quinzaine d'années que cette isoforme a été mise en évidence (Wang et al., 2005). Tout comme ER $\alpha$ 66 et ER $\alpha$ 46, cette isoforme est transcrite à partir du gène *ESR1* mais via un promoteur différent, situé dans un exon récemment découvert qui est localisé dans le premier intron (si on considère l'organisation exon/intron du transcrit codant ER $\alpha$ 66) et a été nommé exon 1'. Plusieurs co-régulateurs de l'expression transcriptionnelle de ER $\alpha$ 36 ont été décrits tels que ER $\alpha$ 66 et WT1 qui seraient répresseurs et EGFR, HER2 ou BMP2 qui eux réguleraient positivement sa transcription (Kang et al., 2011a, 2011b; Rao et al., 2011; Wang et al., 2012, 2005; Yin et al., 2014). Outre son promoteur différent, ER $\alpha$ 36 va également subir un épissage alternatif conduisant à l'absence des exons 7 et 8 et à la présence de l'exon 9 qui est absent dans ER $\alpha$ 66 et ER $\alpha$ 46 (*figure 26*). ER $\alpha$ 36 peut être régulé positivement ou négativement par des facteurs épigénétiques et des petits ARNs non codants (miRNA). Plusieurs sites de fixations de miRNA dans sa région 3'-UTR ont été décrits. On retrouve comme miRNA par exemple hsa-miR-136-5p dont l'expression est inversement corrélée à celle de ER $\alpha$ 36. Par ailleurs, quatre îlots CpG présents dans son promoteur ont été décrits pour pouvoir être méthylés conduisant alors à une augmentation de l'expression de ER $\alpha$ 36, expression diminuée en revanche après déméthylation de ces sites CpG par un agent déméthylant (Thiebaut et al., 2019). L'initiation de la traduction va se faire à partir de l'exon 2, conduisant comme pour ER $\alpha$ 46 à une extrémité aminoterminal dépourvue du domaine AF-1 (Su et al., 2014; Wang and Yin, 2015). De plus, contrairement aux deux autres récepteurs aux œstrogènes, ER $\alpha$ 36 est également dépourvu du domaine AF-2 et seule une petite partie du domaine LBD est conservée, conduisant à une poche de fixation du ligand plus ouverte que celle de ER $\alpha$ , ce qui pourrait contribuer à un spectre de fixation de ligands plus large (Wang and Yin, 2015). Par ailleurs, à la place des acides aminés codés par les exons 7 et 8, il possède une séquence protéique unique de 27 acides aminés au niveau du domaine carboxy-terminal (Le Romancer et al., 2011; Wang et al., 2005). A l'inverse de ER $\alpha$ 66 qui est majoritairement nucléaire, ER $\alpha$ 36 est localisé principalement dans le cytoplasme (40%) et à la membrane plasmique (50%) et très peu dans le noyau (10%) (Lee et al., 2008b; Su et al., 2014; Wang and Yin, 2015; Wang et al., 2006). Plusieurs mécanismes pourraient contribuer à sa localisation extranucléaire, comme la présence de 3 sites de myristoylation (modification post-traductionnelle permettant l'ancrage de protéines à la membrane plasmique) (Wang et al., 2005), une interaction avec la protéine GP96 qui semblerait lui conférer sa localisation membranaire (Hou et al., 2015), ainsi qu'une co-localisation avec la protéine membranaire

cavéoline-1 (Lin et al., 2010a). De plus, la séquence spécifique de 27 acides aminés, riche en leucine, contiendrait un signal d'export nucléaire (NES) (Omarjee et al., 2017; Stommel et al., 1999). Du fait de sa localisation extranucléaire, ER $\alpha$ 36 va induire une signalisation cellulaire non génomique, qui sera décrite dans la partie 6.

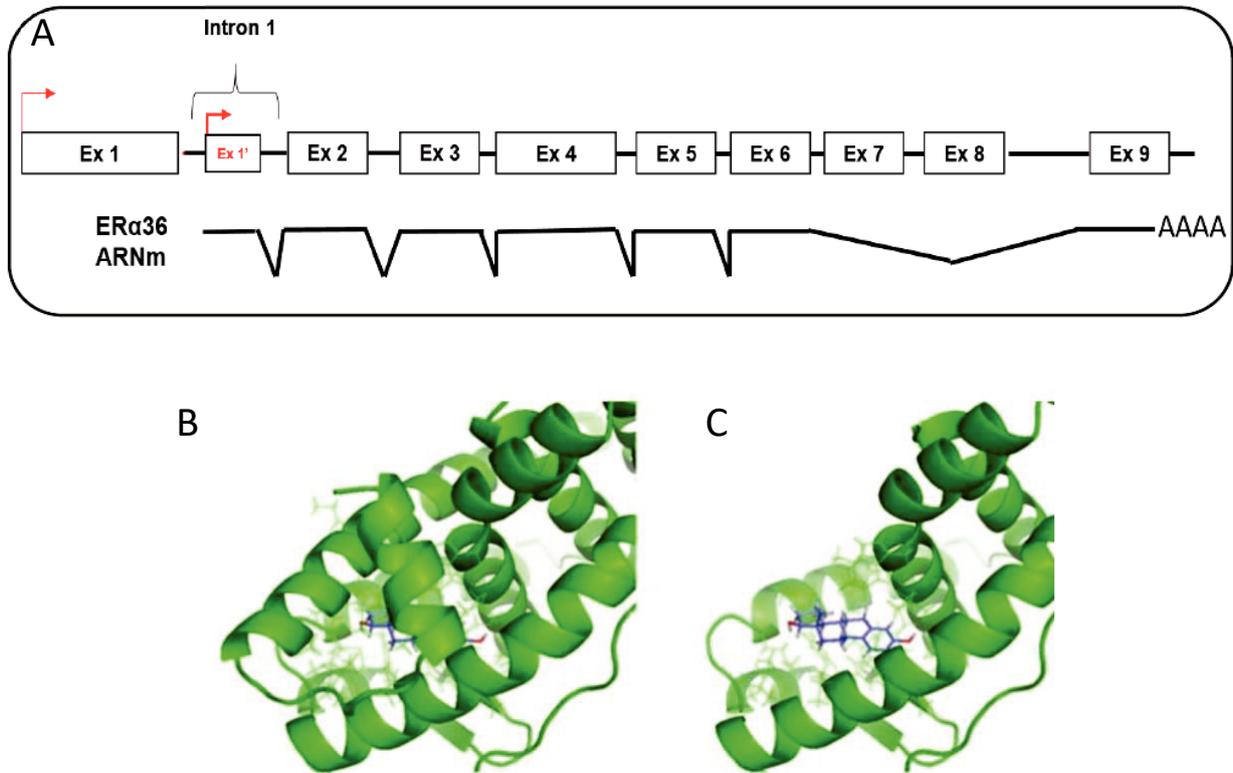


Figure 26: a) Structure du gène ESR1 et de son ARN messager codant pour la protéine ER $\alpha$ 36. (adapté de Wang et al., 2005). Structure tridimensionnelle théorique de la poche de liaison au ligand de ER $\alpha$ 66 (b) et de ER $\alpha$ 36 (c) (Kang et al., 2010).

#### b. Implication dans les cancers du sein

Le rôle et l'expression de ER $\alpha$ 36 dans la glande mammaire normale sont très peu connus à ce jour. Cependant, sa surexpression dans une lignée de progéniteurs bipotents non transformés mais immortalisés (MCF10A) et dans des modèles *in vivo*, conduisait à une résistance à l'apoptose et à une transformation cellulaire (Thiebaut et al., 2017). En revanche, son implication dans les cancers, dont celui du sein, a été un peu plus étudiée. Chez des patientes porteuses de cancers du sein, l'expression d'ER $\alpha$ 36 est associée à un taux de survie plus faible ainsi qu'à un risque de résistance aux traitements plus élevé. ER $\alpha$ 36 peut être exprimé aussi bien dans les tumeurs du sein au statut ER négatif (50%) que pour celles ER positif (50%) (Lee et al., 2008b; Wang and Yin, 2015). Ceci est problématique puisque

l'un des principaux traitements pour les cancers du sein ER positifs est l'hormonothérapie et plus particulièrement le tamoxifène, qui a une action d'agoniste sur ER $\alpha$ 36 (Shi et al., 2009; Wang et al., 2018, 2006). Cette action différente du tamoxifène observée entre ER $\alpha$ 66 et ER $\alpha$ 36 pourrait être expliquée par la configuration de sa poche de fixation des ligands, qui est plus ouverte dans le cas d'ER $\alpha$ 36, et donc potentiellement plus permissive (Wang and Yin, 2015). De plus, puisque la classification ER repose uniquement sur l'expression nucléaire de ER $\alpha$ 66, ER $\alpha$ 36 n'est pas recherché au moment de la classification de la tumeur, conduisant alors à l'utilisation du tamoxifène dans le cas de cancers hormono-dépendants pouvant quand même être positif pour ER $\alpha$ 36. Cela pourrait conduire à une résistance au traitement, en effet, des études cliniques ont mis en évidence que l'expression d'ER $\alpha$ 36 était associée à un faible taux de survie chez les patientes atteintes d'un cancer ER-positif et traitées avec du tamoxifène (Shi et al., 2009). Par ailleurs, une boucle de régulation positive ER $\alpha$ 36/HER2 a été décrite et contribuerait également à cette résistance au tamoxifène (Yin et al., 2014, 2015). De plus, l'activation du complexe pro-tumoral EGFR/HER2/ERK par ER $\alpha$ 36 a également été retrouvée dans les cancers du sein ER $\alpha$ 66-négatif et impliquée dans une résistance à la chimiothérapie (Zhu et al., 2018). Outre un rôle dans la résistance à différents traitements, ER $\alpha$ 36 favorise le développement et la progression tumorale, ainsi que son agressivité, en agissant sur la prolifération et la survie cellulaire, notamment grâce à l'activation de la Cycline D1, à la transcription de l'oncogène c-Myc et à l'activation de la voie des sphingolipides SphK1/S1P impliquée dans la survie cellulaire (Guo et al., 2013a; Maczys et al., 2018; Omarjee et al., 2017), mais aussi en agissant sur la signalisation apoptotique et sur la migration. En effet, ER $\alpha$ 36 induit l'expression de facteurs métastatiques et de l'EMT tels que Snail1, CXCR4 et RANKL, associé à une perte de l'expression de l'E-Cadhérine dans des cellules de cancer du sein de type triple négatives (Chaudhri et al., 2012). Le rôle d'ER $\alpha$ 36 dans l'agressivité et le développement de métastases ne va pas se faire seulement via l'expression de ces facteurs de l'EMT mais également *via* une régulation positive des cellules souches cancéreuses et une augmentation de leur survie, médiée par la transcription et l'expression de l'ALDH1 et de la protéine kinase C (PKC) (Chaudhri et al., 2012; Deng et al., 2014; Kang et al., 2011a; Su et al., 2014; Wang et al., 2018).

Plusieurs molécules ont été décrites pour être des régulateurs négatifs d'ER $\alpha$ 36 dans des modèles de cellules cancéreuses. On retrouve par exemple le brousoflavonol B (5, 7, 3', 4'-tetrahydroxy-3-methoxy-6,8-diprenylflavone) est capable de réguler négativement le niveau protéique d'ER $\alpha$ 36 et d'inhiber la croissance des cellules MDA-MB-231, en entraînant un arrêt du cycle cellulaire mais aussi de sensibiliser les MCF7 au tamoxifène (Guo et al., 2013a, 2013b; Yin et al., 2015). Un autre régulateur négatif, la cyanidine-3-o-glucoside, est quant à elle capable de se lier directement à ER $\alpha$ 36 au niveau de son domaine LBD et d'entraîner l'apoptose (Wang et al., 2016). La découverte de ces molécules constitue donc une piste potentielle pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques

qui viseraient les actions oncogéniques d'ER $\alpha$ 36.

#### 4. ER $\beta$

Quelques années après la mise en évidence de ER $\alpha$ , une autre forme du récepteur aux œstrogènes a été découverte : ER $\beta$  (Haldosén et al., 2014; Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996). ER $\beta$  est codé par le gène *ESR2* présent sur le chromosome 14 (14q23.2) qui est composé de 8 exons et de 7 introns pour une taille de 61,2 kb. Par épissages alternatifs, ce gène va coder plusieurs autres variants (Hirata et al., 2001; Zhao et al., 2008). La traduction va aboutir à une protéine de 530 acides aminés. Comme ER $\alpha$  et la plupart des récepteurs nucléaires, ER $\beta$  possède les 4 domaines A/B, C, D et E/F (Haldosén et al., 2014; Kampa et al., 2013). Par ailleurs, il présente une très forte homologie avec ER $\alpha$ 66, surtout au niveau du DBD pour lequel l'homologie de séquence est de plus de 95%, et également avec les autres domaines (55% pour le LDB, 36% pour le domaine D et seulement 17% pour le domaine A/B) (Kumar et al., 2011; Zhao et al., 2008). Le domaine D est plus court chez ER $\beta$ , conduisant à une activité transcriptionnelle AF-1 réduite. Malgré une configuration proche entre les deux LBD, il est intéressant de noter que la poche de liaison au ligand est plus petite chez ER $\beta$  que chez ER $\alpha$ , modifiant ainsi l'affinité des différents ligands naturels ou synthétiques et les réponses cellulaires associées. Ainsi, certaines études suggèrent que ER $\beta$  jouerait un rôle suppresseur de tumeur dans les tumeurs mammaires (Jonsson et al., 2014; Lam et al., 2012; Thomas et al., 2012; Zhao et al., 2008) mais ce rôle n'est pas encore parfaitement établi et des controverses subsistent. En effet, d'autres études montrent son implication dans la prolifération cellulaire et la résistance au tamoxifène (Jonsson et al., 2014; Skliris et al., 2006).

#### 5. GPER (GPR30)

##### a. Structure du gène et de la protéine

Le récepteur des œstrogènes couplé aux protéines G est un récepteur membranaire qui appartient à la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G, il est localisé au niveau de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique ainsi que dans le noyau (Filardo et al., 2007; Revankar et al., 2005). Identifié en 1997 sous le nom de GPR30 et décrit comme un récepteur orphelin, il a ensuite été renommé GPER à la suite de plusieurs études qui ont montré son activation par les œstrogènes (Carmeci et al., 1997; Zimmerman et al., 2016). Ce récepteur fonctionne de manière indépendante à

ER $\alpha$  ou ER $\beta$ . GPER est codé par le gène *GPER1* situé sur le chromosome 7 (7p22.3), c'est une protéine de 375 acides aminés constituée de 7 domaines transmembranaires. Tout comme ER $\alpha$ 36, GPER va induire une signalisation non génomique à la suite de la fixation d'œstrogènes.

#### *b. Implication dans les cancers du sein*

GPER est exprimé dans environ 50 à 60% des cancers du sein, tout particulièrement dans les tumeurs triple négatives, avec une corrélation positive entre son expression et celle de HER2, la taille tumorale et la présence de métastases (Filardo et al., 2006; Hsu et al., 2019; Marjon et al., 2014; Steiman et al., 2013). De nombreuses études décrivent GPER comme un facteur pro-tumoral, agissant sur la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion mais également sur la résistance aux traitements (Filardo, 2018; Jacenik et al., 2016; Ohshiro et al., 2012). Comme pour ER $\alpha$ 36, le tamoxifène aurait une action agoniste sur GPER. Il a été montré que des cellules ER-positives résistantes au tamoxifène sont plus sensibles à l'E2 qui va induire un changement de localisation de GPER du réticulum endoplasmique à la membrane cytoplasmique (Ignatov et al., 2010; Mo et al., 2013). Cette relocalisation à la membrane va permettre la stimulation de la protéine kinase SRC aboutissant à la formation d'un complexe qui permettra la libération du ligand de l'EGFR, également localisé à la surface de la cellule. L'activation de l'EGFR entraîne alors l'activation de voies de signalisation MAPK/ERK et PI3K/Akt, conduisant alors à l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire comme les Cycline A et D1 et la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Filardo and Thomas, 2005; Quinn et al., 2009; Yu et al., 2014) GPER favorise le développement tumoral également *via* le microenvironnement cellulaire. En effet, en plus d'être présent dans les cellules cancéreuses, GPER est exprimée dans les cellules stromales de type CAF (*Cancer-Associated Fibroblasts*). Ainsi, l'activation de GPER dans ces cellules conduit à leur prolifération et leur migration ainsi qu'à une augmentation de la production d'E2. D'autres facteurs vont également être produits tels que le facteur d'hypoxie HIF1 $\alpha$ , VEGF et des acides gras qui vont agir comme des métabolites oncogéniques (De Francesco et al., 2014; Santolla et al., 2012) et promouvoir la progression tumorale. Ainsi, le rôle pro-tumoral de GPER a été largement décrit, cependant, d'autres études rapportent à l'inverse un rôle anti-prolifératif et pro-apoptotique de GPER, le définissant comme un suppresseur de tumeur (Ariazi et al., 2010; Broselid et al., 2013; Poola et al., 2008; Weißenborn et al., 2014). Cette controverse pourrait être expliquée par le type cellulaire utilisé et notamment le statut des différents ER et de p53 dans ces cellules mais aussi par la localisation de GPER dans la cellule (Samartzis et al., 2014) . En effet, une expression cytoplasmique serait plutôt associée à des tumeurs de stades faibles, plus différenciées et présentant une meilleure survie globale, tandis que son expression nucléaire serait associée à un état peu différencié et à des

tumeurs de sous-type triple négatif. Par ailleurs, l'activation de GPER activerait deux signalisations opposées, l'une pro-tumorale passant par EGFR/MAPK/ERK, décrite précédemment, et l'autre passant par cAMP/PKA qui inhiberait l'activation de ERK (Filardo et al., 2002). Il a également été décrit pour inhiber l'EMT, l'angiogenèse et la migration via la voie NFκB (Chen et al., 2016; Liang et al., 2017; Okamoto and Mizukami, 2016).

## 6. Estrogen-related receptors (ERR)

La famille des Estrogen-Related receptors qui compte trois membres (ERR $\alpha$ , ERR $\beta$  et ERR $\gamma$ , codés respectivement par les gènes ESSRA, ESSRB et ESSRG) a été identifiée sur la base de leur homologie de séquence avec ER $\alpha$  (Giguère et al., 1988). Ces trois protéines sont des récepteurs nucléaires orphelins, leur ligand endogène n'étant pas connu. Ce sont des facteurs de transcription partageant avec ER $\alpha$  de nombreux cofacteurs et gènes cibles et sont considérés comme capable d'interférer avec ce dernier (Cheung et al., 2005). Je ne décrirais pas ces différents récepteurs en détail mais dans le contexte de mon travail, il est intéressant de noter que le BPA a été décrit comme un ligand potentiel de ERR $\gamma$  à la fois dans des prédictions *in silico* et des tests d'interaction *in vitro* (Montes-Grajales and Olivero-Verbel, 2013; Tohmé et al., 2014) et que le BPA est capable d'induire la translocation nucléaire de ERR $\gamma$  (Yaguchi, 2019). Par ailleurs, ERR $\gamma$  peut interférer avec la différenciation ostéoblastique induite par BMP2 en inhibant l'activité transcriptionnelle de Runx2, un des gènes induits par BMP2 dans ce contexte (Jeong et al., 2009). Dans le cancer du sein, il a été montré que via ERR $\gamma$ , le BPA induisait la prolifération dans des lignées ER+ et HER2+ ainsi que la migration et l'invasion dans des lignées triple-négatives (Song et al., 2015; Zhang et al., 2016).

## 7. Connexion entre les différentes isoformes

Plusieurs études décrivent une régulation de ces différentes formes de récepteurs aux œstrogènes entre elles. Cependant, il semble que ce soit très tissu et contexte dépendant. L'initiation de la signalisation induite par ER $\alpha$ 66 nécessite sa dimérisation, soit sous forme d'homodimère soit sous forme d'hétérodimère avec ER $\beta$ . Ainsi une régulation négative par ER $\alpha$ 36 a été décrite qui jouerait un rôle de régulateur dominant négatif naturel pour l'activité génomique de ER $\alpha$ 66 et ER $\beta$ . En effet, il serait capable de former un hétérodimère avec ER $\alpha$ 66 et avec ER $\beta$ , inhibant alors la transactivation

médiée par leurs domaines AF-1 et AF-2 ou de se fixer sur des séquences ERE empêchant alors la fixation de ces deux récepteurs sur ces séquences (Wang and Yin, 2015; Wang et al., 2006). De plus il a également été suggéré que ER $\alpha$ 36 inhiberait la signalisation génomique de ER $\alpha$ 66 en le bloquant dans le cytosol (Wang and Yin, 2015). Outre une régulation négative de ER $\alpha$ 66 par ER $\alpha$ 36, ER $\alpha$ 46 est également capable de réprimer l'activité de ER $\alpha$ 66 (Flouriot et al., 2000; Klinge et al., 2010; Penot et al., 2005). À l'inverse, ER $\alpha$ 66 est quant à lui capable de réguler négativement ER $\alpha$ 36. En effet il semblerait que ER $\alpha$ 66 se fixe sur un ERE du promoteur de ER $\alpha$ 36 par son domaine ligand indépendant AF-1. Cependant cette inhibition est annulée en présence de ER $\alpha$ 46 de ER $\alpha$ 36 (Zou et al., 2009). D'autres études ont montré un lien entre ER $\alpha$ 36 et GPER. En effet une interaction physique a été décrite entre ces deux récepteurs à l'œstrogène (Wang and Yin, 2015). Par ailleurs, après un *knockdown* de GPER dans des cellules cancéreuses mammaires ER négatives, les auteurs observent une diminution de l'expression ER $\alpha$ 36. De plus une expression de GPER dans des cellules négatives pour ce variant entraîne une activation du promoteur de ER $\alpha$ 36 et son expression endogène (Kang et al., 2010).

### C. Signalisations

Les récepteurs aux œstrogènes vont activer plusieurs types de signalisation (*figure 27*) (Hall et al., 2001). La voie de signalisation génomique, ou nucléaire, est une signalisation à long terme qui va nécessiter quelques heures à quelques jours avant de conduire à une régulation des gènes cibles. Le deuxième type de signalisation est une réponse courte de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes qui s'initie généralement à la membrane plasmique et s'effectue dans le cytosol, on parle alors de voie de signalisation non génomique, extra-nucléaire ou rapide. Les récepteurs aux œstrogènes peuvent également interagir avec d'autres récepteurs qui vont, à la suite de la fixation de leur ligand, activer les récepteurs aux œstrogènes. Cette voie de signalisation est indépendante aux œstrogènes.

#### 1. Voies génomiques

##### a. La voie génomique dépendante du ligand : voie directe et voie indirecte

A l'état inactif, ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont séquestrés dans le cytosol sous forme inactive, associé à des protéines chaperonnes de type Hsp90 qui leur permettent d'être stable en absence de ligand (Bagatell et al., 2001; Fliss et al., 2000). La diffusion des œstrogènes à travers la membrane plasmique puis sa fixation sur ER va conduire à une modification de la conformation du récepteur et la dissociation de celui-ci

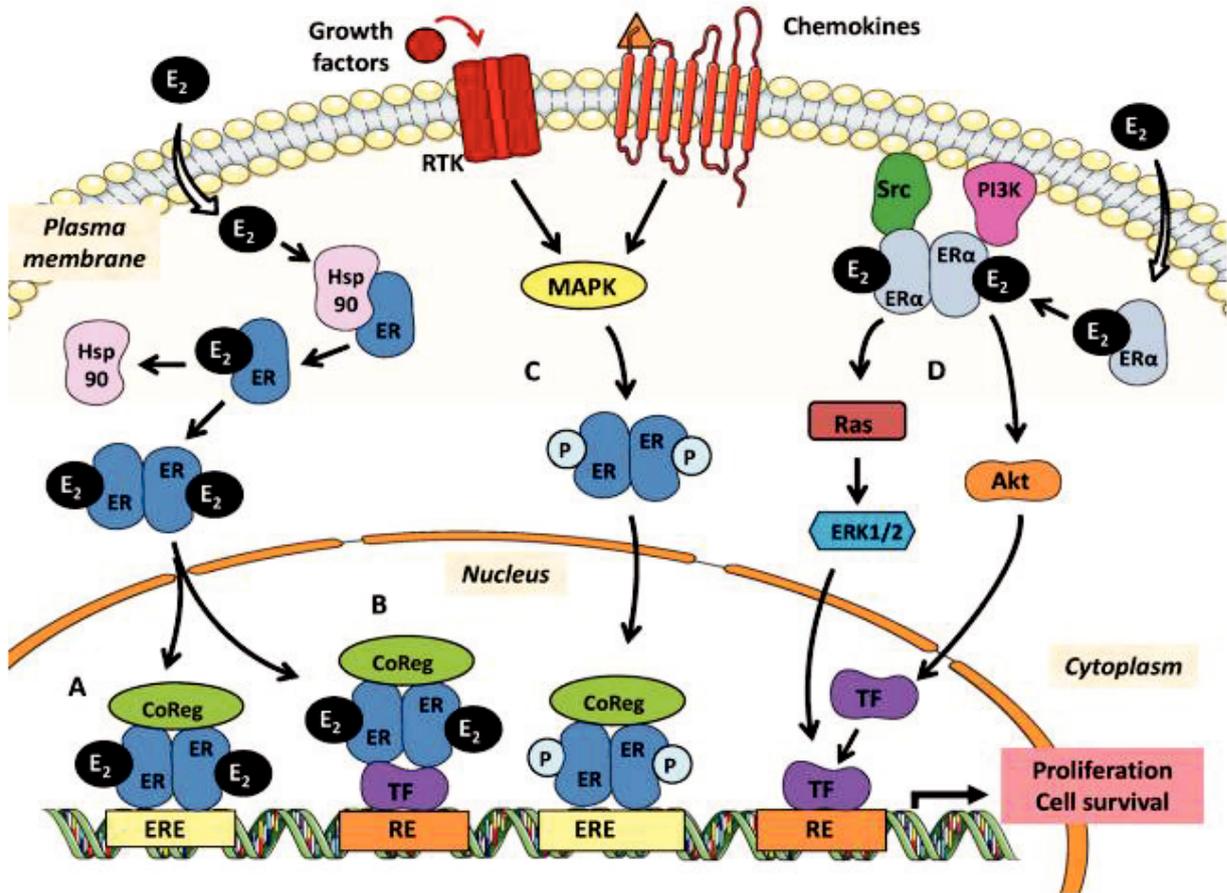


Figure 27: Voies de signalisation des œstrogènes (Le Romancer et al., 2011).

L'E2 peut agir de plusieurs façons, par des voies génomiques (A, B et C) ou par des voies non-génomiques (D).

avec les Hsp90 permettant ainsi sa dimérisation et la découverte de ses séquences de relocalisation nucléaire NLS. Une fois dimérisé, ER va être transloqué dans le noyau pour réguler la transcription génique soit en se liant directement sur l'ADN au niveau des ERE et agissant comme un facteur de transcription, on parle alors de voie génomique directe ou ERE-dépendante (Gruber et al., 2004), soit en se liant à d'autres facteurs de transcription déjà présent sur la chromatine, agissant alors comme un cofacteur transcriptionnel. Dans ce cas, on parle de voie génomique indirecte ou ERE-indépendante (Nilsson et al., 2001; Sanchez et al., 2002). Plusieurs facteurs de transcription ont été décrits pour être impliqués dans la voie génomique indirecte, comme par exemple les protéines SP1, la sous-unité c-rel de NFκB, Fos/Jun, AP-1 ou encore GATA1 et STAT5 (Björnström and Sjöberg, 2005; Marino et al., 2006; Saville et al., 2000).

### b. La voie génomique indépendante du ligand

Outre l'activation des ER par fixation de ces ligands naturels ou synthétiques, ces récepteurs peuvent également être activés après phosphorylation par des kinases provenant d'une signalisation médiée par d'autres récepteurs membranaires. En effet certains facteurs de croissance comme l'EGF, l'IGF1 ou le TGF $\beta$ , après fixation sur leur récepteur, vont activer les voies de signalisation de type MAPK qui vont conduire à l'activation des ER par phosphorylation (Kato et al., 1995; Smith, 1998; Vrtačnik et al., 2014). Cette signalisation MAPK a également été montrée pour phosphoryler ER $\beta$  après l'activation du récepteur membranaire CXCR4 à la suite de la fixation de son ligand CXCL12 (Sauvé et al., 2009; Tremblay et al., 1999). L'activation de cette voie génomique indépendante du ligand nécessite le domaine de transactivation AF-1, puisque c'est à ce niveau que les kinases de la voie MAPK vont phosphoryler ER. Ainsi, le résidu sérine 118 a été décrit pour être la cible de phosphorylation de ERK1/2 et contribuer à l'activation transcriptionnelle de gènes cibles de ER (Bunone et al., 1996; Kato et al., 1995).

## 2. Voie non génomique

Cette voie non génomique a été suspectée après l'observation de réponses cellulaires induites par les œstrogènes qui étaient trop rapides pour être associées à l'activité transcriptionnelle classique induite par ER (Pietras and Szego, 1977). Par ailleurs, les actions non génomiques sont communes aux hormones stéroïdiennes et font intervenir des cascades de signalisation impliquant des protéines kinases. Ainsi il a été démontré qu'un sous-ensemble d'ER $\alpha$  localisé à la membrane plasmique était impliqué dans des cascades de signalisation extranucléaires. L'une d'entre elles fait intervenir la protéine Src, qui à la suite d'une stimulation à l'E2 provoquant l'interaction de ER $\alpha$  avec Src, va entraîner la phosphorylation de Ras, puis l'activation de MEK qui à son tour provoquera la phosphorylation de ERK1/2 (Cabodi et al., 2004; Song et al., 2004). C'est ERK1/2 activé qui va alors être transloqué dans le noyau pour agir sur des gènes cibles (Zassadowski et al., 2012; Zivadinovic and Watson, 2005). D'autres études ont également montré que ER $\alpha$  pouvait interagir avec la sous-unité régulatrice de PI3K après fixation de l'E2, conduisant par la suite à une activation de Akt dans un modèle de cellules endothéliales (Simoncini et al., 2000). En plus de ce sous-ensemble de ER $\alpha$  capable d'initier une signalisation non génomique, d'autres variants de ER $\alpha$  sont également capables de le faire. C'est le cas de ER $\alpha$ 36 du fait de sa localisation majoritairement extranucléaire. En effet, l'activation de la voie MAPK/ERK a été décrite pour être activée par ER $\alpha$ 36 *via* la kinase PKC $\delta$  (Tong et al., 2010) ou *via* la synucléine gamma

(Shi et al., 2010) de manière œstrogène-dépendante. Par ailleurs, il a récemment été décrit que ER $\alpha$ 36 participait à l'activation de ERK2 mais aussi à sa stabilisation (*figure 28*). Tout comme ER $\alpha$ , ER $\alpha$ 36 est capable d'interagir rapidement avec Src après fixation d'E2. Cette interaction conduit à l'activation de MEK puis ERK2. Outre l'action de ERK2 sur l'activation de la Paxilline qui va être ensuite transloqué dans le noyau et agir sur des gènes cibles, il a été montré que ER $\alpha$ 36 pouvait aussi interagir avec ERK2 phosphorylé via ses 27 acides aminés uniques qui contiennent un D-domaine, prévenant alors sa déphosphorylation par MKP3 et assurant ainsi sa stabilité (Omarjee et al., 2017).

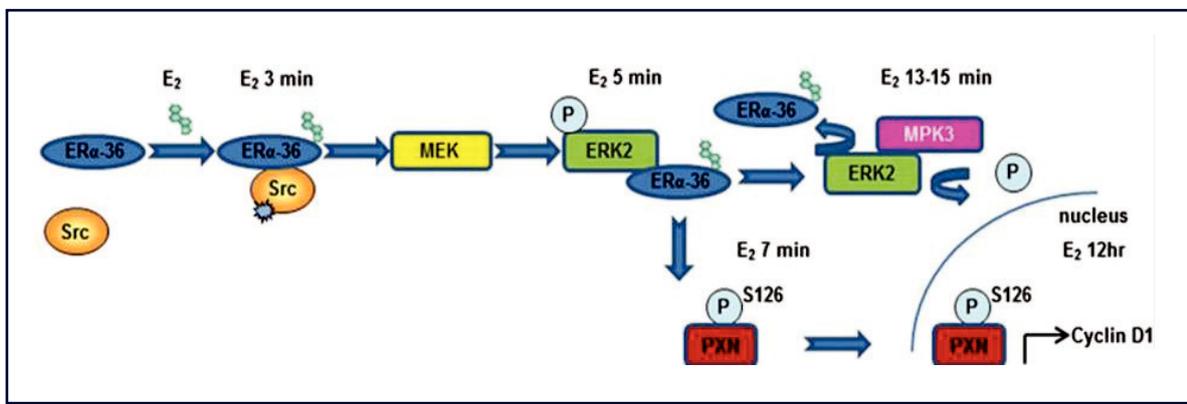


Figure 28: Mécanisme d'action de l'E2 sur ER $\alpha$ 36 (Omarjee et al., 2017).

## Chapitre 4: Les bisphénols

### A. Généralités : Notions de dose, de fenêtre d'exposition et d'effets cocktail

#### 1. Notion de dose

Le fondement de la toxicologie repose sur le principe que tout composé est toxique mais que seule la dose va déterminer les effets, conduisant ainsi à l'établissement d'un seuil de toxicité, en dessous duquel, les effets sont non observables ou mineurs et au-dessus duquel, ils sont majeurs et délétères. Ce concept se base sur l'hypothèse d'une relation linéaire ou monotone entre la dose et l'effet. Cependant, ces dernières années, ce concept évolue à la suite de l'étude de nouvelles substances qui ne suivent pas cette relation linéaire. En effet, certains composés échappent à ce concept de base comme par exemple le bisphénol A (BPA) qui, comme les hormones endogènes, peut agir à très faible dose et selon une courbe non monotone en U ou en U inversé (*figure 29*) (Jenkins et al., 2011; Merzoug-Larabi et al., 2020; Schug et al., 2011; Vandenberg et al., 2009; Watson et al., 2010; Wozniak et al., 2005). Ainsi, de très faibles ou très fortes doses n'auront pas d'effets mais des doses faibles à moyennes induiront des effets délétères, ou dans le cas d'une courbe en U, un effet délétère à très faible ou très forte dose, mais pas d'effets observables à faible, moyenne ou forte doses. Ces deux types de réponses posent une problématique majeure pour déterminer la dose maximale sans effet toxique observable (NOAEL « No Observable Adverse Effect Level ») qui est utilisée pour caractériser la toxicité d'une substance et qui peut également être utilisée pour réguler l'autorisation de son utilisation. Ces réponses non linéaires peuvent être expliquées par deux hypothèses mécanistiques : la pluralité des cibles moléculaires et/ou un rétrocontrôle négatif. Dans le cas du BPA, il a été démontré qu'il présente des affinités différentes entre les divers types de récepteurs aux œstrogènes pouvant donc induire des effets cellulaires variables voire même opposés. La balance entre la prolifération et l'apoptose est régulée par différents facteurs endogènes, comme les œstrogènes, qui se fixent en fonction de leur concentration et de leur affinité à une ou plusieurs formes de récepteurs et vont permettre alors cet équilibre. Jenkins et al. démontrent qu'à faible dose, le BPA agit sur la prolifération cellulaire et favorise la tumorigenèse tandis qu'à forte dose, il induit l'apoptose (Jenkins et al., 2011). Ceci suggère qu'une stimulation différente des récepteurs aux œstrogènes est induite à la suite de la fixation de perturbateurs endocriniens tel que le BPA qui présente une affinité différente pour ces récepteurs et qui, à faible dose, conduira alors à un déséquilibre dans la balance prolifération/apoptose résultant alors en les effets cancérigènes observés à faible dose. En revanche une forte dose entraînera une saturation des récepteurs responsables des signalisations pro-prolifératives et qui présentent la plus forte affinité avec cette molécule exogène mais également

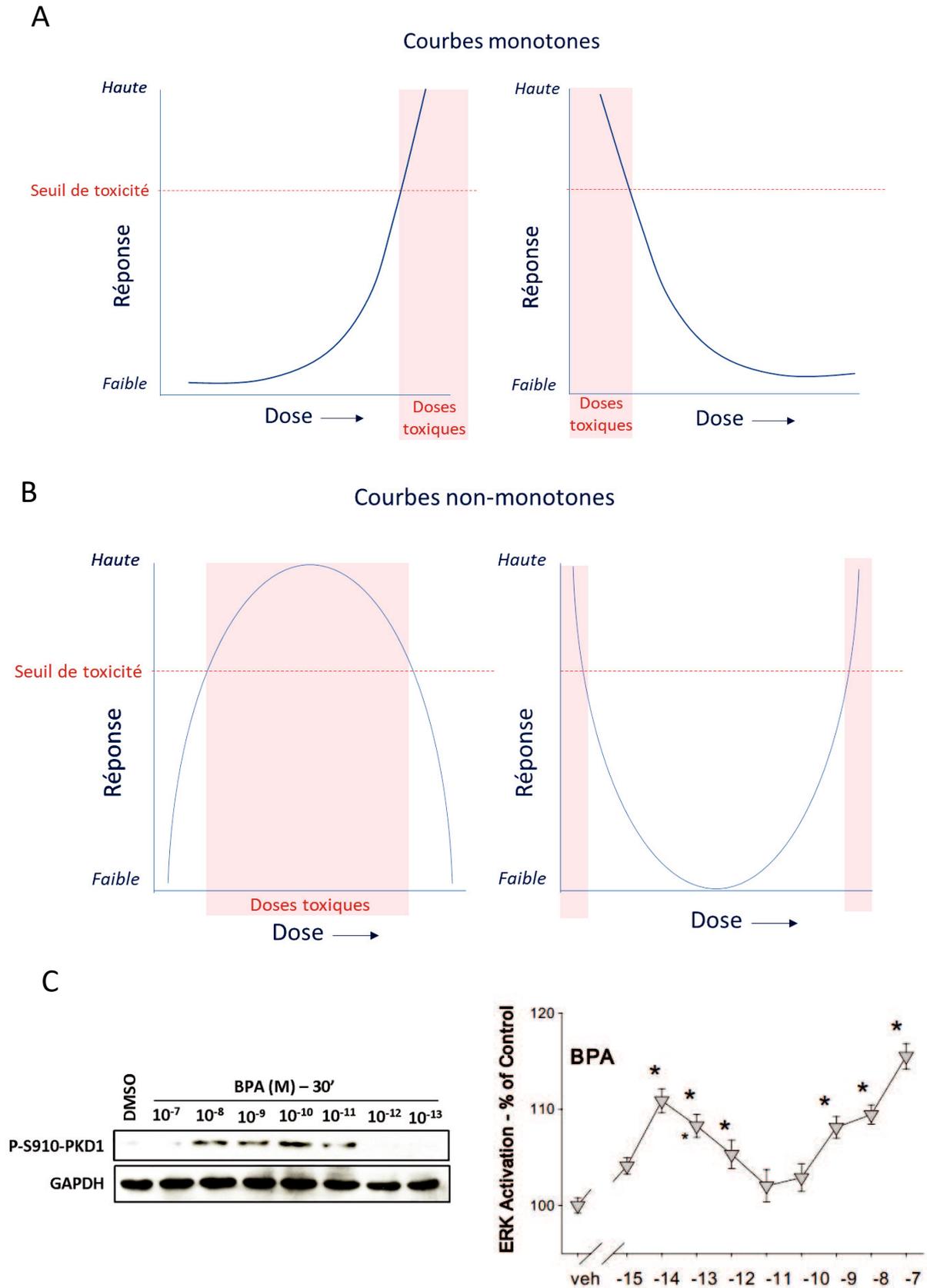


Figure 29: Concept de l'effet dose-réponse utilisé en toxicologie. Certaines substances suivent une courbe monotone illustrée théoriquement en (a) tandis que d'autres, telles que le bisphénol A, suivent une courbe non-monotone, illustrée théoriquement en (b) et expérimentalement en (c) avec à gauche l'effet de plusieurs doses de BPA sur la phosphorylation de PKD1 et à droite sur l'activation de ERK (Merzoug-Larabi et al., 2020, Watson et al., 2010).

une fixation de cette molécule sur les autres récepteurs, à l'origine d'une réponse pro-apoptotique, avec lesquels elle a une plus faible affinité ce qui conduit alors à une diminution des effets cancérogènes (*figure 30*). La seconde hypothèse repose sur un rétrocontrôle négatif qui est un mécanisme adaptatif de l'organisme permettant de pallier une trop forte concentration d'une substance en inhibant sa production ou sa réponse afin d'éviter une stimulation exagérée du système. Ainsi, ce rétrocontrôle peut impliquer plusieurs systèmes, comme celui régulant la production d'œstrogènes et de progestérone via l'axe hypothalamo-hypophysaire, ou se faire au niveau cellulaire, comme par exemple une régulation du *turnover* des récepteurs (source : anses 2013 <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0331Ra-0-An.pdf>).

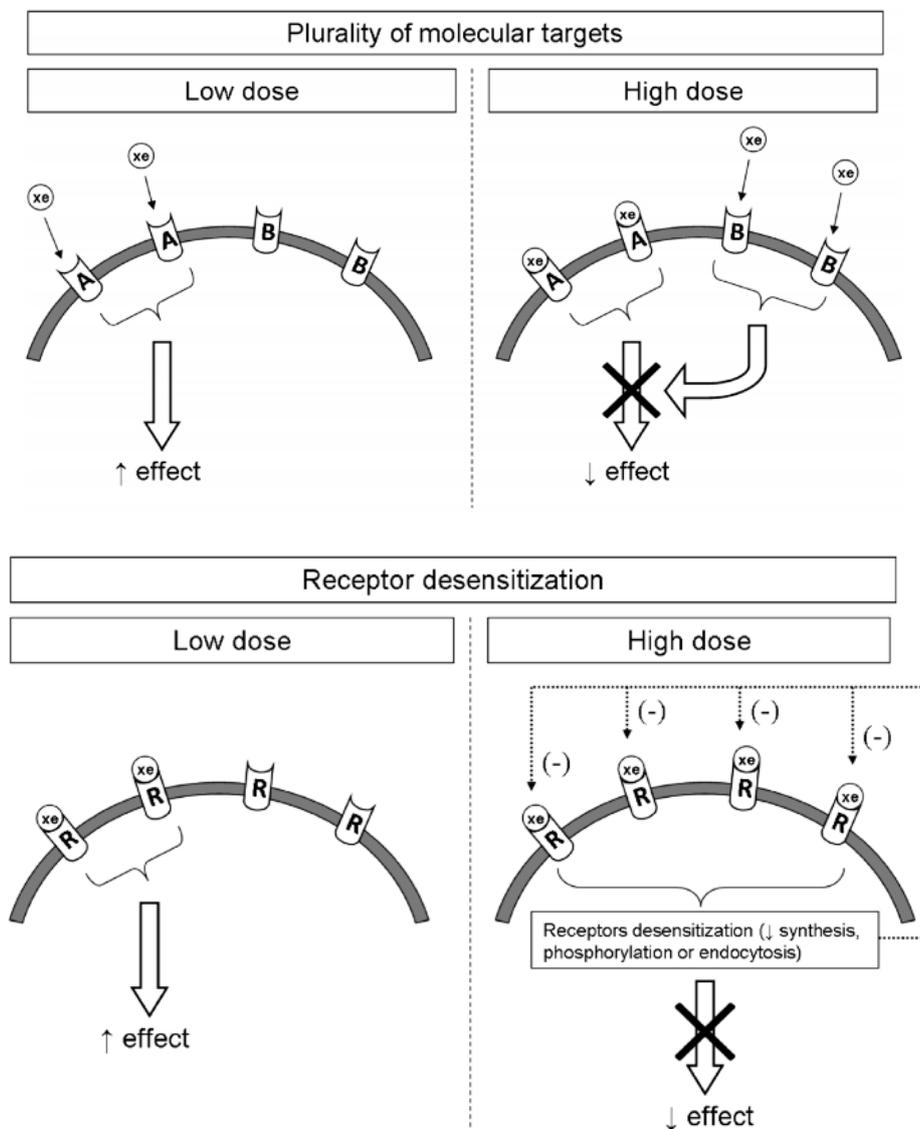


Figure 30: Hypothèses sur les mécanismes moléculaires sous-tendant un effet dose-réponse non monotone (source : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01151409/document>). Xe : xénobiotique, R : récepteur.

## 2. Notion de fenêtre d'exposition

Le développement et la maturation des divers organes se font à des périodes différentes, mais la majorité d'entre eux se font durant le développement fœtal et la petite enfance. Durant ces périodes de développement, l'organisme subit une croissance rapide et importante avec une prolifération et une différenciation cellulaire intense, contrôlées par une régulation fine de nombreux gènes, qui sont alors très sensibles à des agents toxiques (Schug et al., 2011). Ces agents peuvent induire des modifications épigénétiques ou des événements mutagènes conduisant alors à des activations ou répressions de gènes et entraîner des altérations géniques irréversibles qui *in fine*, pourront amener à une initiation de lésions pré-cancéreuses. Ainsi il a été montré que *in utero*, le fœtus est exposé à des agents toxiques et n'y est pas protégé. La présence de perturbateurs endocriniens a été détectée chez la femme enceinte et dans les urines et le sang du cordon et une étude a montré la capacité du BPA à diffuser à travers le placenta (Heinze, 2003; Herbstman et al., 2010; Schönfelder et al., 2002; Zalko et al., 2003; Zeman et al., 2013). En effet, les barrières normalement protectrices, comme le placenta ou la barrière hématoencéphalique, ont été décrites pour être perméable à différents perturbateurs endocriniens lipophiles, voire même, dans le cas du placenta, être un tissu particulièrement hormono-sensible du fait de sa forte expression des récepteurs aux œstrogènes (Birnbaum and Fenton, 2003; Mannelli et al., 2015). Les effets délétères de ces agents toxiques peuvent être visibles à court terme, comme par exemple un changement dans la durée de gestation ou le poids du nouveau-né mais également à moyen et long terme à l'âge adulte, avec l'initiation d'un processus de carcinogénèse ou des anomalies dans les fonctions reproductrices (Schug et al., 2011; Skakkebaek, 2002; Wolff Mary S. et al., 2008). De plus, ces polluants peuvent également entraîner des effets délétères multigénérationnels, c'est-à-dire se retrouvant dans les générations F1 et F2, et même dans les générations suivantes, on parle alors d'effets transgénérationnels. Ceci a été montré pour le BPA qui conduit à une reprogrammation cellulaire au stade fœtal suite à des modifications génomiques, épigénétiques ou du microenvironnement cellulaires chez les descendants (*figure31*) (Jorgensen et al., 2016; Schug et al., 2011; Wolstenholme et al., 2012; Xin et al., 2015), augmentant alors le risque de lésions et donc la susceptibilité de développer un cancer à long terme et ceci sur plusieurs générations. Malgré les effets transgénérationnels confirmés de certains perturbateurs endocriniens, comme le Distilbène (un oestrogéno-mimétique de synthèse), les études épidémiologiques chez l'Homme n'ont pas encore suffisamment de recul à ce jour pour déterminer avec certitude l'effet multi- ou transgénérationnels de certains perturbateurs endocriniens comme le BPA. Cependant, de nombreuses études chez l'animal ont déjà démontré leurs impacts délétères et l'induction d'altérations dans de nombreuses voies de signalisations impliquées dans la tumorigénèse.

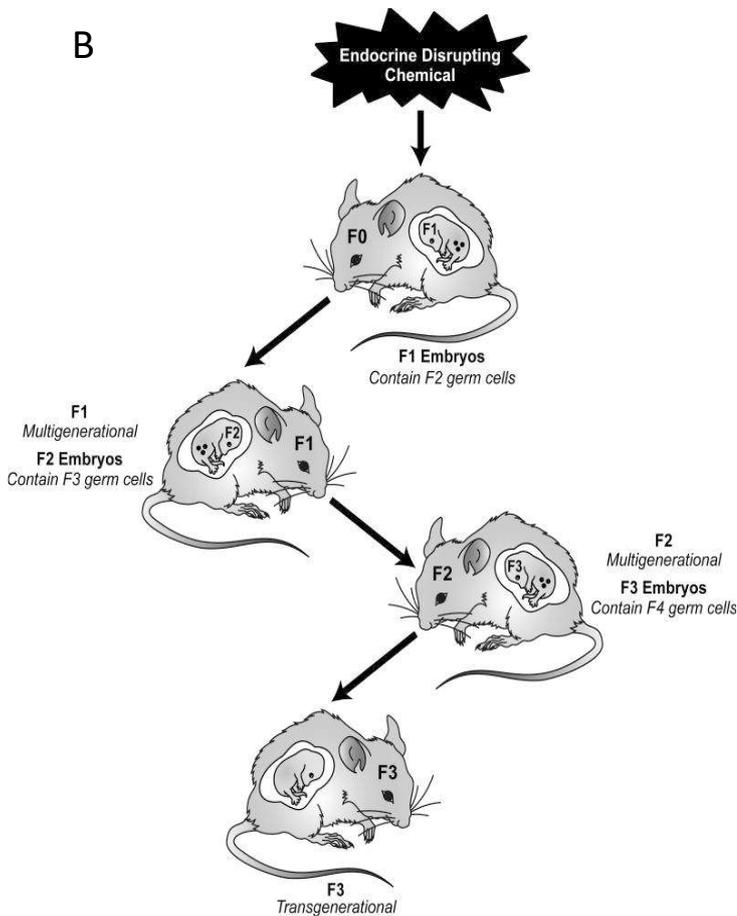
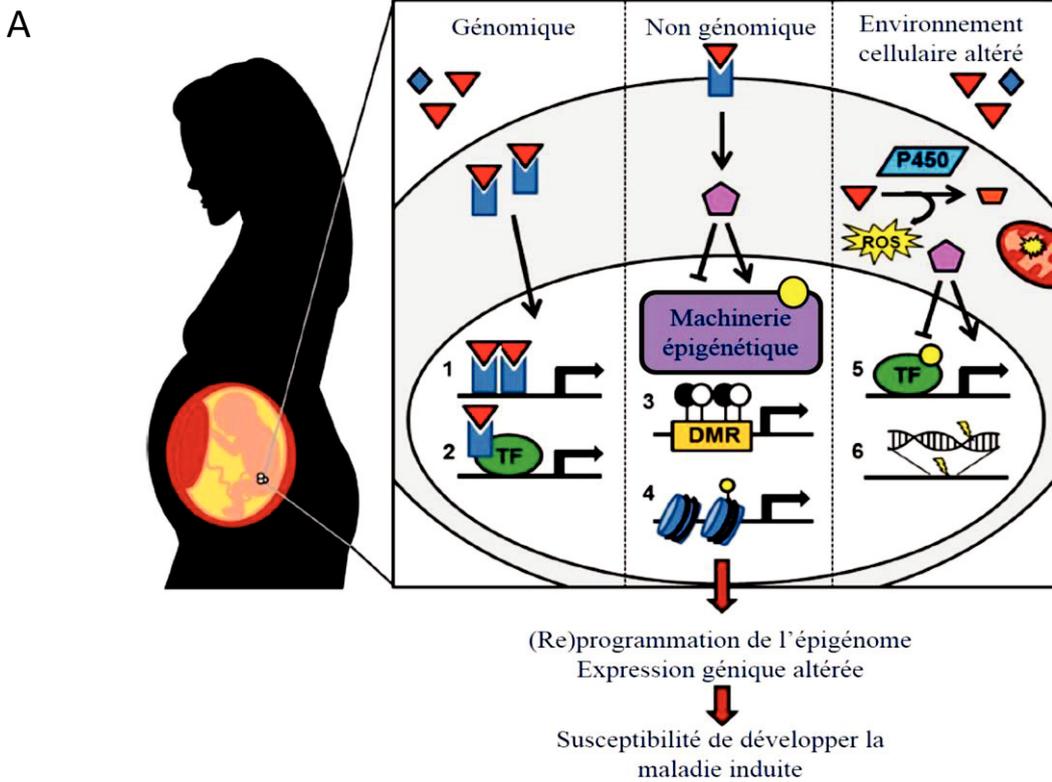


Figure 31: Effets des perturbateurs endocriniens pouvant être dû à plusieurs mécanismes (a), sur les générations immédiates (effets multigénérationnels) ou sur la descendance plus tardive (effets transgénérationnels) (a et b) (Schug et al., 2011+ Xin et al., 2015)

### 3. Notion d'effets cocktail

Dans notre environnement, nous ne sommes pas seulement exposés à un ou deux polluants mais à une multitude d'agents toxiques présents sous différentes formes qui vont interagir entre eux pour constituer ainsi un cocktail de molécules variable en termes de composition et de dose et conduire à des effets additifs ou synergiques sur notre organisme *via* divers mécanismes (Caballero-Casero et al., 2016; Owczarek et al., 2018; Rizzati et al., 2016). De ce fait, une étude précise sur les effets d'un seul composé peut s'avérer peu représentative de la réalité, ce qui complique singulièrement l'obtention de réponses tranchées sur la dangerosité ou l'innocuité d'un composé sur la santé humaine. Cependant, il faut également noter qu'à cause de ces effets cocktails, l'absence d'un risque pour une molécule donnée ne démontre donc pas son absence de risque en présence d'autres molécules ou agents toxiques.

## B. Le bisphénol A (BPA)

### 1. Origine, distribution et législation

Le BPA (4,4'-(propane-2,2-diyl)diphenol) est un composé chimique mis au point à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle et étudié en recherche médicale dans les années 30 en vue d'un traitement préventif pour limiter les avortements spontanés, puis finalement abandonné pour le Distilbène. Il est ensuite utilisé par l'industrie des plastiques dans les années 60 en entrant dans la composition de nombreux types de plastiques (source : [cancer-environnement.fr](http://cancer-environnement.fr)). La plus grande majorité du BPA est utilisée lors de la synthèse de polycarbonates pour la fabrication de nombreux produits plastiques rigides tels que les prises et les interrupteurs électriques, les verres de lunettes, les équipements médicaux, divers appareils électriques communs (téléphones portables et coques de protection, bouilloires, cafetières...) ou encore les récipients alimentaires en plastique, les bouteilles d'eau ou la vaisselle, qui sont directement en contact avec les aliments (*figure 32*). Le BPA est aussi utilisé en plus faible proportion sous forme de résine époxy, afin de protéger de l'oxydation les objets qu'elle recouvre comme par exemple l'intérieur des réservoirs et des tuyauteries en métal ou en béton, les canalisations des réseaux d'eau potable, l'intérieur des boîtes de conserve métallique ou des canettes, et sous forme de poudre non polymérisé largement utilisée sur les papiers thermiques de type reçus de paiement, tickets de caisse. Ainsi, c'est plus de 3 millions de tonnes de BPA produits par an dans le monde qui sont susceptibles de se retrouver dans notre environnement et de contaminer l'air, l'eau, le sol et donc la faune et la flore. En effet, la composition lipophile de ce composé en fait une molécule propice pour

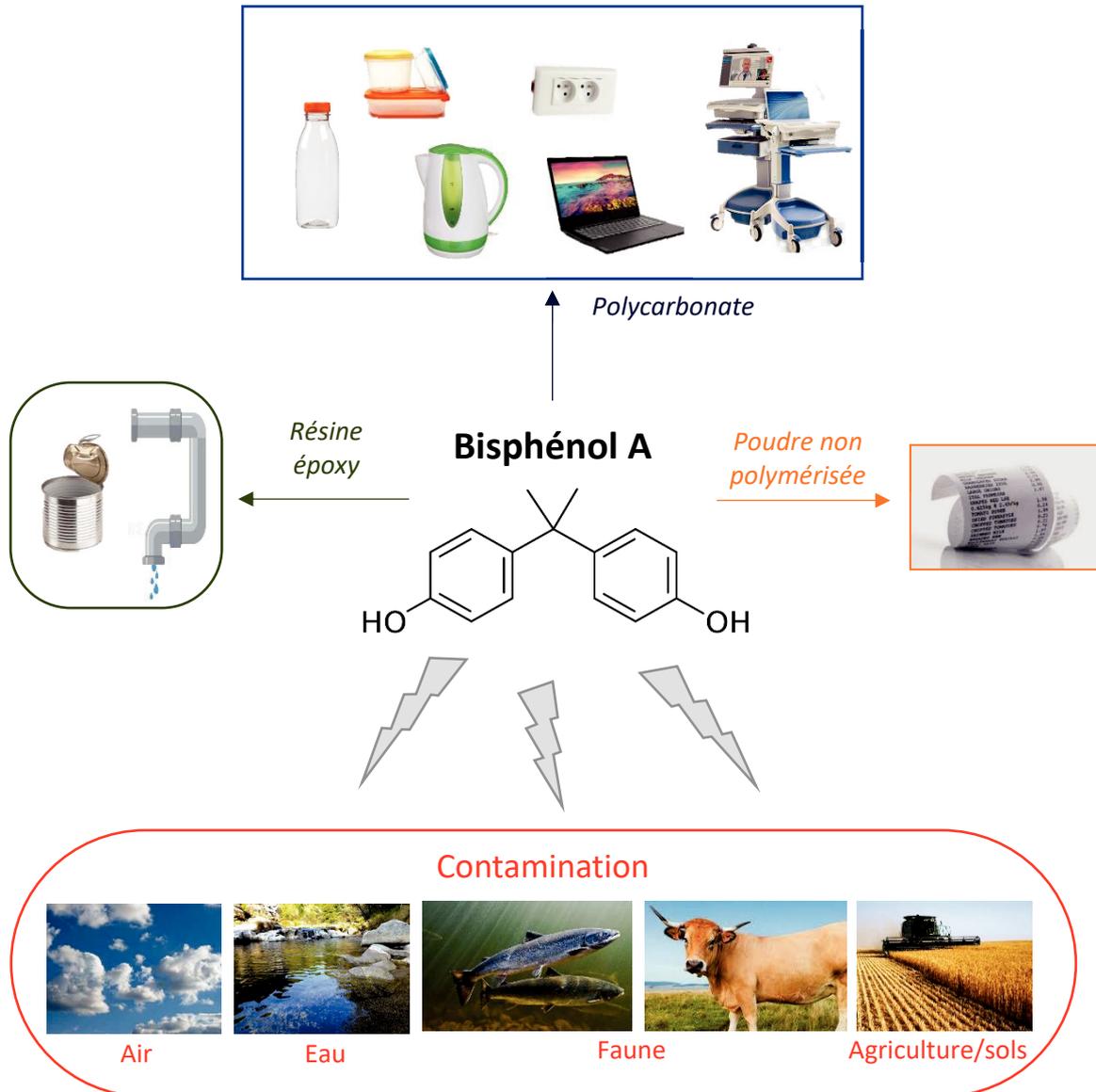


Figure 32: Les différentes formes du BPA et son impact sur l'environnement.

être stockée et pour s'accumuler dans le tissu adipeux et notamment les graisses de différentes espèces animales qui vont se retrouver dans la chaîne alimentaire. Une étude a ainsi rapportée une forte teneur en BPA dans les viandes, la charcuterie et les produits de la mer qui représenteraient la seconde source d'exposition alimentaire (environ 20%) (source : anses 2013 <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0331Ra-0-An.pdf>). Outre cette voie, l'exposition par ingestion est aussi permise par la migration du BPA des contenants vers les contenues alimentaires, notamment *via* les boîtes de conserve ou encore *via* les emballages plastiques de plats pré-préparés qui sont chauffés au micro-onde, pouvant alors favoriser la libération de BPA qui est thermosensible.

Ainsi, il a été estimé que 84% de l'exposition totale moyenne au BPA était attribuable à l'alimentation, le reste étant une exposition par les voies aérienne ou cutanée (source: anses 2013 <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0331Ra-0-An.pdf>). À la suite des rapports de l'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) de 2011 puis de 2013, concernant l'évaluation des risques du Bisphénol A pour la santé humaine, cette molécule était considérée comme dépourvue de risques carcinogènes pour l'Homme puisque son niveau d'exposition reste faible. Cependant, il a tout de même été reconnu qu'il n'y avait pas suffisamment de données pour pouvoir vraiment conclure sur la dangerosité du BPA et également qu'il existait des effets délétères avérés chez l'animal, touchant la reproduction, la glande mammaire, le métabolisme, le cerveau et le comportement et des effets suspectés chez l'Homme, même à faible dose. En effet, l'étude EDEN, rapportée dans les rapports de l'Anses, a montré sur une population de femmes enceintes que leur niveau d'exposition au BPA dépassait les repères toxicologiques établis, dont celui sur la glande mammaire avec un dépassement de 16 à 20% par rapport au seuil, ne pouvant ainsi pas permettre d'écarter les risques du BPA sur la santé de cette population. Effectivement, comme décrit précédemment, en fonction des phases de développement de l'individu (fenêtre d'exposition), certaines populations, comme par exemple les nourrissons ou les jeunes enfants, sont donc identifiées comme plus sensibles par rapport à d'autres populations. Pour donner suite à cela, des recommandations ont été mises en place, dont notamment celle de diminuer l'utilisation du BPA et de le remplacer par des substituts, pour les matériaux en contact avec l'alimentation. Ainsi, en 2010, la France a interdit la production et la commercialisation des biberons comprenant du BPA, par la suite appliqué à toute l'Union Européenne en 2011. Un peu plus tard, l'agence Européenne des produits chimiques (European Chemicals Agency, ECHA) a classifié plus drastiquement le BPA en le passant de la catégorie 2 (toxique pour la reproduction suspecté) à la catégorie 1B, induisant alors la mise en place de mesures réglementaires plus sévères et de préventions, conduisant alors à voter en faveur de la restriction du BPA dans les tickets de caisses. Ce n'est que très récemment, en 2017, que le BPA a été classé comme perturbateur endocrinien en France, puis peu de temps après, a été reconnu comme « substance extrêmement préoccupante » au niveau Européen par l'ECHA.

## 2. Structure, métabolisme et fixation

Comme tous les bisphénols, le BPA possède deux groupements phénols reliés par un pont d'atome qui, dans son cas comprend des groupes méthyles hydrophobes. Pour se protéger, l'organisme met en place des systèmes de détoxification afin de diminuer l'activité biologique des composés toxiques. L'un de ces processus est de convertir des composés lipophiles en des métabolites plus hydrophiles afin de

faciliter leur dégradation et leur élimination dans les urines (Attia, 2010). Cependant, dans certain cas, les métabolites ainsi formés peuvent avoir des fonctions biologiques plus importantes ou différentes que le composé d'origine. De nombreux métabolites vont être métabolisés à partir du BPA mais les principaux retrouvés dans les urines sont sous forme glucuronée, en plus grande proportion, ou sulfatée, à la suite de la conjugaison avec des molécules hydrophiles, via l'implication des enzymes glucuronosyltransférases, majoritairement UGT2B15 mais également d'autres telles que UGT1A9, UGT2A1, UGT1A10 ou UGT1A1 (Gramec Skledar et al., 2015; Hanioka et al., 2008; Street et al., 2017) et de sulfotransférases comme SULT1A1 par exemple (Nishiyama et al., 2002; Suiko et al., 2000). Un faible pourcentage est également retrouvé sous forme non conjuguée ou oxydée (Nakamura et al., 2011; Ye et al., 2005, 2011; Zalko et al., 2003). Une étude a montré que le BPA n'est pas un « E2-mimétique faible » comme il a pu être décrit du fait de sa plus faible affinité à ER $\alpha$  par rapport à l'E2 (Gould et al., 1998). En effet, il présente des mécanismes moléculaires distincts de ceux observés avec les autres ligands, avec une interaction différente au niveau du domaine de fixation des ligands de ER $\alpha$  et un recrutement de co-régulateurs différents, ce qui peut expliquer l'origine de cette différence entre sa réponse biologique et celle observée avec des antagonistes ou des agonistes de ER $\alpha$ . Par ailleurs, il peut aussi interagir avec ER $\beta$ , avec une meilleure affinité pour ce dernier, ainsi que sur des variants de ER et sur GPER (Matthews et al., 2001; Rubin, 2011; Wetherill et al., 2007). Malgré une affinité bien moins grande que l'E2 pour ER $\alpha$  et ER $\beta$ , plusieurs études ont cependant démontré des effets œstrogéniques similaires à ceux observés avec de l'E2, et ceci même à faible concentration, démontrant bien son effet œstrogène-mimétique à faible dose et son éventuelle dangerosité dans la santé humaine (Alonso-Magdalena et al., 2012; Welshons et al., 2006).

### 3. Implication dans la tumorigenèse mammaire

Jusqu'à présent le BPA est classé comme perturbateur endocrinien et pas comme cancérigène mais depuis quelques années, son implication dans le développement tumoral est de plus en plus étudiée. En effet, même s'il n'a pas été décrit comme un *driver* de la tumorigenèse, de nombreuses études rapportent une relation positive entre l'exposition au BPA et le développement tumoral (Hafezi and Abdel-Rahman, 2019) ainsi que son rôle dans des modifications au niveau transcriptionnel, protéique et épigénétique, aussi bien dans le compartiment épithélial que dans le compartiment stromal, favorisant ainsi la tumorigenèse et augmentant le risque de développer un cancer. Effectivement, de nombreuses études ont décrit son implication dans les différentes étapes de la carcinogénèse mammaire.

### a. *Initiation et promotion tumorale*

Dans la majorité des cas les cancers se mettent en place progressivement et nécessitent plusieurs années avant de former une tumeur détectable qui va être régulée par des éléments intracellulaires mais également de son microenvironnement et de l'environnement en général. Ainsi, plus les cellules vont être en contact avec des éléments délétères, plus elles pourront subir des modifications et échapper aux systèmes de régulations pour former des lésions pré-néoplasiques puis néoplasiques. Le BPA s'inscrit très bien dans ce processus (*figure 33*). En effet, il a été montré que notre organisme est exposé à cette molécule durant une longue période puisqu'il y est exposé très précocement, par la mère dès le stade embryonnaire via la diffusion du BPA à travers le placenta, puis à la naissance notamment en cas d'allaitement comme ceci a été rapporté par une étude montrant la présence de BPA dans le lait maternel qui était 2 à presque 3 fois plus élevé que dans le sérum de la mère, suggérant que ce perturbateur endocrinien est capable de s'accumuler dans le lait maternel et même de persister chez le nouveau-né après le sevrage (Yoo et al., 2001) et par la suite tout au long de la vie de l'individu. Par ailleurs, d'autres études ont montré que le BPA pouvait initier, ou du moins favoriser, le développement tumoral, dont celui de la glande mammaire, en créant un déséquilibre dans le microenvironnement ou dans des voies intracellulaires conférant alors un avantage aux cellules pré-transformées ou déjà transformées. En effet, plusieurs études rapportent qu'une exposition au BPA durant l'embryogénèse va conduire à une hyperplasie, notamment par un changement dans le compartiment stromal mammaire qui exprime les récepteurs aux œstrogènes, entraînant une accélération de la maturation des adipocytes et une dérégulation dans la production de la matrice extra-cellulaire, conduisant alors à une altération de la structure épithéliale avec un impact sur la taille et la forme des cellules et leur organisation (Durando et al., 2007; Markey et al., 2001; Murray et al., 2007; Vandenberg et al., 2007). De plus, une exposition au BPA durant l'adolescence, une autre période de la vie où les cellules sont très sensibles aux hormones, entraîne également un mauvais développement de la glande mammaire avec une augmentation du nombre de TEB et des branches latérales ainsi que des altérations géniques qui sont semblables à celles pouvant être observées dans les tissus de cancer du sein, ce qui démontre bien sa capacité à induire des lésions pré-néoplasiques et donc à augmenter le risque de cancer du sein (McCormack and dos Santos Silva, 2006; Muñoz-de-Toro et al., 2005; Wang et al., 2014a). Ces altérations, initiées dès l'embryogénèse, créent alors des conditions plus favorables à un développement tumoral futur (Vandenberg et al., 2009). Les premières étapes de carcinogénèse impliquent une augmentation du taux de prolifération, une résistance à l'apoptose et une activation de voies de signalisation impliquées dans la survie. Pour cela, différents gènes suppresseurs de tumeur, comme par exemple *p53* ou *BRCA1*, nécessitent d'être inactivés.

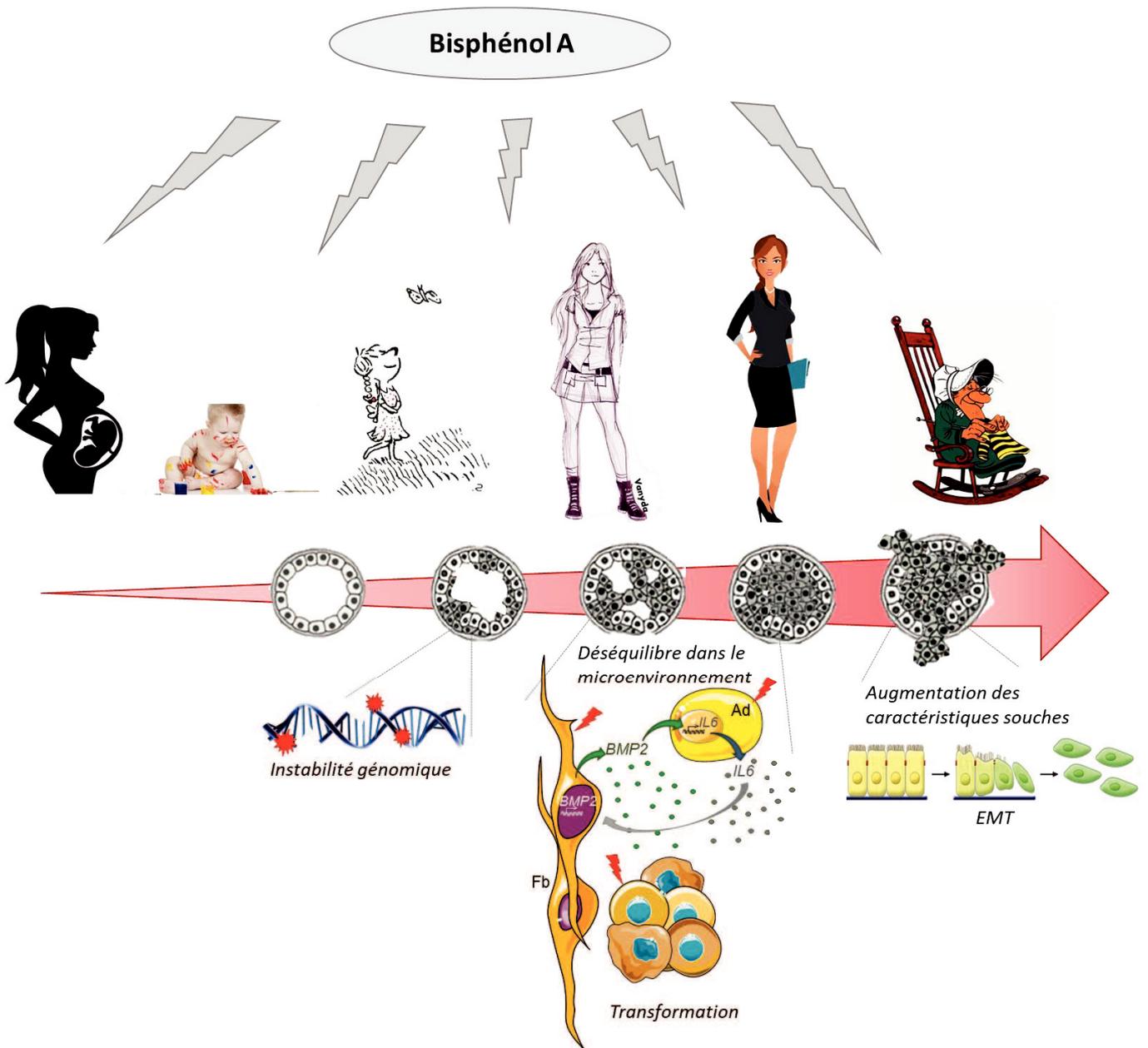


Figure 33: L'exposition au BPA se passe tout au long de la vie et avant même la naissance, dès le stade embryonnaire par sa diffusion à travers le placenta, et participerait ainsi à la tumorigenèse mammaire en agissant soit seul soit en coopération avec plusieurs mécanismes.

Une étude a montré qu'un traitement au BPA induisait une prolifération cellulaire qui pourrait être expliquée par l'augmentation de la sécrétion de facteurs de croissance observée après traitement. De plus, une hyperméthylation, souvent associé à une répression, de gènes suppresseurs de tumeur tel que *BRCA1* a aussi été notée (Qin et al., 2012). Cette étude soutient les études citées précédemment qui démontrent que le BPA promeut un stade pré-tumoral. Par ailleurs, une autre étude a montré son rôle dans la transformation de cellules épithéliales mammaires humaines normales (MCF10F)

(Fernandez and Russo, 2010). Il a été suggéré que cette transformation pourrait être due à la formation d'adduits de l'ADN ou de radicaux oxygénés par certains métabolites du BPA (Jaeg et al., 2004; Schmidt et al., 2013a), conduisant alors à des cassures doubles brins au niveau de l'ADN (Fernandez et al., 2012). De plus, dans ces cellules traitées au BPA, les auteurs observent une diminution de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose et une augmentation de ceux impliqués dans la réparation de l'ADN, ce qui favoriseraient la survie des cellules présentant des cassures et augmenteraient la fréquence de mutations pour ainsi conduire à une instabilité génomique qui est un marqueur reconnu de la tumorigenèse (Fernandez et al., 2012; Hanahan and Weinberg, 2011). Cependant, les cellules épithéliales ne sont pas les seules à pouvoir être impactées par une exposition au BPA pour conduire à la formation d'une tumeur, il peut également agir sur le microenvironnement qui joue un rôle très important dans l'initiation, la progression et la dissémination tumorale. En effet, une connexion complexe existe entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. Ainsi, les cellules tumorales peuvent modifier leur microenvironnement et inversement, le microenvironnement peut agir sur les cellules épithéliales pour favoriser leur transformation. Le BPA peut également agir sur ce microenvironnement et favoriser la transformation des cellules épithéliales. En effet il a été rapporté qu'un traitement au BPA augmentait l'expression de l'aromatase et son activité dans des fibroblastes mammaires sains, conduisant alors à une augmentation de la biosynthèse d'E2 et de sa sécrétion, favorisant ainsi les risques de cancer (Williams and Darbre, 2019). Par ailleurs, le BPA peut également induire la libération d'IL6 et de BMP2 dans le microenvironnement mammaire, tous deux démontrés pour induire la transformation de cellules souches mammaires humaines (Ben-Jonathan et al., 2009).

#### *b. Progression tumorale*

Outre son rôle dans l'initiation tumorale, le BPA a aussi été décrit pour promouvoir la progression en favorisant la prolifération de cellules cancéreuses mammaires ER-positives mais aussi ER-négatives. Comme mentionné précédemment, le BPA peut agir en tant qu'œstrogène-mimétique en interagissant avec le récepteur ER $\alpha$ , cependant, il a également été décrit pour agir via des récepteurs alternatifs de ER $\alpha$ , tels que ERR $\gamma$  ou GPER, induisant alors une signalisation non génomique, pouvant ainsi expliquer son rôle prolifératif dans des lignées cancéreuses ER-négatives (Pupo et al., 2012; Song et al., 2015). En effet, il a été rapporté que le BPA est capable d'augmenter l'expression protéique de co-activateurs impliqués dans la signalisation des œstrogènes, promouvant alors l'activité transcriptionnelle (Wang et al., 2018). Comme décrit précédemment, plusieurs voies de signalisation impliquant les récepteurs aux œstrogènes existent, dont notamment la voie non génomique indépendante des œstrogènes qui passe par l'activation de récepteurs membranaires de types

facteurs de croissances tels que l'EGFR. Ainsi, le BPA peut agir indirectement sur les récepteurs aux œstrogènes en stimulant la libération des ligands de l'EGFR en ciblant directement les métalloprotéinases ADAM17 et ADAM10 (Urriola-Muñoz et al., 2018) Par ailleurs, d'autres données de la littérature ont montré que les cellules souches mammaires sont directement sensibles au BPA qui pouvait induire leur transformation. Effectivement, des études ont démontrés que le BPA pouvait perturber la signalisation aux BMPs dans des cellules souches mammaires entraînant alors leur transformation (Chapellier et al., 2015) et conduire à une augmentation de la taille des mammosphères (Lillo et al., 2017). Le BPA peut également agir sur la progression tumorale en favorisant le développement de métastases. Le processus de dissémination métastatique est un processus dynamique nécessitant une multitude de voies de signalisation et de programmes activés tout au long des différentes étapes permettant notamment une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et des processus de migration et d'invasion (Gupta and Massagué, 2006; Jin and Mu, 2015). Comme décrit précédemment, les tumeurs ER-négatives sont plutôt associées à un risque important de développement métastatique du fait, entre autres, d'une forte expression de marqueurs mésenchymateux qui favorisent le processus métastatique (Rangel et al., 2017). Il a été démontré qu'une exposition au BPA diminuait l'expression transcriptionnelle de marqueurs épithéliaux et augmentait l'expression de gènes mésenchymateux. Il conduit aussi à une perte des contacts cellules/cellules, à un changement de morphologie vers une morphologie plus fibroblastique et à l'EMT dans des cellules tumorales ER-positives mais aussi ER-négatives (Kim et al., 2017; Zhang et al., 2015). D'autres études ont également rapporté une augmentation de la migration et de l'invasion après un traitement au BPA, qui agirait aussi bien *via* l'activation de ER $\alpha$  que *via* GPER, en fonction du statut cellulaire (Castillo Sanchez et al., 2016; Kim et al., 2017; Zhang et al., 2015). Outre son effet sur la migration et l'invasion, le BPA a également été décrit pour augmenter les caractéristiques souches des cellules cancéreuses avec notamment l'induction de l'ALDH1 et de SOX2 (Lillo et al., 2017).

### C. Les bisphénols S et F (BPS, BPF)

Depuis 2015 le bisphénol A est remplacé par des substituts et notamment le bisphénol S (4,4'-sulfonyldiphénol) ou le bisphénol F (4,4'-dihydroxydiphénylmethane). Ces composés ont été choisis à la suite d'études mesurant leur affinité pour ER $\alpha$  qui a révélé leur très faible capacité d'interaction avec ce récepteur. Cependant ces molécules ont des structures très similaires au BPA, suggérant qu'elles pourraient également être des perturbateurs endocriniens. En effet, de très nombreuses études démontrent de plus en plus leur rôle dans la dérégulation hormonale et la tumorigenèse,

remettant ainsi en question leur innocuité et les critères de contrôles utilisés pour évaluer leurs effets sur la santé humaine.

### 1. Structure et métabolites du BPS et du BPF

Le BPS et le BPF sont, comme le BPA, constitués de deux groupements phénols reliés par un pont comportant un groupement soit sulfonyle dans le cas du BPS soit méthylène pour le BPF (*figure 34*). Ces analogues sont utilisés pour remplacer le BPA dans la conception des emballages et des contenants alimentaires en plastique et composent maintenant les biberons, la vaisselle en plastique, les bouteilles d'eau, les tickets de caisse alors intitulés « sans bisphenol A », ainsi que les boîtes pour micro-onde, notamment grâce à la résistance accrue à la chaleur du BPS par rapport au BPA (Liao et al., 2012; Lotti et al., 2011; Pivnenko et al., 2015). Des mesures de détection dans les urines ont montré la présence de BPS dans 78% des échantillons et de BPF dans 40 à 88%. Il est intéressant de noter que dans les échantillons collectés avant la mise en place de la loi de remplacement du BPA, le BPS et le BPF n'étaient pas ou peu détectés mais que depuis quelques années, leur niveau augmente démontrant bien que l'exposition humaine au BPS et BPF est croissante (Ye et al., 2015; Zhou et al., 2014). Une étude récente effectuée sur le porcelet, pour sa ressemblance au niveau de son système digestif avec celui de l'Homme, a mis en évidence que contrairement au BPA, seul 41% du BPS est éliminé par le foie après ingestion et qu'il met 3,5 fois plus de temps à ne plus être détecté dans le sang par rapport au BPA, conduisant alors à une concentration dans le sang qui est 250 fois plus élevée que celle du BPA (Gayraud Véronique et al.). Comme le BPA, la forme principale des métabolites du BPS est sous forme glucuronée et en plus faible proportion sous forme sulfatée (Skledar et al., 2016). Des études ont montré que le BPS pouvait se fixer sur les récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$ , avec une meilleure affinité pour ER $\beta$  (Molina-Molina et al., 2013) mais pouvait aussi induire une signalisation membranaire (Viñas and Watson, 2013). Concernant le BPF, Plusieurs études montrent que le BPF génère de nombreux métabolites différents, pouvant être sous forme glucuronée, sulfatée ou oxydée (Cabaton et al., 2008; Dumont et al., 2011; Gramec Skledar et al., 2015; Schmidt et al., 2013b). Il présente une forte affinité pour ER $\alpha$  et un de ces métabolites présente quant à lui une affinité plus importante pour ER $\beta$  (Cabaton et al., 2009).

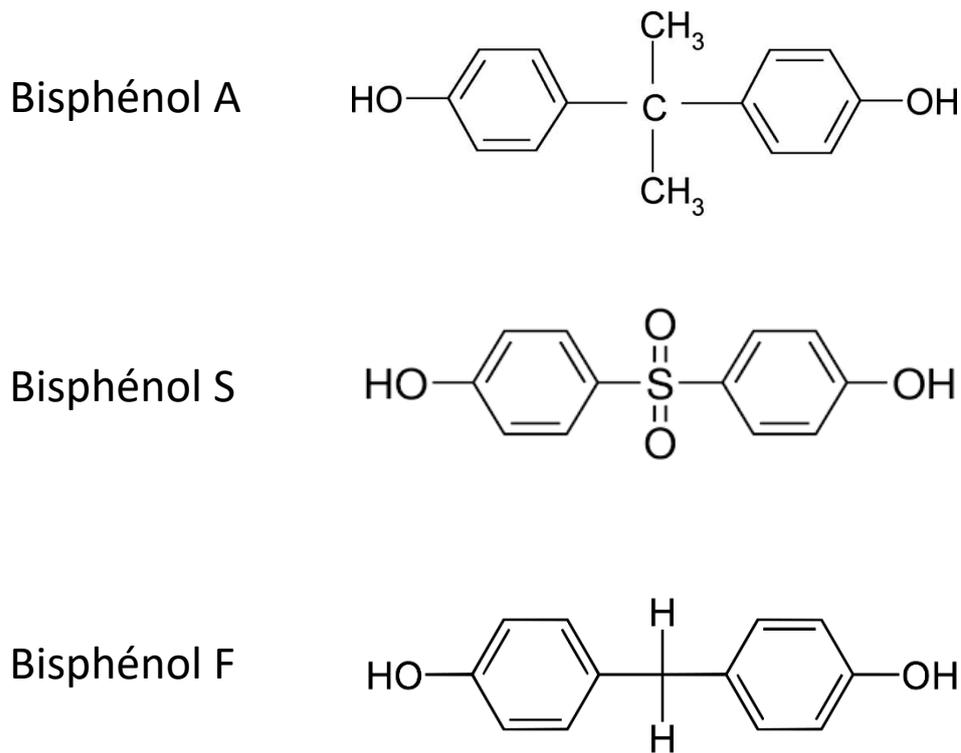


Figure 34: Comparaison structurale entre les différents types de bisphénols, BPA, BPS et BPF.

## 2. Remise en question de l'innocuité du BPS et du BPF

Depuis la substitution du BPA par ses analogues BPS et BPF, de nombreuses études ont été menées afin de mieux caractériser les effets de ces molécules sur la santé humaine et notamment leurs effets sur la descendance et leur implication dans le développement tumoral. Ainsi, des études ont rapporté que le BPS et le BPF induisent des effets similaires au BPA (Eladak et al., 2015; Rochester and Bolden, 2015). En effet, Kim et al ont démontré qu'un traitement au BPS ou au BPF entraînaient une prolifération identique à un traitement au BPA ou à l'E2 dans des cellules tumorales ER-positives via l'induction des cyclines D et E de manière ER-dépendante (Kim et al., 2017). L'effet prolifératif du BPS sur des cellules ER-positives a également été démontré par d'autres études (Deng et al., 2018; Lin et al., 2019). De plus, tout comme le BPA, le BPS peut aussi induire des modifications épigénétiques et des changements transcriptionnels qui favorisent la progression tumorale en agissant sur la prolifération, la migration et l'invasion (Huang et al., 2019). En effet, une étude rapporte le rôle

du BPS mais aussi du BPF sur la migration et les propriétés liées à l'EMT dans des cellules tumorales ER-positives. Après un traitement, les auteurs observent que les cellules semblent perdre leur contact cellules/cellules et acquérir une morphologie plus fibroblastique classiquement associée à un phénotype d'EMT, qui a été par la suite confirmé grâce à une analyse de l'expression protéique montrant une diminution de l'E-cadhérine et une augmentation de la N-cadhérine (Kim et al., 2017). De manière intéressante, il semblerait que l'action du BPA et du BPS sur la migration cellulaire impliquerait des voies de signalisations différentes. En effet, tous deux passent par le récepteur GPER mais dépendant de la signalisation FAK/Scr/ERK2 dans le cas du BPA et via la voie Hippo/YAP dans le cas du BPS (Deng et al., 2018). Par ailleurs, ces deux composés jouent également un rôle sur le microenvironnement cellulaire. En effet, un traitement au BPS conduit à une production de BMP2 par le stroma mammaire sain (Chapellier et al., 2015), et il est intéressant de noter que cette synthèse est similaire à celle observée après un traitement au BPA. Un effet similaire au BPA sur l'activité de l'aromatase et sur la production d'œstrogènes par des fibroblastes mammaires sains après un traitement au BPS a également été montré. Tout ceci démontre bien que ces substituts ont des effets similaires au BPA, aussi bien au niveau de la prolifération que de la progression tumorale et de la dérégulation du microenvironnement. Deux autres études ont également rapporté le rôle du BPS sur le microenvironnement cellulaire, favorisant l'inflammation et l'accumulation de lipides en agissant d'une part sur les macrophages qui augmentent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL6 et réduisent la production de molécules anti-inflammatoires et d'autre part en agissant sur des cellules pré-adipocytaires en induisant leur différenciation et en augmentant l'expression de marqueurs adipogéniques (Boucher et al., 2016; Zhao et al., 2017).

## Chapitre 5: La famille des bone morphogenetic proteins (BMP)

### A. Généralités

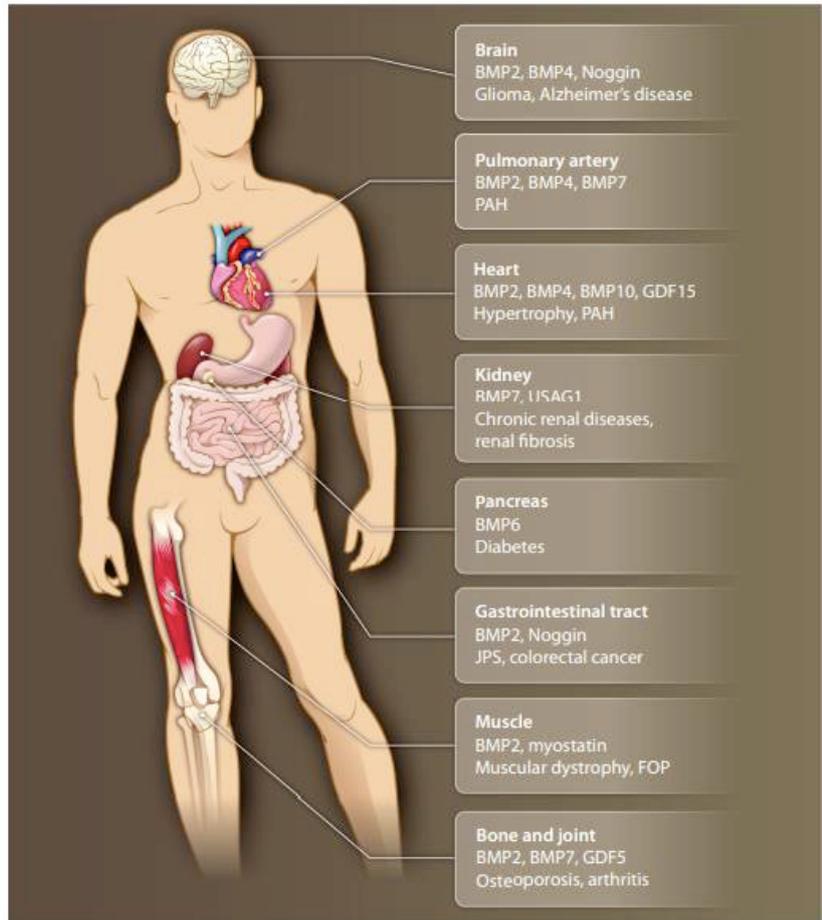
Les BMP ont été décrit pour la première fois en 1965 et nommés *Bone Morphogenetic Proteins* du fait de leur capacité à induire la formation ectopique d'os et de cartilage (Urist, 1965), puis caractérisés, purifiés et clonés à la fin des années 80 (Wozney et al., 1988). Cette famille de molécules appartient à la super famille du TGF $\beta$  dans laquelle on retrouve de nombreuses sous-familles telles que le TGF $\beta$ , les activines, les GDF (growth differentiation factors) et d'autres (Wang et al., 2014b). Les BMP jouent un rôle crucial aussi bien lors de l'embryogénèse, pour leur implication dans l'engagement de plusieurs lignages cellulaires et dans la morphogénèse de différentes structures et organes, qu'à l'âge adulte en cas de réparation tissulaire par exemple (Basson, 2012; Marsell and Einhorn, 2009; Sountoulidis et al., 2012; Wagner et al., 2010). Du fait de leur capacité à réguler de nombreux processus dans le corps entier et pas uniquement dans le système osseux et cartilagineux, les BMP sont également nommés de manière non officielle « *Body Morphogenetic Proteins* » (*figure 35*) (Wagner et al., 2010). Outre leur importance dans l'homéostasie générale, il a été démontré qu'une dérégulation de ces protéines essentielles pouvait être la cause d'un grand nombre de pathologies comme le développement de cancers (Wang et al., 2014b). Le nombre important de ligands et de sous-types de récepteurs, aboutissant à un nombre considérable de combinaisons ligands/ligands, récepteurs/récepteurs et ligands/récepteurs, ainsi que leur localisation cellulaire très régulée font de cette voie une voie de signalisation très complexe dont les effets biologiques sont très variables en fonction du tissu et du contexte (Sieber et al., 2009).

### B. Structure des ligands et des récepteurs

#### 1. Les ligands

Les BMP sont des molécules solubles qui vont être sécrétées par différents types cellulaires mais majoritairement par les cellules stromales. La traduction des BMP se met en place dans le réticulum endoplasmique et des modifications post-traductionnelles peuvent avoir lieu par la suite au niveau de l'appareil de Golgi (Bragdon et al., 2011). Ils sont synthétisés sous forme de précurseurs qui sont constitués de 400 à 500 acides aminés comprenant : un signal peptidique en N-terminal permettant la sécrétion, un prodomaine impliqué dans le repliement de la protéine et en C-terminal un domaine mature qui peut être clivé du

A



B

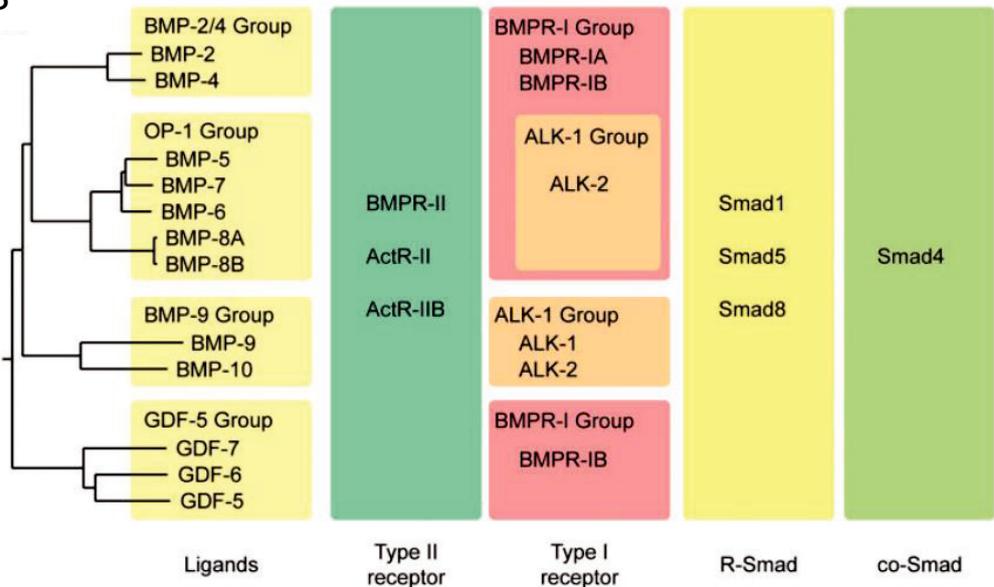


Figure 35: Les BMPs sont une grande famille de molécules solubles comprenant plusieurs types de récepteurs et de molécules de signalisations, dont certains groupes ligands/récepteurs sont illustrés en (b), expliquant ainsi leur capacité à réguler de nombreux processus biologiques (a). (Sieber et al., 2009 + Miyazono et al., 2010)

prodomaine une fois dimérisé (*figure 36A*) (Bragdon et al., 2011; Nelsen and Christian, 2009; Sieber et al., 2009; Xiao et al., 2007). La forme active des BMP est une molécule de 50 à 100 acides aminés comprenant 7 cystéines permettant la formation de ponts disulfures et la dimérisation pour aboutir à une forme biologiquement active qui pourra se fixer aux récepteurs des BMP (BMPR) (*figure 36C*) (Nohe et al., 2002). De nombreux BMP existent et peuvent être classés en 4 sous-familles en fonction de leur homologie de séquences : BMP2/4, BMP5/6/7/8, BMP9/10 et BMP12/13/14 (également appelés GDF7,6 et 5) (Miyazono et al., 2010). Les BMP vont agir sur leur récepteur soit sous forme d'homodimère soit sous forme d'hétérodimère et il a été rapporté que certains hétérodimères comme BMP2/5, BMP2/6, BMP2/7 et BMP4/7 ont une activité plus importante que les homodimères correspondant (Israel et al., 1996; Little and Mullins, 2009; Sieber et al., 2009). Une fois dimérisés, les BMP vont être sécrétés avec ou sans leur prodomaine ou empaquetés dans des vésicules (*figure 36B*). Ils pourront par la suite diffuser sous forme libre ou être capturé par des éléments de la matrice extracellulaire tels que les microfibrilles via leur prodomaine et se concentrer ainsi dans le microenvironnement cellulaire, entraînant des effets biologiques variés (Ramirez and Rifkin, 2009; Sengle et al., 2008). En effet, comme l'a démontré l'équipe du Dr Picard, en fonction du mode de présentation des BMP, leur internalisation dans la cellule et la réponse cellulaire seront différentes (Fitzpatrick et al., 2017; Gilde et al., 2016).

## 2. Les récepteurs au BMP

Deux types de récepteurs aux BMP existent : le type I et le type II. Ils sont composés de trois différentes parties : un domaine extracellulaire comprenant le site de liaison des ligands, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire qui présente une activité sérine-thréonine kinase (*figure 36C*) (Zylbersztejn et al., 2018). Parmi le type I, également appelé ALK pour *Activin receptor-Like Kinase*, on retrouve sept sous-types de récepteurs (ALK1 à ALK7) (Miyazono et al., 2010) répartis en trois groupes en fonction de leur structure et de leur fonction. Il existe uniquement trois récepteurs de type II : BMPR-II, ActR-II et ActR-IIB, dont les deux premiers sont spécifiques à la sous-famille des BMP. Même si les BMP peuvent parfois se fixer sur le type I en absence du type II, la présence des deux types est nécessaire pour permettre une fixation idéale des ligands et pouvoir induire une signalisation optimale. Ainsi, la liaison des ligands se fait au niveau d'une poche formée par la dimérisation de deux type I et la spécificité ligand/récepteur va dépendre directement du sous-type du ligand et du récepteur. Ainsi, certains ligands vont présenter une forte affinité pour un type de récepteur particulier, comme par exemple BMP2 et BMP4 qui vont se fixer aux récepteurs BMPR-1A et BMPR-1B alors que BMP6 et BMP7 auront une meilleure affinité pour ALK-2 par rapport à BMPR-1B. Il a été rapporté qu'il existe deux isoformes de BMPR-II, une forme courte et une forme longue,

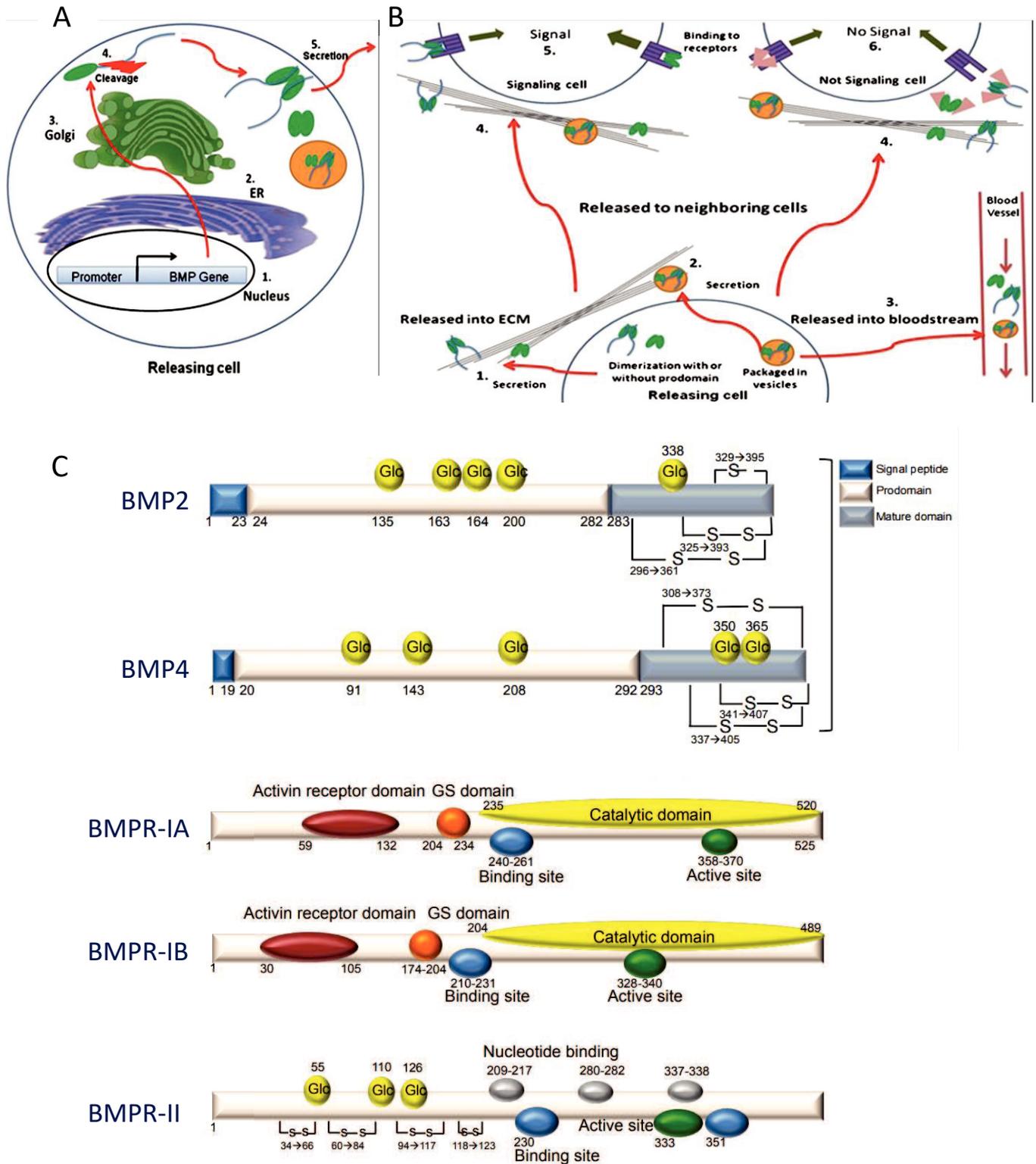


Figure 36: Mécanismes de production (a) et de sécrétion des BMP (b) et structures protéiques de BMP2, BMP4 et des récepteurs BMPR-IA, BMPR-1B et BMPR-II (c). (Bragdon et al., 2011 + Zylbersztejn et al., 2018)

résultant d'un épissage alternatif. Ainsi, seule la forme longue garde un motif d'endocytose au niveau de sa queue permettant son internalisation et sa dégradation. Par ailleurs, son expression membranaire est plus faible. A l'inverse, la forme courte de BMPR-II présente une stabilité membranaire plus importante ce qui en fait l'acteur majeur dans la signalisation aux BMP (Amsalem et al., 2016). Du côté de BMPR-I, BMPR-1A et BMPR-1B présentent des profils d'expression membranaire et de localisation cellulaire différents du fait que BMPR-1A est N-glycosylé et non BMPR-1B. En effet, cette modification post-traductionnelle confère à cette protéine une conformation particulière, influençant son endocytose et la voie de signalisation induite et elle pourrait également être en cause dans la localisation de BMPR-1A dans des micro-domaines membranaires enrichis en cholestérol (Hirschhorn et al., 2017).

La signalisation des BMP nécessite la formation d'un complexe entre un dimère de ligands BMP, un dimère de BMPR de type I ainsi que d'un dimère de BMPR de type II. L'interaction du ligand avec son récepteur peut se faire sous différentes formes, soit un complexe de récepteurs BMPR-I/BMPR-II est déjà formé à la membrane et le ligand vient alors s'y fixer, on parle de PFC (Preformed complexe), soit le ligand vient d'abord se fixer sur un dimère de BMPR-I seul permettant alors le recrutement de BMPR-II, on parle dans ce cas-là de BISC (BMP-induced signaling complexes). La localisation de ces différents complexes ou des homodimères de récepteurs est très variable, pouvant être dans des domaines riches en clathrine, dans des rafts lipidiques impliquant les cavéolines ou encore dans des domaines enrichies en intégrines ou en lectines et ceci va participer au type de signalisation induite (Ehrlich, 2016; Guzman et al., 2012; Hartung et al., 2006; Nohe et al., 2005; Yadin et al., 2016).

### C. Signalisation des BMP

La cascade de signalisation des BMP commence après la fixation des BMP sur ses récepteurs permettant ainsi la transphosphorylation de BMPR-I par BMPR-II au niveau de son domaine riche en glycine-sérine, aboutissant alors à son activation. Par la suite, BMPR-I va alors pouvoir recruter des protéines et initier une cascade de phosphorylation pour entraîner *in fine* l'activation ou l'inhibition de gènes cibles. Deux types de voies de signalisation peuvent être initiés par les BMP, une voie dite canonique faisant intervenir les protéines SMADs, et des voies de signalisations non-canoniques SMADs-indépendantes (*figure 37*).

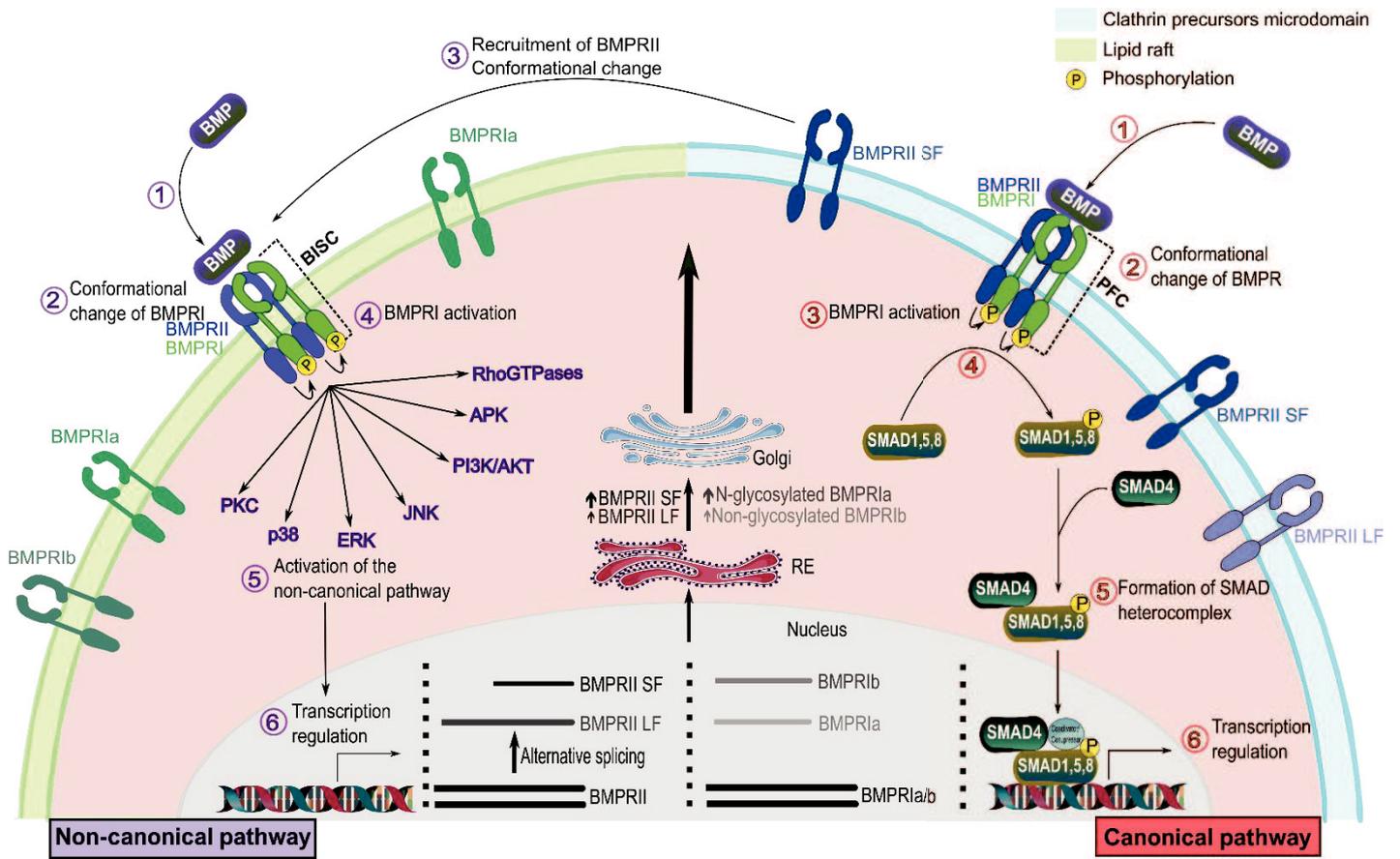


Figure 37: Biosynthèse, oligomérisation, localisation des récepteurs aux BMP et induction des différentes voies de signalisation (Cuella Cristina en préparation).

L'interaction du ligand avec son récepteur peut se faire sous différentes formes, soit un complexe de récepteurs BMPRI/BMPRII est déjà formé à la membrane et le ligand vient alors s'y fixer, on parle de PFC (Preformed complexe), permettant alors l'activation de la voie canonique SMAD-dépendante, soit le ligand vient d'abord se fixer sur un dimère de BMPRI seul permettant alors le recrutement de BMPRII pour activer des voies non canoniques, SMAD-indépendantes et on parle dans ce cas-là de BISC (BMP-induced signaling complexes).

## 1. La voie canonique

Des données de la littérature suggèrent qu'une configuration PFC des récepteurs serait à l'origine de l'initiation de la voie canonique (Hartung et al., 2006; Nohe et al., 2002). En effet, des complexes de récepteurs type I et II déjà formés seraient retrouvés dans des microdomaines riches en clathrine et induiraient une signalisation dépendante des SMADs mais de manière très faible, par la suite amplifiée après la fixation d'un dimère de ligands BMP sur ce complexe permettant un changement de conformation des récepteurs et l'activation de BMPR-I par phosphorylation. Cette activation entraîne alors le recrutement et l'activation par phosphorylation des SMAD1/5/8 (R-SMADs). Cette étape de signalisation s'effectue alors que les récepteurs sont toujours localisés à la membrane (Hartung et al., 2006). Par la suite, les SMAD1/5/8 phosphorylées vont former un complexe avec le médiateur SMAD4 (co-SMAD) et être transloquées dans le noyau et réguler l'expression génique en se fixant directement sur des éléments de réponses de types SBE ou indirectement par interaction avec des facteurs de transcriptions ou des coactivateurs transcriptionnels tels que OAZ, p300, CPB ou des corépresseurs comme HDAC, Ski, TOB ou encore FOXO, conduisant alors à l'expression de gènes cibles tels que ceux de la famille *ID* (Inhibitor of Differentiation), *runx* ou encore *gata* (Ito and Miyazono, 2003; Massagué and Wotton, 2000; Massagué et al., 2005; Nemer and Nemer, 2003). Des études ont démontré que cette activation SMAD-dépendante pouvait également être retrouvée dans des radeaux lipidiques riches en cavéoline puisqu'un KO de cette protéine entraîne une diminution de la fixation de BMP2 sur son récepteur et l'abolition de la cascade de signalisation canonique dépendante des SMADs (Bonor et al., 2012).

## 2. La voie non-canonique

Comme décrit précédemment, les BMP peuvent activer une voie de signalisation en se fixant sur un dimère composé seulement de BMPR-I et permettre alors le recrutement d'un dimère de BMPR-II afin d'initier une réponse cellulaire, on parle alors de BISC. Il a été montré que la signalisation induite *via* ce mécanisme est différente de celle initiée par la configuration PFC (Hartung et al., 2006). En effet, sa localisation privilégiée au niveau de micro-domaine riche en cavéoline semblerait orienter ce mode d'activation plutôt vers des voies de signalisation non-canoniques, SMAD-indépendantes telles que APK, p38, ERK, JNK, PI3K/AKT, Rho GTPases ou encore PKC qui aboutiront à la transcription de gènes cibles (Hartung et al., 2006; Nohe et al., 2002). A ce jour, ce mécanisme d'activation reste encore très obscur et de nouvelles études sont nécessaires pour mieux comprendre cette signalisation.

### 3. Les régulations de la voie des BMP

Un premier niveau de contrôle de la voie des BMP se fait par la régulation et de la disponibilité des récepteurs (*figure 38*).

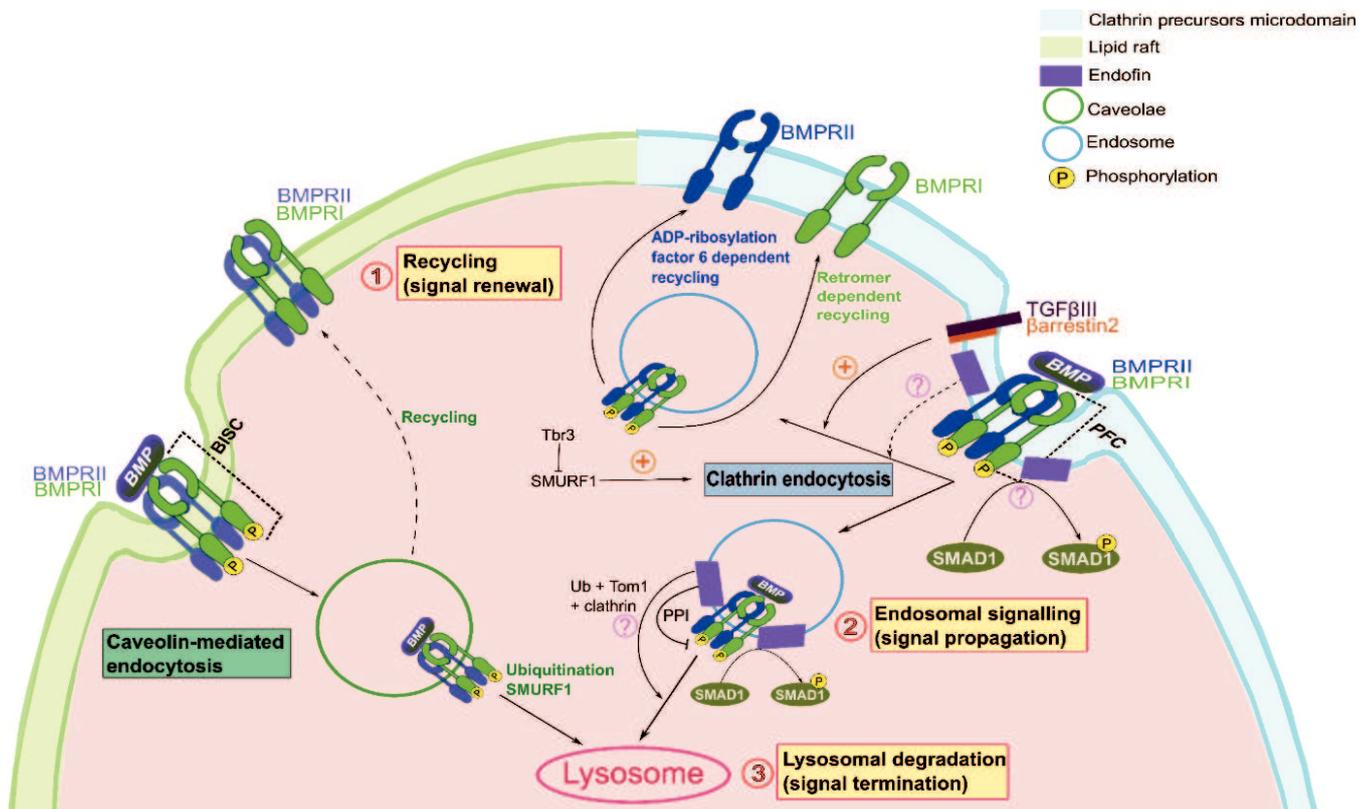


Figure 38: Régulation de la voie des BMP par le recyclage à la membrane (1), l'endocytose (2) ou la dégradation par les lysosomes (3) de leurs récepteurs. (Cuella Cristina en préparation).

En effet, l'endocytose des récepteurs diminue leur taux à la membrane, réduisant ainsi la capacité des BMP à s'y fixer et donc à induire une signalisation. Ainsi, dans le cas d'un complexe PFC, l'internalisation de celui-ci se fera préférentiellement *via* une endocytose dépendante de la clathrine. Cette internalisation ne gêne pas la phosphorylation des SMAD1/5/8 mais une inhibition de celle-ci entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle induite par les SMADs, suggérant ainsi que l'endocytose se met en place après l'activation de la signalisation mais est nécessaire pour transduire correctement le signal (Hartung et al., 2006). Plusieurs protéines sont impliquées dans ce processus d'endocytose, dont Esp15, qui a été montré pour interagir avec BMPRII, ou encore le co-récepteur TGFβRIII qui promeut l'internalisation de BMPRII (Callery et al., 2012; Hartung et al., 2006; Lee et al.,

2009). Il a été montré que l'endocytose des complexes sous forme de BISC se fait par les cavéolines, ce qui est en accord avec le fait qu'ils sont majoritairement localisés au niveau de micro-domaines enrichis en cavéolines, et qu'une interaction des récepteurs BMPR-I et II a été retrouvée avec la cav-1 $\alpha$  (Hartung et al., 2006). L'internalisation des récepteurs va permettre une régulation de la voie, soit positive par un recyclage du récepteur à la surface de la cellule pour initier une nouvelle signalisation, comme ceci a été démontré pour BMPR-I grâce au complexe rétromère ou par la propagation du signal médiée par l'intégration à des endosomes ; soit négative par ubiquitination des récepteurs et fusion avec des lysosomes via la protéine SMURF1, permettant ainsi une dégradation des récepteurs et un arrêt de la signalisation, évitant alors une suractivation de la voie (Ehrlich, 2016; Gleason et al., 2014; Murakami and Etlinger, 2019). Plusieurs études ont montré qu'une protéine importante pour la régulation de la voie était l'Endofin (Goh et al., 2015; Murphy, 2007; Shi et al., 2007). Tout comme les protéines SARA qui permettent le recrutement des SMAD 2/3 pour l'activation de la voie du TGF $\beta$ , cette protéine possède un domaine FYVE et va promouvoir le recrutement de SMAD1 vers les récepteurs, permettant ainsi l'initiation de la signalisation. Outre sa capacité à initier la cascade de signalisation des SMADs, elle va également jouer un rôle de régulateur négatif de cette voie grâce au recrutement de la protéine phosphatase I (PPI), conduisant à la déphosphorylation et à l'inactivation de BMPR-I, ainsi qu'à la dégradation de ce dernier grâce au recrutement de TOM1. D'autres molécules vont également être impliquées dans la régulation de la signalisation des BMP. On retrouve ainsi une régulation extracellulaire, *via* des molécules solubles du microenvironnement comme Noggin, Chordin ou Follistatine entre autres, qui vont se lier au BMP ou avoir un rôle de compétiteurs de ces derniers en se fixant sur les récepteurs. On retrouve également des compétiteurs au niveau des récepteurs, comme BAMBI qui va se lier avec BMPR-II et empêcher alors la formation d'un complexe BMPR-I/II et donc la signalisation des BMP (Gazzerro and Canalis, 2006; Onichtchouk et al., 1999). En revanche, d'autres co-régulateurs peuvent favoriser cette signalisation, tel que RGM, qui va augmenter la liaison ligand/récepteur favorisant ainsi la signalisation (Corradini et al., 2009). Une régulation au niveau des SMADs existe aussi (*figure 39*). En effet, SMAD6 et SMAD7 ont été décrits pour avoir des structures proches de celles des SMAD1/5/8 et permettraient d'empêcher la phosphorylation de ces dernières et la formation du complexe avec SMAD4 (Miyazawa and Miyazono, 2017). Ils agiraient également sur le processus d'ubiquitinylation en coopération avec les protéines SMURF. SMAD7 est un régulateur négatif qui agit également dans la signalisation du TGF $\beta$  tandis que SMAD6 semble être plus spécifique de la voie des BMP. SMAD6 agit également au niveau intranucléaire puisqu'il semblerait stabiliser des éléments répresseurs de transcription tel que Hoxc-8 et empêcher ainsi l'action du complexe SMAD1/SMAD4 (Bai and Cao, 2002). D'autres corépresseurs comme Tob, Gli3 ou Ski, agissent également sur la régulation de la voie des BMP au niveau de la transcription des gènes cibles du complexe R-SMADs/SMAD4 (Miyazono et al., 2010; Yoshida et al., 2000). Il a également été démontré

que des mécanismes épigénétiques tels que des hypo ou hyperméthylations de gènes ou des miRNA peuvent aussi réguler la signalisation des BMP (Kimura et al., 2008; Lee et al., 2008a; Long et al., 2013; Rajee and Ashma, 2019; Yin et al., 2010).

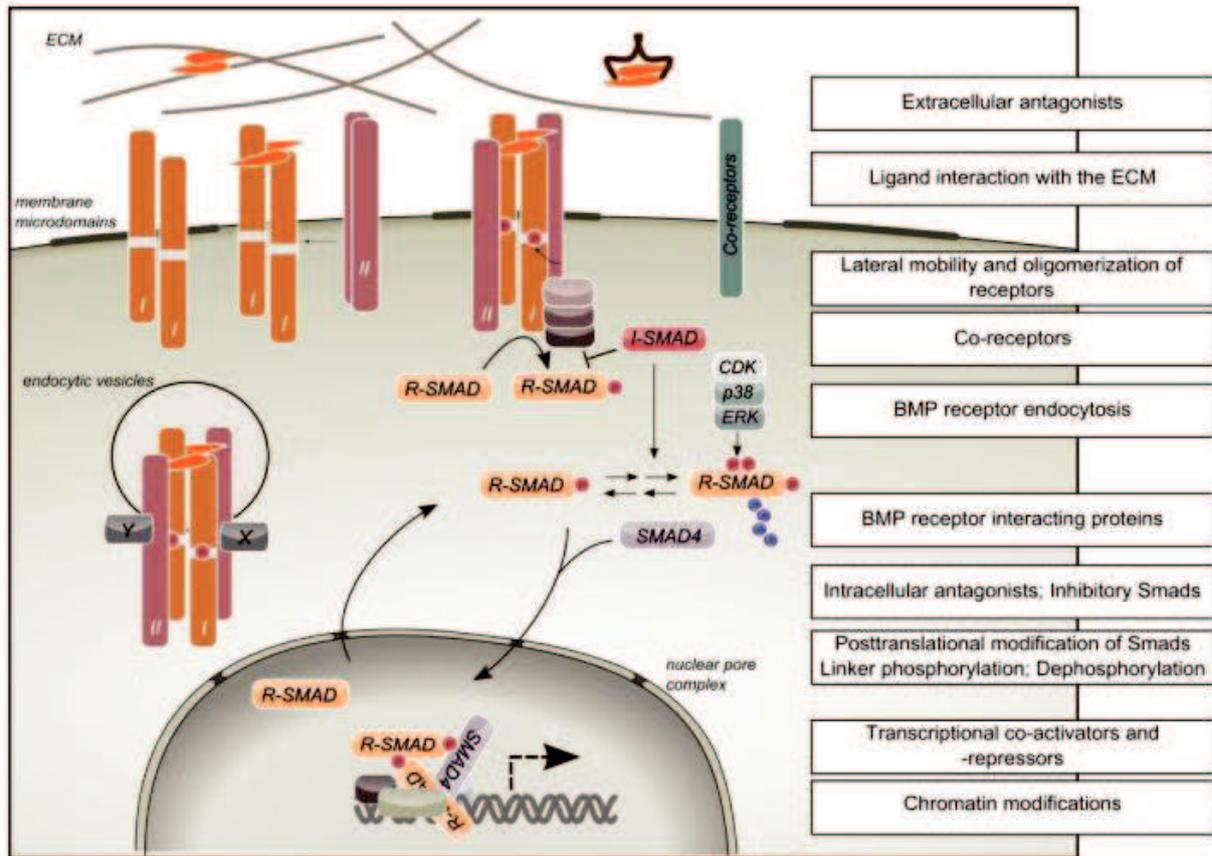


Figure 39: Autres niveaux de régulation des voies de signalisation des BMP, pouvant passés entre autres par des antagonistes extracellulaires, des co-récepteurs, des inhibiteurs intracellulaires. (Kopf et al., 2014)

#### D. Implication dans les cancers

Le nombre important de ligands et de sous-types de récepteurs, aboutissant à un nombre considérable de combinaisons ligands/ligands, récepteurs/récepteurs et ligands/récepteurs, ainsi que de leur localisation cellulaire font de cette voie une voie de signalisation très complexe dont les effets biologiques sont très variables en fonction du tissu et du contexte, ce qui est à l'origine de sa capacité à réguler de nombreux processus dans le corps entier et pas uniquement dans le système osseux et cartilagineux. Ainsi, une dérégulation de ces protéines essentielles peut être la cause d'un grand

nombre de pathologies comme le développement de cancers (Sagorny et al., 2012; Thawani et al., 2010; Wang et al., 2014b). En effet, les BMP sont impliqués dans différentes étapes de carcinogénèse ainsi que dans la résistance aux traitements.

### 1. Initiation et progression tumorale

Des données de la littérature ont montré qu'une augmentation de la N-glycosylation de BMPR-1A contribuait à la croissance tumorale en augmentant l'expression de ce récepteur à la surface cellulaire et donc en favorisant la signalisation des BMP qui participe alors à la prolifération et à la migration cellulaire. En revanche, une diminution de l'expression membranaire de BMPR-1A *via* une diminution de la N-glycosylation annule cette progression tumorale (Hirschhorn et al., 2017). Outre une implication des récepteurs dans la tumorigénèse, les ligands peuvent également y contribuer. Comme décrit précédemment, les BMP ont une multitude d'actions biologiques en fonction du tissu et du contexte. En effet, il a été montré dans le modèle du sein que BMP2 était plutôt impliqué dans la différenciation et la prolifération des progéniteurs mammaires luminaux tandis que BMP4 permet un maintien de l'état indifférencié des cellules souches et des progéniteurs luminaux et contrôle la différenciation myoépithéliale. A l'inverse, dans le système hématopoïétique, BMP4 joue un rôle important dans l'induction de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Des études effectuées dans le laboratoire d'accueil de ma thèse ont mis en évidence une altération des BMP dans le microenvironnement du sein conduisant à la transformation des cellules souches. En effet, une surproduction de BMP2 par les cellules fibroblastiques saines a été observée dans le microenvironnement des tumeurs lumineuses et il a été démontré qu'une exposition chronique à faible dose de BMP2 sur des cellules mammaires immatures humaines (MCF10A) conduit à leur transformation, *via* le récepteur BMPR-1B (*figure 40A*) (Chapellier et al., 2015). Un niveau élevé de BMP2 et BMP4 a également été observé dans la niche tumorale dans le modèle de la leucémie myéloïde chronique, promouvant l'expansion des cellules leucémiques immatures (*figure 40B*) (Laperrousaz et al., 2013). Par ailleurs, il a été rapporté qu'une signalisation médiée par BMP2 ou BMP4 pouvait promouvoir la survie cellulaire en inhibant l'apoptose (Chen et al., 2001). Ainsi, une prolifération de cellules immatures combinée à leur transformation et à un blocage de l'apoptose, induit par les BMP ou leur dérégulation contribuent donc à favoriser le développement tumoral. L'importance du microenvironnement dans le développement tumoral et sa progression a largement été décrit. Outre un changement dans la concentration des différentes molécules solubles, ce microenvironnement peut également subir des modifications dans sa rigidité et ses propriétés mécaniques. Ceci a été montré dans le cas des cancers du sein qui présentent une rigidité pouvant être

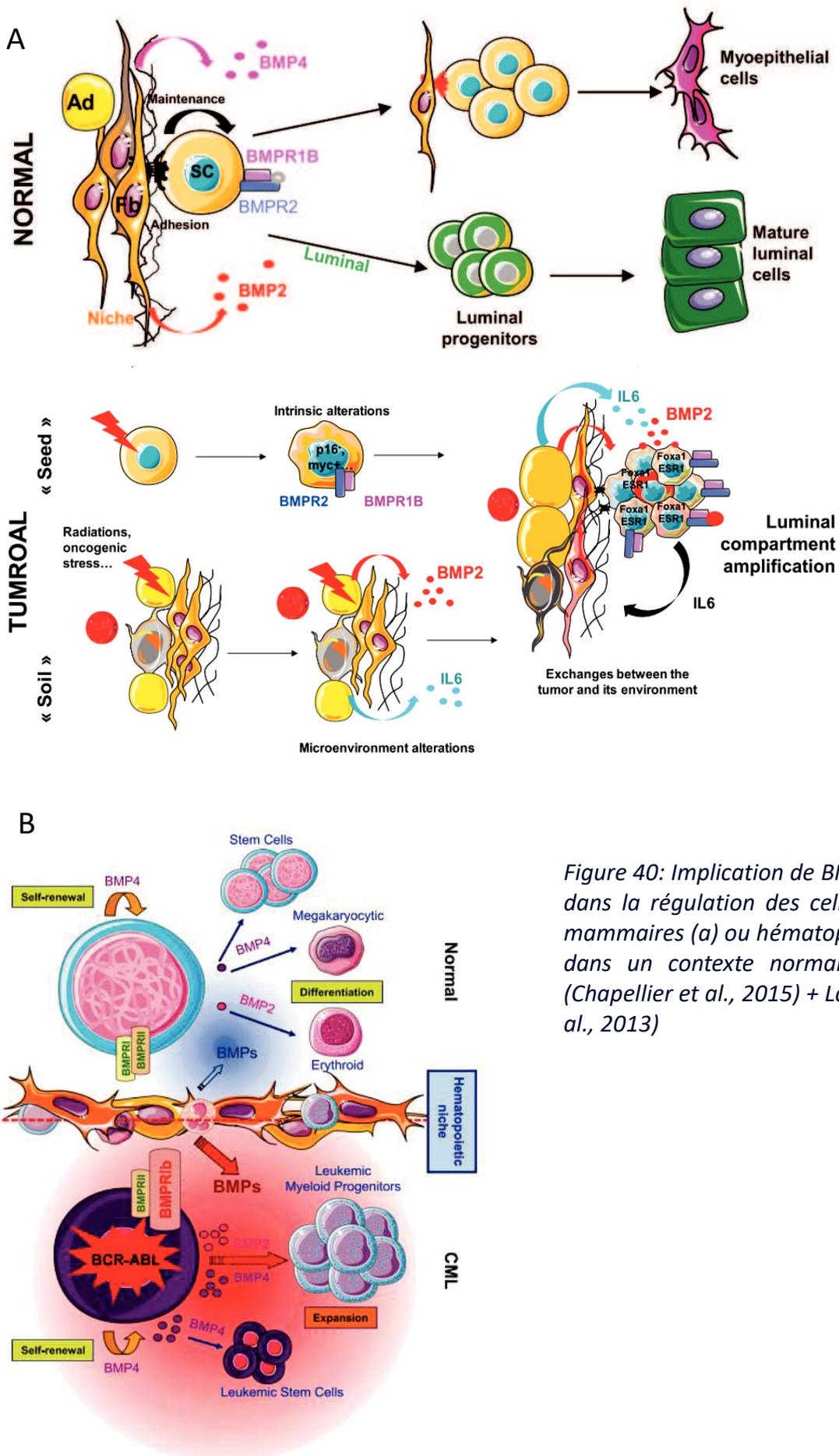


Figure 40: Implication de BMP2 et BMP4 dans la régulation des cellules souches mammaires (a) ou hématopoïétiques (b) dans un contexte normal et tumoral (Chapellier et al., 2015) + Laperrousaz et al., 2013)

jusqu'à 10 fois plus importante que le tissu sain ou dans le cas de la leucémie myéloïde aigue où une augmentation de la pression est retrouvée dans la moelle osseuse (Handorf et al., 2015; Petrakis, 1954). Ainsi, ces modifications de la rigidité et des forces mécaniques qui s'exercent sur les cellules va modifier différentes fonctions telles que l'adhésion, la prolifération ou la différenciation, pouvant alors participer à la tumorigenèse (Engler et al., 2006; Handorf et al., 2015, 2015; Klein et al., 2009; Matsunaga et al., 2003; Mitsiades et al., 2001; Paszek et al., 2005; Provenzano et al., 2009; Sethi et al., 1999; Williams et al., 2008). En effet, il a été montré qu'un changement dans la rigidité de la matrice entraînait une augmentation de la prolifération des cellules mammaires par une augmentation de l'expression de la *Cycline D1* ainsi que d'autres gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et également une modification dans le processus d'apoptose permettant alors une résistance des cellules cancéreuses, favorisant donc la progression tumorale (Klein et al., 2009; Mitsiades et al., 2001; Provenzano et al., 2009; Sethi et al., 1999). Cette augmentation de la rigidité peut être imputable à une augmentation de plusieurs composants de la matrice extra-cellulaire, avec notamment une abondance de collagènes, de fibronectines et de protéoglycanes de types héparanes sulfates associée à une dérégulation des métalloprotéinases. (Handorf et al., 2015; Williams et al., 2008). Ainsi, il a été montré dans différents modèles que les BMP sont impliqués dans le remodelage de la matrice, par exemple *via* la synthèse de protéoglycanes et l'expression de métalloprotéinases par BMP2 ou encore *via* la synthèse de procollagène de type I et III par BMP12 (Blaney Davidson et al., 2007; Fu et al., 2003; Hou et al., 2009; Lou et al., 2001; Rajaram et al., 2016). En plus de l'implication des BMP dans une modification de la matrice, il a été rapporté que la voie des BMP pouvait, en retour, être modulée en fonction des forces et de la rigidité qui s'appliquent sur les cellules (Kopf et al., 2014). En effet, les BMP ont été décrit comme des mécanotransducteurs, de par la localisation de leurs récepteurs au niveau des cavéolines, décrites pour être des senseurs et de manière indirecte *via* l'interaction avec d'autres récepteurs tels que les intégrines dont l'interaction avec les BMPR module leur endocytose et l'activation des SMADs, ou ROR2 qui a été montré pour supprimer la signalisation SMADs dépendante au profit d'une signalisation non canonique *via* son interaction avec BMPR-IB (Du et al., 2011; Lai and Cheng, 2005; Parton and del Pozo, 2013; Sammar et al., 2004, 2009; Zhou et al., 2013). Par ailleurs, la signalisation des BMP est également sensible aux contraintes du microenvironnement par la régulation de ses antagonistes par ces contraintes. En effet, il a été montré que les inhibiteurs de la voie des BMP : Noggin, Follistatine, Gremlin ou encore SMAD6 sont sensibles aux forces mécaniques (Handorf et al., 2015; Hayashi et al., 2012).

## 2. Métastases, résistance aux traitements et rechutes

La dissémination des cellules cancéreuses est une étape importante dans la progression tumorale et ceci peut conduire à un développement de métastases médié par une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Une dérégulation dans la signalisation des BMP a été rapportée pour être impliquée dans différents processus tel que l'induction de l'EMT et l'augmentation de la mobilité ou encore stimuler l'angiogenèse et l'invasion, favorisant ainsi la progression tumorale (Guo et al., 2012a; Katsuno et al., 2008; Ma et al., 2017; Sotobori et al., 2006; Zeng et al., 2017). Comme décrit dans un chapitre précédent, la chimiothérapie est le traitement le plus utilisé contre les cancers. Cependant des chimiorésistances se mettent en place en partie dues au maintien de cellules souches cancéreuses qui n'ont pas été éliminées avec le traitement et reforment alors une nouvelle tumeur, à l'origine des rechutes (Pattabiraman and Weinberg, 2014). Ces cellules souches cancéreuses sont soit déjà présentes dans la tumeur primaire soit apparues à la suite d'une reprogrammation comme l'EMT. Ainsi, il a été montré dans le cas de la leucémie myéloïde chronique qu'une boucle autocrine BMP4/BMPR-1B se met en place entre les cellules souches leucémiques et leur niche, augmentant l'expression de TWIST1 et conduisant à une résistance au traitement (Grockowiak et al., 2017). De manière similaire, une augmentation de BMPR-1A dans le modèle de la leucémie myéloïde aigue entraîne une augmentation de l'expression de gènes de pluripotence tels que  $\Delta Np73$  and NANOG et conduirait à un auto-renouvellement des cellules souches dont une augmentation du nombre est corrélée à une chimiorésistance, à des rechutes et à un mauvais pronostic (Voeltzel et al., 2018).

*Nous avons ainsi vu que les BMP sont des facteurs régulant de très nombreuses fonctions biologiques dont une dérégulation peut être la cause d'un grand nombre de pathologies comme le développement de cancers, pouvant être initié par exemple, à la suite d'une surproduction de BMP2 par le microenvironnement et stabilisé dans un environnement inflammatoire permit par l'IL6 (Chapellier et al., 2015). Cette coopération entre la voie des BMP et l'IL6, qui sera introduit plus en détail dans le chapitre suivant, démontre qu'en plus d'une forte hétérogénéité dans les différentes signalisations initiées par les BMP, ces dernières peuvent également agir en synergie avec d'autres signalisations, telles que les voies de signalisations STAT, Wnt, Notch ou encore celles initiées par les œstrogènes (von Bubnoff and Cho, 2001; Miyazono et al., 2010; Yamamoto et al., 2002).*

## Chapitre 6: Le trio IL6/ERs/BMP

### A. Généralités sur l'interleukine 6 (IL6)

#### 1. Structure et production

L'interleukine 6 est une cytokine impliquée dans de très nombreuses fonctions physiologiques. De ce fait, elle fut découverte par plusieurs équipes au même moment et plusieurs noms lui a été donné, tels que IFN $\beta_2$ , BSF-2, HSF entre autres. Il a fallu attendre le séquençage de l'ADNc pour se rendre compte que toutes ces protéines n'étaient finalement qu'une seule et même molécule (Van Snick, 1990). Le gène codant pour l'IL6 est situé sur le chromosome 7 (7p21) et est composé de 5 exons et de 4 introns pour une longueur d'environ 5 Kb (Kamimura et al., 2003). Plusieurs sites de régulation existent, pouvant impliquer des coactivateurs tels que NF- $\kappa$ B, NF-IL-6, SP1, CREB, IRF-1 et AP-1, permettant ainsi une régulation fine de son expression (Kamimura et al., 2003). Ce gène code une protéine de 21-27 KDa, composée de 212 acides aminés qui fait partie de la même famille que l'interleukine 11, la cardiotrophine-1, les cardiotrophin-likes cytokynes, l'oncostatine M, le leukemia Inhibitory Factor et le ciliary neutrophilic factor, basée sur la présence d'une sous unité commune au niveau de leur récepteur (Heinrich et al., 1998). Elle s'organise sous forme de 4 hélices principales parmi lesquelles on retrouve 4 résidus cystéines, permettant la formation de pont disulfures, et 2 sites de N-glycosylation (Heinrich et al., 1998; Kamimura et al., 2003). Cette cytokine est produite, en réponse à des infections ou lésions tissulaires, par plusieurs types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules mésangiales, les cellules endothéliales ou encore des cellules de l'immunité tels que les macrophages, les lymphocytes B et T, les *Natural Killer* ou encore les cellules dendritiques (Tanaka et al., 2014) et peut agir soit localement soit à distance en passant dans la circulation sanguine (Kamimura et al., 2003).

#### 2. Rôles, signalisations et régulations

Outre son rôle dans des processus de différenciations cellulaires durant l'embryogenèse ou la formation du système nerveux central, l'IL6 fait partie, avec l'interleukine 1 et les protéines de la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF), des cytokines pro-inflammatoires de l'immunité innée et est libérée lors de la phase aiguë de l'inflammation, permettant alors la différenciation des cellules immunitaires ainsi que la libération de facteurs cruciaux pour la réponse immunitaire (Chomarat et al., 2000; Kamimura et al., 2003; Park et al., 2004; Yang et al., 2016). L'initiation de la signalisation de l'IL6

va commencer par sa fixation sur son récepteur constitué de 2 sous-unités : la sous-unité GP130, exprimée par la majorité des cellules et faisant office de corécepteur, et la sous-unité GP80, également appelée IL-6R $\alpha$ , qui est spécifique de certains types cellulaires. Il a été montré que cette dernière sous-unité pouvait être retrouvée sous forme soluble, générée par clivage protéolytique ou par épissage alternatif, ou sous forme membranaire, localisée alors à la surface de la cellule (Rose-John, 2012). L'IL6 va d'abord se fixer sur IL-6R $\alpha$ , soluble ou membranaire, puis par la suite former un complexe avec GP130 (figure 41).

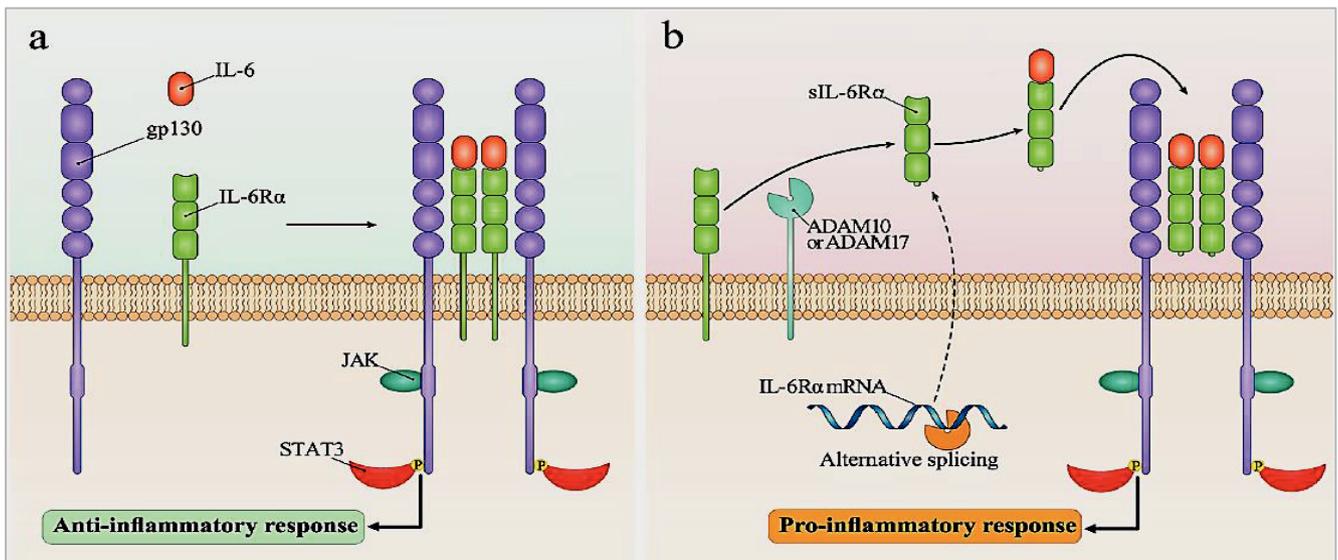


Figure 41: Les différentes signalisations de l'IL6. a) signalisation passant par la fixation de l'IL6 sur la forme membranaire de son récepteur à l'origine d'un effet anti-inflammatoire. b) signalisation passant par la fixation de l'IL6 sur la forme soluble de son récepteur à l'origine d'un effet pro-inflammatoire. (Masjedi et al., 2018)

Cependant, il faut une interaction entre deux de ces complexes tri-moléculaires afin de former un super-complexe résultant en une transduction efficace du signal (Chow et al., 2001; Ward et al., 1994). Il est intéressant de noter que l'IL6 n'est pas que pro-inflammatoire mais peut également exercer des fonctions anti-inflammatoires. En effet, l'interaction de l'IL6 avec la forme membranaire d'IL-6R $\alpha$  semblerait plutôt activer une réponse anti-inflammatoire tandis que sa fixation sur la forme soluble aboutirait en revanche à une réponse pro-inflammatoire, avec notamment une action sur la prolifération et la différenciation cellulaire. Cette opposition dans les réponses peut être expliquée par le fait que GP130 est exprimé par toutes les cellules et est présent en très grand nombre à la surface de la cellule par rapport à IL-6R $\alpha$  membranaire. Ainsi, une fixation de l'IL6 sur la forme soluble permettrait un plus grand nombre de complexes avec GP130 et donc une réponse plus importante mais aussi une action sur la plupart des cellules de l'organisme puisque GP130 est retrouvé de manière ubiquitaire

(Jones et al., 2001; Kamimura et al., 2003; Masjedi et al., 2018). De plus, il a été montré que l'internalisation diffère en fonction de la réponse cellulaire, avec, dans le cas de la forme soluble, une internalisation faible et un signal prolongé. De ce fait, la signalisation induite par la fixation de l'IL6 à la forme soluble est donc non seulement plus longue mais également plus importante, que celle avec la forme membranaire (Dittrich et al., 1994; Peters et al., 1998). La signalisation IL6 peut induire plusieurs voies de signalisation intracellulaire. La sous unité GP130 n'est pas dotée d'une activité kinase mais va permettre le rapprochement de protéines qui elles ont une activité kinase : les protéines JAK. A la suite de la formation du super-complexe *via* la fixation de l'IL6, les kinases JAK 1, 2 et 3 vont alors être recrutées puis s'activer par autophosphorylation, ce qui permettra alors la phosphorylation des résidus tyrosines localisés sur la partie intracytoplasmique du corécepteur GP130, conduisant par la suite au recrutement d'autres molécules (*figure 42*). Ainsi, les protéines JAK vont pouvoir activer les signalisations STAT1-STAT3, MAPK/ERK ou PI3K/Akt (Heinrich et al., 2003; Kamimura et al., 2003; Masjedi et al., 2018; Park et al., 2004). Des régulations négatives ont été décrites pour moduler cette signalisation induite par l'IL6. Une des premières régulations se fait au niveau de la fixation de l'IL6 avec ses récepteurs, grâce à la présence d'une forme soluble de GP130, obtenue par un épissage alternatif, qui va agir comme un dominant négatif en capturant le complexe IL6/IL-6R $\alpha$  soluble, empêchant ainsi l'interaction avec GP130 membranaire (Jostock et al., 2001; Rose-John, 2012).

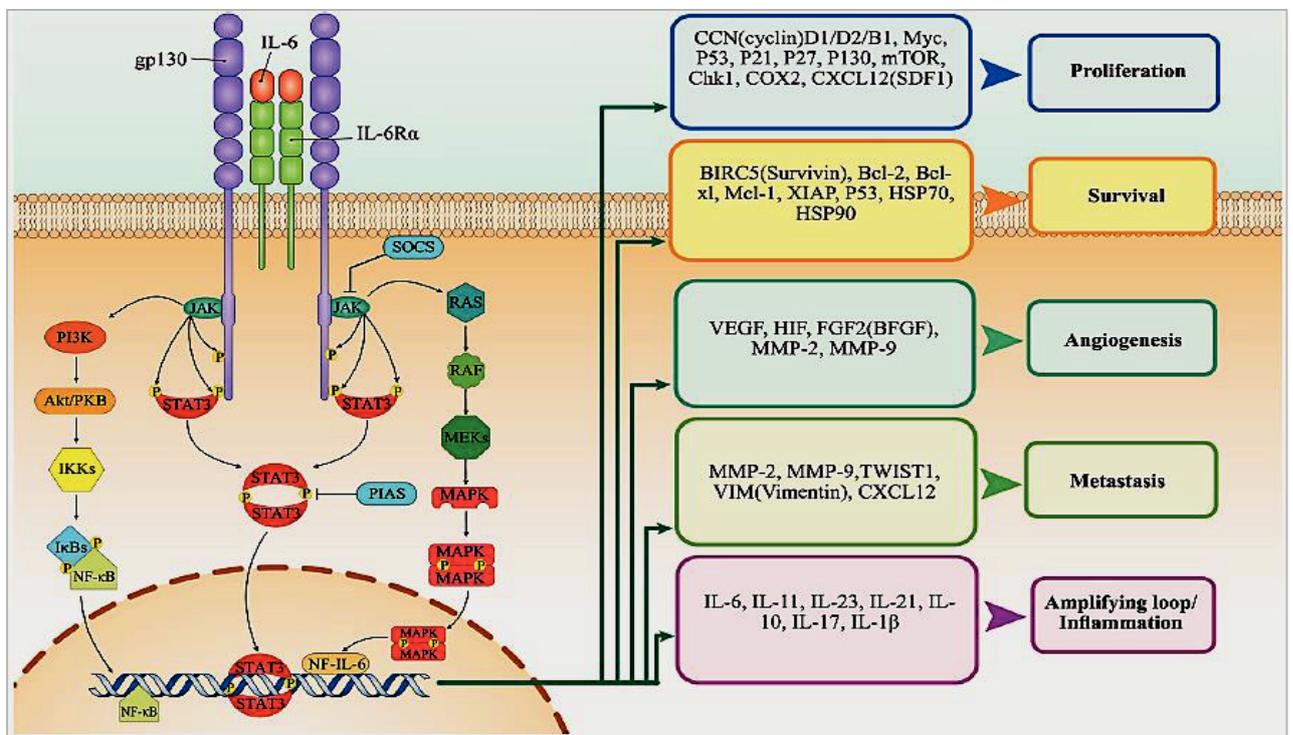


Figure 42: Implication de l'IL6 dans la tumorigenèse par l'activation de plusieurs voies de signalisations aboutissant à la prolifération, la survie, l'angiogenèse, la migration et l'inflammation. (Masjedi et al., 2018)

Il existe également une régulation s'effectuant au niveau de la signalisation intracellulaire par les protéines SOCS (*Suppressor of Cytokine Signaling*) et PIAS (*Protein Inhibitors of Activated STAT*) qui empêchent l'accès aux protéines JAK et la liaison des dimères STAT à l'ADN (Heinrich et al., 2003; Kishimoto, 2006). La signalisation de l'IL6 va conduire à la transcription d'un certains nombres de gènes tels que la cycline D1, Bcl-xL, c-Myc, Mc11 ou encore VEGF.

### 3. Implication dans les cancers

#### a. Dérégulation et initiation tumorale

Outre son rôle dans le développement, l'IL6 est un facteur majeur de l'inflammation et son taux peut être dérégulé dans certaines circonstances. En effet, des études ont montré un taux important d'IL6 dans le tissu adipeux et le plasma chez les personnes obèses. Par ailleurs, plusieurs études démontrent qu'une dérégulation de l'IL6 peut favoriser le développement de certaines maladies. Ainsi, le niveau plasmatique d'IL6 a été décrit pour être associé à une résistance à l'insuline et à un diabète de type 2. Une délétion du récepteur à l'IL6 dans le foie a également été impliquée dans une résistance à l'insuline et à une augmentation de l'inflammation (Makki et al., 2013). Outre le lien IL6/diabète, différents cancers dont les cancers du sein présentent une augmentation du niveau d'IL6 dans le sérum et au niveau de la tumeur (Chavey et al., 2007; Dethlefsen et al., 2013; Kozłowski et al., 2003). Par ailleurs cette augmentation est souvent associée à un mauvais pronostic et un taux de survie faible chez les patients atteints de cancer du sein, tandis qu'une diminution est associée à une meilleure réponse aux traitements (Guo et al., 2012b; Kozłowski et al., 2003; Shibayama et al., 2014). En effet, par ses fonctions pro-inflammatoires, l'IL6 peut être un acteur majeur de la carcinogénèse puisque l'inflammation a été inclus en tant que marqueur du cancer. Il va également être à l'origine de l'induction d'un certain nombre de facteurs et de voies de signalisations impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire ainsi que dans l'angiogenèse ou le développement de métastases, tout ceci contribuant grandement à la tumorigenèse (Hanahan and Weinberg, 2011; Masjedi et al., 2018). Des études ont rapporté qu'une cause possible d'une dérégulation de la production d'IL6 était l'exposition à des polluants environnementaux et notamment des polluants comme le bisphénol A, qui d'une part est capable d'être stocké dans le tissu adipeux et d'autre part va agir sur les adipocytes ou les fibroblastes pour augmenter la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL6 et également activer des signalisations pro-inflammatoires (Cimmino et al., 2019; Xiong et al., 2017) Ainsi, il a été montré qu'une surproduction d'IL6 dans le microenvironnement cellulaire induit un phénotype

néoplasique, causé par l'activation de la signalisation NF-kB et une augmentation de la cycline D1 dans les cellules normales du sein, mais également en mettant en place une boucle positive d'inflammation conduisant à un switch épigénétique qui stabilise un état transformé (Esquivel-Velázquez et al., 2015; Iliopoulos et al., 2009). De plus, il peut également conduire à la transformation de cellules souches normales du sein et de la prostate, notamment lorsqu'il agit en coopération avec BMP2 (Chapellier et al., 2015; Iliopoulos et al., 2009; Kim et al., 2013).

#### *b. Progression tumorale et résistance aux traitements*

En plus d'induire la transformation de cellules mammaires et des cellules souches, l'IL6 a également été rapportée pour réguler ces cellules souches, entre autres en favorisant leur auto-renouvellement. En effet, une étroite collaboration se met en place entre les cellules souches mésenchymateuses et la tumeur mammaire, pouvant être composée de cellules cancéreuses et de cellules souches cancéreuses. Ainsi, il a été montré que l'IL6, produit par les cellules cancéreuses, va stimuler la sécrétion de molécules chimio-attractantes et d'IL6 par les cellules souches mésenchymateuses et en retour, ces facteurs vont agir d'une part sur les cellules cancéreuses pour maintenir cette boucle et d'autre part sur les cellules souches cancéreuses permettant alors leur auto-renouvellement (Liu et al., 2011; Spaeth et al., 2009). Comme décrit précédemment, les cellules souches cancéreuses représentent une problématique majeure dans la progression tumorale, notamment du fait de la difficulté à les cibler, et de leur capacité à résister aux traitements, et donc pouvant être à l'origine de certaines rechutes, mais également du fait que ces cellules présentent un phénotype agressif pouvant provoquer des métastases. En plus de favoriser l'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses, l'IL6 a aussi été décrit pour induire des caractéristiques agressives, aussi bien dans des cellules cancéreuses que dans des cellules souches cancéreuses, avec notamment l'induction d'une EMT provoquée par les adipocytes *via* la sécrétion d'IL6 qui va agir de manière paracrine sur les cellules cancéreuses mais aussi en augmentant le potentiel invasif des cellules et en favorisant l'angiogenèse (Dirat et al., 2011; Gyamfi et al., 2018; Sansone et al., 2007; Wei et al., 2003). Par ailleurs, des données de la littérature ont également souligné le rôle de l'IL6 dans la résistance à certains traitements, comme par exemple au Trastuzumab dans le cas des cancers de type HER+, grâce à la mise en place d'une boucle inflammatoire qui permet l'expansion de la population de cellules souches cancéreuses, favorisant alors un accroissement tumoral et le développement de métastases. Ou encore *via* une connexion avec des mécanismes impliqués dans la détoxification de la cellule, comme des transporteurs à efflux permettant d'exporter les molécules de traitement en dehors de la cellule cancéreuse ou comme des enzymes de détoxifications (Eichten et al., 2016; Ghandadi and Sahebkar, 2016; Korkaya et al., 2012; Kumari et al., 2016).

## B. Crosstalks avec IL6

### 1. IL6 et ERs

Comme vu précédemment, l'IL6 est impliquée dans la tumorigenèse par de nombreux aspects. Plusieurs études ont démontré un lien entre cette cytokine et la signalisation des œstrogènes, ce qui peut être une autre piste pour expliquer sa participation à un développement cancéreux. Dans le modèle du cancer de l'endomètre, il a été rapporté que l'interaction entre les cellules stromales et tumorales permettait une augmentation de la production d'œstrogènes et d'IL6 et ceci grâce à une boucle de régulation positive entre ces deux molécules. En effet, sous l'effet de l'E2, les cellules tumorales vont induire la synthèse d'IL6 *via* une coopération entre ER $\alpha$  et NF-KB et conduire ensuite à sa sécrétion dans le microenvironnement. L'IL6 ira alors agir sur les cellules stromales localisées à proximité pour entraîner une augmentation de l'aromatase ayant pour conséquence une augmentation de la production d'œstrogènes, qui à son tour ira stimuler les cellules cancéreuses (*figure 43*). Par ailleurs, une étude récente a aussi montré que l'activation de la signalisation de l'IL6 par l'E2 promeut la survie, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de l'endomètre *via* l'activation des gènes cibles de l'IL6 tels que Bcl-2, Cycline D1 et MMP2 entre autres, connus pour être impliqués dans la tumorigenèse (Che et al., 2014, 2019). Ceci a également été rapporté dans le modèle du sein, avec l'induction de l'aromatase dans les fibroblastes en réponse à l'IL6 (Purohit et al., 2003; Singh et al., 1995, 1999). De plus, une sécrétion de la forme soluble de l'IL-6R $\alpha$  par les cellules cancéreuses mammaires après une stimulation à l'E2 a aussi été décrite. Ainsi, une étroite collaboration existe entre l'IL6 et les œstrogènes ou la voie de signalisation des œstrogènes. Cependant, il est intéressant de noter que la surproduction d'IL6 dans les tumeurs mammaires est inversement corrélée avec l'expression de ER $\alpha$ , puisque le niveau de cette cytokine est retrouvé plus élevé dans les tumeurs ER-négatives comparé aux tumeurs ER-positives (Chavey et al., 2007). Ceci suggère qu'une connexion existe entre l'IL6 et d'autres variants de ER $\alpha$ , soutenue par une étude qui démontre que dans un type particulier de cancer du sein, de type inflammatoire, l'activation d'une voie non génomique passant par ER $\alpha$ 36 ou GPER favorise l'agressivité de ce cancer et son invasion (Ohshiro et al., 2012). En effet, plusieurs études rapportent un lien entre l'IL6 et les voies non-génomiques de ER $\alpha$  faisant intervenir des variants de ER $\alpha$  avec notamment l'induction de la sécrétion d'IL6 par la voie MEK/ERK initiée par GPER ou encore une régulation de NF-KB via l'interaction physique de ce facteur avec ER $\alpha$ 36 couplé à GPER qui agissent alors comme des co-régulateurs de la signalisation de l'IL6 (He et al., 2009; Pelekanou et al., 2016).

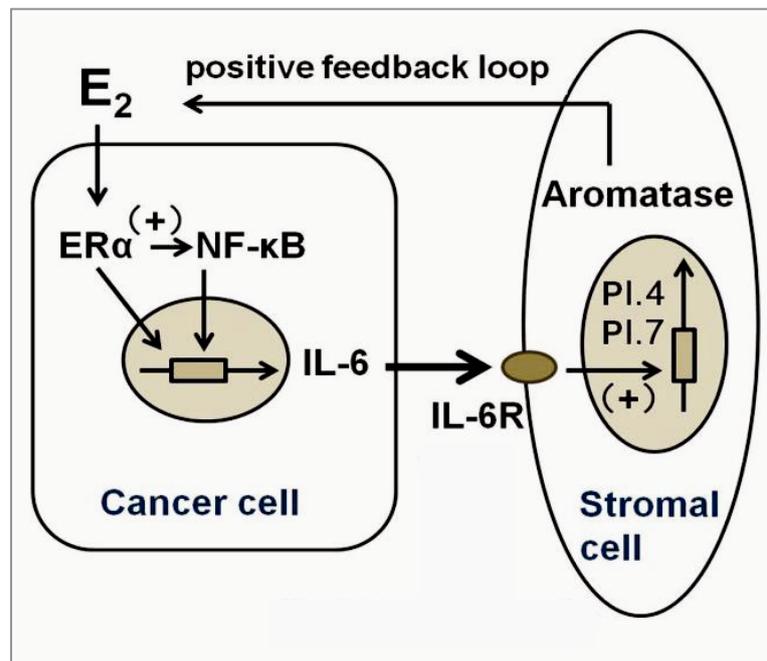


Figure 43: Relation entre l'E2 et l'IL6 mise en place entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales (Che et al., 2014).

## 2. IL6 et BMP

Nous avons vu précédemment que la voie des BMP pouvait initier une transformation des cellules souches mammaires du fait d'une surproduction de BMP2 dans le microenvironnement. Par ailleurs, il a été montré que cette transformation nécessite un environnement inflammatoire permis par la présence d'IL6, afin de soutenir et maintenir cette transformation (Chapellier et al., 2015). Ainsi, plusieurs études rapportent également un lien entre la voie des BMP et l'IL6 (figure 44). En effet, des données de la littérature ont démontré l'implication des BMP dans la réponse immunitaire et l'inflammation, notamment dans la régulation des cellules immunitaires, permettant leur activation, leur migration et leur adhésion au site inflammatoire (Lee et al., 2010; Sanders et al., 2016; Wu and Hatzopoulos, 2019). Une étude a ainsi montré l'expression d'IL6 dans des macrophages *via* la voie SMAD-dépendante mais également *via* la voie non-canonique, initiées par BMP6 (Lee et al., 2010). Par ailleurs, BMP6 et BMP2 ont aussi été décrit pour réguler l'expression de l'hepcidine dans les hépatocytes. L'hepcidine est un régulateur majeur du métabolisme du fer, synthétisé et libéré en réponse à une augmentation de la concentration du fer dans le corps ou en cas d'inflammation.

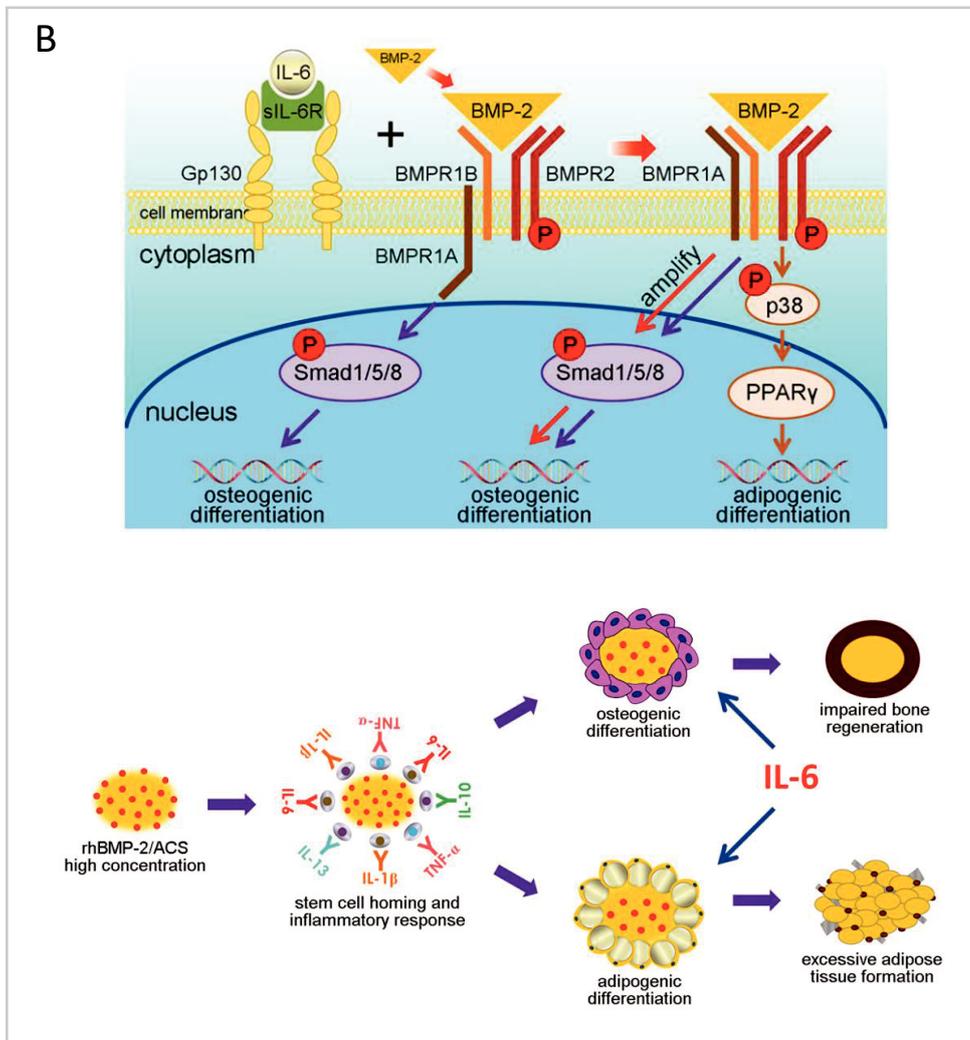
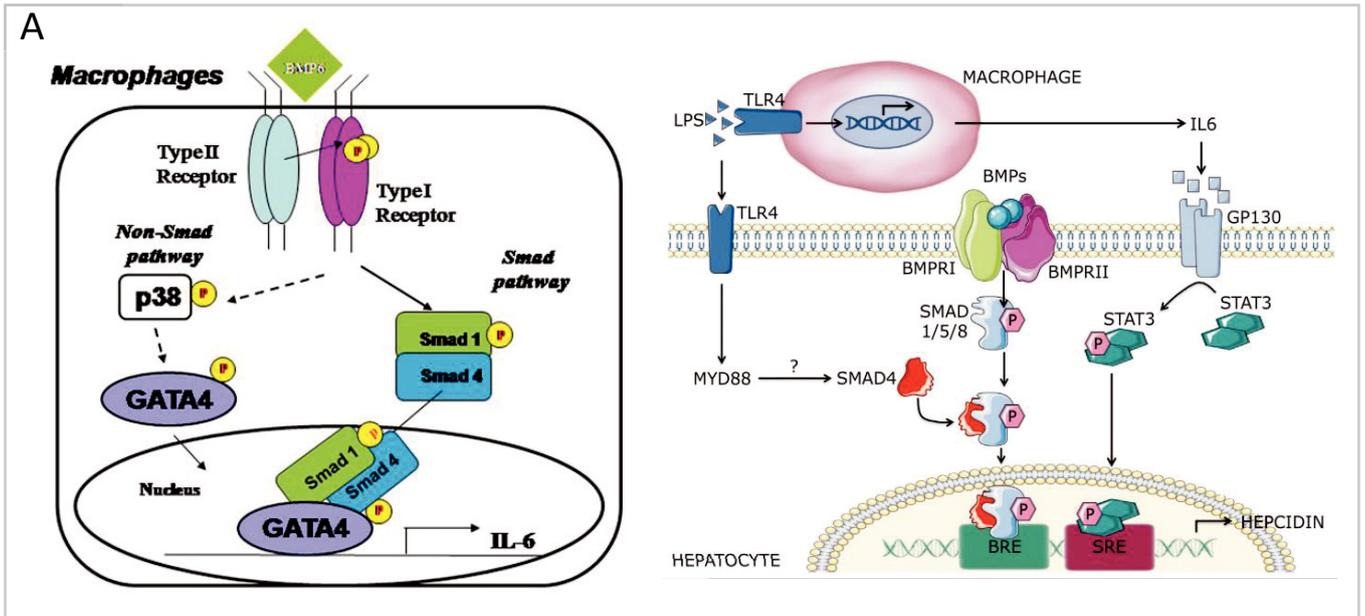


Figure 44: Coopération entre les voies initiées par les BMP et par l'IL6 dans le processus de production de l'hepcidine (a) (Lee et al., 2010 + Silvestri et al., 2019) ou dans la régénération osseuse (b) ((Huang et al., 2018)

Un trouble dans ce facteur conduit à diverses maladies, dont l'anémie inflammatoire qui a pour cause principale l'IL6. Il a ainsi été montré que la voie des BMP, par une signalisation SMAD, agissait en collaboration avec l'IL6 afin d'initier l'expression de l'hepcidine (Mayeur et al., 2014; Silvestri et al., 2019). Dans un tout autre cadre, celui de la régénération osseuse, un *crosstalk* entre l'IL6 et la voie des BMP a aussi été rapporté. En effet, pour ses fonctions sur l'os, BMP2 est utilisé en clinique sous forme d'implant associé à du collagène (BMP2/ACS), pour induire la régénération osseuse dont un équilibre fin entre synthèse et résorption est essentiel. Cependant des effets secondaires majeurs arrivent, notamment une détérioration de la qualité de l'os, la formation de tissu adipeux et l'apparition d'une inflammation importante du fait d'un recrutement de cellules inflammatoires au site d'implantation et la présence d'un grand nombre de cytokines inflammatoires telles que l'IL6. Il a été montré que l'IL6 entraîne une augmentation de la taille de la matrice osseuse formée par l'implant, mais que cette matrice est immature et de mauvaise qualité. Ceci est dû au fait que l'IL6, en synergie avec son récepteur IL-6R soluble, va promouvoir une différenciation des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (BMSC) en ostéoblastes grâce à une amplification de la signalisation des SMAD initiée par BMP2 en renforçant la translocation de BMPR-1A à la surface cellulaire et en inhibant sa dégradation. Par ailleurs, il a également été noté que l'IL6 entraîne une accumulation excessive de tissu adipeux résultant de la différenciation adipogénique des BMSC, mais contrairement à la différenciation ostéogénique dépendante de la signalisation SMAD, celle-ci se fait via la voie non canonique p38/MAPK initiée par BMPR-1A (Huang et al., 2015, 2018).

### C. *Crosstalk* ER/voie BMP

Outre les interactions entre IL6/ER et IL6/BMP, il a également été rapporté des interactions entre ER et la voie des BMP.

#### 1. ER $\alpha$ 66 et SMADs

Certaines études ont démontré le rôle suppresseur des œstrogènes sur les fonctions de BMP, entre autres par une répression de l'expression génique de BMP4 dans les cellules ostéoblastiques ou de BMP7, dans les cellules de l'oviducte (Monroe et al., 2000; van den Wijngaard et al., 2000). En plus de pouvoir réguler l'expression génique de certains BMP, il a également été montré que les œstrogènes pouvaient inhiber la signalisation induite par les BMP via l'interaction directe entre ER et les SMAD. En effet, dans le modèle des cellules mésangiales et dans celui du cancer du sein, Yamamoto et al ont

démonstré que l'E2, aussi bien *via* ER $\alpha$  que *via* ER $\beta$ , diminue l'expression de gènes cibles induits par BMP2 et également la phosphorylation des SMADs. Ceci résulte d'une interaction physique dépendante de l'E2, mais également de l'activation de la signalisation des BMP, entre le DBD (domaine de liaison à l'ADN) de ER $\alpha$  et SMAD1 (Yamamoto et al., 2002). Inversement, dans des cellules cancéreuses mammaires, une autre étude a rapporté que SMAD4 agit en tant que corépresseur de la transcription de ER $\alpha$  mais également réprime l'expression de gènes cibles de la voie des œstrogènes. En effet, SMAD4 et ER $\alpha$  vont former un complexe, nécessitant le domaine AF1 de ER $\alpha$  et les domaines MH1 et *linker* de SMAD4, lorsque ER $\alpha$  va se fixer sur ses éléments de réponses au niveau de l'ADN (Wu et al., 2003). Il semblerait donc que les voies ER et BMP se réguleraient mutuellement de manière négative. Cependant, d'autres études mettent en lumière une régulation positive. Cette différence pourrait être expliquée par le type de récepteur aux œstrogènes mis en jeu. En effet, comme décrit précédemment, la régulation négative implique ER $\alpha$ 66 tandis que d'autres auteurs observent une régulation positive dans des modèles ER-négatifs mais exprimant le variant ER $\alpha$ 36.

## 2. ER $\alpha$ 36 et voie des BMP

Durant l'ostéogénèse, la signalisation des œstrogènes, faisant principalement intervenir le variant ER $\alpha$ 36, a été décrite pour participer à la régulation des cellules stromales de la moelle osseuse. En effet, durant ce processus, une augmentation de son expression transcriptionnelle a été observée durant la phase de prolifération cellulaire, puis une diminution de celui-ci est par la suite notée lors de la différenciation. Ce profil d'expression est similaire à celui de Runx2 qui est le facteur majoritairement impliqué dans la formation osseuse mais également un gène cible de la voie des BMP. De plus, il a été montré que ER $\alpha$ 36 et Runx2 co-localisent dans ces cellules stromales de la moelle osseuse, durant l'ostéogénèse (Francis et al., 2014). Dans un modèle de cellules cancéreuses mammaires négatives pour ER $\alpha$ 66 mais positives pour ER $\alpha$ 36, Wang et al ont démontré une corrélation entre l'expression de ER $\alpha$ 36 et BMP2 et également que ce dernier pouvait induire l'expression de ER $\alpha$ 36 (*figure 45A*). Par ailleurs, de manière intéressante, ils ont montré que des cellules initialement insensibles à l'E2, le devenaient après une induction de BMP2, permettant ainsi leur prolifération (Wang et al., 2012). Ceci suggère donc qu'une exposition au BMP2 de cellules cancéreuses mammaires ER-négatives conduirait à une augmentation de l'expression de ER $\alpha$ 36 qui par la suite pourra être activé par l'E2 et entraîner la prolifération cellulaire. Par ailleurs, des données non publiées du laboratoire ont également montré une augmentation de l'expression de ER $\alpha$ 36 après un court traitement au BMP2 mais dans un modèle de cellules souches mammaires non transformées ER-négatives, ainsi qu'une augmentation de l'expression de gènes cibles de la voie des œstrogènes lors

d'une transformation de ces cellules par BMP2. Des articles récemment publiés par l'équipe ont montré que, à l'inverse, une exposition à des polluants E2-mimétiques ou à de l'E2 dans ce même modèle de cellules souches ER $\alpha$ 66-/ER $\alpha$ 36+ conduit à une potentialisation de la voie des BMP, illustrée par une augmentation du niveau de phosphorylation des SMAD1/5/8. De plus, cette exposition à des polluants entraîne une augmentation de la sécrétion de BMP2 par les fibroblastes mammaires (figure 45B) (Chapellier et al., 2015; Clément et al., 2017).

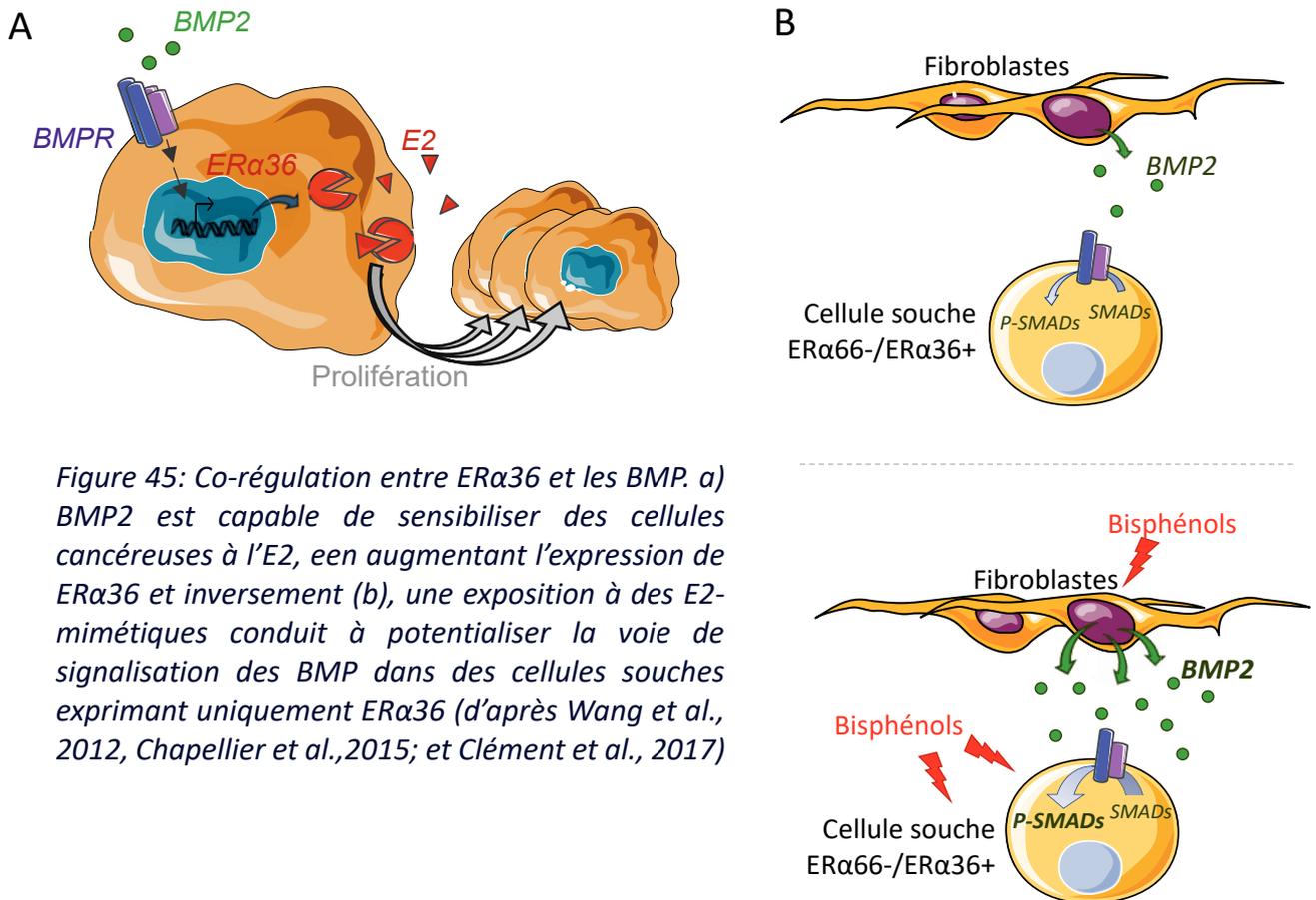


Figure 45: Co-régulation entre ER $\alpha$ 36 et les BMP. a) BMP2 est capable de sensibiliser des cellules cancéreuses à l'E2, en augmentant l'expression de ER $\alpha$ 36 et inversement (b), une exposition à des E2-mimétiques conduit à potentialiser la voie de signalisation des BMP dans des cellules souches exprimant uniquement ER $\alpha$ 36 (d'après Wang et al., 2012, Chapellier et al., 2015; et Clément et al., 2017)

### 3. Convergence entre les voies ER $\alpha$ 36 et BMP

Outre ce lien direct entre la signalisation des BMP et les récepteurs aux œstrogènes, d'autres études rapportent également des points de convergences entre les signalisations initiées par les BMP et ER $\alpha$ 36. Comme décrit dans le chapitre 3, ER $\alpha$ 36 peut activer la voie MAPK via son association avec Scr qui conduit à une cascade d'activation aboutissant à la phosphorylation de ERK2, mais va également permettre la stabilisation de P-ERK grâce à son interaction avec ER $\alpha$ 36 (Omarjee et al., 2017). Il a été

montré que P-ERK est capable de phosphoryler un résidu sérine particulier (S206) de la région faisant le lien entre les domaines MH1 et MH2 de SMAD1 avec pour conséquence son inhibition mais également sa dégradation par ubiquitinylation via Smurf1, ce qui suggère qu'il pourrait être un régulateur négatif de la voie des BMP (figure 46) (Kretzschmar et al., 1997; Lian et al., 2019; Sapkota et al., 2007). Cependant, nous pouvons également émettre l'hypothèse que cette régulation de la voie SMAD par ERK pourrait être un autre moyen de réguler l'engagement dans l'une ou l'autre voie initiées par les BMP, afin de réprimer la signalisation canonique au profit d'une signalisation non-canonique. En effet, d'autres arguments peuvent soutenir cette hypothèse. Comme décrit précédemment, la voie non-canonique serait plutôt initiée lorsque les récepteurs se localisent dans des radeaux lipidiques riches en cavéolines, où l'on retrouve notamment une interaction entre les BMPR et la cavéoline1 (Nohe et al., 2005). Par ailleurs, il a également été montré que ER $\alpha$ 36 pouvait aussi interagir avec la cavéoline 1 (Lin et al., 2010b), ce qui laisse supposer, de par cette localisation partagée, l'existence d'un lien entre ces différents récepteurs. De plus, la description d'une colocalisation, dépendante du domaine intracellulaire C-terminal de BMPR-II, entre la protéine Scr, pouvant s'associer avec ER $\alpha$ 36, et BMPR-II renforce également cette hypothèse (Wong et al., 2005).

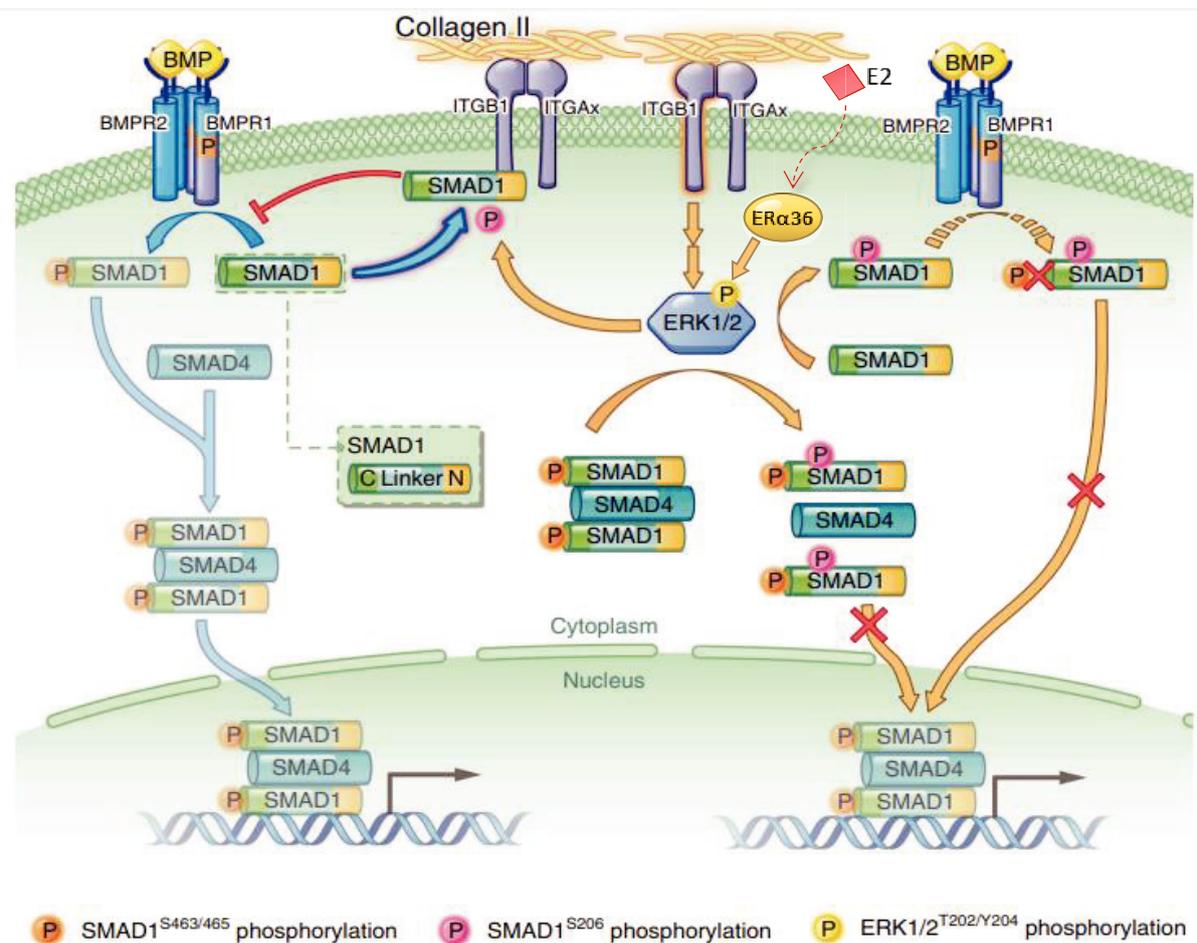


Figure 46: Convergence entre la voie des SMAD initiée par les BMP et la voie ERK, pouvant être induite par ER $\alpha$ 36 (adapté de Lian et al., 2019).

*L'ensemble de ces données portant sur le lien entre ER $\alpha$ 36 et la voie des BMP, notamment à travers une augmentation de l'expression de ER $\alpha$ 36 par BMP2 et, inversement, par la potentialisation de la voie des BMP et l'augmentation de la production de BMP2 observées après une exposition à des polluants œstrogène-mimétiques et passant par ER $\alpha$ 36, suggèrent grandement l'existence d'un crosstalk entre ces deux voies, qui pourrait entre autre passer par une interaction entre ER $\alpha$ 36 et les récepteurs aux BMP. Cette hypothèse est renforcée par la localisation conjointe de ER $\alpha$ 36 et des BMPR au niveau des radeaux lipidiques et de leurs interactions respectives avec la cavéoline1.*

---

---

---

---

---

Thématique du groupe de  
recherche et objectifs de thèse

---

---

---

---

---

Les travaux de mon laboratoire d'accueil portent sur l'étude des cellules souches normales et cancéreuses et leur régulation par des signaux venant de leur niche ou de notre environnement. Nous nous intéressons plus particulièrement à la famille des Bone Morphogenetic Protein, molécules produites par le microenvironnement cellulaire, et à ses voies de signalisation qui ont été décrites pour réguler les principales fonctions des cellules souches, tels que la quiescence, l'auto-renouvellement et la différenciation. Une dérégulation de ces molécules peut être observée dans différents types de tissus, aussi bien dans le système hématopoïétique que dans la glande mammaire, conduisant à un développement tumoral ou favorisant des résistances aux traitements ou des rechutes. Au sein du laboratoire, nous cherchons donc à comprendre comment les dérégulations dans les voies des BMP apparaissent, notamment, en s'intéressant aux facteurs pouvant déréguler directement le microenvironnement comme ceci peut être le cas après une exposition chronique à certains polluants environnementaux tels que les bisphénols. Outre l'étude des origines en cause dans ces dérégulations, nous étudions également les mécanismes moléculaires sous-jacents et leurs aboutissants sur les caractéristiques des cellules souches.

Précédemment au laboratoire, il a été démontré qu'une quantité anormalement élevée de BMP2 est retrouvée dans le microenvironnement des tumeurs luminales mammaires et qu'une dérégulation de cette molécule est capable d'induire la transformation de cellules souches en mettant en jeu l'un de ces récepteurs, le récepteur BMPRII. Des analyses complémentaires ont montré que l'une des causes de cette surproduction de BMP2 peut être l'exposition de fibroblastes à des polluants environnementaux comme le bisphénol A, décrit pour avoir des effets œstrogéno-mimétiques et de ce fait, pouvant augmenter le risque de cancer du sein. D'autres données du laboratoire ont également mis en exergue un lien entre la signalisation des BMP et un des récepteurs aux œstrogènes, ER $\alpha$ , notamment via l'observation d'une potentialisation de la signalisation BMP2 à la suite d'une exposition chronique au bisphénol A. De nombreuses études ont mis en évidence les effets délétères du BPA sur la santé humaine, ce qui a donné suite à diminuer l'utilisation du BPA et à le remplacer par d'autres substitutifs comme le BPS ou le BPF. Cependant, ces deux molécules alternatives ont des structures très similaires au BPA, suggérant qu'elles pourraient également être des perturbateurs endocriniens. Cette suspicion est renforcée par de nombreuses études qui démontrent de plus en plus leur rôle dans la tumorigenèse et dans la dérégulation hormonale, dont l'une issue du laboratoire, démontrant une surproduction de BMP2 similaire après une exposition au BPA ou au BPS, et, remettant ainsi en question leur innocuité et les critères de contrôles utilisés pour évaluer leurs effets sur la santé humaine. L'ensemble de ces données nous conduit à proposer un modèle de travail postulant une implication des bisphénols via une coopération entre la signalisation BMP2 et celle d'ER $\alpha$  dans une dérégulation des propriétés des cellules souches pouvant conduire à leur transformation.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse qui se décline en deux grands axes :

*1/ Etudier les effets fonctionnels et moléculaires des bisphénols seuls ou en combinaison avec BMP2 sur des cellules souches/progénéteurs mammaires humaines non transformées ER $\alpha$ 66-/ER $\alpha$ 36+*

Pour étudier cette problématique, j'ai réalisé une exposition chronique à de faibles doses de BPA, BPS ou BPF ( $10^{-7}$ M) sur un modèle de cellules souches épithéliales mammaires humaines, les MCF10A. En plus de ces polluants environnementaux, un traitement au 17- $\beta$  œstradiol (E2) a également été réalisé afin de comparer leurs effets à l'E2, puisque des études ont montré qu'ils possèdent des effets œstrogène-mimétiques (Kim et al., 2017; Pupo et al., 2012; Song et al., 2015). Par ailleurs, puisque BMP2 a aussi été décrite pour induire la transformation des MCF10A, une exposition au BMP2 a également été effectuée seule ou en combinaison avec chacun des autres traitements chroniques. Des études fonctionnelles, à travers des tests de mammosphères évaluant la fréquence de cellules à capacité souche, des tests de E-CFC mesurant la fréquence de progénéteurs et des tests de formation de colonies en agar mou, mettant en évidence la transformation cellulaire, ont été réalisés.

*2/ Identifier les acteurs moléculaires impliqués dans l'interaction entre les voies de signalisation ER $\alpha$ 36 et BMP2.*

Afin de mieux caractériser les mécanismes moléculaires impliqués, des études moléculaires ont également été entreprises. En se reposant sur des données de la littérature et du laboratoire suggérant l'existence d'une interaction entre ER $\alpha$ 36 et la voie de signalisation BMP2, j'ai donc recherché une interaction directe entre ER $\alpha$ 36 et les récepteurs des BMP ou les SMAD impliqués dans la signalisation BMP. Pour cela, j'ai utilisé en premier lieu une stratégie de GST pull-down avec une GST- ER $\alpha$ 36. Pour compléter cette première analyse, j'ai effectué une co-immunoprécipitation ainsi qu'un PLA (Proximity Ligation Assay) qui permet de détecter et de localiser les interactions entre deux protéines *in vivo* au niveau unicellulaire.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse, retrouvés dans la section suivante, n'ont pas encore donné lieu à une publication mais, en vue d'une publication future, ils ont été rédigés en anglais et présentés sous forme d'article scientifique. Ils seront discutés dans la partie « Discussions et conclusion » de ce manuscrit.

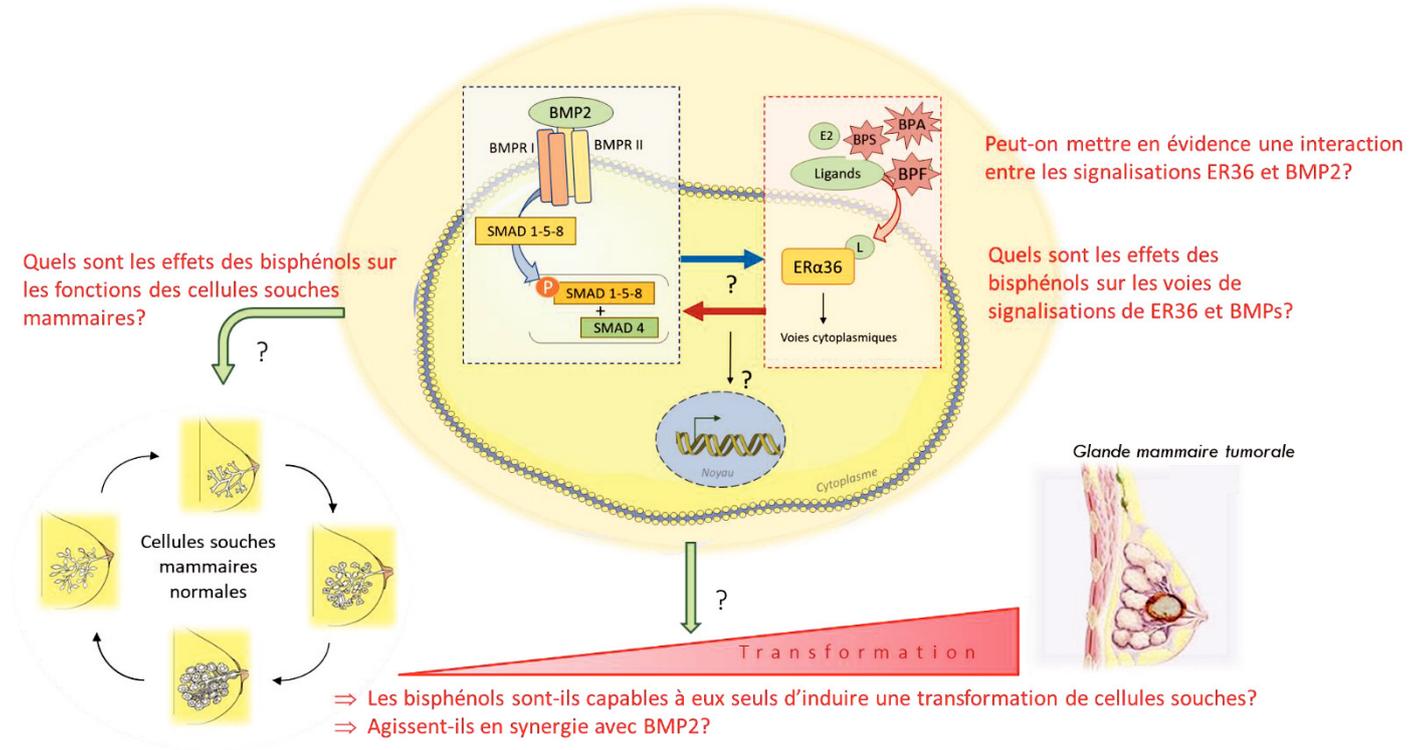


Figure 47: Objectifs de thèse

---

---

---

# RESULTATS

---

---

---

# Bisphenols involvement in transformation and mammary stem cell properties by crosstalk between ER $\alpha$ 36 and BMP2 signalling pathway.

## Abstract

Members of the bisphenol family are ubiquitous environmental pollutants that may be at the origin of hormonal dysregulations favouring breast cancer development. Indeed, the bone morphogenetic protein 2 (BMP2), over-produced by normal mammary fibroblasts upon exposure to bisphenol A or S (BPA, BPS), is involved in luminal breast cancer emergence and is abnormally elevated in the microenvironment of this type of cancer. Owing to increasing evidence highlighting BPA as a dangerous molecule, notably for its E2-mimetic effects, other molecules considered to be safer have been developed. Here, we investigated the effects of BPA and of some of its alternatives, BPS and BPF, on the regulation of immature mammary cells by evaluating their impact alone or in combination with BMP2. We demonstrated that chronic exposure of MCF10A cells to BPS and BPF, alongside BMP2, affects immature mammary epithelial cells differently than BPA or E2, by promoting an enrichment in stem cell populations. Moreover, long-term treatment with BPA, but also with BPS or BPF, potentiated the response of MCF10A cells to BMP2 by over-activating its canonical pathway through an increase in SMAD phosphorylation. Finally, we speculated that a crosstalk between oestrogen receptor alpha 36 (ER $\alpha$ 36) and BMP2 signalling may be involved in the functional and molecular effects observed following long-term exposure to bisphenols, because the ER $\alpha$ 36/BMP2 interaction noticed in unexposed cells was lost in the presence of different treatment combinations.

## INTRODUCTION

Common environmental pollutants, such as bisphenols and notably bisphenol A (BPA), pose serious public health concerns, as they were shown to be involved in several diseases, particularly in breast cancer tumorigenesis<sup>1-4</sup>. BPA is an aromatic compound used by the plastic industry in the synthesis of polycarbonates and epoxy resins, which are largely found in routinely-used plastics, including water bottles or food containers, toys or thermal paper. Over the last decades, publications on BPA and cancer have increased continually, demonstrating the role of this environmental pollutant at all stages of breast cancer development. This role is largely attributed to its oestrogen-mimicking properties, as although oestrogen (E2) plays a crucial role in normal breast development through the promotion of luminal cell proliferation and differentiation, it is also implicated in their transformation. Therefore, exposure to oestrogen-mimicking environmental pollutants, like BPA, can increase the risk

of developing breast cancer, through interactions with the most common E2 receptor, namely oestrogen receptor alpha 66 (ER $\alpha$ 66). In order to reduce the impact of environmental pollutants on public health, BPA has been forbidden in different European countries in numerous consumer plastics and replaced by BPA analogues presenting a lower ER $\alpha$ 66 affinity, such as BPS or BPF<sup>5-7</sup>. However, some studies have proven that these analogues can activate signalling pathways and trigger epigenetic modifications involved in mammary cell proliferation and survival, as well as in resistance to therapy, despite their lower affinity for ER $\alpha$ 66<sup>8-10</sup>. Aside from this classical oestrogen receptor, another ER $\alpha$  isoform, namely ER $\alpha$ 36<sup>11</sup>, may also be involved in cancer development as it is co-expressed in normal luminal cells and in tumoral cells, and its expression is associated with poor breast cancer patient prognosis, aggressive tumours and resistance to therapy. Unlike tumours expressing ER $\alpha$ 66, on which anti-oestrogen drugs used in clinic have antagonistic effects, these treatments remain ineffective against ER $\alpha$ 36-expressing tumours and even present agonistic effects, as is the case for tamoxifen<sup>12-14</sup>. Such differences between ER $\alpha$ 66 and ER $\alpha$ 36 are likely due to their structure, since both transactivation domains AF1 and AF2 are lacking in ER $\alpha$ 36 and the ligand binding domain is shorter. This may produce an alternative conformation to that of ER $\alpha$ 66, at the origin of the larger ligand pocket and hence a broader spectrum of ligands. Based on this knowledge, we speculated that the deleterious effects of BPS and BPF during breast carcinogenesis may arise through their interaction with ER $\alpha$ 36.

Tumours are a complex ecosystem composed of tumours cells and their microenvironment. In addition to genetic mutations in cancer cells, microenvironmental alterations can also contribute to tumorigenesis. Consistently, the involvement of bone morphogenetic proteins (BMPs), soluble members of the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily and present in this microenvironment, has been described in numerous cancers<sup>15</sup>. Indeed, our team previously demonstrated that BMP2 is over-produced in the microenvironment of luminal breast tumours and that chronic exposure to high BMP2 levels leads to the transformation of immature human mammary epithelial cells, mediated by one of its receptors: BMPR1b<sup>16</sup>. The origin of this over-production in the breast cancer microenvironment has not fully been investigated, though we showed that it could be due to exposure to environmental pollutants. Indeed, we observed that exposure to BPA stimulates BMP2 production by normal fibroblasts and that exposure to BPS has similar effects, indicating that this alternative molecule can induce similar effects to BPA despite its lower affinity for ER $\alpha$ 66<sup>16</sup>. Interestingly, mammary fibroblasts express ER $\alpha$ 36, and our team and others showed a link between BMP2 and ER $\alpha$ 36 in mammary epithelial cells, including an increase in ER $\alpha$ 36 protein expression after BMP2 treatment, as well as an enhanced BMP2 signalling in ER $\alpha$ 36+/ER $\alpha$ 66- immature epithelial cells upon exposure to BPA<sup>17,18</sup>.

Collectively, these findings suggest a molecular and functional crosstalk between BMP2 and ER $\alpha$ 36 signalling that could involve E2-mimicking environmental pollutants, such as BPA or its

analogues BPS and BPF, and could explain the effects of these pollutants on breast cancer development. Based on this hypothesis, we demonstrate herein that BPA, BPS and BPF, affect human immature mammary cell properties and their response to BMP2 in different ways. We show that BPS and BPF, currently privileged for their presumed safer properties, present under certain circumstances effects as deleterious as or even more so than BPA and/or E2. Moreover, we also reveal that ER $\alpha$ 36, which is currently not taken into account in the establishment of ER breast cancer status, could be involved in these mechanisms, notably via the interaction between ER $\alpha$ 36 and two major BMP pathway actors, namely BMPR1b and SMAD1.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Cell culture*

MCF10A cells (ATCC CRL-10317) are a human mammary epithelial cell line from a fibrocystic disease. MCF10A were cultured according to recommendations in phenol red-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 nutrient mix supplemented with 5% horse serum (Life), 10 mg/mL insulin, 0.5 mg/mL hydrocortisone, 100 ng/mL cholera toxin, 20 ng/mL EGF (all Sigma), 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies). MC26 and M1B26 cells were grown in the MCF10A cell medium but supplemented with only 2% of horse serum and with 10 ng/mL BMP2 (R&D Systems) and 10 ng/mL IL6 (Peprotech). As a control, CT cells were grown in concomitantly to MC26 and M1B26 in the same medium but without BMP2 and IL6 supplementation.

The chronically-exposed cellular model was obtained by incubating MCF10A cells with 10 ng/mL BMP2, 10<sup>-8</sup>M E2, 10<sup>-7</sup>M BPA, 10<sup>-7</sup>M BPS, 10<sup>-7</sup>M BPF and/or 10ng/mL IL6, in phenol red-free DMEM/F-12 medium supplemented with 5% steroid-depleted (via dextran-coated activated charcoal) horse serum, 10  $\mu$ g/mL insulin, 0.5  $\mu$ g/mL hydrocortisone, 100 ng/mL cholera toxin, 20 ng/ml EGF (all supplied by Sigma), and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies). Media and treatments were changed twice a week. This led to the establishment of twenty distinct MCF10A-derived cell cultures.

For short-term treatment on chronically-exposure cells, these cells were kept without chronic treatment for one week before a 15-minute stimulation with 10 ng/mL of BMP2 and then lysed for Western blot analysis.

For short-term treatment on parental MCF10A cells, cells were starved overnight in phenol red-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 nutrient mix supplemented with 1% BSA, 0.5mg/mL hydrocortisone (Sigma) and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies). MCF10A cells were then treated for 5 or 15 min with 10 ng/mL BMP2, 10<sup>-8</sup>M E2, 10<sup>-7</sup>M BPA, 10<sup>-7</sup>M BPS and/or 10<sup>-7</sup>M BPF.

### *Functional assays*

Proliferation rate and viability were measured by manual counting in the presence of trypan blue. For each functional test, a blind evaluation of results was performed by randomly attributing a number to each treated cell in order to avoid a counting bias. A new random number was attributed for each new experiment.

*Mammosphere assay:* MCF10A cells under chronic exposure to BMP2 and/or E2, BPA, BPS, BPF, were seeded at very low concentration (100 cells/well) onto 96-well ultra-low-attachment plates (BD Corning) in serum-free basal mammary epithelial growth medium (Promocell) supplemented with B27, 4 mg/mL heparin, 20 ng/mL basic fibroblast growth factor (both from Life Technologies) and epithelial growth factor (EGF) (Sigma). After 5 days, mammospheres were counted and measured from pictures using the Image J software.

*E-CFC:* MCF10A cells chronically-exposed for 12, 14 and 16 weeks were seeded onto an irradiated NIH3T3 fibroblast (30Gy) layer in complete Epicult-B medium (STEMCELL Technologies)<sup>19</sup>. After 5 days, medium was removed, and cells were fixed in 100% ice-cold methanol for 15 min. Two washes with PBS1X were then performed and a wright staining solution from RAL diagnostics (320400-0125) was added for 2 minutes to colour colonies. After several washes with H<sub>2</sub>O, and drying, colonies were counted.

*Soft agar colony formation assay:* The bottom agar layer was prepared from 3% agar diluted in culture medium from MCF10A cells to a final concentration of 0.75% and 1 mL was added to 12-well cell culture plates and incubated at room temperature for 1 hr. The top agar layer was prepared accordingly at a final concentration of 0.45% into MCF10A medium containing cells and added on top of the bottom agar at a final concentration of 30,000 cells/well in 0.5 mL. Each condition was performed in duplicate. Cell culture plates were incubated at room temperature for 30 min before incubation at 5% CO<sub>2</sub> and 37°C. Colonies were quantified after 2 to 3 weeks.

*Terminal Duct and Lobular Unit (TDLU):* 350 µL of matrigel low growth factor without red phenol (Becton Dickinson/Corning #356231) was laced on the bottom of a labteck chamber slide (Nunc cat: 055071). After 3-5 min, time required to obtain a mildly hardened gel before total solidification, 1 µL of cell suspension containing 1,000 cells was rapidly injected in one spot at the middle of the Matrigel and the plate was placed in the incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 10 min. Then 150 µL of complete MCF10A medium was added on top and the plate was incubated for 15-20 days. Every 4 days, half of the medium was replaced. Pictures of the structures formed were regularly taken with Nikon microscope at x4, x10 or x20.

### *Proximity ligation assay (PLA)*

All reagents were purchased from Merck.

Cells were grown on coverslips in 12-well plates, and then fixed in methanol for 3 min, before being washed twice in PBS1X. The cells were initially saturated using the blocking solution, then couples of primary antibodies (ER $\alpha$ 36 and BMPR1b) were added and incubated 1 hr at 37°C. After a first quick wash and a second one lasting 5 min under agitation with buffer A, from PLA kit, the PLA minus and plus probes containing the secondary antibodies conjugated with complementary oligonucleotides were added and incubated for 1 hr at 37°C. After one quick wash and a second one lasting 5 min under agitation with buffer A, ligation cocktail was added for 30 min at 37°C and washed twice as described above. Then, a rolling-circle amplification (RCA) reaction was performed for 100 min at 37°C. The amplification solution contained fluorescent-labelled oligonucleotides, which hybridized to the RCA product. Following hybridization, the samples were washed twice for 10 min with buffer B and then mounted with Duolink II Mounting Medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and visualised under fluorescent microscopy.

*Image acquisition and analysis:* Slides were viewed under a Nikon Eclipse Ni microscope. Images were acquired under identical conditions at x43 magnification. Image acquisition was performed by imaging DAPI staining at a fixed Z Position while a Z stack of +/- 5  $\mu$ m at 1  $\mu$ m intervals was carried out. The final image was stacked to a single plane before further quantification. On each sample, at least 100 cells were counted. Analyses and quantifications of these samples were performed using the Image J software. PLA dots were quantified on 8-bit images using the 'Analyse Particles' command, while the number of nuclei were manually counted.

Antibodies	Supplier	Reference	Dilution for PLA
BMPR1b (2E2)	Santa Cruz	Sc-293428	1/200
ER $\alpha$ 36	Le Romancer team, CRCL, INSERM 1052, CNRS 5286 (covalab, Lyon)	Covalab rabbit	1/100

#### *Glutathion transferase (GST) pull-down assay*

*Induction and extraction of the GST-ER $\alpha$ 36 fusion protein:* *E. coli* of the Rosetta strain transformed with an inducible expression vector of the GST-ER $\alpha$ 36 fusion were grown until the culture reached an OD<sub>595</sub> of 0.6. 0.2 mM of IPTG was then added to 500 mL of bacterial culture and incubated for 2 hrs at 28°C. Bacteria were isolated after 15 min of centrifugation at 4,000 rpm and the pellet was frozen at -20°C until further use. All following procedures were carried out at 4°C. Bacterial pellets were resuspended in 12 mL of lysis buffer (50mM Tris pH 8.0, 100 mM KCL, 1m M EDTA, 1m M DTT, 1 pill of complete protease inhibitors and 25U/mL benzonase). Then, 0.1 mg/mL of lysozyme was added and cells were lysed for 30 min under agitation. Lysate was sonicated twice for 30 s, then 12 mL of lysis buffer was added and two additional rounds on sonication for 30 s were performed. 2.5 mL of 10%

Triton X100 was then added for 30 min to solubilize the GST fusion proteins. The lysed bacteria were then centrifuged at 10,000g for 30 min and the GST-fusion proteins recovered in the supernatant.

*Isolation and quantification of GST-ER $\alpha$ 36 fusion protein:* 240  $\mu$ L of a 50/50 slurry of glutathione-sepharose beads was added to the supernatant and incubated for 2 hrs at 4°C under rotation. After 15 min of centrifugation at 4,000 RPM, the GST-ER $\alpha$ 36 fusion protein bound to the glutathione-sepharose beads were recovered. Several washes with PBS were then performed and the quality and amount of recovered fusion protein was evaluated by SDS-PAGE followed by coomassie blue staining.

*Preparation of samples:* MCF10A cells grown for 48 hrs in charcoal-treated horse serum supplemented medium were treated or not with BMP2 (10 ng/mL) for 15min and lysed for total protein extraction following Western blot analysis. 1.25 mg of total protein was incubated for 2 hrs with 2.5  $\mu$ g of GST-ER $\alpha$ 36 or GST, in the presence or absence of 10 nM of E2. Several washes with RIPA buffer were then performed and the GST-fusions protein were finally eluted and denatured in Laemmli loading buffer at 100°C for 5 min for Western blot analysis.

#### *Co-immunoprecipitation*

*Pre-clearing:* protein G sepharose (protein G Sepharose 4 fast Flow GE Healthcare 17-0618-01) was washed in special IP-RIPA buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% triton, 1 mM EDTA). Then, 50  $\mu$ L of clean protein G sepharose was added to 1 mg of total protein lysate and kept for 2 hrs at 4°C under agitation. After 5 min of centrifugation at 3,000 RPM, part of the supernatant was collected for input and the rest was used for immunoprecipitation.

*Immunoprecipitation:* immunoprecipitated antibody (at the final concentration of 2  $\mu$ g/mg of total protein) as detailed in the table below was added on pre-cleaned lysate and incubated overnight at 4°C under agitation. Then, lysate was incubated 2 hrs at 4°C under agitation with 25  $\mu$ L of washed-protein G sepharose. After 5 min of centrifugation at 3,000 RPM, the pellet was washed 4 times with special RIPA buffer and eluted on 20  $\mu$ L of Laemmli 1X.

<b>Antibodies</b>	<b>Supplier</b>	<b>Reference</b>
BMPR1b Ab1	Abcam	Ab78417
IgG BMPR1b Ab1	Abcam	Ab18415
BMPR1b Ab2	Abcam	ab138484
IgG BMPR1b Ab2	Sigma	I5006
SMAD1 Ab1	Santa Cruz	sc-81378
SMAD1 Ab2	Santa Cruz	sc-7965
IgG SMAD1	Thermofisher	02_6100

### Western blot analysis

Cells were lysed for 20 min in RIPA buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.25% deoxycholate (NaDoc), 1 mM EDTA) or in the special IP-RIPA buffer, supplemented with a protease and phosphatase inhibitor cocktail (30 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 40 mM  $\beta$ -glycerophosphate, protease inhibitor tablets Roche), then scratched on ice and centrifuged for 20 min at 12,000 RPM. The protein extract was collected by recovering the supernatant. Protein concentration was determined by the Bradford method (BioRad) using a BSA standard curve at a wavelength of 560 nm. Whole-cell extracts were separated by SDS-PAGE and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane using a transfer apparatus according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad Trans Blot Turbo). After incubation with 5% non-fat milk or 5% BSA in TBST (10 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Tween 20) for 60 min, membranes were incubated overnight with antibodies at 4 °C, as detailed in the table below. Membranes were washed three times for 5 to 10 min and incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Jackson Research, West Grove, PA, USA) at a dilution of 1:10 000 for 60 min at room temperature. Blots were washed with TBST five times and developed with the ECL system.

Membranes were re-used in order to perform P-SMAD/SMAD ratios. Membranes used for P-SMAD detection were stripped according to the following protocol. The membrane was covered with stripping buffer (1.5% glycine, 0.1% SDS, 1% tween20, pH 2.2) and incubated twice for 5-10 min in fresh stripping buffer for the second time, washed twice for 10 min in PBS1X and twice for 5 min in TBST.

Antibodies	Supplier	Reference	Dilution for WB
P-SMAD1/5/8	Cell Signaling	9511	1/500
SMAD1/5/8	Santa Cruz	Sc-6031-r	1/500
SMAD1	Santa Cruz	Sc-81378	1/500
BMPR1b	Abcam	Ab138484	1/500
ER $\alpha$ 36	LeRomancer team, CRCL, INSERM 1052, CNRS 5286 (covalab, Lyon)	Covalab rabbit	1/1000
Recombinant ER $\alpha$ SP1	Abcam	Ab16660	1/500
ER $\alpha$ (F10)	Santa Cruz	Sc-542	1/200
GAPDH (6C5)	Abcam	Ab8245	1/10000

### Generation of the ShBMPR1b cell line

Two templates including BMPR1b-specific shRNA sequences (mRNA target sequences: shBMPR1b #317: GAACGAAUGUAAUAAAGACCUA and shBMPR1b #462: GAACGAAUGUAAUAAAGACCUA) were ordered from Sigma<sup>20</sup> and EcoRI and XhoI sites added by PCR. Inserts and vectors were digested using

EcoRI and XhoI, the digested vector dephosphorylated and used for a ligation reaction with each of the inserts, with 125 ng of LT3GEPiR plasmid and 5 ng of insert using a quick ligation kit from Promega. Each ligation product was used to transform *E. coli* of the Stbl2 strain to prevent hairpin recombination. Four ampicillin-resistant colonies of each shBMPr1b were picked and amplified. Plasmid DNA was extracted using a QIAquick kit from Qiagen and the shRNA region sequenced. Correct clones were expanded and their plasmid DNA purified using a Qiagen Plasmid midi kit. Three million MCF10A cells were transfected with 5 µg of each plasmid containing one shBMPr1b by electroporation using a Neon apparatus using the following program: 1250 V, 20 ms, 2 pulses. After transfection, cells were grown on their complete medium without antibiotic. 24 hrs later, medium was changed for a complete medium with 1% penicillin/streptomycin and puromycin at the final concentration of 0.5 µg/mL. Cells were kept in culture in 10 cm dishes in selection for 15 days and medium was changed twice a week. Resistant clones were pooled before further amplification. Inducibility of resistant clones by doxycycline was first validated by measuring GFP expression by FACS. MCF10A cells with shBMPr1b #3 or #4 were induced for 24 hrs, 48 hrs or 72 hrs with 1200 ng/mL of doxycycline and then analysed for GFP fluorescence using a Cantoll flow cytometer (Beckton Dickinson).

#### *Gene expression analysis*

RNA was extracted using the RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). RNA concentration was measured using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, France). Reverse transcription was conducted using a mix containing for 1 µg of RNA: 1 µL of random hexamers at 0.2 µg/µL, 1 µL of dNTP at 10 mM, 2 µL of DTT at 0.1 M, 1 µL of RNaseOUT at 40 U/µL and 1 µL of Superscript II (Invitrogen, France). The cDNA was stored at -80°C. qPCR was performed using sequence-specific primers on a LightCycler 480 II system (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) with SyBR Green I technology (QuantiFAST SyBR kit from Qiagen) and LightCycler 480 Multiwell Plates 96 (Roche Applied Science). CPB and HPRT were used as reference genes.

Gene name	Forward	Reverse
CPB	ACT-TCA-CCA-GGG-GAG-ATG-G	AGC-CGT-TGG-TGT-CTT-TGC
HPRT	TGACCTTGATTTATTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT
BMPR1B	GCC-AGC-TGG-TTC-AGA-GAG-AC	CAG-GAC-CCT-GTC-CCT-TTG-AT

#### *RNAseq*

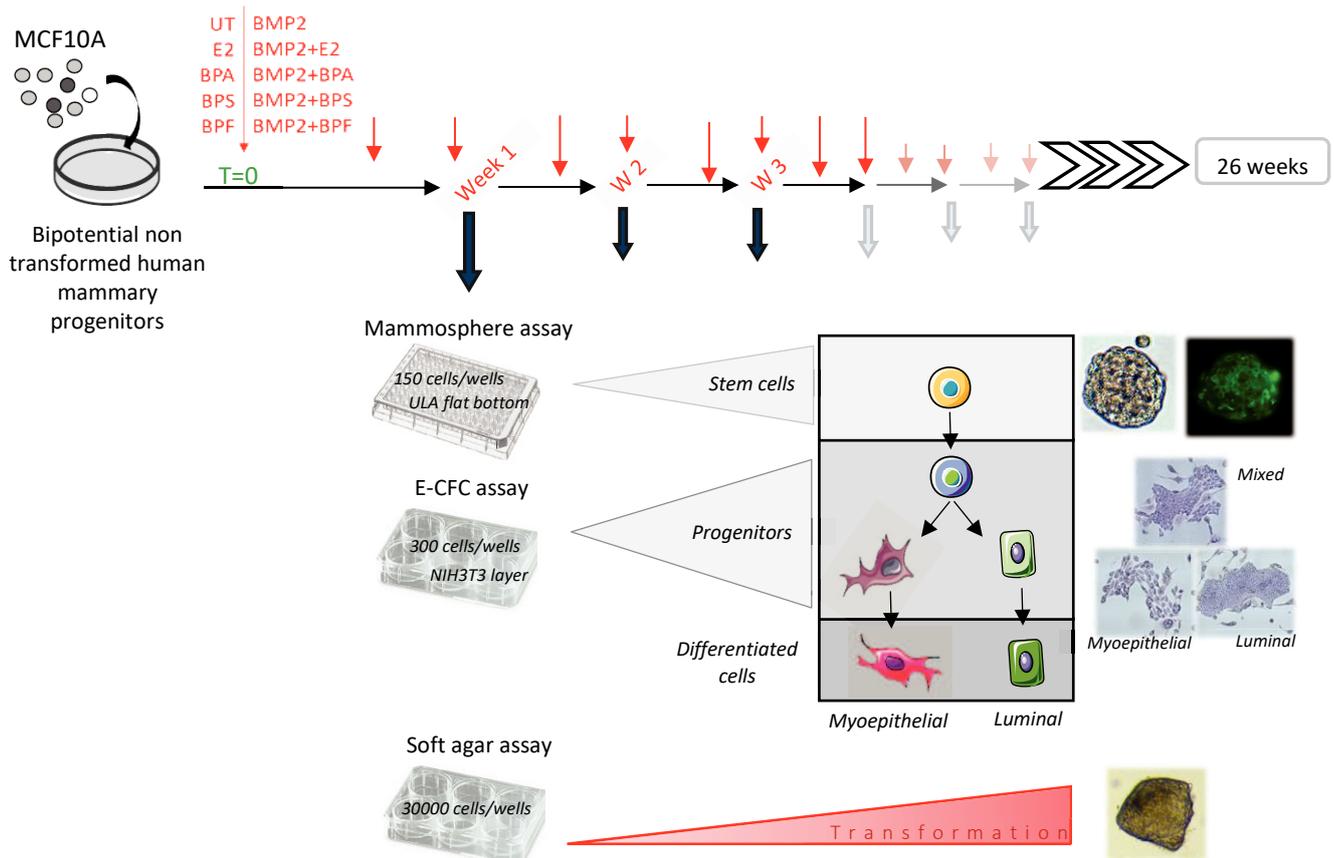
Total RNA were extracted in triplicates from independent cultures with the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). Libraries were prepared with the TruSeq PolyA+ kit from Illumina and sequenced on an Illumina NovaSeq machine with a paired-end protocol. Gene expression was quantified using Salmon (1.1.0) and the annotation of protein coding genes from gencode v33. Differential expression analyses

were performed using the “Wald test” from the DESeq2 R package. Hierarchical clustering analysis were done using the “HierarchicalClustering” module from the GenePattern repository after log2 transformation and the resulting clustering images created using the “HierarchicalClusteringImage” module. Pathways enrichment analysis of selected genesets were performed using the Gene Ontology resource ([geneontology.org](http://geneontology.org)). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) were performed using the GSEA 4.1.0 software from the Broad Institute.

**RESULTS**

*Chronic oestrogen-mimicking treatment does not impact proliferation and viability of MCF10A cells*

Because they are supposed to be safe due to their lower affinity for ERα66, bisphenols S and F are currently being used by the industry to replace BPA. However, numerous papers have reported a role for BPA substitutes in cancer development, in particular in breast cancer cell proliferation and in migration and invasion<sup>8,9,21,22</sup>. We previously demonstrated that BPA and BPS induce a dysregulation of BMP2 production by cells from the mammary gland microenvironment and that BMP2 is involved in luminal breast cancer emergence<sup>16</sup>. In addition, bisphenol is known to potentiate BMP2 signalling. To assess a possible functional interaction between bisphenols and BMP2 we performed the experiments presented as a schematic diagram in Figure 1. Briefly, MCF10A cells, a model of immortalized but not transformed human mammary stem and progenitor cells, were subjected or not to chronic treatments (thereafter referred to as “treatments”) with E2 (10<sup>-8</sup> M), BPA, BPS or BPF (all at 10<sup>-7</sup> M) in combination or not with BMP2 (10 ng/mL).

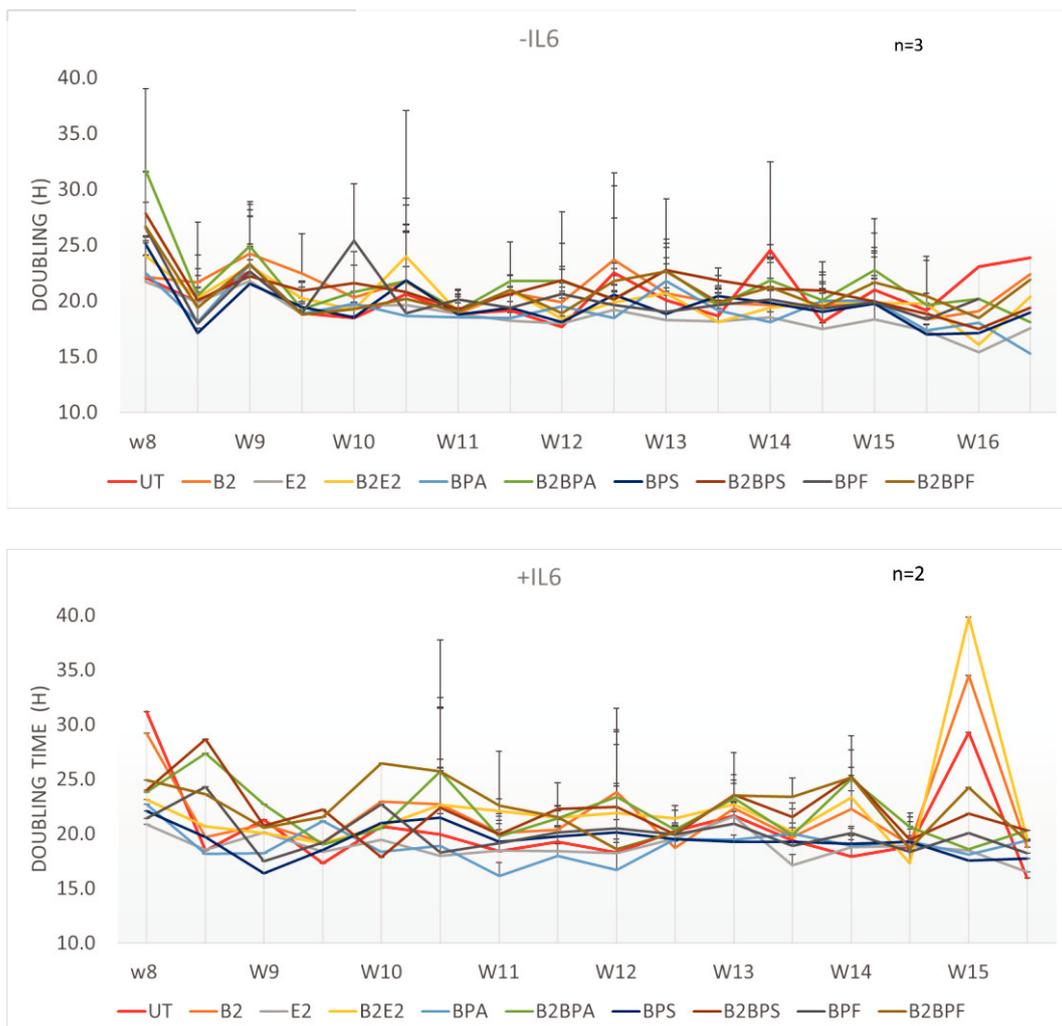


**Figure 1. Schematic diagram of chronic exposure experiments**

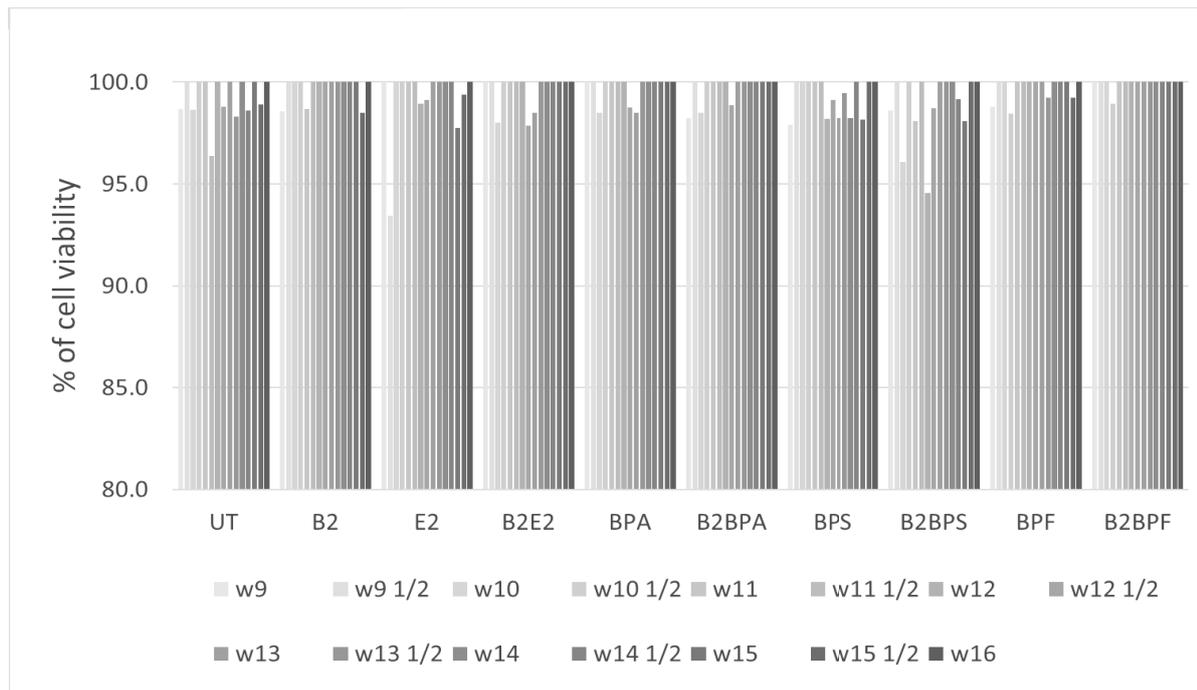
Bipotential non-transformed human mammary progenitors, MCF10A cells, were kept in chronic exposure for 26 weeks and different functional assays were performed every week or every two weeks.

In culture, MCF10A cells are composed of different immature subsets, some with stem cell-like phenotypes, having the ability to form mammospheres, and some with less immature phenotypes behaving as progenitors in E-CFC assays. Cells were passaged twice a week with a complete medium change and were used once a week for various functional assays described in the following parts of the manuscript. In addition, cells were regularly frozen to preserve samples at time points of interest, revealed during the course of the study. Finally, total protein and RNA were regularly extracted from chronically-treated cells. As shown in Figure 2, during the first 16 weeks, no obvious impact of the treatments was observed in terms of cell proliferation or viability. This was expected for the BMP2 treatment based on previous observations from the team. For the oestrogen or bisphenol treatments, alone or in combination with BMP2, it suggests that, at least at the concentrations used, these compounds had no obvious toxic or proliferative effects on non-transformed human immature mammary epithelial cells. This observation is highly interesting by itself, and particularly important for the correct interpretation of the functional assays performed in the subsequent parts of the study.

A



B



**Figure 2. Chronic exposure to different treatments does not impact cell proliferation or viability**

(A) Doubling time in hour of the different treated cells from weeks 8 to 16. N = 2 or 3. ±SEM

(B) Percentage of cell viability from weeks 9 to 16. N = 1

UT: untreated cells, B2: BMP2 treated cells, E2: 17-β estradiol treated cells, BPA, BPS, BPF : Bisphenol A, S, F treated cells.

*BMP2-mediated increase in stem-like mammosphere-forming cell frequency and proliferative ability is modulated by bisphenols.*

In order to assess the effect of the treatments on the more immature population in MCF10A cells, we performed mammosphere assays. Although the gold standard for assessing mammary stem cell is *in vivo* transplantation, the classical transplantation of human mammary cells in mice produces poor results presumably due to differences in the human and mouse microenvironment, and are also extremely time-consuming experiments difficult to apply to large numbers of samples. Hence, mammosphere *in vitro* assays were developed to circumvent these caveats and were shown to reliably allow the detection of human mammary stem cells, both normal and transformed. However, they present some limitations that will be presented in the “discussion” section. As shown in Figure 3A, left panel, chronic exposure to BPA, BPS, BPF or E2 alone did not induce any clear difference in mammosphere frequency (around 1 to 2 mammospheres per 150 seeded cells) when compared to unexposed cells. However, for all treatments, the combination with BMP2 increased the mammosphere frequency compared to untreated cells (Figure 3A, right panel), though E2 and bisphenols alongside BMP2 did not induce similar changes in mammospheres frequency as BMP2 alone. We also measured the size of the mammospheres generated in the different treatments by dividing them into three classes: small (15-30  $\mu\text{m}$ ), medium (30-45  $\mu\text{m}$ ) and large (> 45  $\mu\text{m}$ ) (see Figure 3C as an example). Albeit this will be discussed later, the size of mammospheres is usually thought to represent the proliferative ability of stem-like cells. In Figure 3B and D, we show that at 12 and 14 weeks, chronic exposure to E2, BPA, BPS or BPF alone produces mammospheres with a similar size distribution as unexposed cells. In contrast, treatment with BMP2 alone increases the frequency of medium and large mammospheres. This increase in size is slightly reduced but still present when E2, BPA or BPF are added to BMP2. Interestingly, the combination of BPS and BMP2 induces a further increase in mammosphere size compared to BMP2 alone. These results show that the effect of BMP2 on the proliferative capacity of stem-like mammosphere-forming cells is different according to the oestrogen-mimicking bisphenol used. BPS, the most common BPA substitute seems to be the most potent regarding to the amplification of BMP2 effects.

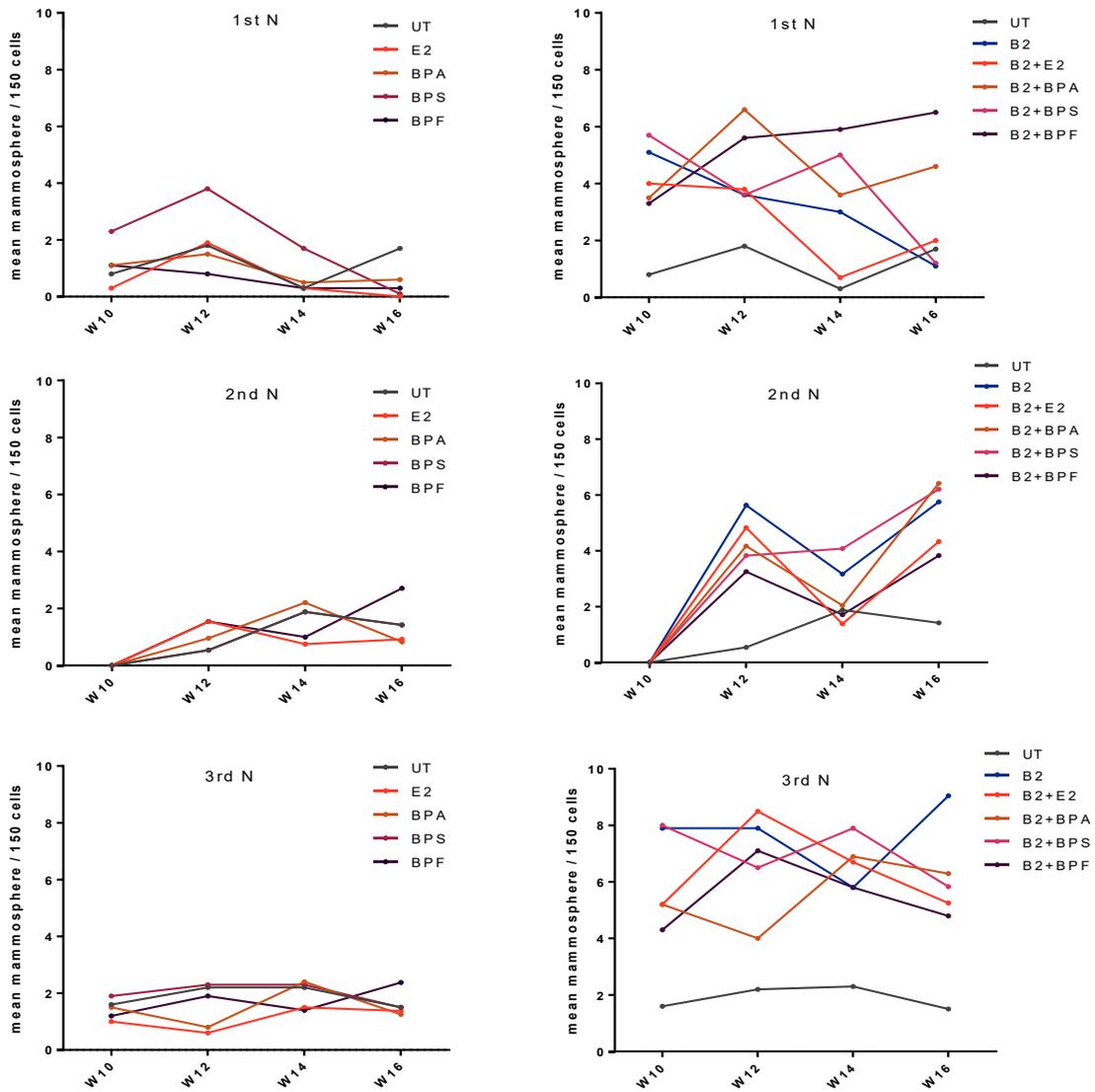
**Figure 3. Bisphenols, in combination with BMP2, increase immature cell populations**

(A) 3 independent experiments of mammosphere frequency in the treated cell population after 10 to 16 weeks of chronic exposure. MCF10A cells were chronically exposed to E2 ( $10^{-8}\text{M}$ ), BPA ( $10^{-7}\text{M}$ ), BPS ( $10^{-7}\text{M}$ ) or BPF ( $10^{-7}\text{M}$ ) alone (left panel) or in combination with BMP2 (10 ng/mL) (right panel) for 10 to 16 weeks and seeded at 150 cells/well onto 96 ultra-low attachment plates (100  $\mu\text{L}$ /well with 24 wells/sample). UT are the control cells (unexposed to treatments).

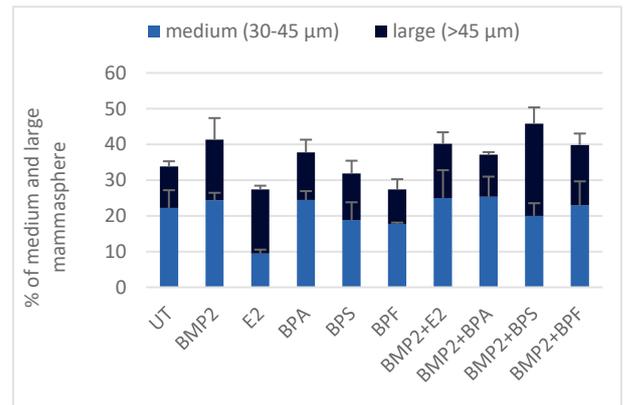
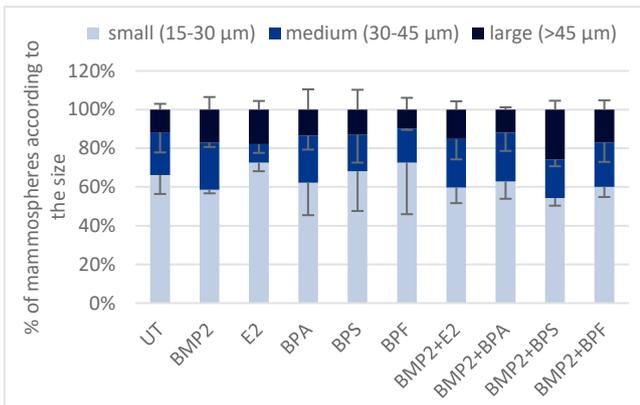
(B) Percentage of mammospheres according to the size, as illustrated below in (C), corresponding to the average mammospheres obtained after 12 and 14 weeks of chronic exposure. N = 2,  $\pm\text{SEM}$ . Scale bars = 50  $\mu\text{m}$

(D) Number of mammospheres according to the size, corresponding to the average mammospheres obtained after 12 and 14 weeks of chronic exposure. N = 2,  $\pm\text{SEM}$ .

A



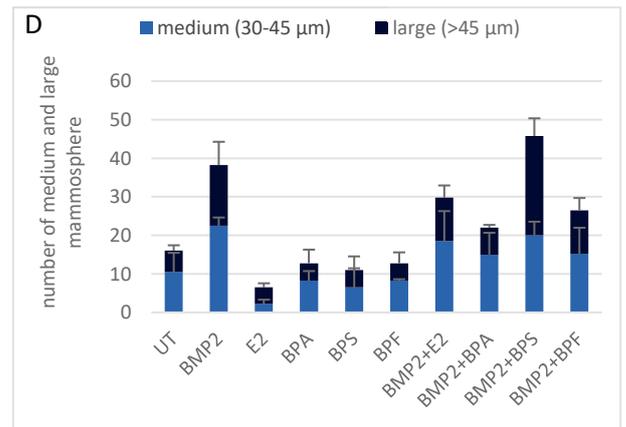
B



C



D

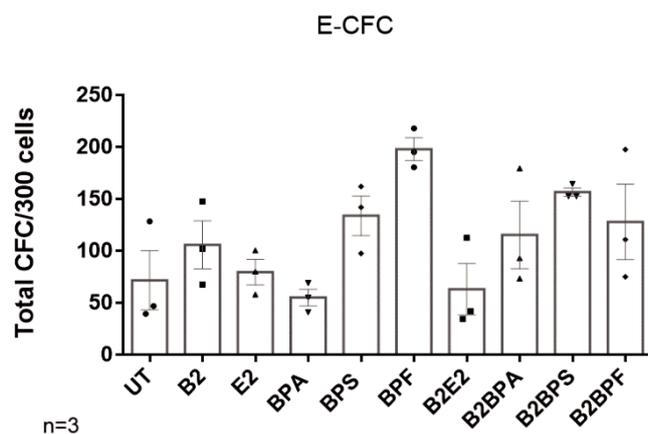


Another assay used to assess the presence of a stem-like activity in mammary epithelial cells is the TDLU assay. Terminal Duct Lobular Units are the basic functional unit of the mammary gland and specific organoid assays in gels mimicking the basement membrane have been developed that allow the generation of branched structures with terminal lobules resembling TDLUs. The ability to form these TDLU is considered to be restricted to stem-like cells, as they need to form both luminal and myoepithelial lineages and display enhanced proliferation. This assay also reveals an ability for an adequate morphogenesis that implicates subtle interactions between the cells, giving rise to a complex 3D structure. At the beginning of this study, we performed TDLU assays on MCF10A treated or not with E2, BMP2 or both for 8 weeks (see supplementary Figure 1). We did not observe any obvious difference between the TDLU formed in the different conditions. Given the relative difficulty to observe more subtle changes, requiring the inclusion, sectioning and immunolabelling of the 3D structures we did not pursue this approach.

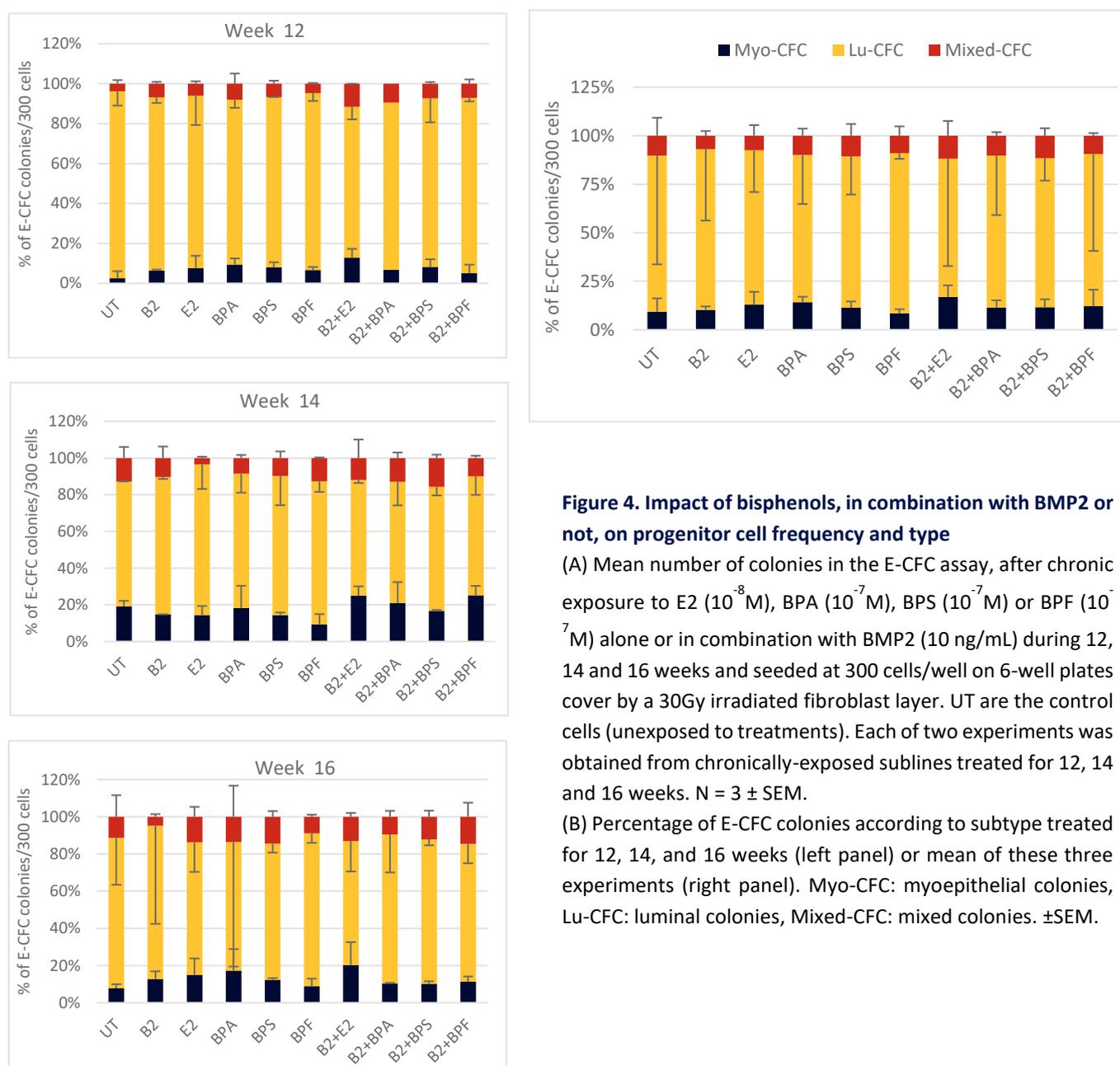
*The frequency of mammary progenitors, but not their commitment, is modulated by bisphenols.*

We then explored the impact of the treatments on the frequency of progenitors using the E-CFC assay. MCF10A cells in culture contain a subset of cells able to form colonies of differentiated cells, progenitors, when plated on irradiated NIH3T3 fibroblasts. This E-CFC assay assesses the frequency of these progenitors in the population and their commitment. Indeed, MCF10A is a bipotential mammary epithelial cell line able to differentiate in both luminal and myoepithelial lineages. Based on the morphology of a colony and of the cells forming it, it is possible to differentiate luminal, myoepithelial and bipotential progenitors that gave rise to colonies formed of luminal only, myoepithelial only or both types of cells (mixed colonies), respectively. The total number of colonies obtained at weeks 12, 14 and 16 of treatment are shown in Figure 4A. Interestingly and contrarily to what was observed for mammosphere assays, BPF or BPS alone, but not BMP2, E2 or BPA alone, increased the progenitor frequency in the cell population. Combinations with BMP2 show that bisphenols, especially BPS, seem to induce the progenitor populations more than E2. When the three different classes of progenitors, luminal, myoepithelial and bipotential were discriminated (Figure 4B), no significant difference induced by the treatments was seen, with a majority of luminal progenitors and similar numbers of myoepithelial and bipotential. These results suggest that some bisphenols, namely BPS and BPF are able to increase the frequency of mammary epithelial progenitors, mostly independently of BMP2, but have no effect in these settings on their commitment.

A



B



**Figure 4. Impact of bisphenols, in combination with BMP2 or not, on progenitor cell frequency and type**

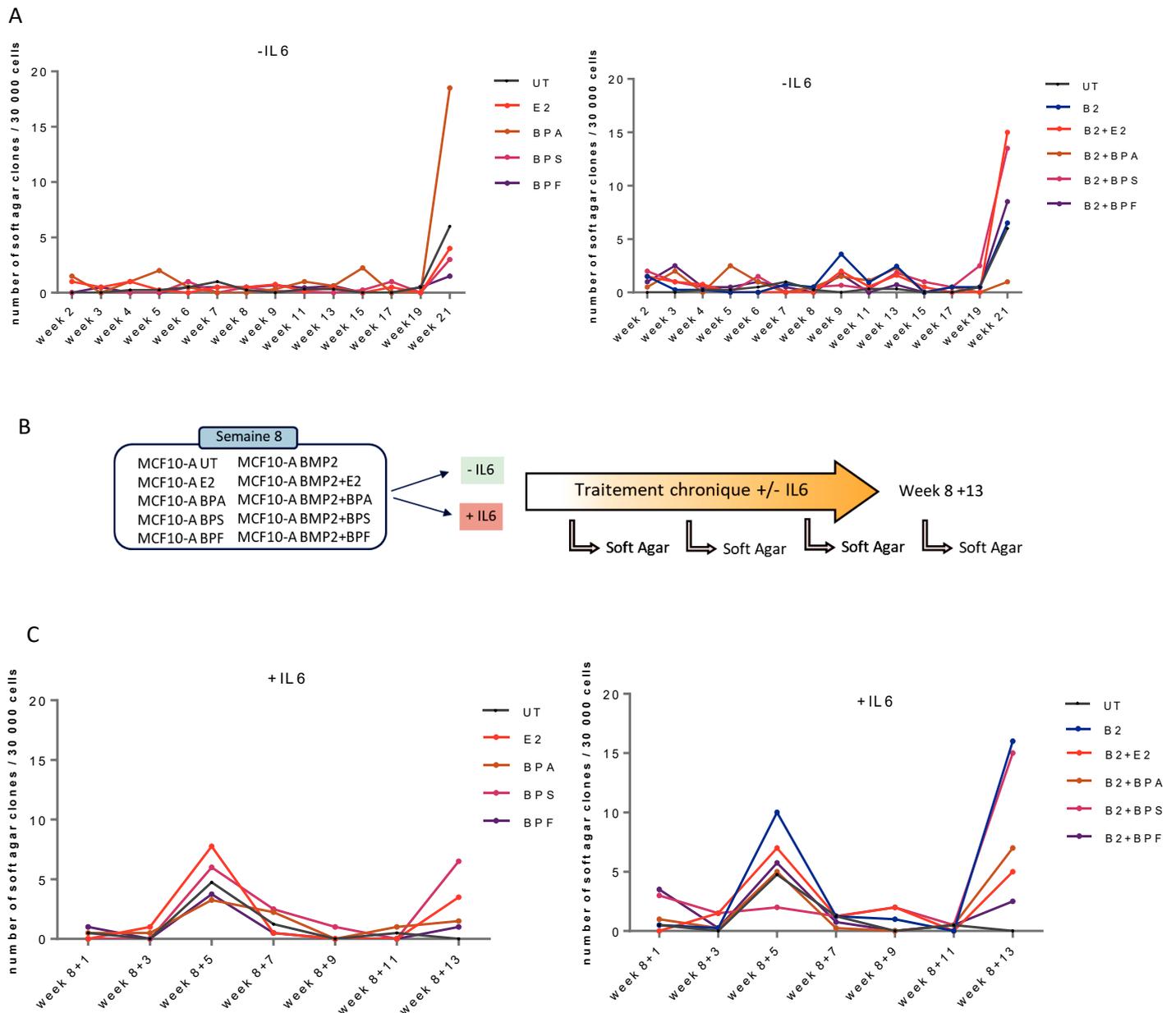
(A) Mean number of colonies in the E-CFC assay, after chronic exposure to E2 ( $10^{-8}$  M), BPA ( $10^{-7}$  M), BPS ( $10^{-7}$  M) or BPF ( $10^{-7}$  M) alone or in combination with BMP2 (10 ng/mL) during 12, 14 and 16 weeks and seeded at 300 cells/well on 6-well plates cover by a 30Gy irradiated fibroblast layer. UT are the control cells (unexposed to treatments). Each of two experiments was obtained from chronically-exposed sublines treated for 12, 14 and 16 weeks. N = 3  $\pm$  SEM.

(B) Percentage of E-CFC colonies according to subtype treated for 12, 14, and 16 weeks (left panel) or mean of these three experiments (right panel). Myo-CFC: myoepithelial colonies, Lu-CFC: luminal colonies, Mixed-CFC: mixed colonies.  $\pm$ SEM.

*Effects of bisphenols on BMP2-induced transformation of MCF10A cells.*

As mentioned earlier, we previously described that chronic BMP2 treatment induces the appearance of transformed cells, as evidenced by soft-agar colony assays, engraftment in mice and transcriptomic analysis. With BMP2 alone this transformation is only transitory but is stabilized in the presence of IL6, presumably owing to its pro-inflammatory activity. IL6 by itself has no transforming effect. The appearance of soft-agar colonies routinely starts between 12 and 15 weeks of BMP2/IL6 exposure. To assess the effects of these treatments on BMP2-induced transformation of MCF10A, we performed soft-agar colony formation assays from weeks 2 to 21. These first experiments were conducted in the absence of IL6 to strictly test a putative interaction between bisphenols and BMP2 only, and also based on the possibility, as mentioned in the introduction, that bisphenols could induce IL6 production. As shown in Figure 5A, there were no soft-agar colonies in any treatment condition until week 19. At week 21, we observed a clear appearance of soft-agar colonies, especially for BPA alone, as well as E2 and BPS in combination with BMP2. But since untreated cells also generated soft-agar colonies at this week, these results are difficult to interpret. Unfortunately, the Covid-19 outbreak prevented us from obtaining data for longer time points for the purpose of this manuscript that would have been necessary to conclude on the appearance of transformed cells from week 21 onwards. These results show that bisphenols are not able to replace the IL6 signalling required for a stable BMP2-mediated transformation. Since we did not observe any sign of transformation around weeks 13 and 15 in these experiments, we decided to test the effect of the addition of IL6 to the treatments (Figure 5B). Starting from cells at week 8, the treatments were applied for 13 additional weeks in the absence or presence of IL6. As shown in Figure 5C, left panel, in the absence of BMP2 the addition of IL6 did not induce any soft-agar colonies from treated cells until week 8+11, with the exception of a transitory increase at week 8+5, the origin of which is unknown but is not due to the treatments since untreated cells showed increase. At week 8+13, when no soft-agar colony was observed from the untreated cells, we observed a modest increase in soft-agar colonies for E2 and BPS. When IL6 was added to the BMP2-combined treatments (Figure 5C, right panel), except the transitory and unspecific increase in soft-agar colonies observed before at week 8+5, the treatments did not induce any increase in transformation until week 8+11. At week 8+13, approximately at the time of combined BMP2 and IL6 chronic treatment (week 13), we observed a strong increase in soft-agar colonies from BMP2/IL6 treated cells compared to cells treated with IL6 alone. The presence of BPS did not affect the frequency of soft-agar colonies while the presence of E2, BPA or BPF reduced this frequency, especially for the latter. As mentioned previously, the sanitary restrictions prevented us from obtaining longer time points of exposure to treatments. These longer exposure times will be required to conclude with enough certainty on the effects of bisphenols on the BMP2/IL6 mediated transformation of the MCF10A. At this point, we can

nonetheless observe that in these settings, treatments either had no effects or a repressive effect, depending on the bisphenol considered, on the BMP2/IL6-mediated transformation of the MCF10A.



**Figure 5. Impact of bisphenols in combination with BMP2 or not and in the presence or absence of IL6, on MCF10A transformation**

Number of soft agar clones obtained in MCF10A cells chronically-exposed for 21 weeks with to E2 ( $10^{-8}$  M), BPA ( $10^{-7}$  M), BPS ( $10^{-7}$  M) or BPF ( $10^{-7}$  M) alone (left panel) or in combination with BMP2 (10 ng/mL) (right panel) in the absence (A) or in presence (C) of IL6. UT are the control cells (unexposed to treatments).

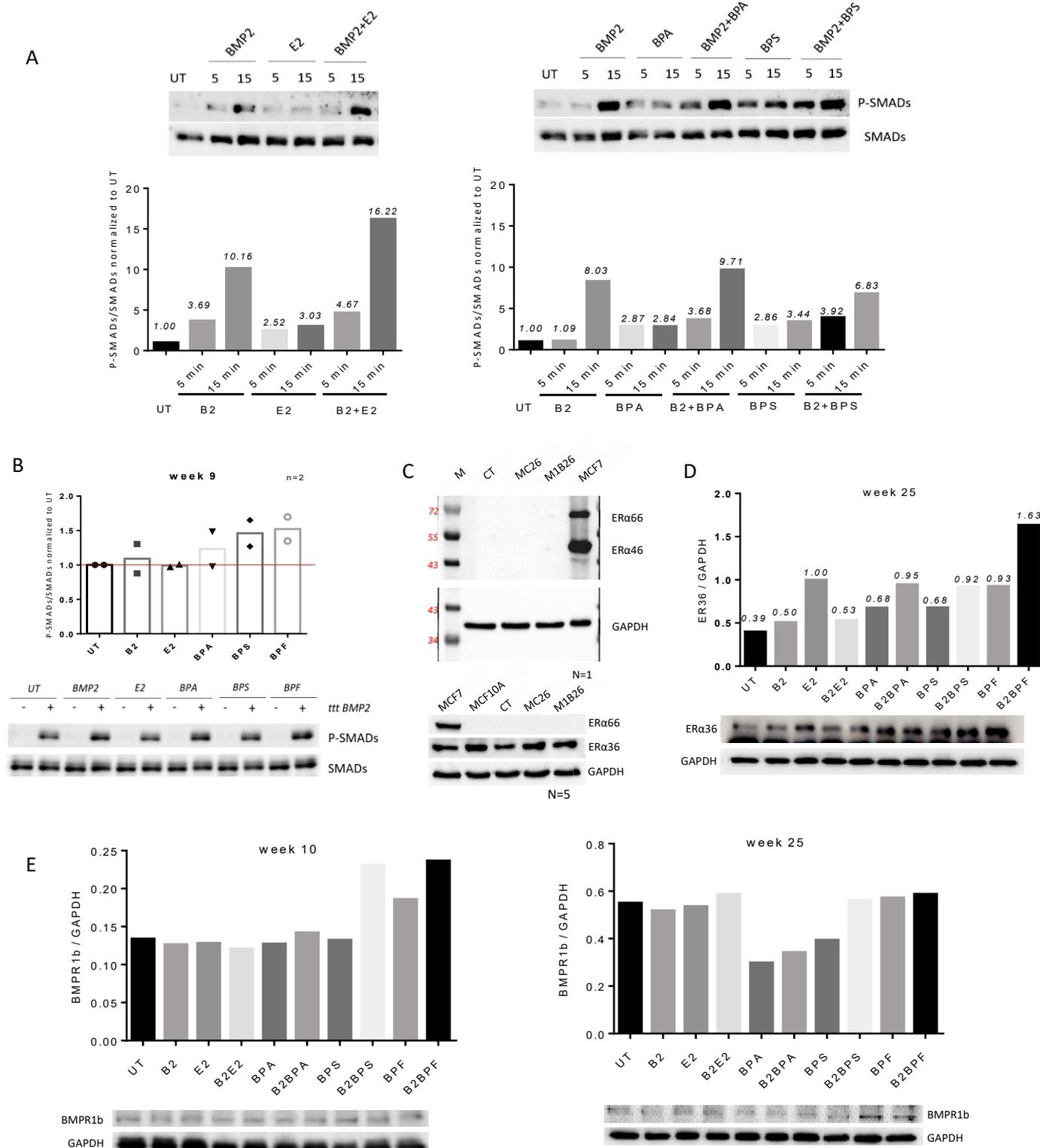
(B) Schematic diagram describing the transformation assay in an inflammatory context

*Expression of oestrogen receptors and effects of bisphenols on canonical BMP signalling in MCF10A cells.*

The team previously showed that long-term exposure to BPA (60 days) leads to an increase in the basal level (*i.e.* without exogenous BMP addition) of the canonical pathway activation, measured through the ratio between phosphorylated and total SMAD1/5/8<sup>17</sup>. This pre-activation did not induce an increase in SMAD phosphorylation after BMP stimulation but tended to affect BMP4 control of stem-related features in MCF10A cells.

We herein investigated the effects of acute stimulation by E2, BPA and other bisphenols in the presence or absence of BMP2. As shown in Figure 6A, acute treatment with E2, BPA and BPS alone induced an almost three-fold increase in SMAD phosphorylation, which was stable between 5 and 15 minutes of stimulation. When exogenous BMP2 was added, there was no increase in SMAD phosphorylation at 15 minutes in samples co-treated with BPA and BPS compared BMP2 alone, yet the addition of BMP2 to E2 induced an increase in phosphorylation. We then tested if chronic treatments with E2 or bisphenols induced a stable change in the activation of the canonical BMP2 pathway. To test this, untreated cells and cells chronically treated with BMP2, E2, BPA, BPS or BPF for 9 weeks were left untreated for one week and then acutely stimulated with BMP2. As shown in Figure 6B, BPS and BPF treatments induced a mildly stronger activation of the canonical SMAD pathway in response to BMP2. These results suggest that E2 and oestrogen-mimicking bisphenols may pre-activate the canonical BMP pathway in the absence of exogenous BMP and that BPS and BPF may durably modify the response to BMP2.

To better understand the molecular mechanisms sustaining MCF10A response to E2 and bisphenols, we investigated the expression of ER $\alpha$  isoforms in MCF10A, as well as in their transformed cells lines, namely MC26 and M1B26, following long-term BMP2 treatment. As shown in Figure 6C, using an ER $\alpha$ 36-specific antibody and another antibody against both ER $\alpha$ 66 and ER $\alpha$ 46, MCF10A, MC26 and M1B26 cells, express only ER $\alpha$ 36 but not ER $\alpha$ 46 or ER $\alpha$ 66 at detectable levels, albeit the luminal tumour cell line MCF7 expresses all three isoforms. These data show that the non-transformed stem-like cell line MCF10A and its transformed counterparts, which conserved a very immature phenotype (unpublished data), express an ER $\alpha$  receptor despite being considered as ER-negative cells owing to their lack of ER $\alpha$ 66 expression. This makes ER $\alpha$ 36 a strong candidate to mediate the effects observed upon bisphenol treatment in this model of mammary epithelial stem cells. We then tested whether the different treatments could modify ER $\alpha$ 36 protein expression levels by Western blot using the specific antibody. As shown in Figure 6D, all three bisphenols increased ER $\alpha$ 36 expression, this effect being amplified in the presence of BMP2, which had no effect by itself. This synergistic effect of BMP2 is especially important for BPF and the contrast with E2 is surprising since contrarily to bisphenols, BMP2 tempers the increase in ER $\alpha$ 36 expression induced by E2.



**Figure 6. Bisphenols modify BMP2 pathway activation and ERα36 expression**

(A) Column scatter plot (down panel) and the Western blot associated (up panel) showing the quantification of the ratio of Phospho-SMAD1-5-8/total SMAD1-5-8 normalized against untreated cells (UT) detected by Western blot after 5 or 15 min of BMP2, E2, BPA or/and BPS. N = 1

(B) Column scatter plot (up panel) and the Western blot associated (down panel) showing the quantification of the ratio of Phospho-SMAD1-5-8/total SMAD1-5-8 detected by Western blot normalized against unexposed control cells (UT), in chronically-exposed cells treated for 9 weeks and devoid of treatment for one week before 15 min of BMP2 stimulation. N = 2 independent experiments. The Western blot is representative of two experiments.

(C) Western blot of MCF7, MCF10A or transformed-MCF10A (MC26 and M1B26) cells for ERα66, ERα46 and ERα36 expression. N = 1 or 5. CT cells are non-transformed control cells for MC26 and M1B26.

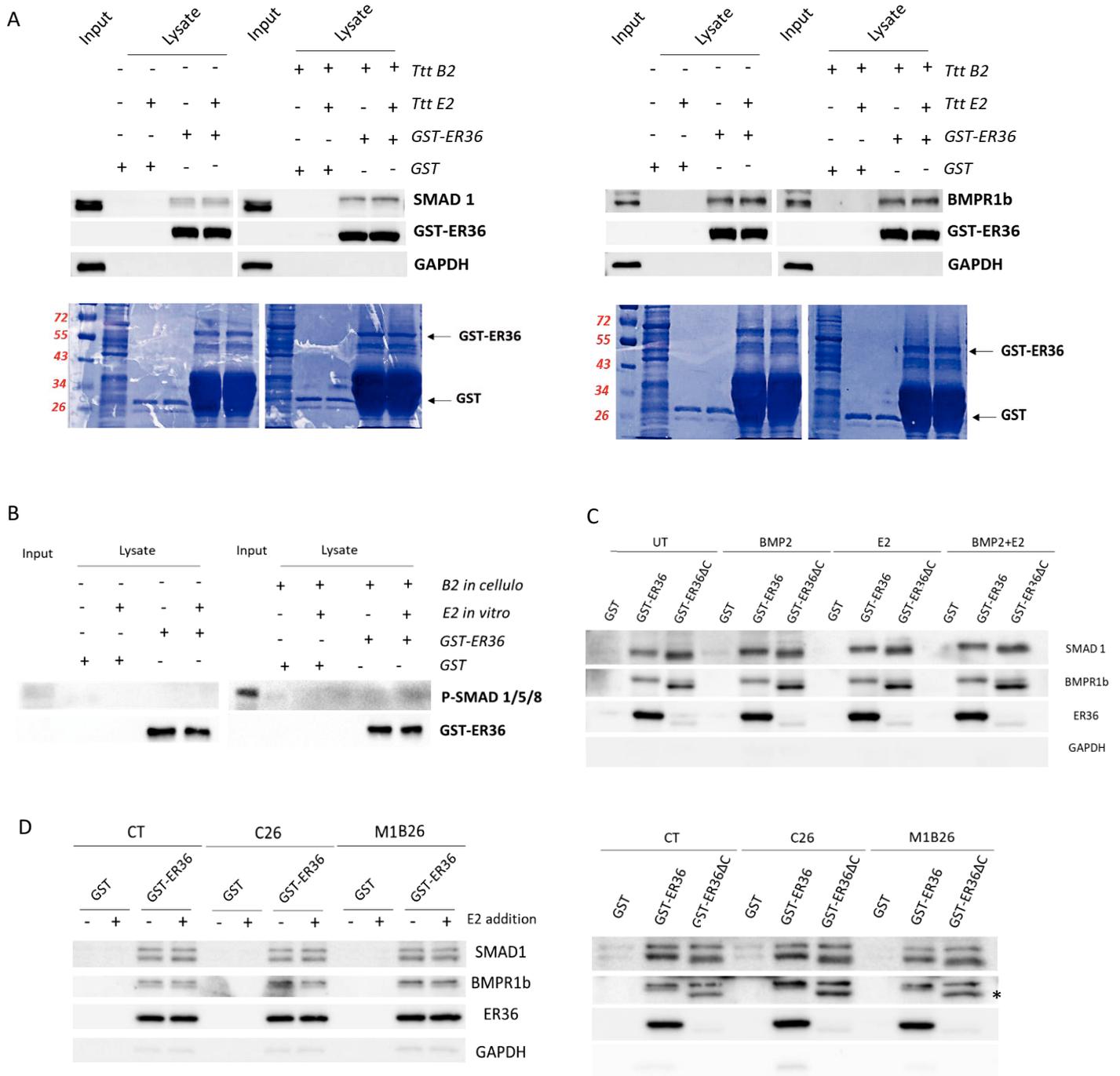
(D) ERα36 expression by Western blot and its quantification in chronically-exposed cells for 25 weeks. N = 1

(E) BMPR1b expression by Western blot and its quantification in chronically-exposed cells for 10 or 25 weeks. N = 1

The transforming effect of BMP2 in MCF10A is mediated by the BMPR1b receptor<sup>16</sup> and cells expressing higher levels prone to transformation. Our team previously showed that long-term BPA treatment (60 days) did not modify BMPR1b protein expression levels and we verified whether this was the same for other bisphenols. As shown in Figure 6E, the level of BMPR1b is not modified by the treatments at both a relatively early time of treatment (9 weeks) and a longer one (25 weeks). This suggests that the observed effects of the treatments are not the consequence of a simple overexpression of BMPR1b.

#### *ERα36 interacts in vitro with two key members of the BMP2 signalling in MCF10A*

Based on the literature describing an interaction between the DNA binding domain of ERα66, that is also present on ERα36, and SMAD1, we hypothesized that ERα36 could also interact with SMAD1. In addition, we wondered whether ERα36 and BMPR1b interacted. To test these hypotheses, we first performed GST pull-down assays using lysates from MCF10A cells and a GST-ERα36 fusion protein. As shown in Figure 7A, left panel, we were able to pull-down SMAD1 from MCF10 lysates, but not GAPDH used as a control, using the GST-ERα36 fusion but not the GST alone. In the same experiments, as shown in Figure 7A, right panel, we were also able to specifically pull-down BMPR1b using the GST-ERα36 fusion. Interestingly, these *in vitro* interactions of the GST-ERα36 with SMAD1 and BMPR1b were not modified when MCF10A cells used to produce the lysates were treated with BMP2 or when E2 was added to the GST binding reaction. This suggests that the interactions between the GST-ERα36 and SMAD1 or BMPR1b are not dependant on the phosphorylation of BMPR1b and SMAD1 or the presence of a ligand on ERα36. In addition, as shown in Figure 7B we were unable to detect a pull-down of phosphorylated SMAD1/5/8 when cells used for the lysates were treated with BMP2. This suggests that only unphosphorylated SMAD1, and not phosphorylated SMAD1 following BM2 stimulation, is able to interact with the GST-ERα36 in this context. We then investigated the specificity of this GST-ERα36 interaction with SMAD1 and BMPR1. We used a GST-ERα36Δ fusion protein, lacking the ERα36 specific domain (see Figure 24 from introduction), and as shown if Figure 7C, the GST-ERα36Δ fusion was able to pull-down both SMAD1 and BMPR1b, independently of the treatment applied to the cells. This shows that *in vitro*, the interaction between ERα36 and SMAD1 or BMPR1b does not involve the ERα36-specific domain, suggesting that these interactions likely occur with all ERα isoforms, although this will remain to be formally demonstrated. We then wanted to test if the modalities of the interactions between the GST-ERα36 and SMAD1 or BMPR1b could change during the BMP2-mediated transformation of the MCF10A cells. As shown in Figure 7D, left panel, the interaction between ERα36 and SMAD1 or BMPR1b is conserved in transformed MC26 and M1B26 cells, independently the treatment applied (MC26 and M1B26 were cultured in presence of BMP2). In addition, this interaction did not rely on the ERα36 specific domain, indicating that the BMP2-mediated



**Figure 7. ER $\alpha$ 36 interacts with two major actors of BMP2 signalling pathway in transformed or non-transformed MCF10A cells**

(A-B-C-D) Western blot analysis of the GST pull-down assay.

(A) Parental MCF10A cells were treated, or not, with BMP2 (10 ng/mL) for 15 min. Input represent cell lysate, before incubation with GST-ER $\alpha$ 36 or GST and/or E2 ( $10^{-8}$  M). Pull down represents proteins bound to GST-ER $\alpha$ 36 or GST obtained after elution. The bottom panel shows the corresponding Coomassie-stained membrane. N = 3.

(B) Parental MCF10A cells were treated, or not, with BMP2 (10 ng/mL) for 15 min. Western blot represents proteins bound to GST-ER $\alpha$ 36 or GST obtained after elution. N = 3

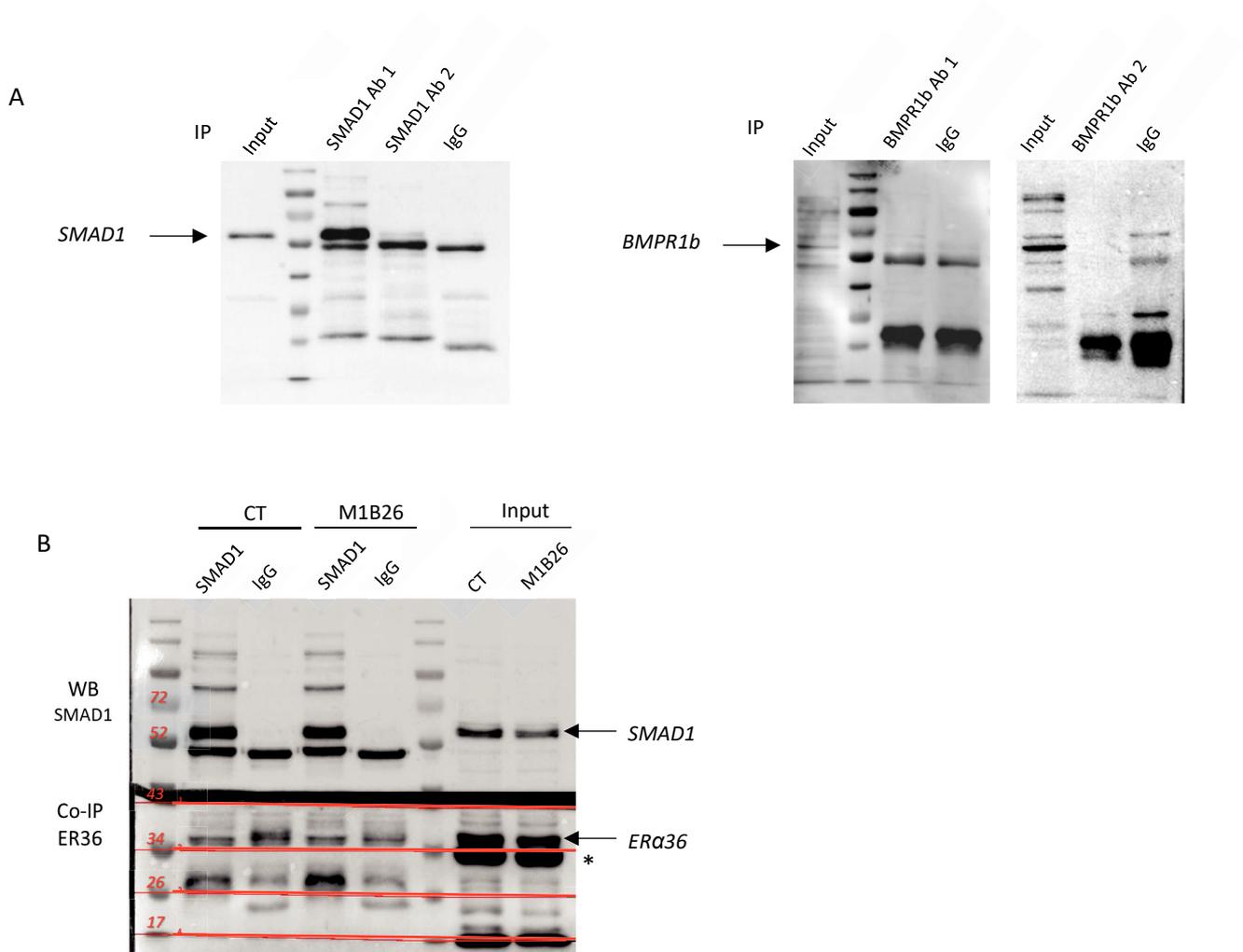
(C) Parental MCF10A cells were treated, or not, with BMP2 (10 ng/mL), E2 ( $10^{-8}$  M) or a combination of both 15 min. Western blot represents proteins bound to GST-ER $\alpha$ 36, GST or GST-ER $\alpha$ 36 $\Delta$ C obtained after elution. N = 2

(D) Lysate of BMP2-induced transformed MCF10A cells (MC26 and M1B26) or their non-transformed control (CT) were incubated with GST-ER $\alpha$ 36, GST, GST-ER $\alpha$ 36 $\Delta$ C and/or E2 ( $10^{-8}$  M). Western blot represents proteins bound to GST-ER $\alpha$ 36, GST or GST-ER $\alpha$ 36 $\Delta$ C obtained after elution. N = 3. \*non-specific band.

transformation of MCF10A cells does not induce detectable modifications of ER $\alpha$ 36 interactions with SMAD1 or BMPR1b in this *in vitro* setting.

*In vivo interaction between ER $\alpha$ 36 and BMPR1b in MCF10A.*

Since GST pull-down is an *in vitro* assay that involves the use of a very large amount of GST-ER $\alpha$ 36, the stoichiometric ratio between ER $\alpha$ 36 and potential interacting proteins is largely artificial. This assay may thus detect interactions that are physically possible but that actually do not take place *in vivo* due for example to different sub-cellular localizations or titration by stronger or more abundant interactors of the proteins of interest. To test whether ER $\alpha$ 36 interactions with SMAD1 or BMPR1b could be observed with endogenous proteins, we performed co-immunoprecipitation assays. Since the only available specific antibody against ER $\alpha$ 36 is a rabbit IgG, we were limited to antibodies against SMAD1 and BMPR1b developed in other species. We were able to test two antibodies against SMAD1 and two against BMPR1b for the ability to precipitate their target proteins. As shown in Figure 8A, left panel, of the two SMAD1 antibodies tested, both were immunoprecipitated, although only one (ab1) gave a strong signal. Consequently, this antibody alone was used for further experiments. Unfortunately, none of the two antibodies against BMPR1b were immunoprecipitating (Figure 8A, right panel) and we were hence unable to further test the ER $\alpha$ 36/BMPR1b interaction. When we successfully immunoprecipitated SMAD1 from MCF10 or M1B26, we were unable to detect any specific band at the expected size of the ER $\alpha$ 36 protein (Figure 8B). Even though these co-immunoprecipitation experiments involved endogenous proteins, they are nonetheless based on the lysis of cells, that results in the loss of any sub-cellular organization that could be necessary to observe a putative interaction between endogenous proteins expressed at low levels, but that could be compensated by the large amounts of GST fusion proteins used in the GST pull-down assay.

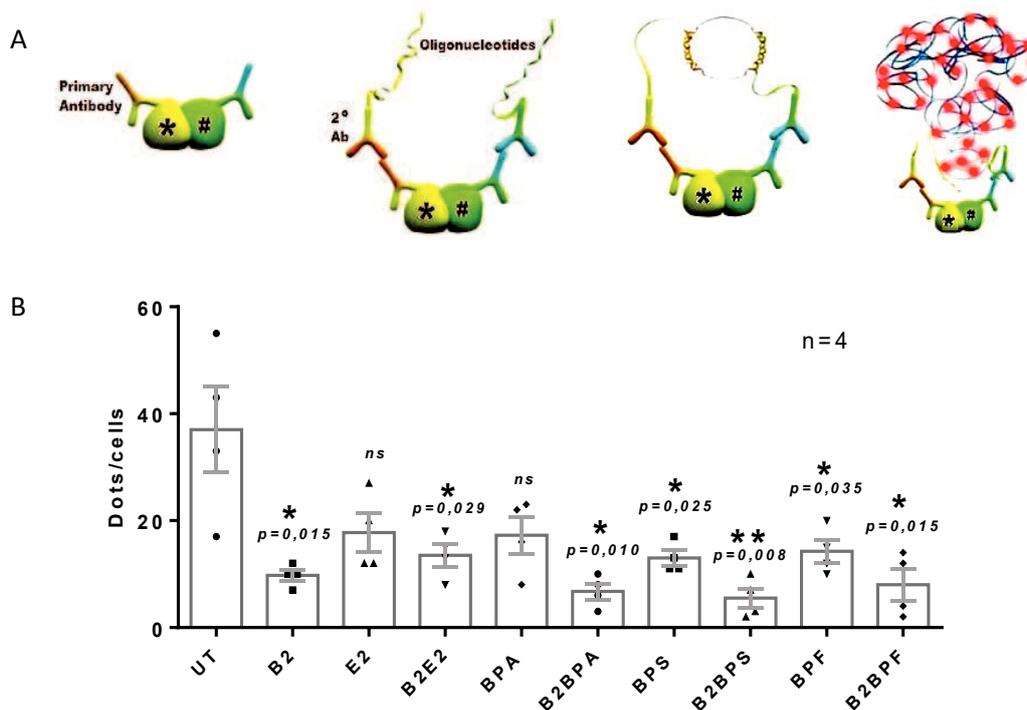


**Figure 8. Validation of the interaction between ER36 and BMP pathway actors via co-immunoprecipitation**

(A) Western blot analysis of validation of several BMPR1b and SMAD1 antibodies for immunoprecipitation

(B) Western blot analysis of ER36 co-immunoprecipitation with SMAD1 on transformed-MCF10A cells (M1B26) and its non-transformed control (CT). \* : non specific band

Therefore, we next sought for interactions between ER $\alpha$ 36 and SMAD1 or BMPR1b using the Proximity Ligation Assay (PLA, see figure 9A). This assay results in the detection of interactions between two close proteins (under 40 nm apart), and can be used *in situ* and *in vivo* to detect endogenous proteins without lysing cells, since these are simply fixed in methanol prior to the experiment. Since the two antibodies used for the PLA assay have to be from different species and since only a rabbit antibody is available for ER $\alpha$ 36, we had to find suitable antibodies for SMAD1 and BMPR1b in other species. Although, we were unable to find such an antibody against SMAD1 (not shown), we found an antibody against BMPR1b suitable for immunofluorescence assays and PLA. As shown in Figure 9B, we performed an ER $\alpha$ 36/BMPR1b PLA assay on MCF10A cells subjected to the different chronic treatments. A clear and specific signal between ER $\alpha$ 36 and BMPR1b in untreated cells could be observed. Interestingly, the proximity between ER $\alpha$ 36 and BMPR1b is largely lost in treated cells and this decrease seems stronger in cells treated with BPA, BPS and BPF when combined to BMP2, although this is not the case with E2 in combination with BMP2.

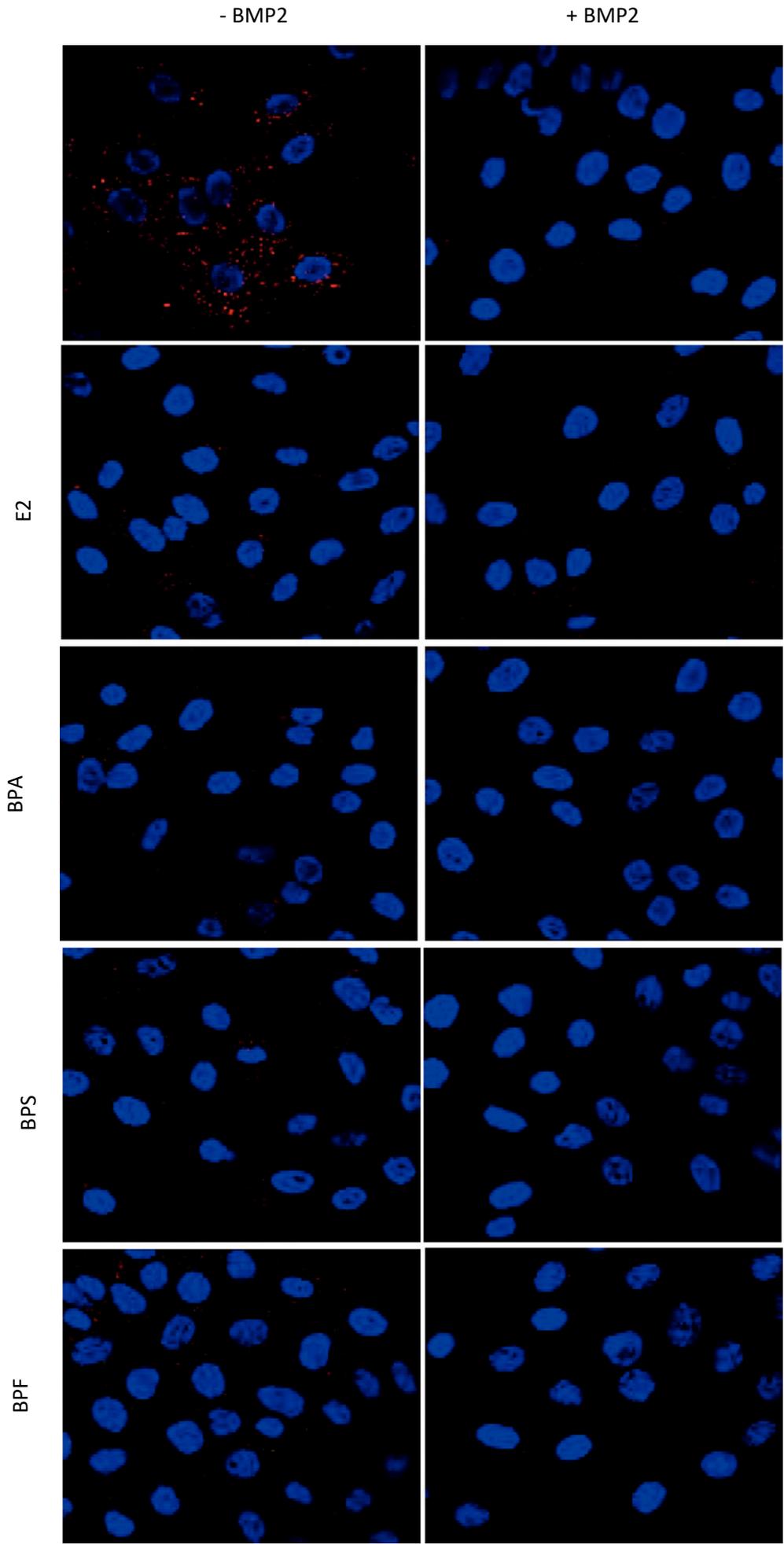


**Figure 9. Validation of the interaction between ER $\alpha$ 36 and BMP pathway actors via PLA assay**

(A) Description of the different steps of the PLA assay. Two primary antibodies from two different species specifically recognise their respective proteins in the cell. Two types of secondary antibodies coupled with oligonucleotides (PLA probes) bind to each primary antibody. When PLA probes are close to each other, connector oligos join the PLA probes, ligated and amplified by DNA polymerase, resulting in fluorescent dots representing a protein-protein interaction.

(B) (C) BMPR1b/ER $\alpha$ 36 interaction in chronically-exposed cells observed by PLA. (B) Quantification was performed by counting the number of signals per cells as reported in the materials and methods. Each dot of the graph represents a PLA assay performed in chronically-exposed MCF10A cells treated for 17, 19, 21 and 22 weeks. N = 4 (C) Representative images of BMPR1b/ER $\alpha$ 36 interaction. Red dots correspond to dimers detection and nuclei were counterstained with DAPI (blue). Objective x43.

C



To rule out non-specific binding in PLA between ER $\alpha$ 36 and BMPR1b, we decided to conduct control experiments in which the expression of one of the target proteins is repressed. We thus obtained MCF10A cells knocked down for BMPR1b. We used an all-in-one doxycycline inducible lentiviral shRNA expression vector<sup>20</sup> to derive a MCF10A cell line with an inducible BMPR1b knockdown (Figure 10A). As shown in Figure 10B, after transfection of the shRNA expression plasmids and antibiotic selection, we obtained two MCF10A cell lines expressing two different shRNA against the BMPR1b mRNA and one MCF10 line expressing a shRNA against luciferase mRNA as a control. These three MCF10A lines showed a strong GFP induction under doxycycline, suggesting a good expression of the shRNA that are processed from an intron of the GFP transcript in these constructs. We performed a time-course of doxycycline induction in the shLuc, shBMPR1b317 and shBMPR1b462 cell lines and measured the amount of BMPR1b transcript by RT-qPCR. As shown in Figure 10C, we detected a specific decrease in BMPR1b transcripts after 72 hours of shBMPR1b induction. Western blot experiments are currently ongoing to confirm that this shBMPR1b317 is suitable to test the specificity of the proximity signal seen between BMPR1b and ER $\alpha$ 36.

**Figure 10. ShBMPR1b development on MCF10A cells**

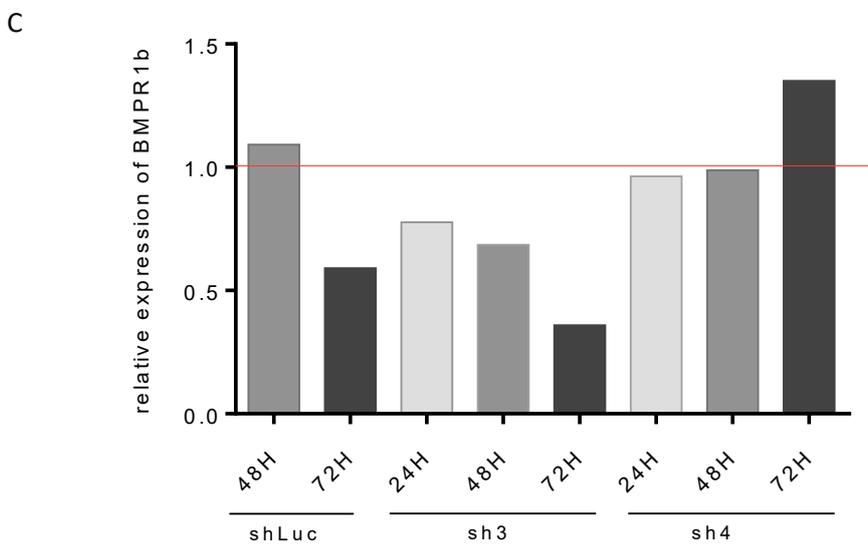
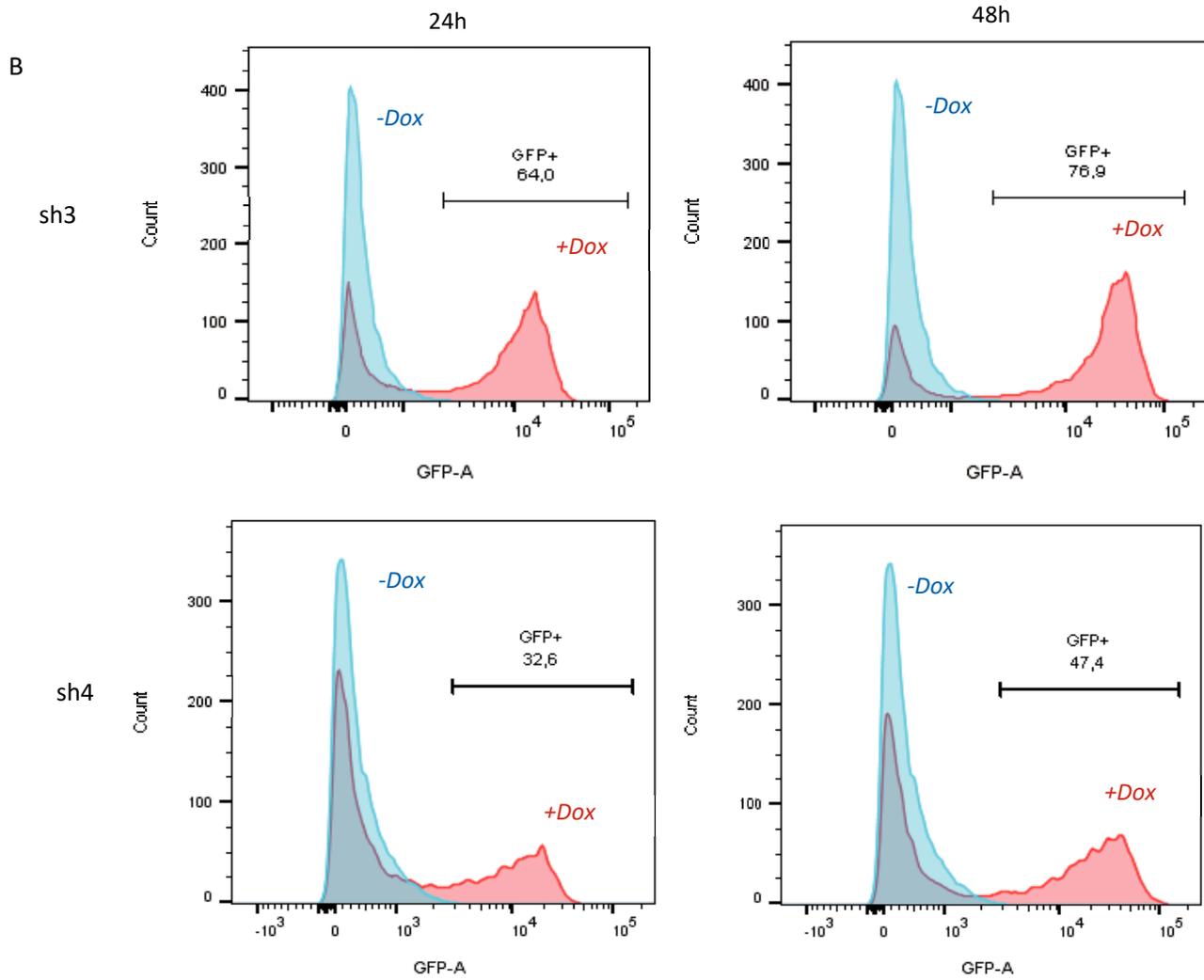
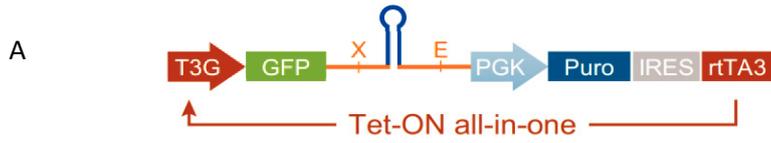
(A) Structure of the doxycycline-inducible lentiviral shRNA expression vector from <sup>20</sup>

(B) Flow cytometry analysis of GFP expression in shBPR1b-expressing MCF10A cells induced or not with doxycycline for 24 h or 48 h. N = 1

(C) Transcriptomic expression of BMPR1b in shBMPR1b-expressing MCF10A after 24 h, 48 h and 72 h of doxycycline normalised against the non-induced doxycycline condition. N = 1

+Dox: doxycycline induction; - Dox : non-induced condition, shLuc : ShLuciferase control, sh3 : shBMPR1b #317, sh4 : shBMPR1b #462.





*Analysis of treatment-induced modifications at the transcriptomic level.*

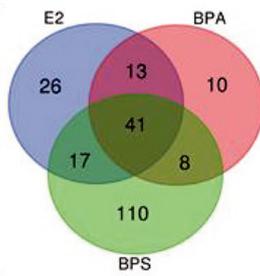
To gain insights into the transcriptomic changes induced by the treatments, we performed RNAseq analyses on independent cultures triplicates of untreated cells or cells treated with BMP2, E2, BPA and BPS, alone or in combination for 13 weeks. BPF was not included due to restrictions in the number of sample slots available. After normalization of read counts, we established a list of differentially expressed (DE) genes between untreated cells and each treatment conditions using the DESeq2 R package. In this first analysis, we only considered genes with an expression fold change (FC) > 2 and an adjusted p-value (Benjamini-Hochberg) < 0,001. With these settings, 1 out of every 1000 DE genes are expected to be false positive and the highest number of DE genes obtained (in treatments including BMP2) was never superior to 1500. In consequences, the global analyses we performed are unlikely to be drastically impacted by false positive DE genes.

We first looked at genes differentially expressed following E2, BPA and BPS chronic treatments. As shown in Figure 11A, 97 and 72 genes are differentially expressed following E2 and BPA treatments, respectively. Most of DE genes associated with BPA treatment are also associated with E2 treatment (54 out of 72). Strikingly, BPS treatment is associated with a larger number (176) of DE genes. Almost two third of the DE genes associated with BPS are not associated with E2 or BPA treatments. All genes differentially expressed in at least one treatment were then subjected to a hierarchical clustering analysis to better visualize the effects of all treatments (Figure 11B). The two main clusters are formed of genes downregulated (cluster 1) or upregulated (cluster 2) by all treatments. Most genes in cluster 1 are more strongly repressed by BPS than E2 or BPA. Genes in cluster 2 seem equally split between genes more strongly upregulated by BPS (upper half of the cluster) or by E2 and BPA (lower half of the cluster). Interestingly, despite some differences, changes in gene expression induced by E2 and BPA seem extremely similar while BPS has a quantitatively different effect. In addition, small clusters of genes (at the bottom of the clustering image) are specifically upregulated by both bisphenols or by E2 and BPA only. A pathway enrichment analysis on the two mains clusters was then performed. Cluster 1, down regulated by all treatment but more strongly by BPS, is enriched in genes involved in TCF transcription factor activity control by Wnt ligand antagonists, in degradation of the extracellular matrix and in NGF stimulated transcription. Cluster 2, upregulated by all treatment at various levels is enriched in genes involved in formyl peptide receptors function, in neutrophil degranulation and FGFR3 signaling.

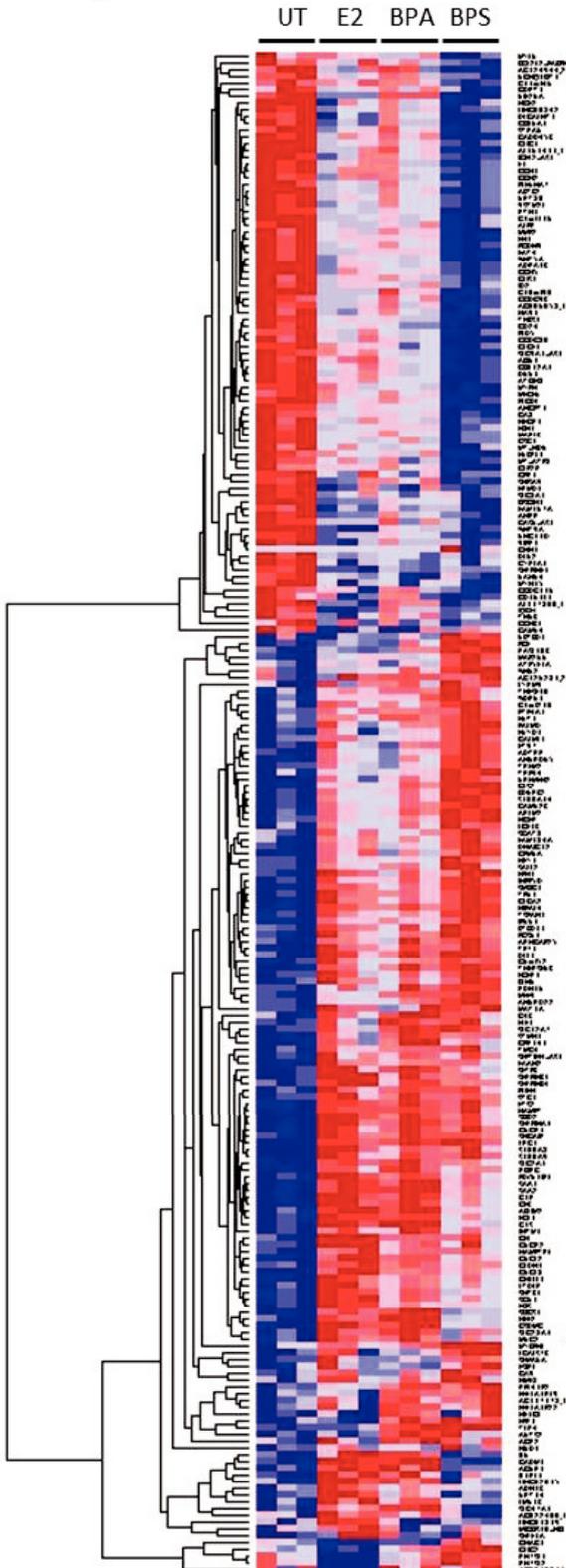
Globally, these data show that E2, BPA and BPS have mostly similar qualitative effects on gene expression. But interestingly, BPS has clear quantitative different effects compared to both E2 and BPA.

A

DE genes compared to UT FC>2, p<0.001



B



1

Pathway name	Entities		
	found	ratio	p-value
Negative regulation of TCF-dependent signaling by WNT ligand antagonists	3 / 15	0.001	1.50e-04
Degradation of the extracellular matrix	6 / 148	0.01	4.94e-04
NGF-stimulated transcription	4 / 56	0.004	5.69e-04

2

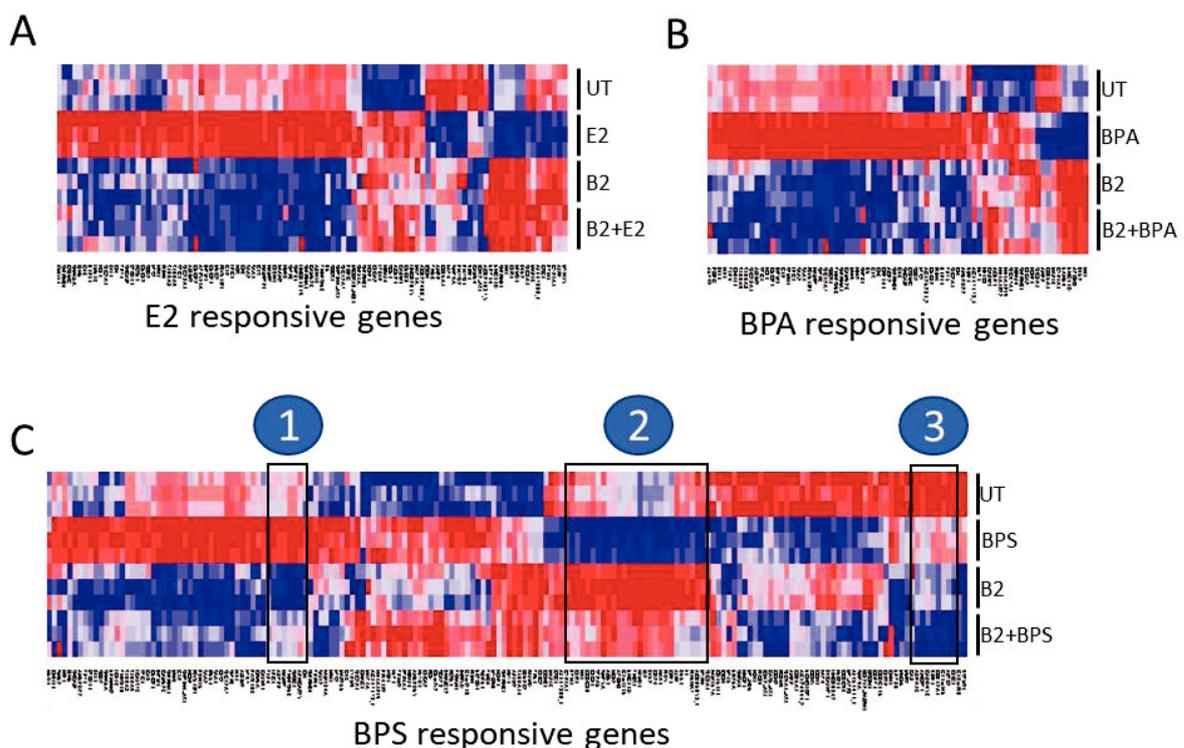
Pathway name	Entities		
	found	ratio	p-value
Formyl peptide receptors bind formyl peptides and many other ligands	3 / 11	7.47e-04	1.39e-04
Neutrophil degranulation	13 / 480	0.033	3.52e-04
Signaling by activated point mutants of FGFR3	3 / 17	0.001	4.94e-04

Figure 11: Differential gene expression induced by estradiol and bisphenols long-term treatments.

(A): Venn diagram showing the number and overlap of differentially expressed genes (fold change >2 with p-value <0.001) between cells treated with estradiol, BPA or BPS and untreated cells (UT).

(B): Heat-map of a hierarchical clustering of all differentially expressed genes (fold change >2 with p-value <0.001) in at least one of the estradiol, BPA or BPS conditions compared with untreated cells. High and low expression levels are shown in red and blue, respectively. The two main genes clusters were subjected to a pathway enrichment analysis using the “Reactome” database. Pathways enriched with a p-value < 0.001 are shown.

We then analyzed BMP2 treatment effect on E2, BPA and BPS responsive genes. For that, we performed a hierarchical clustering of DE genes including BMP2 treatment alone or in combination with E2, BPA or BPS (Figure 12). For both E2 and BPA responsive genes (Figure 12A and B, respectively), BMP2 alone has opposite effects on the expression of most genes and combined treatments are almost indistinguishable from BMP2 alone. This suggests that BMP2 has a strong dominant effect on DE genes associated to E2 and BPA treatments. Interestingly, several DE genes associated with BPS show a more complex response to BMP2 (Figure 12C). Indeed, for a significant proportion of genes, expression changes in the BMP2/BPS combination seems to integrate the effects of each treatment alone. Three clusters are highlighted as examples. Genes in cluster 1 are strongly upregulated by BPS and downregulated by BMP2 but have an intermediate expression in presence of BMP2 and BPS. Genes in cluster 2 have the opposite response than in cluster 1. Genes in cluster 3 are repressed by both BPS and BMP2 and the combination of treatments show a stronger repression. Clusters with similar responses to BMP2 are never found in E2 or BPA responsive genes.



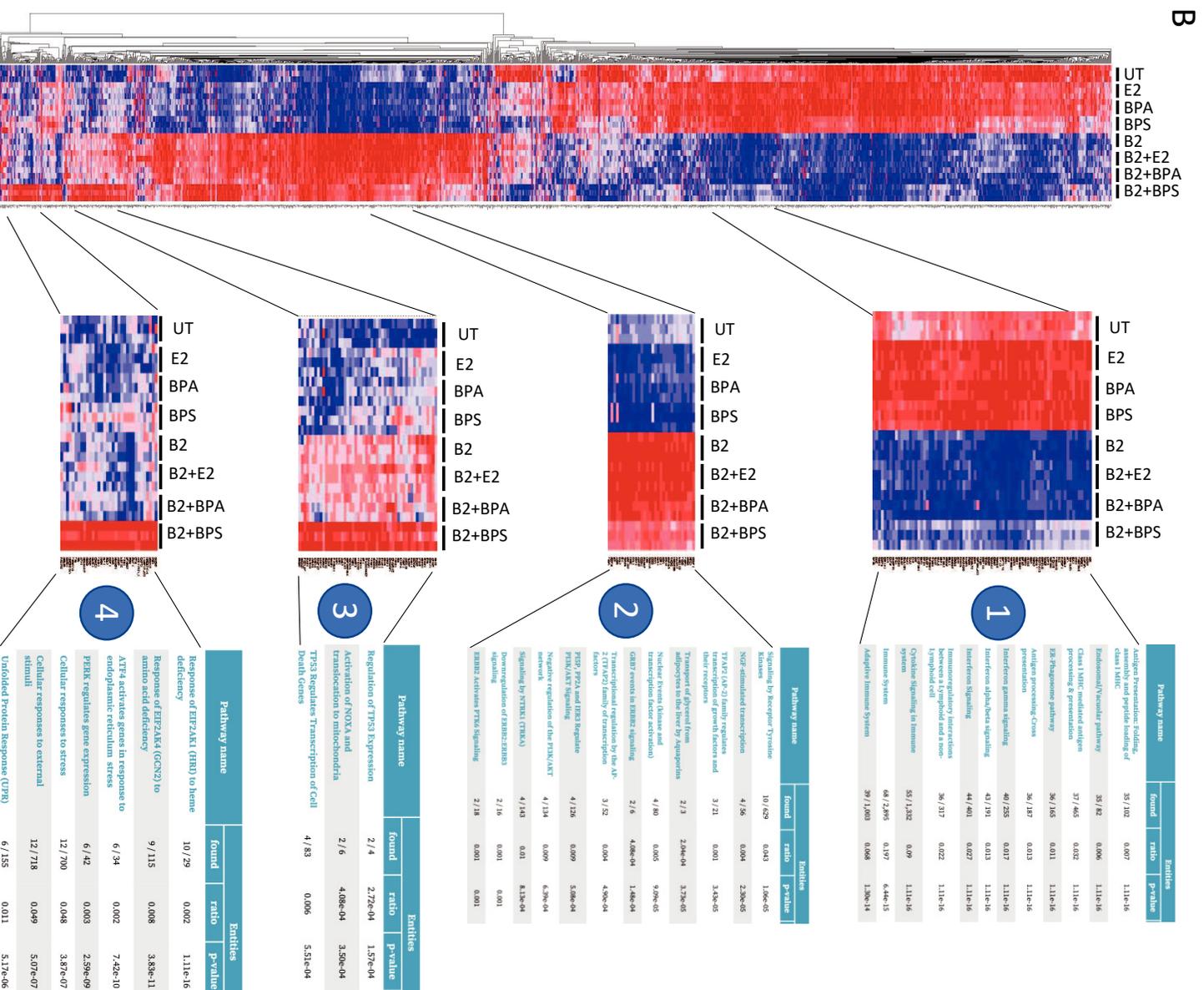
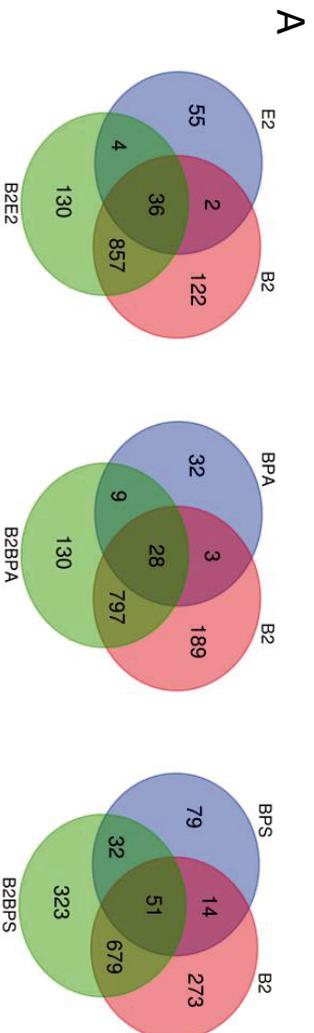
**Figure 12: BMP2 effect on estradiol, BPA and BPS responsive genes.** Heat-map of a hierarchical clustering of estradiol (A), BPA (B) and BPS (C) responsive genes (from Figure 11A) in the indicated conditions. Dendrograms are not shown for clarity. In C, three clusters of BPS responsive genes with differential expression between BMP2 (B2) and B2+BPS conditions are shown.

We then included in similar analyses DE genes related to BMP2 treatment. As shown in Figure 13A, 1017 genes were differentially expressed in response to BMP2 chronic treatment. As shown by the Venn diagrams, E2 and BPA have very similar interactions with BMP2 in term of DE genes. Again, BPS stands out with almost 2.5-fold more DE genes than E2 or BPA when in combination with BMP2. We then performed a hierarchical clustering of all DE genes in at least one of the indicated treatments (Figure 13B). The genes are mainly segregated according to the presence or absence of BMP, which is expected since BMP2 induces the differential expression of around 10 times more genes than E2 or bisphenols. Interestingly, BMP2 and BMP2+E2 or BMP2+BPA conditions are essentially indistinguishable, while several genes show a differential expression between BMP2 and BMP2+BPS conditions. Four clusters of such genes were chosen as examples and subjected to pathway enrichment analyses. Cluster 1 is composed of genes upregulated by E2, BPA and BPS in a similar extent, strongly downregulated by BMP2 independently of the presence of E2 or BPA, but with an intermediate expression in presence of BMP2+BPS compared to BMP2 or BPS alone. Cluster 1 is enriched in genes involved in several pathways related to immunity, including antigen processing and presentation by class 1 MHC and Interferons signaling. Cluster 2 is composed of genes downregulated by E2, BPA and BPS, strongly stimulated by BMP2 independently of the presence of E2 or BPA, and again with an intermediate expression in presence of BMP2+BPS. Cluster 2 is enriched in genes involved in pathways related mainly to signaling pathway, including signaling by ERBB2. Clusters 1 and 2 show antagonist effects between BMP2 and BPS as see in Figure 12. But the present analysis including BMP2+BPS responsive genes allowed us to also identify a cooperation between BMP2 and BPS. Indeed, cluster 3 is composed of genes weakly or not activated by E2, BPA and BPS, mildly activated by BMP2 independently of E2 or BPA, but strongly activated in presence of both BMP2 and BPS. Cluster 3 is enriched in genes involved in regulation of TP53 and some of its target genes. Cluster 4 is similar to cluster 3 but with an even more striking synergistic effect between BMP2 and BPS. Indeed, cluster 4 is composed of genes that are not regulated by E2, BPA, BPS, BMP2, BMP2+E2 and BMP2+BPA. But BMP2+BPS induces a strong upregulation, this synergy between BMP2 and BPS for the expression of these genes is the epitome of a cocktail effect between an environmental pollutant and an endogenous molecule. Cluster 4 is enriched in genes involved in responses, especially translational, to various stresses.

**Figure 13: MCF10A cells were chronically exposed to E2 (10-8M), BPA (10-7M), BPS (10-7M) or BPF (10-7M). BPS interacts with BMP2 differently than E2 or BPA in the regulation of gene expression.**

(A): Venn diagrams showing the number and overlap of differentially expressed genes (fold change >2 with p-value <0.001) between untreated cells and cells treated with BMP2, E2 or both (left diagram), BPA or both (middle diagram) and BPS or both (right diagram).

(B): Heat-map of a hierarchical clustering of all differentially expressed genes in at least one of the indicated conditions compared with untreated cells. Four genes clusters are enlarged and were subjected to a pathway enrichment analysis using the “Reactome” database. All or a subset of pathways enriched with a p-value < 0.001 are shown. UT are the control cells (unexposed to treatments).



We showed that MCF10A cells do not detectably express ER $\alpha$ 66 and ER $\alpha$ 46 but only ER $\alpha$ 36. This suggests that the observed effects of E2, BPA and BPS treatments are mediated by ER $\alpha$ 36. To test this hypothesis, we performed a hierarchical clustering and a GSEA analysis of genes described as estrogen responsive in cells expressing ER $\alpha$ 66

As shown in Figure 14A, no obvious regulation of these genes by any treatments is apparent on the hierarchical clustering or detected by the GSEA analyses. Since other estrogen receptors exist, like those of the Estrogen Related Receptors family, we tested if known target genes of ER $\alpha$  or ER $\gamma$  were responding to E2 or bisphenols treatment in MCF10A cells. As shown in Figure 14B and 14C, known ER $\alpha$  and ER $\gamma$  target genes, respectively, are not regulated by any treatment in MCF10A cells. Finally, we chose a subset of BMP target genes we know to be regulated by BMP2 in MCF10A cells to confirm their regulation by the BMP2 treatments in this RNAseq experiment. Interestingly, except for ID1, the activation of BMP2 targets genes expression seems to be attenuated by BPS but not by E2 or BPA.

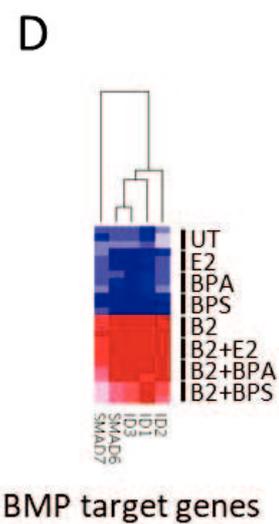
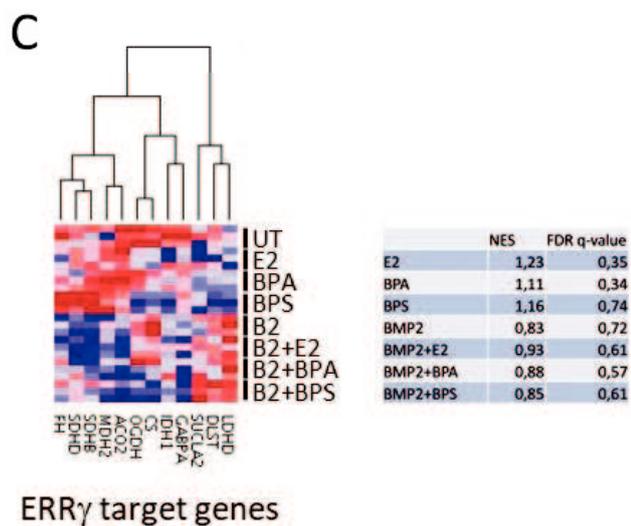
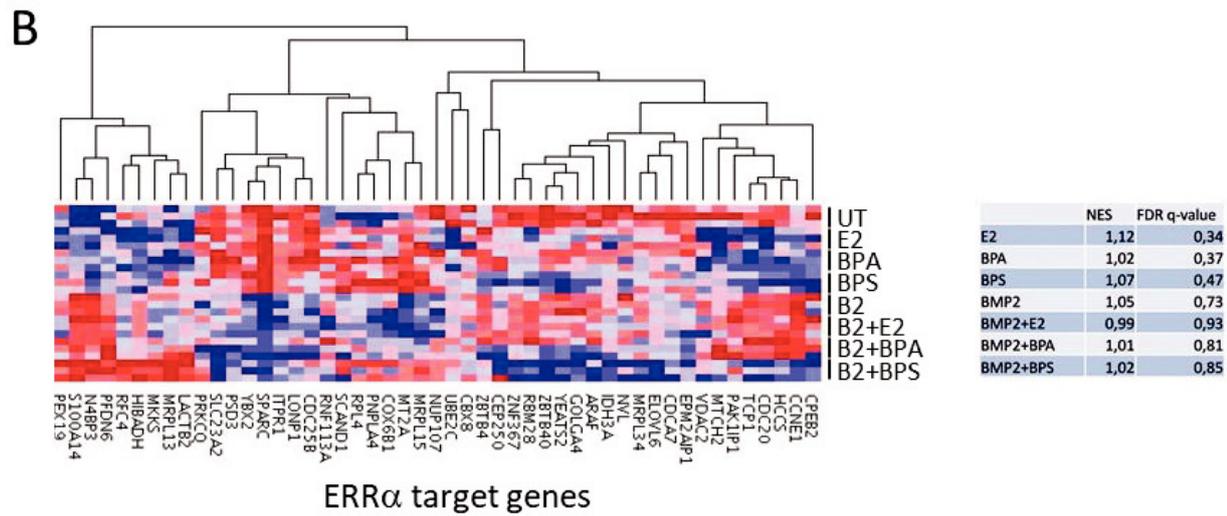
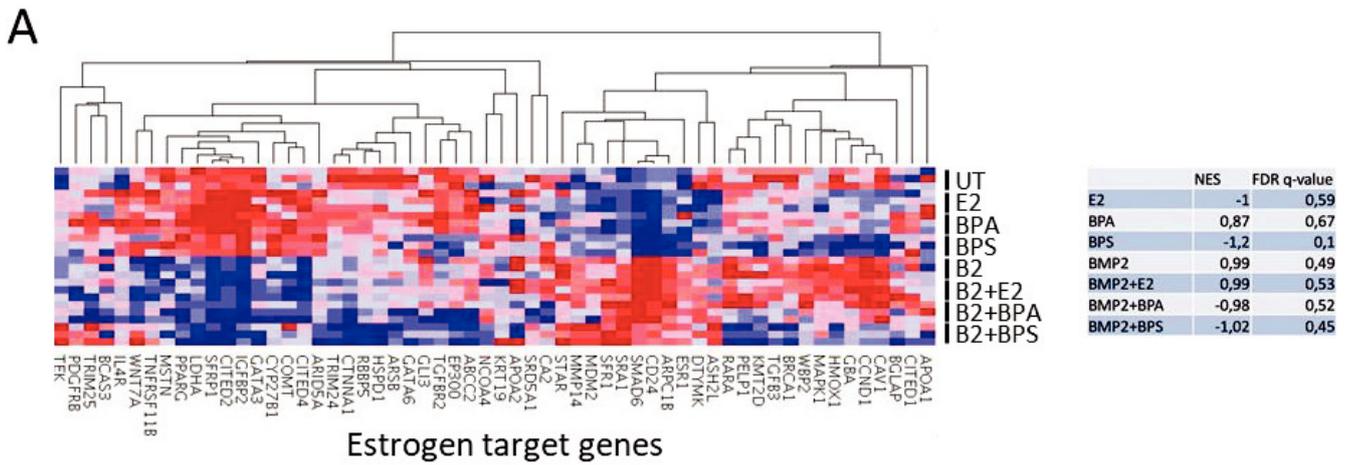
**Figure 14: Known estradiol, ER $\alpha$  and ER $\gamma$  targets genes are not regulated by estradiol or bisphenols in MCF10A cells.**

(A): Heat map of the hierarchical clustering of known estrogen target genes (from Gene Ontology term “response to estrogen, GO:0043627) in the indicated conditions. The right table shows the results of a GSEA (NES: Normalized Enrichment Score) analysis using the same genes as genes and comparing untreated cells (UT) with the indicated conditions.

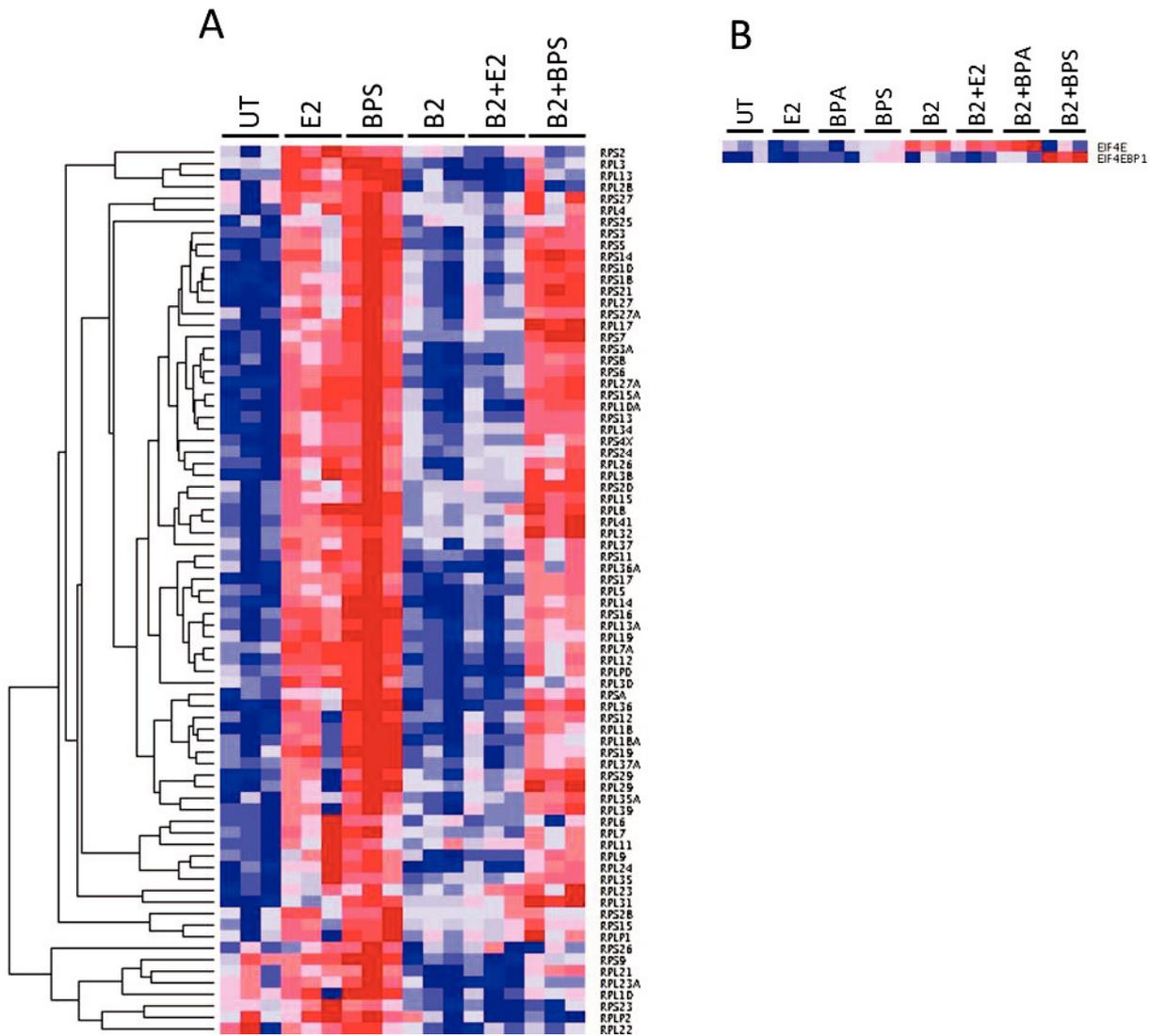
(B): Same as in A, using known ER $\alpha$  target genes from Deblois et al. 2009<sup>23</sup>.

(C): Same as in A, using known ER $\gamma$  target genes from Eichner et al., 2010<sup>24</sup>.

(D): Heat map of the hierarchical clustering of known BMP2 target genes in MCF10A in the indicated conditions.



In preliminary analysis by GSEA using genes lists involved in various biological function (not shown), we found that genes coding for ribosome proteins were consistently overexpressed in some treatments. These expression changes are not apparent in our previous analysis since the expression fold-change is often slightly inferior to 2. We visualize in Figure 15A the effects of the treatments on all cytoplasmic (i.e. not mitochondrial) ribosomal proteins coding genes. BPA effects are not shown since unfortunately one of the triplicates for the BMP2+BPA is not consistent with the others. E2 and BPA alone both activate almost all ribosomal protein coding genes. BMP2 has no obvious effects except for a few ribosomal protein genes that are repressed. Interestingly, and as saw before for other genes, BMP2 cancel the E2 mediated activation of these genes but has much less effect on the BPS mediated activation. In consequence, in presence of BMP2 signalling, only BPS is still able to induce the expression of ribosomal protein coding genes. This observation prompted us to analyse the expression of genes coding for proteins involved in translation. As shown in Figure 15B, two important regulators of cap-dependent translation, EIF4E and EIF4E-BP1, are differentially regulated by the treatments. EIF4E, the rate limiting factor of the cap-binding complex, is activated by BMP2 independently of E2 or BPA, but BPS counteracts this activation. EIF4E-BP1, an inhibitor of EIF4E, is only activated in presence of both BMP2 and BPS (EIF4E-BP1 is a member of the cluster 4 in Figure 13B). These observations suggest that BPS could have specific impacts on the translation machinery that are described in the discussion section.



**Figure 15**

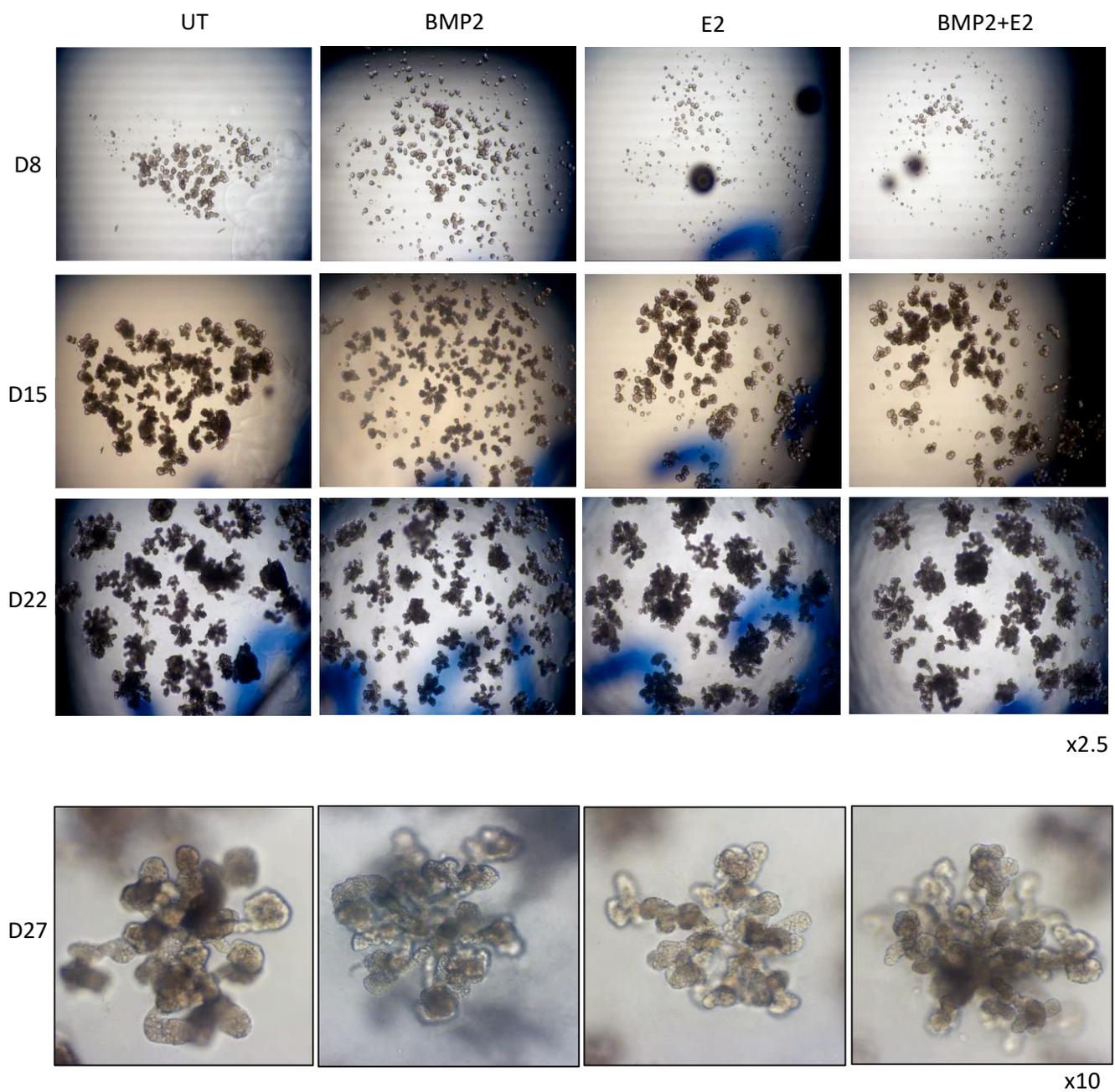
(A): Heat map of the hierarchical clustering of cytoplasmic ribosomal protein genes in the indicated conditions. UT are the control cells (unexposed to treatments).

(B): Heat map showing the expression of EIF4E and EIF4EBP1 genes in the indicated conditions.

## CONCLUSION

Owing their involvement in carcinogenesis, E2-mimicking environmental pollutants like bisphenols, that are increasingly present in our environment, remain a crucial public health issue. Indeed, BPA has been shown to promote proliferation and transformation of breast cancer cells, and to increase hormone sensitivity during lactation and gestation, favouring the risk of breast cancer development. As speculated in our group, one possible molecular explanation is that exposure to BPA dysregulates BMP2 production by mammary fibroblasts and stromal cells, leading to immature mammary cell transformation. Considering the number of studies describing BPA as a dangerous molecule, notably for its E2-mimicking effects, other molecules considered safe, such as BPS and BPF, are now used instead. Here, we investigate the effects of BPA and its alternatives, BPS and BPF, on the regulation of immature mammary cells by evaluating their impact alone or in combination with BMP2. We demonstrated in MCF10A cells that a chronic exposure to BPS and BPF, in collaboration with BMP2, acts differently than BPA or E2 on immature mammary epithelial cells, by increasing the size of mammospheres and the number of progenitors. In addition to modifying mammary epithelial stem cell properties, chronic exposure to bisphenols appears to have an effect on the response to BMP2. Indeed, we observed that long-term treatment to BPS or BPF, enhances the response of MCF10A cells to BMP2 by over-activating its canonical pathway through an increase in SMAD phosphorylation. These data demonstrate that these BPA alternatives, considered as safe, have similar effects as BPA on BMP2 signalling, a pathway known to be involved in luminal breast cancer emergence. Moreover, we also show that ER $\alpha$ 36, another ER $\alpha$ 66 isoform which is not taken into account in the establishment of ER breast cancer status, could be involved in these mechanisms, notably via an interaction between ER $\alpha$ 36 and two major actors of the BMP pathway: BMPRIb and SMAD1.

## SUPPLEMENTARY FIGURE



**Supplementary Figure 1. Impact of BMP2 and/or E2 treatment on mammary gland architecture obtained from MCF10A cells**

Bright-field images at day 8, 15, 22 or 27 of 3D structures generated in the TDLU assay from untreated (UT), or BMP2 (10ng/ml) or/and E2 ( $10^{-8}$ M), previously treated for 8 weeks.

## REFERENCES

1. Muñoz-de-Toro, M. et al. Perinatal Exposure to Bisphenol-A Alters Peripubertal Mammary Gland Development in Mice. *Endocrinology* 146, 4138–4147 (2005).
2. Williams, G. P. & Darbre, P. D. Low-dose environmental endocrine disruptors, increase aromatase activity, estradiol biosynthesis and cell proliferation in human breast cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 486, 55–64 (2019).
3. Pupo, M. et al. Bisphenol A induces gene expression changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Environ. Health Perspect.* 120, 1177–1182 (2012).
4. Song, H. et al. Low doses of bisphenol A stimulate the proliferation of breast cancer cells via ERK1/2/ERK $\gamma$  signals. *Toxicol In Vitro* 30, 521–528 (2015).
5. Liao, C., Liu, F. & Kannan, K. Bisphenol s, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol a residues. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6515–6522 (2012).
6. Lotti, N., Colonna, M., Fiorini, M., Finelli, L. & Berti, C. Poly(butylene terephthalate) modified with ethoxylated bisphenol S with increased glass transition temperature and improved thermal stability. *Polymer* 52, 904–911 (2011).
7. Pivnenko, K., Pedersen, G. A., Eriksson, E. & Astrup, T. F. Bisphenol A and its structural analogues in household waste paper. *Waste Manag* 44, 39–47 (2015).
8. Deng, Q. et al. GPER/Hippo-YAP signal is involved in Bisphenol S induced migration of triple negative breast cancer (TNBC) cells. *J. Hazard. Mater.* 355, 1–9 (2018).
9. Lin, Z., Zhang, X., Zhao, F. & Ru, S. Bisphenol S promotes the cell cycle progression and cell proliferation through ER $\alpha$ -cyclin D-CDK4/6-pRb pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 366, 75–82 (2019).
10. Huang, W. et al. Bisphenol S induced epigenetic and transcriptional changes in human breast cancer cell line MCF-7. *Environmental Pollution* 246, 697–703 (2019).
11. Wang, Z.-Y. & Yin, L. Estrogen receptor alpha-36 (ER- $\alpha$ 36): A new player in human breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 418 Pt 3, 193–206 (2015).
12. Shi, L. et al. Expression of ER- $\alpha$ 36, a novel variant of estrogen receptor  $\alpha$ , and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 3423–3429 (2009).
13. Wang, Z. et al. A variant of estrogen receptor- $\alpha$ , hER- $\alpha$ 36: Transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9063–9068 (2006).
14. Wang, Q. et al. Tamoxifen enhances stemness and promotes metastasis of ER $\alpha$ 36 + breast cancer by upregulating ALDH1A1 in cancer cells. *Cell Res* 28, 336–358 (2018).
15. Wang, R. N. et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis* 1, 87–105 (2014).
16. Chapellier, M. et al. Disequilibrium of BMP2 Levels in the Breast Stem Cell Niche Launches Epithelial Transformation by Overamplifying BMPR1B Cell Response. *Stem Cell Reports* 4, 239–254 (2015).
17. Clément, F. et al. Long-term exposure to bisphenol A or benzo(a)pyrene alters the fate of human mammary epithelial stem cells in response to BMP2 and BMP4, by pre-activating BMP signaling. *Cell Death Differ* 24, 155–166 (2017).
18. Wang, D. et al. Induction of estrogen receptor  $\alpha$ -36 expression by bone morphogenetic protein 2 in breast cancer cell lines. *Mol Med Rep* 6, 591–596 (2012).
19. Stingl, J., Raouf, A., Emerman, J. T. & Eaves, C. J. Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10, 49–59 (2005).
20. Fellmann, C. et al. An optimized microRNA backbone for effective single-copy RNAi. *Cell Rep* 5, 1704–1713 (2013).
21. Kim, J.-Y. et al. Effects of bisphenol compounds on the growth and epithelial mesenchymal transition of MCF-7 CV human breast cancer cells. *J Biomed Res* 31, 358–369 (2017).

22. Huang, B. et al. The modulatory role of low concentrations of bisphenol A on tamoxifen-induced proliferation and apoptosis in breast cancer cells. *Environ Sci Pollut Res Int* 26, 2353–2362 (2019).
23. Deblois, Geneviève et al. “Genome-wide identification of direct target genes implicates estrogen-related receptor alpha as a determinant of breast cancer heterogeneity.” *Cancer research* vol. 69,15 (2009): 6149-57. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1251
24. Eichner, L. J., Perry, M. C., Dufour, C. R., Bertos, N., Park, M., St-Pierre, J., & Giguère, V. (2010). miR-378(\*) mediates metabolic shift in breast cancer cells via the PGC-1 $\beta$ /ERR $\gamma$  transcriptional pathway. *Cell metabolism*, 12(4), 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.09.002>

---

---

---

DISCUSSION  
et  
CONCLUSION

---

---

---

Durant ma thèse, je me suis intéressée aux effets d'un perturbateur endocrinien œstrogénomimétique très controversé actuellement, le bisphénol A, ainsi qu'à deux molécules alternatives (bisphénol S et F) sur un modèle de cellules souches épithéliales mammaires humaines non transformées (MCF10A).

Le BPA est massivement utilisé dans la fabrication du plastique et est un composant majeur de nombreux objets du quotidien. À la suite de la dégradation de ces plastiques il est retrouvé dans notre environnement. Un rapport effectué par l'Anses en 2011, puis confirmé peu après en 2013 ([source : anses 2013 https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0331Ra-0-An.pdf](https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0331Ra-0-An.pdf)), met en lumière les effets délétères du BPA chez l'animal, touchant la reproduction, la glande mammaire, le métabolisme, le cerveau et le comportement, ainsi que des effets suspectés chez l'Homme, même à faible dose. De plus, il a également été rapporté que certaines populations peuvent y être d'avantage sensibles telles que les femmes enceintes ou les nourrissons. Suite à cela, des recommandations ont été mises en place, dont notamment celle de diminuer l'utilisation du BPA et de le remplacer par des substituts comme le BPS ou le BPF. Cependant, ces deux molécules alternatives ont des structures très similaires au BPA, suggérant qu'elles pourraient également être des perturbateurs endocriniens œstrogénomimétiques. Cette suspicion est confirmée par de nombreuses études qui démontrent l'effet du BPS et du BPF sur la dérégulation hormonale et la tumorigenèse, remettant ainsi en question leur innocuité et les critères de contrôles utilisés pour évaluer leurs effets sur la santé humaine (Deng et al., 2018; Huang et al., 2019; Kim et al., 2017; Lin et al., 2019). En effet, l'évaluation de l'activité œstrogénomimétique de ces composés et de leur potentielle dangerosité repose essentiellement sur des modèles cellulaires ou murins considérés ER $\alpha$  positifs sur la base de leur expression de l'isoforme ER66, ou exprimant artificiellement cette dernière. Cependant, d'autres isoformes de ER $\alpha$  qui ne sont pas prises en compte existent, tel que ER $\alpha$ 36. Ceci apporte une possible explication aux effets œstrogénomimétiques observés dans certaines études, qui pourraient donc mettre en jeu d'autres isoformes de ER $\alpha$ .

Lors de mes travaux de thèse, j'ai choisi d'utiliser un modèle de cellules souches épithéliales mammaires non transformées, les MCF10A, qui bien que classiquement considérées ER $\alpha$  négatives sur la base de l'absence d'expression d'ER66, expriment uniquement l'isoforme ER $\alpha$ 36. Le choix d'une lignée cellulaire plutôt que d'un modèle murin repose sur le fait que dans les modèles animaux, l'avantage d'une situation beaucoup plus physiologique est tempéré par la difficulté à identifier les populations cellulaires responsables des effets observés et leurs bases moléculaires. Cette approche permet donc d'évaluer les effets des bisphénols œstrogénomimétiques sur un type cellulaire, les cellules souches, et via une isoforme d'ER $\alpha$ , ER $\alpha$ 36, rarement étudiés dans ce contexte. Par ailleurs il

existe une extrême interdépendance de nombreuses voies de signalisation, celles activées par ER $\alpha$  ne faisant pas exception. En effet, des données du laboratoire et de la littérature suggèrent une interaction entre la signalisation des BMP et des œstrogènes dans les MCF10A ainsi que dans des cellules épithéliales mammaires transformées (Chapellier et al., 2015; Clément et al., 2017; Wang et al., 2012). Sur la base de ces données, j'ai choisi d'étudier d'éventuelles interactions fonctionnelles ou moléculaires entre les bisphénols et la voie de signalisation des BMP. L'approche expérimentale principale choisie fut de réaliser une exposition chronique à de faibles doses de BPA, BPS ou BPF ( $10^{-7}$ M). En plus de ces polluants environnementaux, un traitement au 17- $\beta$  œstradiol (E2) a également été réalisé pour servir de référence à l'évaluation des effets œstrogène-mimétiques des bisphénols. Les doses utilisées de bisphénols et d'E2 ont volontairement été choisies dans la gamme basse de celles fréquemment utilisées dans la littérature pour s'approcher des conditions d'exposition environnementales qui sont toutefois mal connues chez l'homme. Le nombre déjà élevé de conditions testées ne nous a pas permis de réaliser une gamme de concentrations, ce qui serait malgré tout intéressant dans le futur, en particulier si l'on considère la relation non monotone entre dose et effet des bisphénols évoquée dans l'introduction bibliographique. Afin d'étudier d'éventuelles interactions fonctionnelles ou moléculaires entre les bisphénols œstrogène-mimétiques et la voie de signalisation des BMP, une exposition au BMP2 a également été effectuée seule ou en combinaison avec chacun des autres traitements chroniques, aboutissant alors à la genèse de 10 lignées cellulaires dérivées des MCF10A parentales.

Des expériences fonctionnelles ont été réalisées pour étudier l'effets de ces différentes expositions sur les caractéristiques des populations à activité souche ou progénitrice des MCF10A, à travers des tests de formation de mammosphères et de E-CFC. Par ailleurs, compte tenu de l'implication individuelle du BPA, du BPS, du BPF, des œstrogènes ainsi que du BMP2 déjà rapportée dans la littérature sur la transformation des cellules mammaires, des études fonctionnelles sur la transformation ont également été réalisées, grâce à des tests de formation de colonies en agar mou. De plus, une analyse des modifications transcriptomiques induites par ces différents traitements a été réalisée.

### Implication des bisphénols dans la régulation des cellules souches mammaires.

Des données de la littérature, basées aussi bien sur des modèles murins que sur des modèles cellulaires, ont montré que les cellules souches mammaires sont sensibles au BPA, puisqu'il conduit à un déséquilibre dans la quantité de cellules souches et à une dérégulation de leurs fonctions (Chapellier et al., 2015; Chen et al., 2013; Clément et al., 2017; Lillo et al., 2017; Wang et al., 2014a). A l'exception d'une augmentation induite par BMP2, les expériences de mammosphères que j'ai

réalisées afin d'évaluer la fréquence des cellules de type souche en fonction des traitements ne m'a pas permis de mettre en évidence d'effets reproductibles de l'E2 ou des bisphénols, seuls ou en combinaison avec BMP2, sur la fréquence des mammosphères. En revanche, j'ai observé une tendance à une augmentation des mammosphères de grande taille en présence de BMP2, tendance renforcée par la combinaison BMP2+BPS alors que le BPS seul n'a pas d'effet. Il est intéressant de noter qu'une augmentation de la taille des mammosphères a déjà été rapportée mais à la suite d'une exposition au BPA et dans un contexte tumoral (Lillo et al., 2017). Il restera à déterminer si l'augmentation de la taille des mammosphères est due à une augmentation de la prolifération, de la croissance cellulaire ou des deux. Même si de manière intuitive la première option semble la plus probable, l'absence d'augmentation de la prolifération cellulaire basée sur la mesure du temps de doublement des cellules en culture ne supporte pas cette hypothèse d'une augmentation de la prolifération. De manière intéressante, une étude a montré que parmi la sous-population Lin<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup>CD29<sup>++</sup>, décrite pour contenir une forte proportion de cellules souches dans le modèle murin, les cellules ayant une taille supérieure à 10 µm ont un potentiel de formation de mammosphères et de repopulation après transplantation supérieur à celui retrouvé dans les cellules ayant une taille inférieure à 10 µm (Machado et al., 2013). Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que BMP2 et BPS pourraient coopérer pour favoriser la clonogénicité de cellules de type souche de taille plus importante et donc potentiellement avec un phénotype plus immature. Puisque le test de formation des mammosphères interroge la fréquence de cellules de type souche à un instant donné mais ne donne pas d'information sur leur capacité d'auto-renouvellement, et au vu des résultats liant les grosses cellules à un potentiel souche plus important, il serait intéressant de réaliser des tests de formation de mammosphère en série. Ce test consiste en une dissociation des sphères de première génération pour être utilisées lors d'un autre test de formation de mammosphère, et ainsi de suite, permettant d'évaluer le degré de persistance, et donc l'auto-renouvellement, de cellules de type souche au sein des mammosphères (Dontu et al., 2003). Pour compléter ces études et apporter d'autres arguments en faveur d'une augmentation de l'immaturité à la suite d'une exposition au BMP2+BPS, il sera également intéressant de mesurer l'expression de certains gènes associés à un phénotype souche. En effet, il a notamment été rapporté dans la littérature une augmentation de l'expression de facteurs de pluripotence ou caractéristiques des cellules souches adultes à la suite d'une exposition au BPA (Chen et al., 2013; Eladak et al., 2015; Lillo et al., 2017; Rochester and Bolden, 2015). Mes résultats montrant la spécificité de cet effet du BPS par rapport aux autres bisphénols suggèrent un mode d'action quantitativement ou qualitativement différent qu'il reste à élucider.

J'ai également mesuré la fréquence et le type des progéniteurs épithéliaux mammaires en fonction des différents traitements. Bien que davantage de répétitions seront nécessaires pour déterminer si certaines tendances observées sont significatives, notamment pour le BPS seul ainsi que

pour BPA et BPF en combinaison avec BMP2, le BPF et le BPS en combinaison avec BMP2 augmentent la fréquence des progéniteurs. En revanche, aucun effet des traitements n'a été mis en évidence sur les proportions de chaque type de progéniteurs obtenus (luminal, myo-épithélial ou mixte). N'ayant pas mis en évidence de diminution de la fréquence des mammosphères, il semble improbable que cette augmentation du nombre de progéniteurs découle d'une transition accélérée entre l'état de cellule souche et celui de progéniteur. Il est envisageable que les effets observés sur l'augmentation du nombre de progéniteurs résultent d'une prolifération accrue de ces derniers, sans impact sur leur engagement dans la différenciation terminale luminale ou myoépithéliale, au moins dans le contexte de ces tests E-CFC.

Même si je n'ai pas mis en évidence d'effets du BMP2, de l'E2 ou de la combinaison des deux sur la capacité à former les différentes structures d'une glande mammaire par des tests de TDLU, plusieurs études rapportent cependant des modifications dans la morphologie à la suite d'un traitement au BPA ou au BPS (Markey et al., 2001; Murray et al., 2007; Vandenberg et al., 2007). Il sera donc tout de même intéressant d'étudier l'effet des traitements sur la capacité à former les différentes structures d'une glande mammaire par des tests de TDLU. La morphogénèse normale des TDLU nécessite en effet un contrôle spatio-temporel fin de la prolifération et de la différenciation des cellules souche/immatures à leur origine. Des altérations du rapport entre la taille des canaux et des lobules ainsi que dans l'expression de marqueurs de différenciation, y compris terminaux comme la synthèse de protéines du lait pourraient ainsi compléter l'étude des effets des traitements.

## Implication des bisphénols dans la carcinogenèse mammaire.

### *Implication dans la transformation des MCF10A.*

Outre leur implication dans de nombreux processus biologiques et leur rôle important dans la physiologie de la glande mammaire, les œstrogènes peuvent être impliqués dans l'apparition de tumeurs mammaires. Comme introduit dans le chapitre 4 de l'introduction, le BPA a été classé comme perturbateur endocrinien du fait de sa capacité à mimer les effets des œstrogènes. Par ailleurs, de plus en plus d'études démontrent son implication dans le développement tumoral, ce qui a conduit au développement d'autres molécules alternatives telles que le BPS ou le BPF qui présentent une faible affinité pour ER66. Cependant, plusieurs études ont démontré que ces molécules alternatives peuvent avoir des effets similaires au BPA et favoriser le développement des cancers du sein (Chapellier et al., 2015; Eladak et al., 2015; Rochester and Bolden, 2015).

J'ai donc voulu évaluer la capacité des bisphénols à influencer la transformation des MCF10A obtenue après le traitement chronique par BMP2 et IL6 déjà décrit par l'équipe (Chapellier et al., 2015). Nous savions que l'IL6, bien que ni suffisante ni nécessaire pour induire la transformation qui reste dépendante de BMP2, était requise pour stabiliser dans le temps le phénotype transformé (mesuré par la formation de colonies en agar mou). J'ai toutefois dans un premier temps décidé de tester les effets des bisphénols, seuls ou en combinaison avec BMP2, en absence d'IL6 pour faciliter l'interprétation d'éventuelles coopérations observées entre BMP2 et les bisphénols. Je n'ai toutefois pas observé de signes clairs de transformation avec aucun des traitements en absence d'IL6 et ce jusqu'à la semaine 21, bien après la transformation habituellement obtenue en présence d'IL6 (vers les semaines 13/15). Il est possible que lors de cette expérience en particulier, la transformation ait été trop faible ou transitoire en absence d'IL6 pour permettre de la détecter avec des tests de formation de colonies en agar mou espacés de deux semaines. Devant l'absence de transformation en absence d'IL6, j'ai décidé de poursuivre les traitements en présence ou absence d'IL6 en repartant de la semaine 8 des traitements sans IL6. Dans ces conditions, j'ai observé à la 13<sup>e</sup> semaine de traitement avec IL6 une forte augmentation du nombre de clones en agar mou, spécifique du traitement avec BMP2 par rapport aux cellules non traitées. De façon surprenante, E2, BPA et BPF semblent diminuer la transformation par BMP2, contrairement au BPS qui ne la modifie pas. De plus, en absence de BMP2, une augmentation du nombre de colonies pourrait s'amorcer en présence de BPS. Ces observations, basées sur une unique semaine des traitements, restent préliminaires et devront être confirmés par l'analyse des semaines suivantes de traitement en présence d'IL6. Si ces tendances se confirment, elles suggèrent que dans les MCF10A, les bisphénols n'induisent pas d'augmentation ou d'accélération de la transformation induite par BMP2/IL6, ni ne sont capables de l'induire par eux-mêmes. Conclure sur les effets carcinogènes des bisphénols dans ce modèle demandera toutefois beaucoup plus d'études.

Même si ce travail n'a pas montré que les bisphénols sont capables de transformer les MCF10A, ceci n'empêche pas leur possible implication dans la dérégulation de certaines fonctions biologiques pour induire un état pré-tumoral entraînant alors une sensibilisation des cellules à d'autres facteurs qui conduiront à la transformation. Les données de transcriptomiques discutées plus loin indiquent d'ailleurs des pistes d'investigation dans cette perspective

#### *Sensibilisation des MCF10A au BMP2.*

Il a été publié par mon équipe d'accueil qu'un traitement à long terme (60 jours) des MCF10A par le BPA induisait une pré-activation de la voie SMAD en absence de stimulation exogène par les BMP (Clément et al., 2017). J'ai montré que cela était également le cas lors de traitements à très court

terme (5 et 15 minutes) pour l'E2, le BPA et le BPS en l'absence de BMP2. Or, le rôle transformant de BMP2 sur les MCF10A a été démontré. Ceci suggère que les bisphénols pourraient sensibiliser les cellules au BMP2 et donc favoriser leur transformation. J'ai donc voulu déterminer si les traitements à long terme par les bisphénols étaient capables de modifier durablement la signalisation canonique de BMP2. J'ai montré qu'après neuf semaines de traitement et une semaine de retrait de ces derniers, une stimulation courte par BMP2 induit une activation des SMAD1/5/8 plus importante dans le cas d'un traitement initial par le BPS ou le BPF seuls. Bien que ces résultats nécessitent d'être répétés un nombre plus important de fois pour confirmer cette tendance, ils suggèrent que les cellules traitées par le BPS ou le BPF gardent une mémoire (au moins pendant une semaine dans ce protocole) de cette exposition au regard de leur réponse à BMP2 via la voie canonique. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette mémoire de l'exposition au BPS ou au BPF résultant en une potentialisation de la voie canonique initiée par BMP2. Une première hypothèse serait une inhibition de la régulation négative de la voie des SMADs. En effet, comme décrit dans le chapitre 5 de l'introduction, SMAD6 et SMAD7 sont des régulateurs négatifs de la voie canonique en empêchant, entre autres, la phosphorylation des SMADs par compétition au niveau du récepteur (Miyazawa and Miyazono, 2017). L'analyse transcriptomique réalisée semble supporter cette hypothèse, le traitement par le BPS réprimant l'expression de SMAD6 et dans une moindre mesure de SMAD7 (Figure 14D). Outre la voie canonique des SMAD, BMP2 peut également activer d'autres voies de signalisation dites voies non-canoniques/SMAD indépendantes. Une autre hypothèse serait un switch entre la signalisation non-canonique et canonique, en faveur d'une signalisation SMAD dépendante, justifiant alors l'augmentation de la phosphorylation des SMADs. Pour étudier cette hypothèse, il serait donc intéressant de mesurer l'activation des voies de signalisations non canoniques comme par exemple les voies ERK ou PI3K/AKT, les analyses transcriptomiques en cours pourront permettre de mesurer d'éventuelles variations dans l'expression des gènes cibles de ces voies, qu'il sera intéressant de compléter par une mesure plus directe de leur niveau d'activation. Une autre hypothèse serait que l'exposition chronique au BPS ou BPF entraînerait une augmentation du nombre de récepteurs capables de lier BMP2, consécutive par exemple à une augmentation de la synthèse ou du recyclage à la membrane, soit à un changement de localisation augmentant leur expression membranaire. Cette hypothèse est en partie basée sur des données du laboratoire qui ont mis en évidence une localisation différente de BMPR1b entre les cellules saines et les cellules tumorales, validant l'idée que la localisation de BMPR1b est ajustable par les cellules. J'ai mesuré le niveau d'expression global de la protéine BMPR1b sans mettre en évidence de corrélation nette entre potentialisation de la réponse à BMP2 et expression de BMPR1b. Il sera intéressant d'étudier en complément la localisation subcellulaire de BMPR1b.

Cette mémoire de l'exposition au BPS ou au BPF résultant en une potentialisation de la voie canonique initiée par BMP2 n'est pas sans rappeler les effets multigénérationnels ou transgénérationnels du BPA, décrits pour conduire à une reprogrammation cellulaire au stade fœtal suite à des modifications génomiques, épigénétiques ou du microenvironnement cellulaires chez les descendants (Jorgensen et al., 2016; Schug et al., 2011; Wolstenholme et al., 2012; Xin et al., 2015), augmentant alors le risque de lésions et donc la susceptibilité de développer un cancer à long terme et ceci sur plusieurs générations. En effet, une étude a montré qu'un traitement au BPA pouvait induire une hyperméthylation, souvent associé à une répression, de gènes suppresseurs de tumeur tel que *BRCA1*, qui est un facteur dont les mutations héréditaires ont été décrites pour augmenter drastiquement le risque de cancer du sein (Foulkes et al., 2003; Qin et al., 2012; Zhong et al., 2015).

#### *Augmentation de l'expression de ER $\alpha$ 36.*

Il a été décrit dans la littérature que le BPA est capable d'augmenter l'expression d'ER $\alpha$ 36 et que ce dernier promeut la prolifération cellulaire (Guo et al., 2013a; Omarjee et al., 2017; Yu et al., 2019). De nombreuses données de la littérature ont rapporté que ER $\alpha$ 36 est associée à la transformation, à un taux de survie plus faible, à un risque de résistance aux traitements plus élevés ainsi qu'à un risque de développement de métastases plus important (Thiebaut et al., 2017). De plus, ER $\alpha$ 36 a aussi été décrit pour jouer un rôle majeur dans la régulation et la maintenance de cellules tumorales mammaires de type souches/progéniteurs (Deng et al., 2014; Wang et al., 2018).

Une analyse de l'expression protéique de ER $\alpha$ 36 a également réalisé et a montré que l'E2 et les bisphénols semblaient augmenter l'expression d'ER $\alpha$ 36, tendance augmentée par la présence de BMP2 avec l'exception notable de l'E2. Cela suggère une régulation différente d'ER $\alpha$ 36 par l'E2 et les bisphénols en coopération avec BMP2 dont les bases moléculaires restent à déterminer. En première approximation, il est possible de proposer que les bisphénols, en coopération avec BMP2, pourraient amorcer une boucle de régulation positive via l'augmentation de l'expression d'ER $\alpha$ 36. Cette augmentation de ER $\alpha$ 36 pourrait initier un état favorable à la transformation.

En effet, puisque nous avons observé que l'exposition chronique aux bisphénols sensibilise les cellules au BMP2 pour potentialiser sa voie canonique, nous pouvons imaginer que, basé sur le même principe, l'exposition chronique aux bisphénols est également capable de sensibiliser les cellules à l'œstrogène via cette augmentation de l'expression de ER $\alpha$ 36. Nous pouvons supposer qu'une exposition aux différents bisphénols au cours de la vie de la femme, en conjonction avec BMP2, pourrait entraîner une sensibilisation des cellules de la glande mammaire aux œstrogènes. Au moment des pics de production des œstrogènes endogènes, ces cellules pourraient répondre de façon anormalement élevée aux œstrogènes, via ER $\alpha$ 36, favorisant alors l'effet pro-prolifératif de ces

hormones et donc le risque de cancer du sein. Il a été décrit dans la littérature que ER $\alpha$ 36, après activation par l'E2, active une cascade de signalisation qui passe, entre autres, par la phosphorylation de ERK et sa stabilisation via son interaction avec ER $\alpha$ 36, pour aboutir à l'activation de la cycline D1, et favoriser la prolifération cellulaire (Omarjee et al., 2017). Ainsi, dans le cadre de l'hypothèse précédente, il serait pertinent d'étudier si une exposition chronique aux différents bisphénols, seule ou combinée au BMP2, entraîne une modulation de l'interaction entre ER $\alpha$ 36/P-ERK.

Cependant, un suivi de la prolifération basé sur la mesure du temps de doublement des cellules en culture n'a pas montré d'effet flagrant des traitements, suggérant que l'action pro-proliférative parfois attribuée au BPA n'est pas majeure dans les MCF10A. Il pourrait être informatif de réaliser une étude plus fine de la prolifération cellulaire, par exemple en utilisant des approches de type xCELLigence pour éventuellement mettre en évidence des effets mineurs des traitements sur la prolifération. Le BPA ainsi que ses deux dérivés BPS et BPF sont capables de former des adduits de l'ADN ou de radicaux oxygénés au moment de leur métabolisme conduisant alors à des cassures doubles brins au niveau de l'ADN (Fernandez et al., 2012; Jaeg et al., 2004; Schmidt et al., 2013a). Une association de ces cassures avec une diminution de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose et à une augmentation de ceux impliqués dans la réparation de l'ADN, comme ceci a été démontré après un traitement au BPA, pourrait alors favoriser la survie des cellules présentant des cassures et augmenter la fréquence de mutations pour ainsi conduire à une instabilité génomique, un marqueur reconnu de la tumorigenèse (Fernandez et al., 2012; Hanahan and Weinberg, 2011). Cependant, un suivi de la mortalité basé sur l'exclusion du bleu Trypan n'a pas mis en évidence d'effet des traitements sur la survie cellulaire. Il convient toutefois de noter que les MCF10A en culture de routine ont une mortalité extrêmement réduite qui permettrait difficilement la mise en évidence d'un effet par exemple anti-apoptotique des traitements. Il serait intéressant d'évaluer un éventuel effet protecteur des traitements après induction de l'apoptose par différents stress (oxydatif, dommages à l'ADN...) via des marquages AnnexinV/iodure de propidium.

#### *Interactions entre ER $\alpha$ 36 et les acteurs de la signalisation BMP2*

J'ai recherché une interaction physique entre ER $\alpha$ 36 et SMAD1 basé sur la description dans la littérature d'une interaction entre ER66 et SMAD1 (Yamamoto et al., 2002) ainsi qu'une interaction entre ER $\alpha$ 36 et BMPR1b, basé sur l'importance de ce dernier dans la signalisation de BMP2 dans les MCF10A. J'ai d'abord mis en œuvre une approche de GST pull-down en utilisant une fusion GST- ER $\alpha$ 36 développée dans l'équipe du Dr Muriel Le Romancer et des lysats de MCF10A. J'ai ainsi mis en évidence une interaction *in vitro* ER $\alpha$ 36/SMAD1 ainsi que ER $\alpha$ 36/BMPR1b. Etant donné la grande homologie de séquence entre SMAD1 et SMAD5 et dans une moindre mesure entre SMAD1 et SMAD8, il sera

intéressant de déterminer si l'interaction avec ER $\alpha$ 36 est spécifique de SMAD1 ou partagée par les autres SMAD activées par les récepteurs BMP. Il est intéressant de constater que les interactions ER $\alpha$ 36/BMPR1b et ER $\alpha$ 36/SMAD1 ni ne requièrent ni ne sont modifiées dans cette expérience par un traitement BMP2 préalable à la lyse des cellules ou par la présence d'un ligand d'ER $\alpha$ 36 (E2) lors de l'incubation avec la fusion GST- ER $\alpha$ 36. Cela suggère que le ou les complexes impliquant ER $\alpha$ 36, SMAD1 et BMPR1b sont formés préalablement à toute stimulation exogène par les ligands d'ER $\alpha$ 36 ou de BMPR1b. De plus, il semble qu'une fois phosphorylé, SMAD1 n'interagisse plus avec ER $\alpha$ 36 de façon détectable, dans les limites de la technique employée. Le fait que l'interaction vue en utilisant un anticorps anti-SMAD1 total ne soit pas perdue après stimulation BMP2 suggère qu'une petite fraction seulement de SMAD1 totale est phosphorylée suivant cette stimulation. Il sera intéressant de confirmer cette absence d'interaction entre ER $\alpha$ 36 et SMAD1 phosphorylée *in vitro* en utilisant par exemple une SMAD1 recombinante avec des acides aspartiques (acide aminé phospho-mimétique) en lieu et place des sérines 463 et 465 qui sont phosphorylées en réponse aux BMP. Considérant les limitations inhérentes aux approches *in vitro* telle que les GST-pull-down, j'ai essayé de confirmer les interactions ER $\alpha$ 36/SMAD1 et ER $\alpha$ 36/BMPR1b par d'autres approches. Les co-immunoprécipitations n'ayant pas été concluantes, j'ai mis en œuvre une approche de PLA qui permet de mettre en évidence *in vivo* et *in situ* la proximité (de l'ordre de 40 nm) de deux protéines. Mes résultats suggèrent que l'interaction entre ER $\alpha$ 36 et BMPR1b vue *in vitro* existe aussi *in vivo* dans les MCF10A non traitées. La mise au point du PLA pour le couple SMAD1/ ER $\alpha$ 36 sera une étape importante dans la validation de cette interaction. De plus, l'obtention en cours de MCF10A permettant la répression de BMPR1b (et idéalement de MCF10A n'exprimant pas ou moins d'ER $\alpha$ 36) sera indispensable pour confirmer la réalité de la proximité vue en PLA.

L'utilisation d'une fusion GST- ER $\alpha$ 36 $\Delta$  montre que l'interaction avec SMAD1 et BMPR1b ne requiert pas le court domaine spécifique d'ER $\alpha$ 36 qui n'est pas présent sur ER $\alpha$ 46 et ER $\alpha$ 66. Il est donc envisageable que SMAD1 (comme déjà décrit dans la littérature) et BMPR1b (il restera à le démontrer formellement) puisse interagir avec ER66. Yamamoto et al. ont mis en évidence une interaction entre SMAD1 et ER66 au niveau de son domaine de fixation à l'ADN (DBD domain) (Yamamoto et al., 2002). Or, ce domaine est partagé entre ER $\alpha$ 66 et ER $\alpha$ 36. Ainsi, l'interaction avec ER $\alpha$ 36 pourrait faire intervenir son DBD, au moins pour SMAD1.

De façon surprenante, il semble que la présence de BMP2 ou/et de l'E2 et des trois bisphénols provoquent la perte de la majeure partie de l'interaction ER $\alpha$ 36/BMPR1b observée par PLA. Si confirmée, cette perte de la proximité entre BMPR1b et ER $\alpha$ 36 induite par les traitements permet de proposer quelques hypothèses intéressantes sur les modalités de l'interaction ER $\alpha$ 36/BMPR1b. Le fait que l'interaction ER $\alpha$ 36/BMPR1b est indépendante d'une stimulation BMP2 en GST pull-down mais est perdue en PLA pourrait suggérer que BMPR1b phosphorylé suite à la liaison de BMP2 n'est pas

intrinsèquement incapable d'interagir avec ER $\alpha$ 36 mais que dans le contexte d'une cellule intacte, l'activation de BMPR1b rend l'interaction avec ER $\alpha$ 36 impossible à cause par exemple de l'induction de localisation subcellulaire différentes pour les deux protéines ou du recrutement de partenaires de BMPR1b, comme BMPRII par exemple, qui pourraient induire un encombrement stérique incompatible avec l'interaction d'ER $\alpha$ 36. Toutefois, nous ne connaissons pas la proportion de BMPR1b phosphorylée suite à un traitement BMP2. Des données non publiées du laboratoire montrant que dans les MCF10A, BMPR1b est essentiellement intracellulaire et que seule une minorité est membranaire, je ne peux pas exclure que la persistance de l'interaction BMPR1b après stimulation BMP2 ne soit pas due à des protéines BMPR1b qui n'était pas membranaires et donc non exposées à BMP2. Une analyse protéomique en cours de préparation dans l'équipe qui intégrera les traitements chroniques que j'ai réalisé devrait générer des données informatives dans ce contexte. Par ailleurs, mes données ne permettent pas de déterminer si un tri-complexe ER $\alpha$ 36/SMAD1/BMPR1b existe. Si c'est le cas et si SMAD1 fait le pont entre ER $\alpha$ 36 et SMAD1 en l'absence de BMP2, peut être que la phosphorylation de SMAD1 en présence de BMP2 induit la perte de l'interaction entre SMAD1 et ER $\alpha$ 36 et donc celle entre BMPR1b et ER $\alpha$ 36. La compatibilité de cette hypothèse avec les résultats des GST pull-down dépend là encore de la proportion de SMAD1 phosphorylée en réponse à BMP2.

*En conjonction avec BMP2, le BPS induit des modifications transcriptomiques différentes de celles associées à l'E2 ou au BPA.*

L'analyse des modifications transcriptomiques induites par les différents traitements chroniques des MCF10A à globalement mis en évidence une action très différente du BPS par rapport à l'E2 et au BPA, en particulier en présence de BMP2.

Les modifications transcriptomiques induites par l'E2 et les bisphénols seuls semblent globalement similaires d'un point de vue qualitatif. Si l'on considère l'ensemble des gènes différentiellement exprimés en réponse à au moins l'un de ces traitements, on constate que la grande majorité des gènes se divise en deux groupes. L'un est composé de gènes réprimés et l'autre de gènes activés par l'E2 et les bisphénols. En revanche, si l'E2 et le BPA induisent des modifications transcriptomiques très similaires, le BPS a une action quantitativement différente. Ainsi, les gènes réprimés par l'E2 et le BPA le sont beaucoup plus par le BPS. En revanche, les gènes activés par l'E2 et le BPA se subdivisent en deux groupes, avec d'une part des gènes plus activés par le BPS que par l'E2 ou le BPA et d'autre part des gènes plus activés par l'E2 ou le BPA que par le BPS (Figure 11). D'autres gènes, en nombre beaucoup plus faible, sont activés spécifiquement par les bisphénols ou par l'E2 et le BPA. Ils n'ont pas été étudiés en détails à ce stade précoce de l'analyse mais pourraient compléter la compréhension des effets différentiels de l'E2 et des bisphénols.

Nous avons ensuite analysé l'effet du BMP2 sur les gènes différentiellement exprimés suite aux traitements par l'E2, le BPA ou le BPS. Si l'on considère d'abord les gènes régulés par l'E2 ou le BPA, on constate une réponse au BMP2 essentiellement dominante et antagoniste. En effet, une part importante des gènes régulés par l'E2 ou le BPA sont régulés de façon opposée par BMP2. De plus, la comparaison des conditions BMP2 vs BMP2+E2 et BMP2 vs BMP2+BPA révèle que la présence de BMP2 neutralise globalement les effets de l'E2 ou du BPA (Figure 12A et B). En revanche, lorsque l'on considère les gènes régulés par le BPS, on peut mettre en évidence de nombreux gènes qui ne montrent pas la réponse stéréotypée observée pour l'E2 et le BPA (Figure 12C), avec des gènes dont le niveau d'expression en présence de BMP2+BPS est intermédiaire entre ceux observés en présence de BMP2 ou BPS seul. De plus, BPS et BMP2 peuvent aussi coopérer pour la répression de certains gènes.

L'intégration à ces analyses de l'ensemble des gènes différentiellement exprimés en réponse à au moins un traitement incluant BMP2 montre qu'ils sont pour la grande majorité insensibles à l'E2 ou au BPA. Certains ne sont simplement pas régulés par l'E2 ou le BPA et pour d'autres, la présence de BMP2 annule l'effet de l'E2 ou du BPA. En revanche, de nombreux groupes de gènes ont une réponse au BPS différente de celle à l'E2 et au BPA. Comme observé dans le cas des gènes régulés par le BPS seul, certains gènes présentent une régulation opposée par le BMP2 et le BPS et un niveau d'expression intermédiaire en présence des deux. De plus, de nombreux gènes sont activés de façon additive ou synergique par le BMP2 et le BPS, ce qui n'est jamais le cas pour l'E2 ou le BPA. Cet effet différentiel du BPS par rapport à l'E2 et au BPA est très intéressant dans le contexte du modèle de cellules souches mammaires utilisé qui exprime uniquement l'isoforme ER $\alpha$ 36. Cela suggère que le BPS a des effets qualitativement et quantitativement différents du BPA et de l'E2 sur la signalisation d'ER $\alpha$ 36. Il a été récemment décrit *in vitro* que l'E2, le BPA et le BPS induisent le recrutement de co-activateurs et co-répresseurs différents par ER66 (Li et al., 2018). L'effet différentiel du BPS pourrait par analogie découler de l'induction du recrutement de cofacteurs transcriptionnels différents par ER $\alpha$ 36. ER $\alpha$ 36 est classiquement considéré comme initiant essentiellement une signalisation cytoplasmique puisqu'il est majoritairement extra-nucléaire et dépourvu de domaine d'activation de la transcription. Il a toutefois été montré récemment qu'ER $\alpha$ 36 pouvait se localiser dans le noyau suite à la liaison du tamoxifène et restait capable d'induire directement la transcription (Wang et al., 2018). Il serait donc intéressant d'évaluer la localisation nucléaire d'ER $\alpha$ 36, sa capacité à induire la transcription ainsi que sa liaison à la chromatine en réponse à l'E2, au BPA et au BPS. De plus, considérant d'une part l'interaction possible entre SMAD1 et ER $\alpha$ 36 et d'autre part la coopération entre BMP2 et BPS dans l'activation de nombreux gènes, la recherche de séquences régulatrices co-occupées par ces deux protéines par ChIP-seq pourrait être très informative. Alternativement, les récepteurs aux BMP et ER $\alpha$ 36 initiant tous des cascades de signalisations cytoplasmiques, il est

envisageable que le BPS induise une signalisation *via* ER $\alpha$ 36 différente de celles induites par l'E2 et le BPA. Cette signalisation spécifique du BPS pourrait alors interagir avec celle de BMP2 et conduire aux régulations transcriptionnelles observées en présence de BMP2 et BPS. Il devrait être possible de tester cette possibilité en inventoriant les voies de signalisation activées par les différents traitements, par exemple par des approches de phospho-protéomique.

L'implication postulée jusqu'ici d'ER $\alpha$ 36 dans les effets transcriptionnels induits par l'E2 et les bisphénols repose sur l'observation que notre modèle cellulaire n'exprime de façon détectable que cette isoforme d'ER $\alpha$ . Toutefois, d'autres récepteurs aux œstrogènes qu'ER $\alpha$  existent, comme détaillé dans l'introduction bibliographique. Il sera donc important de mesurer l'expression des récepteurs de la famille ERR, d'ER $\beta$  et de GPER dans les MCF10A. Il est en effet envisageable que les effets différentiels du BPS par rapport à l'E2 et au BPA reposent sur des interactions spécifiques de l'un de ces ligands avec d'autres récepteurs aux œstrogènes qui pourraient avoir des activités transcriptionnelles différentes. Il a ainsi été suggéré que contrairement à l'E2 et au BPA, le BPS n'activait pas ER $\beta$  (Li et al., 2018). L'observation que dans les MCF10A, des gènes cibles connus d'ERR $\alpha$  et ERR $\gamma$  ne montrent pas de régulation concertée par l'E2 et les bisphénols suggère que l'effet de ces derniers ne passe pas par ces membres de la famille ERR. Il restera à étendre ces analyses aux autres récepteurs aux œstrogènes et à vérifier directement leur niveau d'expression dans les MCF10A. Par ailleurs, l'inactivation constitutive ou conditionnelle d'ER $\alpha$ 36 dans les MCF10A permettra de déterminer sans ambiguïtés son rôle dans les réponses observées à l'E2 et aux bisphénols.

Déterminer les fonctions biologiques associées aux gènes régulés par l'E2 et les bisphénols en coopération ou non avec BMP2 (dans le cas du BPS) nécessitera des analyses plus poussées que celles réalisées à ce stade. Toutefois, il est intéressant de constater que l'E2 et les bisphénols activent des gènes impliqués dans la réponse immunitaire, notamment dans la réponse aux interférons, dans la présentation des antigènes par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 et dans la réponse inflammatoire médiée par les neutrophiles. Considérant l'importance de l'échappement au système immunitaire dans le développement tumoral, une étude détaillée des fonctions de ces gènes pourrait identifier un rôle des bisphénols dans cet aspect de la transformation.

Parmi les gènes activés en synergie par BMP2 et BPS (clusters 3 de la figure 13B), certains sont associés à la régulation de TP53 et de ses gènes cibles impliqués dans l'apoptose et il sera intéressant de tester la sensibilité des cellules ayant reçu ce traitement à l'induction de l'apoptose par différents stress. D'autres (cluster 4 de la figure 13B) sont impliqués dans la régulation de l'activité traductionnelle en réponse à différents stress. De plus, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression des gènes codant les protéines ribosomiques cytoplasmiques par l'E2 et le BPS, mais maintenue uniquement par le BPS en présence de BMP2. Enfin, en présence de BMP2 et de BPS, le

ratio EIF4E-BP1/EIF4E (au moins au niveau transcriptionnel) augmente. Dans des conditions normales, EIF4E et EIF4E-BP1 sont respectivement phosphorylés par la kinase Mnk (elle-même activée par la voie ERK) et par la voie mTOR (Siddiqui and Sonenberg, 2015). Dans ce cas, l'interaction d'EIF4E-BP1 avec EIF4E est inhibée et cela permet l'activation de la traduction dépendante de la coiffe, processus dont EIF4E est le facteur limitant. De multiples stress, notamment nutritionnels ou hypoxiques, vont conduire à diminuer la phosphorylation d'EIF4E et EIF4E-BP1, permettre l'interaction EIF4E-BP1/EIF4E et donc inhiber la traduction coiffe-dépendante. Très certainement lié à l'importance déterminante d'EIF4E pour l'initiation de la traduction, EIF4E est un oncogène dont la surexpression est associée à de nombreux cancers (Siddiqui and Sonenberg, 2015; Truitt et al., 2015). De façon contre-intuitive, la surexpression d'EIF4E-BP1 est fréquemment retrouvée dans les cancers du sein et est un facteur de mauvais pronostic (Rutkovsky et al., 2019). Cela pourrait être lié à une activation de la traduction indépendante de la coiffe lorsque la traduction dépendante de la coiffe est inhibée. Parmi les transcrits dont la traduction peut être indépendante de la coiffe on trouve par exemple ceux codant pour le VEGF (Braunstein et al., 2007), qui est impliqué dans la néo-vasculogénèse tumorale et pour c-myc (Stoneley et al., 2000) qui est un oncogène majeur. En conséquence, il est possible que la coopération entre BMP2 et BPS induise des modifications quantitatives et/ou qualitatives des capacités traductionnelles des cellules. Pour tester cette hypothèse, nous allons à court-terme réaliser des analyses protéomiques qui, une fois croisées avec les données transcriptomiques déjà obtenues, nous permettront d'identifier des protéines candidates à une régulation traductionnelle par la combinaison BMP2/BPS.

#### *Dérégulation du micro-environnement en faveurs de la carcinogénèse.*

Les cellules épithéliales ne sont pas les seules à pouvoir être impactées par une exposition aux bisphénols, qui peuvent également agir sur le microenvironnement et induire des dérégulations qui pourraient favoriser le développement tumoral. En effet, comme décrit dans le chapitre 1 de l'introduction, une étroite connexion existe entre les cellules épithéliales, immatures ou différenciées, et les cellules stromales ou les différents éléments matriciels. Les interactions résultantes sont essentielles pour maintenir un bon développement de la glande mammaire mais aussi son intégrité structurale et fonctionnelle. Plusieurs données de la littérature suggèrent que les bisphénols auraient un effet sur le microenvironnement cellulaire. En effet, le BPA et le BPS augmentent l'expression de l'aromatase et favorisent la production d'E2 par les fibroblastes mammaires sains (Williams and Darbre, 2019). Outre cette augmentation de la production d'E2, le BPA et le BPS peuvent aussi augmenter la production de BMP2 par les fibroblastes mammaires sains (Chapellier et al., 2015). Or, le rôle transformant de BMP2 sur les MCF10A, dépendant de BMPR1b et stabilisé par l'IL6 a été

démonstré au laboratoire. En plus des fibroblastes, les adipocytes sont un autre composant du microenvironnement dont le rôle dans les cancers du sein est connu (Chu et al., 2019; Wu et al., 2019). Les adipocytes produisent de nombreuses molécules ayant des actions paracrines sur les cellules épithéliales, pouvant créer un environnement inflammatoire favorisant une augmentation du risque de cancer du sein. Le BPS favoriserait l'inflammation et l'accumulation de lipides en agissant d'une part sur les macrophages, en induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL6 ainsi qu'une réduction de la production de molécules anti-inflammatoires et d'autre part en agissant sur des cellules pré-adipocytaires en induisant leur différenciation (Boucher et al., 2016; Zhao et al., 2017). Outre le BPS, le BPA est également obésogène, notamment via l'activation de PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor gamma) et conduit à la production d'adipocytes hypertrophiques avec une signalisation de l'insuline dérégulée, une utilisation réduite du glucose et une augmentation de la production de cytokine pro-inflammatoire (Ariemma et al., 2016). Des études suggèrent que le nombre d'adipocytes est déterminé durant l'enfance et l'adolescence. Par la suite, l'augmentation du volume des adipocytes entraîne un gain de poids (Arner and Spalding, 2010; Spalding et al., 2008). Ceci suggère donc que l'enfance est une phase critique pour l'adipogénèse dont une bonne régulation des processus à ce moment-là est essentielle. Ainsi, une exposition aux bisphénols durant cette période critique peut entraîner un déséquilibre de l'adipogénèse et par la suite favoriser l'obésité. Il a d'ailleurs été montré qu'une exposition prénatale au BPA conduit à une augmentation du poids et de l'adiposité (García-Arevalo et al., 2014; Rubin and Soto, 2009). De plus, des effets transgénérationnels favorisant l'obésité ont également été rapportés puisqu'une exposition au BPA conduit à une augmentation de la méthylation dans le génome de la 3<sup>ème</sup> génération, associée à un phénotype d'obésité (Manikkam et al., 2013). L'ensemble de ces données suggère donc qu'une exposition prénatale aux bisphénols va conduire à un développement anormal des adipocytes favorisant alors l'obésité, qui comme décrit dans l'introduction est un facteur de risque des cancers du sein. En plus de favoriser l'obésité, les bisphénols peuvent entraîner d'autres maladies et notamment le diabète de type 2, qui peut également résulter de l'obésité (Rancière Fanny et al.; Tudurí et al., 2018). Le diabète est également un facteur de risque de développement des cancers du sein, notamment du fait du facteur mitotique IGF-1, dont la surproduction est connue pour participer à la tumorigénèse mammaire en favorisant entre autres la prolifération cellulaire (Alokail et al., 2009; Eketunde, 2020; Wolf et al., 2005). Outre une dérégulation dans la synthèse des adipocytes, les bisphénols vont également être accumulés dans les adipocytes compte tenu de leur nature lipophile (Nunez et al., 2001; Wang et al., 2015). De ce fait, ils vont pouvoir être libérés en continu tout au long de la vie de la femme. De plus, au moment de la puberté et de la grossesse, de nombreuses hormones vont être libérées pour agir notamment sur les adipocytes du microenvironnement mammaire qui vont libérer des facteurs cruciaux pour le développement de la glande mammaire. Ainsi une dérégulation des adipocytes va potentiellement

modifier la production de ces facteurs et donc déséquilibrer le développement de la glande mammaire pour aboutir à un développement pré-néoplasique ou néoplasique.

L'ensemble de ces observations encourage l'analyse du sécrétome des fibroblastes, des macrophages, des adipocytes ou encore des cellules mésenchymateuses, à la suite d'une exposition chronique aux différents bisphénols. Il serait également intéressant d'étudier l'effet des surnageants ainsi obtenus sur les caractéristiques des MCF10A traitées chroniquement qui ont précédemment été décrites, tels que l'autorenouvellement et la multipotence, leur clonogénicité, la potentialisation de la voie initiée par BMP2 et la transformation. Outre un effet potentiel des bisphénols sur la sécrétion de divers facteurs par les cellules du microenvironnement, il serait également pertinent de caractériser directement ces cellules puisqu'il est déjà connu qu'au cours de la tumorigenèse, certaines cellules du microenvironnement se modifient et favorisent la transformation. C'est le cas par exemple des cellules appelées « cancer-associated fibroblasts » (CAF) (Sahai et al., 2020)

#### *Implication dans les rechutes et les résistances.*

Outre leurs effets dans l'initiation tumorale, de nombreuses études ont également mis en évidence le rôle des bisphénols dans les étapes plus tardives de la carcinogenèse, notamment dans les processus de dissémination métastatique ou d'invasion (Castillo Sanchez et al., 2016; Deng et al., 2018; Huang et al., 2019; Kim et al., 2017; Lillo et al., 2017; Zhang et al., 2015). J'ai montré que les interactions ER $\alpha$ 36/SMAD1 et ER $\alpha$ 36/BMPR1b sont conservées après la transformation des MCF10A par l'exposition chronique à BMP2/IL6 (lignées MC26 et M1B26). Si ces interactions sont retrouvées dans d'autres lignées ou cellules primaires mammaires transformées, notamment si elles sont considérées ER négative sur la base de l'absence d'expression d'ER66, l'étude des conséquences de ces interactions sur les signalisations ER et BMP pourrait ouvrir de nouvelles perspectives sur les effets des BMP, de l'E2 et des bisphénols lors de la progression tumorale, la dissémination métastatique ou la réponse aux traitements. Ainsi, une étude plus poussée de l'effet de ces polluants, seuls ou en combinaison avec BMP2, sur la migration et l'agressivité pourrait être intéressante à réaliser, à l'aide de tests de « scratch assay » ou de chambre de Boyden.

Dans le laboratoire, un système en 3 dimensions basé sur la co-culture de cellules souches mésenchymateuses et de cellules hématopoïétiques sur un substrat de phosphate de calcium et mimant la niche hématopoïétique médullaire, est en cours de mise au point. Une fois ce modèle validé, il serait intéressant d'y ajouter les cellules exposées chroniquement afin d'étudier leur capacité à remanier la matrice pour y migrer et s'y développer, mimant ainsi le processus de mise en place des métastases osseuses qui peuvent être retrouvées dans le cas des cancers du sein. Ceci permettrait de

compléter l'étude des effets d'une exposition chronique aux bisphénols sur l'invasion et le développement de métastases mais dans un modèle plus physiologique.

Au cours du diagnostic des cancers du sein, l'un des facteurs étudiés pour déterminer le sous-type et donc la ligne de traitement à suivre par la suite est l'expression du récepteur alpha de l'œstrogène, et plus particulièrement sa forme classique, ER $\alpha$ 66. Or ER $\alpha$ 36 peut être présent aussi bien dans les tumeurs dites ER positives que ER négatives (Lee et al., 2008b; Wang and Yin, 2015). Cette observation est cruciale puisque l'un des traitements utilisés dans le cas des cancers ER+ est le tamoxifène pour son action antagoniste sur ER66 dans la glande mammaire, bien qu'il montre un effet agoniste sur ER $\alpha$ 36 (Shi et al., 2009; Wang et al., 2018, 2006). Ainsi, une utilisation de tamoxifène chez des patientes exprimant ER $\alpha$ 36 pourrait avoir un effet délétère, comme par exemple une augmentation de l'agressivité de la tumeurs, liés à un développement de métastases ou des résistances aux traitements, puisque ER $\alpha$ 36 a été décrit pour être associé à un taux de survie plus faible, à des résistances, à une augmentation de l'expression de facteurs métastatiques ou encore une implication dans la survie des cellules souches cancéreuses (Chaudhri et al., 2012; Deng et al., 2014; Shi et al., 2009; Su et al., 2014; Wang et al., 2018; Yin et al., 2014, 2015; Zhu et al., 2018). Ainsi, une caractérisation du statut ER $\alpha$ 36 de la tumeur pourrait modifier le choix du traitement et améliorer ainsi son efficacité. Par ailleurs, l'équipe a démontré que BMP2 joue un rôle important dans l'émergence des tumeurs lumineales et donc une quantification de sa concentration dans le microenvironnement mammaire pourrait également être un atout pour la prise en charge thérapeutique. De plus, considérant l'interaction entre la signalisation BMP2 et celle des bisphénols, potentiellement via ER $\alpha$ 36, il serait intéressant d'évaluer si une expression de ER $\alpha$ 36 associée à une production élevée de BMP2 modifie le risque de transformation mammaire, son développement ou encore la réponse au tamoxifène.

### Evolution de la réflexion sur la législation des bisphénols.

Le BPA a été remplacé dans un certain nombre d'objets du quotidien, notamment les contenants alimentaires ou les tickets de caisse du fait de la publication d'un grand nombre d'études l'incriminant dans le développement de tumeurs mammaires conséquemment à son effet de perturbateur endocrinien. L'utilisation des molécules remplaçant le BPA, comme le BPS et le BPF est justifiée par le fait qu'ils présentent une très faible affinité pour ER66 comparé à l'œstrogène et au BPA. Cependant, l'innocuité de ces molécules est remise en question par de nombreuses publications démontrant des effets du BPS et du BPF similaires à ceux du BPA et de l'œstrogène, aussi bien sur les cellules épithéliales que sur le microenvironnement cellulaire. J'ai moi-même démontré que dans notre modèle de cellules souches mammaires humaines ER $\alpha$ 66/ER $\alpha$ 36<sup>+</sup> le BPS induisait des

modifications transcriptomiques très différentes de celles induites par l'E2 ou le BPA, en particulier en conjonction avec la signalisation BMP2. Cette observation illustre bien la nécessité d'utiliser, en plus des modèles animaux, des modèles cellulaires pertinent lors de l'étude des effets des polluants en général et des bisphénols en particulier. Les MCF10A permettent d'étudier les effets des bisphénols dans un modèle non transformé de cellules souches mammaire exprimant l'isoforme d'ER $\alpha$  normalement retrouvée dans ce type cellulaire. Considérant que la majeure partie des études ayant initialement décrit que le BPS n'avait pas d'activité œstrogène-mimétique étaient basées sur des modèles exprimant ER66, parfois de façon exogène, il paraît rétrospectivement inévitable qu'elles aient échoué à mettre en évidence ses effets.

L'une des problématiques majeures liées aux bisphénols ou aux polluants environnementaux en général est le fait que ces molécules sont retrouvées dans notre environnement à très faibles doses. Par ailleurs, ces bisphénols sont des composés lipophiles qui en font des molécules propices à être stockées et s'accumuler dans le tissu adipeux de notre organisme ou dans les graisses de différentes espèces animales qui vont se retrouver dans la chaîne alimentaire (Ohore and Zhang, 2019). Tout ceci rend donc toute quantification extrêmement compliquée. Outre cette difficulté à mesurer notre exposition, il s'avère que nous ne sommes pas exposés seulement à une molécule mais à un cocktail de molécules, qui peuvent coopérer entre elles pour induire des effets délétères sur la santé humaine, mais extrêmement ardues à étudier en laboratoire. Dans ce contexte, nous avons initié une collaboration, avec le groupe du Dr Alba Hernández de l'Université Autonome de Barcelone en Biosciences, basée sur mes travaux pour évaluer l'effet des nanoparticules de plastiques en conjonction avec les bisphénols et BMP2. En effet, les nanoparticules de plastiques sont en augmentation constante dans notre environnement, leur petite taille les rend très facilement internalisables par les cellules et même quand les bisphénols n'entrent pas dans leur composition elles peuvent favoriser leur absorption par les cellules. Outre une exposition multiple et à de faibles doses, nous sommes également exposés à ces molécules tout au long de notre vie, et ceci dès le stade embryonnaire. L'ensemble de ces facteurs rendent l'étude de ces molécules très compliquées mais essentielles puisqu'elles agissent à long terme et à travers de multiples effets, confortant la nécessité de la réflexion sur les études de toxicité mise en place et leur réglementation.

Bisphénols

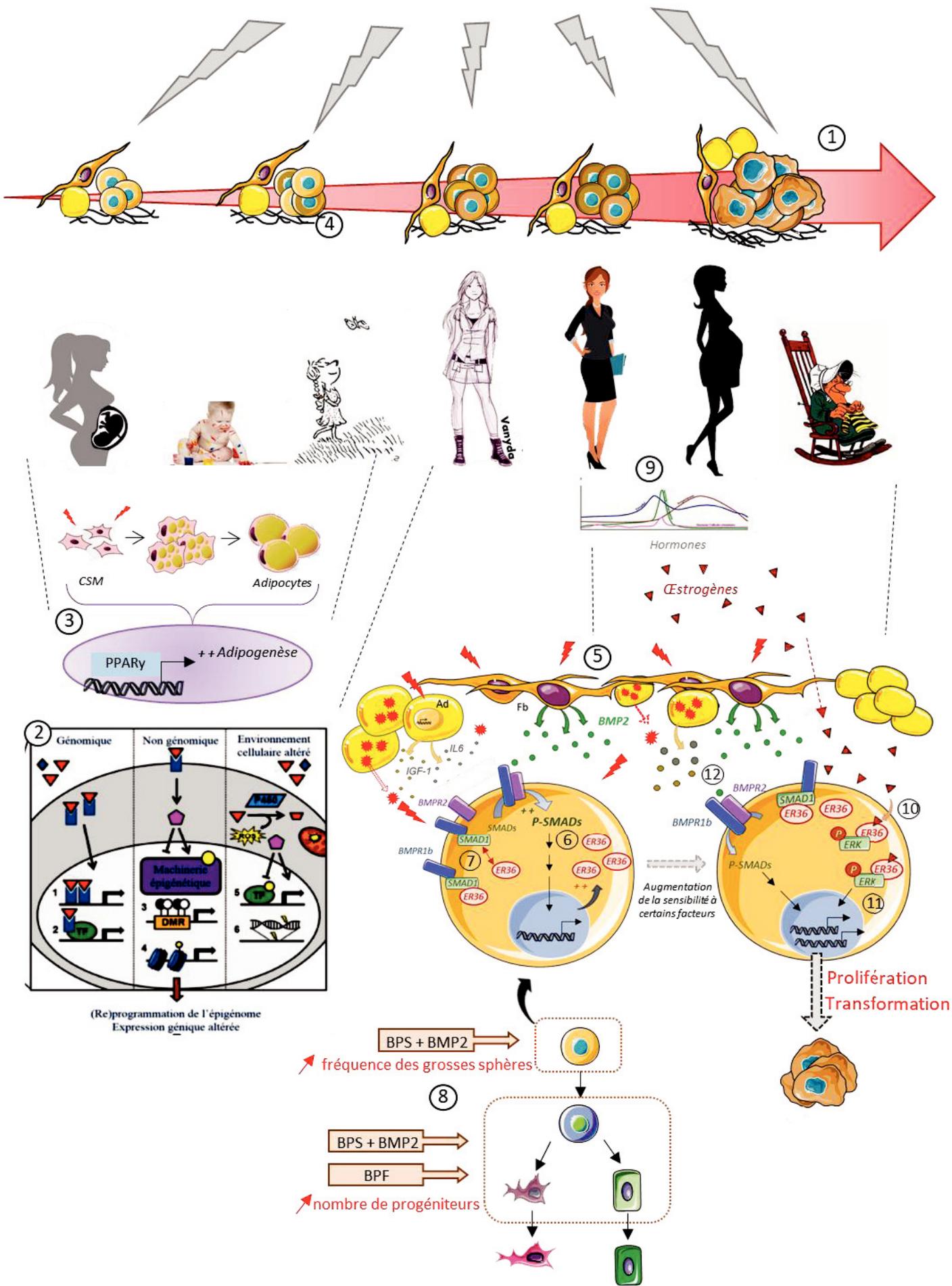


Figure n°48: Hypothèses d'implication des bisphénols dans le développement de tumeurs mammaires.

L'exposition aux bisphénols se fait tout au long de la vie, dès le stade embryonnaire, aussi bien par une contamination extérieure que suite à leur stockage et à leur libération par le tissu adipeux, pouvant conduire à un développement tumoral (1). Une exposition prénatale, via la mère, et durant l'enfance peut entraîner des modifications génétiques et/ou épigénétiques (2) (Jorgensen et al., 2016; Schug et al., 2011; Wolstenholme et al., 2012; Xin et al., 2015), que ce soit dans les cellules épithéliales ou dans celles du microenvironnement, entraînant alors des dérégulations comme dans l'adipogenèse, dont un exemple est illustré en (3) (González-Casanova et al., 2020; Hoepner L. A. et al., 2019). Les conséquences de ces dérégulations peuvent se retranscrire à l'âge adulte, sur la physiologie des organes, dont la glande mammaire et ces cellules souches. Toujours sous l'action des bisphénols, d'autres dérégulations peuvent survenir après l'enfance. Cet ensemble de dérégulations pourrait induire un état pré-transformé (4) des cellules épithéliales mammaires en augmentant la production de facteurs transformant ou en sensibilisant les cellules épithéliales à ces facteurs. Par exemple via une augmentation de la production d'IL6, de BMP2, d'IGF et d'E2 par les cellules stromales (5) (Chapellier et al., 2015, Williams and Darbre, 2019) et/ou une augmentation de l'expression d'ER36 et une potentialisation de la voie canonique de BMP2 dans les cellules souches épithéliales mammaires (6). Ces deux effets sur les cellules épithéliales pourraient passer par une perte de l'interaction entre ER36 et BMPR1b suite à la fixation de leurs ligands. En effet, la fixation d'un ou de deux ligands pourrait conduire à un encombrement stérique, conduisant à la dissociation du complexe BMPR1b/SMAD1 et ER36, libérant alors les SMADs pour leur activation (7). L'augmentation de la clonogenité de cellules de type souche avec potentiellement un phénotype plus immature, ainsi qu'une augmentation du nombre de progéniteurs (8), pourraient être des conséquences de cette perte d'interaction, d'augmentation de ER36 et/ou de la potentialisation de la voie BMP.

A long terme, l'augmentation de ER36 pourrait entraîner une sensibilité accrue des cellules à l'E2 ou aux E2-mimétiques, tels que les bisphénols. Ainsi, au moment des pics de production des œstrogènes endogènes (9), lors des périodes de puberté et de grossesse par exemple, ou à la suite d'un dérèglement de sa production, à cause de déséquilibres du microenvironnement induit par les bisphénols, ces cellules pourraient amplifier la réponse induite par les œstrogènes (10). Cette réponse pourrait être médiée par ER36, via son interaction avec P-ERK pour favoriser alors l'effet pro-prolifératif de ces hormones et donc le risque de cancer du sein (11) (Omarjee et al., 2017). En plus de l'induction de la prolifération, une transformation médiée par l'axe BMP2/BMPR1b, et stabilisée par un environnement inflammatoire peut s'initier et conduire alors à une tumeur mammaire (12) (Chapellier et al., 2015).

---

---

---

---

# ANNEXE

---

---

---

---

---



## Review

# Early Steps of Mammary Stem Cell Transformation by Exogenous Signals; Effects of Bisphenol Endocrine Disrupting Chemicals and Bone Morphogenetic Proteins

Nora Jung <sup>1,2,3,4,5</sup>, Veronique Maguer-Satta <sup>1,2,3,4,5,\*</sup>  and Boris Guyot <sup>1,2,3,4,5,\*</sup>

CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France; nora.jung@lyon.unicancer.fr

<sup>2</sup> Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

<sup>3</sup> Université de Lyon, F-69000 Lyon, France

<sup>4</sup> Department of Tumor Escape Signaling, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

<sup>5</sup> Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France

\*Correspondence: veronique.maguer-satta@lyon.unicancer.fr (V.M.-S.); boris.guyot@lyon.unicancer.fr (B.G)

Received: 20 June 2019; Accepted: 10 September 2019; Published: 12 September 2019

**Abstract:** Estrogens are major regulators of the mammary gland development, notably during puberty, via estrogen receptor (ER) activation, leading to the proliferation and differentiation of mammary cells. In addition to estrogens, the bone morphogenetic proteins (BMPs) family is involved in breast stem cell/progenitor commitment. However, these two pathways that synergistically contribute to the biology of the normal mammary gland have also been described to initiate and/or promote breast cancer development. In addition to intrinsic events, lifestyle habits and exposure to environmental cues are key risk factors for cancer in general, and especially for breast cancer. In the latter case, bisphenol A (BPA), an estrogen-mimetic compound, is a critical pollutant both in terms of the quantities released in our environment and of its known and speculated effects on mammary gland biology. In this review, we summarize the current knowledge on the actions of BMPs and estrogens in both normal mammary gland development and breast cancer initiation, dissemination, and resistance to treatment, focusing on the dysregulations of these processes by BPA but also by other bisphenols, including BPS and BPF, initially considered as safer alternatives to BPA.

**Keywords:** bone morphogenetic protein (BMP); epithelial stem cells; breast cancer; bisphenol; estrogens; microenvironment

## 1. Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women and exhibits important phenotypic and genetic diversities associated with different prognostics. Breast cancers are clinically classified based on histological appearance and expression of hormone receptors such as estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors, as well as on the amplification of the Her2 gene coding for a member

of the EGF receptor family [1]. Based on these criteria, four major breast cancer subtypes have been defined: Luminal A and luminal B (all ER+), HER+ (that can be either ER- or ER+), and basal-like, triple negative (as such ER-) tumors [2,3]. The ER status in breast tumors is determined by immunohistochemistry detection of the nuclear expression of the classical 66 kDa isoform of ER $\alpha$  (ER $\alpha$ 66). In ER-positive tumors, preventing ER activation is an efficient therapy. This can be achieved either by using competitive antagonists of estrogens (e.g., Tamoxifen), preventing its binding to and subsequent activation of ER, by using drugs blocking estrogen synthesis (anti-aromatase) in post-menopausal women, or by luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) analogs, inhibiting female hormones release by the ovaries [4].

Based on epidemiological studies, different factors increasing the risk of breast cancer development have been highlighted. These factors can be intrinsic, such as mutations in Brca1 or 2, Tp53 or ATM, or extrinsic, e.g., related to the environment or lifestyle [5,6]. While different genetic alterations appear progressively following different oncogenic signals, hereditary mutations in breast cancer-predisposing genes likely account for approximately 10% of breast cancers [7,8]. In breast cancer with a genetic origin, the most commonly mutated genes are Brca1 and Brca2 [7]. BRCA1 and 2 are two major regulators of DNA double-strand break (DSB) repair through homologous recombination (HR) and play a crucial role as tumor suppressor genes, likely by preventing mutations and genome instability [9]. Breast cancer is a multifactorial disease and evidence for the involvement of extrinsic factors in breast cancer risk has been described. Indeed, a lack of physical activity, tobacco or alcohol consumption and contraceptive pills or hormone replacement therapy for post-menopausal women were shown to increase breast cancer risk [10]. As mentioned previously, estrogens are involved in the proliferation of normal mammary cells but also of breast tumor cells through ER stimulation, leading to the activation of several pathways involved in cell proliferation and resistance to apoptosis [11,12]. Hormonal status has been described to play a major role in breast cancer risk, as a premature or extensive exposure to endogenous estrogens (due to an early menarche, nulliparity, late age for first full-term pregnancy or a late menopause) increases the risk of breast cancer [13].

The mammary gland is not only exposed to endogenous hormones but also to endocrine-disrupting chemicals (EDCs), molecules present in the environment able to mimic these hormones. The interest in EDCs is growing rapidly, owing notably to their extensive use in manufactured goods and their release in our environment. Several EDCs involved in breast cancer risk have been identified, including organochlorine pesticides like DDT or DDE, dioxins or polychlorinated biphenyls. In addition, the bisphenol A (BPA) EDC has raised increasing concerns during the past few years due to its widespread presence in our environment [14,15]. BPA is an aromatic compound used by the plastic industry as a monomer in the synthesis of polycarbonates and epoxy resins. Polycarbonates are found in consumer plastic-like water bottles, sport equipment or toys. Epoxy resins are used to coat the inside of food or beverage containers. BPA can also be found in thermal paper. BPA monomers from these compounds can be released into the environment by hydrolysis. Despite rising concerns about its safety [16] and progressive restrictions on its use, several million tons of BPA are still produced worldwide. Due to its estrogen-mimetic properties allowing ER activation [17,18], the role of BPA in breast cancer is of particular interest. Importantly, tumor development is a long and complex process, which includes several steps following transformation initiation by genetic and epigenetic modifications in normal cells. It is thus highly probable that mutations or abnormalities accumulate in a given epithelial cell, ultimately leading to its transformation. This process is accompanied by morphological changes and modifications of key cellular functions (proliferation, survival, and differentiation) until advanced stages of cancer initiation, following which altered cells expand and completely invade the lumen. In this context, these events will preferentially take place in a long-lasting cell of the mammary gland. Indeed, previous data suggest that target cells of the transformation process could be mammary epithelial stem-like cells as documented in the case of the claudin-low breast cancer subtype [19]. In that context, studying the role of BPA on mammary stem cell biology appears to be highly pertinent.

## 2. The Role of Estrogens in Mammary Gland Development and Homeostasis

### 2.1. Production and Function in Early Mammary Gland Development

The mammary gland begins its development during embryogenesis and is composed of a rudimentary ductal system blocked until puberty. Then, two master reproductive hormones are secreted, namely, estrogens and progesterone. Estrogens control the growth of ducts from their distal extremity called terminal end buds (TEBs) [20–22], while progesterone is involved in lateral branch development [23,24].

One of the major hormones involved in mammary gland development is estrogen, mostly produced by the ovaries but also by other tissues including breast, adipose tissue, liver, pancreas, bone, skin, brain, and placenta. Estrone (E1), estradiol (E2), estriol (E3) and estetrol (E4, only produced by the foetus but passing in the mother's blood) are the four major endogenous estrogens in women. Depending on the life stage of women, these various types of estrogens are differentially expressed, with a predominance for estriol and estetrol during pregnancy, for estrone during menopause, and for estradiol in non-pregnant women between menarche and menopause [25]. Even though a non-aromatase pathway exists [26], the major estradiol biosynthesis pathway involves aromatase enzymes, catalyzing the conversion of androstenedione to estrone that is then converted to estradiol or catalyzing the direct conversion of testosterone into estradiol [27].

The effects of estrogens appear at the time of breast development following the establishment of the hypothalamo–hypophyseal axis. During puberty, the hypothalamus releases gonadotropin-releasing hormone (GRH), leading to the secretion of several hormones by the pituitary gland, such as gonadotropins, follicle-stimulating hormone (FSH), and growth hormone (GH) [28]. These hormones drive estrogen production by the ovaries. In addition, it has been shown in the rat mammary gland that GH can directly increase estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) expression in breast stromal cells that surround mammary epithelial cells [29]. Altogether, estrogens, in combination with other hormones, orchestrate the growth of the ductal system and adipose tissue accumulation during puberty [20–22].

### 2.2. Importance in the Adult Mammary Gland

The adult mammary gland is formed of ducts and lobules of secreting luminal epithelial cells surrounded by contractile myoepithelial cells. These epithelial cells are embedded in a stroma mainly formed of fibroblasts and adipocytes that secrete several soluble molecules regulating epithelial cell functions and differentiation. Epithelial cells of the mammary gland are generated by mammary stem cells, while the stromal compartment arises from mesenchymal stem cells. During adulthood, the mammary gland undergoes functional and structural changes that alternate between phases of proliferation, differentiation and apoptosis. This is controlled by cyclic hormonal variation due to the estrous/menstrual cycle. However, this post-pubertal mammary tree is still immature and only achieves full maturation during pregnancy and lactation. These final steps encompass alveogenesis and milk production, which take place mostly under the control of progesterone and prolactin [30,31]. Mallepell et al. suggested that estrogens do not directly stimulate proliferation of the ER-positive luminal cells but act via a paracrine process [11,32]. Indeed, ER-positive and proliferative cells were shown to be distinct [33,34]. Estrogens act on luminal ER/PR-positive cells, leading to the cleavage and liberation of amphiregulin [35,36], which affects neighboring ER/PR-negative cells. In addition, these ER/PR-negative cells have characteristics of stem cells (SCs), in which asymmetric division is controlled by growth factors like amphiregulin released by stromal cells [37–40]. Moreover, when mice are ovariectomized or treated with letrozole (to inhibit endogenous estrogen biosynthesis and provide a normal stromal and hormonal environment for all other hormones), a decrease in the absolute number of repopulating cells and in ductal growth and expansion was reported in the fat pads following

transplantation of a limited number of mammary stem cells (MaSCs) [41]. In this setting, an increase in the percentage of MaSCs-enriched cells in the G0/G1 phases, a decrease in the Ccnd1 and Ccnd2 level in MaSCs-enriched population, and a decrease in the size of the luminal cell population were also observed. However, estrogen depletion does not directly impact the size of the MaSCs-enriched subpopulation [41].

These data support the hypothesis that ductal elongation controlled by estrogens is dependent on the presence of luminal ER/PR-positive cells which act as estrogens sensors and release in response factors resulting in ER/PR-negative stem cell division. This highlights the importance of the estrogen pathway on MaSC regulation and their potential resultant sensitivity to estrogen-mimetics like BPA.

### 2.3. Effects of EDCs with Estrogenic Activity

Some chemical pollutants have been classified as EDCs based on the following definition: “*an exogenous chemical, or mixture of chemicals, that interferes with any aspect of hormone action*” [15,42]. Estrogens are one of the main hormones altered by EDCs. Perturbations of estrogen functions have been reported in a wide spectrum of pathologies, including metabolic, bone, and reproductive disorders as well as breast, endometrial or ovarian cancers [16].

At the cellular level, stem cells are a unique category of cells active from embryogenesis up to late stages of human adult life. Stem cells are fundamental in the development of all organs, in tissue homeostasis and in diseases. Their unique properties, such as an extended life and low cycling features, make these cells privileged targets of long-term exposure to numerous factors and alterations. As important actors of organ integrity, tissue homeostasis and repair, stem cells are likely involved at one step or another in dysregulations of physiological processes that can occur at any stage of life.

Normal stem cells functions are thus likely to be affected upon exposure to EDCs [43–47]. It has been shown that this exposure occurs throughout life and even during embryogenesis, at the moment of mammary gland establishment. For instance, bisphenol A (BPA) has been detected in urinary samples but also in maternal and fetal plasma, in colostrum and in placental tissue at birth [48]. Several studies have demonstrated that a prenatal exposure to BPA induces changes in fetal mouse mammary glands, in the epithelial compartment as well as the stromal compartment, favoring the fat pad maturation and increasing the mammary gland susceptibility to oncogenes [49–51]. Wadia et al. have described transcriptome modifications, notably an increased expression of genes involved in apoptosis prevention, myoepithelial differentiation or adipogenesis and a decreased expression of those involved in cell adhesion [51]. These data highlight an impact on mammary gland development by EDCs, such as BPA.

## 3. Mammary Gland Regulation by the BMP Pathway

One of the major conserved signaling pathways involved in stem cell regulation from embryogenesis up to adult stages is the bone morphogenetic protein (BMP) signaling. There are 21 different soluble BMP molecules that act through serine/threonine kinase BMP receptors (BMPR). In the context of SC regulation, BMP2 and BMP4 progressively emerge as the most important BMPs. Likely through its involvement in SC regulation, the BMP pathway is involved in numerous physiological and pathological processes [52], particularly in tissue regulation. Indeed, BMPs were first described as regulators of skeletal development, and are actually found in the microenvironment of several tissues where they contribute to tissue morphogenesis and homeostasis, such as the mammary gland. It is well known that members of the TGF $\beta$  family, which includes BMPs, are involved in different aspects of female reproduction [53–56]. BMPs were initially identified as key regulators of bone morphogenesis through

their function in mesenchymal stem cells (MSCs) regulation, such as lineage specification of adipocytes that are one of the major elements of the mammary gland microenvironment [57–59]. Alterations in BMP signaling have been implicated in metabolic disorders such as obesity in women [60,61]. Altogether, it indicates a major importance of BMP signaling in the regulation of different aspects of the mammary gland biology.

### 3.1. Role of BMPs in Mammary Gland Development

The BMP signaling pathway is a dynamic and complex pathway, leading to the transduction of various signals depending on the nature of the BMP ligand and of the BMPR complex oligomerization induced (for review: [62,63]). It has been reported that BMPs may interact with their receptors in two different ways [64,65]: On the one hand, BMPs induce a BMPR complex formation called BISC (BMP-induced signaling complex) and on the other hand, a preformed BMPR complex is present before BMPs fixation, known as PFC (pre-formed complex). These two different modes of BMP signal initiation lead to two different signaling cascades, namely, the canonical SMAD-dependent pathway and the non-canonical SMAD-independent pathway [65]. The SMAD-dependent pathway includes the recruitment of SMAD1-5-8 proteins, leading to their phosphorylation by type 1 BMPR. SMAD-phosphorylated proteins then form a complex with SMAD4, leading to its translocation to the nucleus where it acts as a transcription factor on target genes [62,66]. The SMAD-independent pathway does not simply encompass one signaling pathway but a multitude of downstream cascades, involving p38, Ras/ERK and PI3K/AKT [67–70]. BMPs are involved in the different steps of the mammary gland development. During embryogenesis in mice, BMP4 was shown to participate in the early steps of mammary gland development by regulating the dorso–ventral axis establishment [71]. The BMP pathway also plays a role in mammary bud formation and outgrowth, as well as in ductal branching morphogenesis initiation. Hens et al. showed that BMP4 is expressed in both mesenchymal and epithelial cells of the mammary bud and that the use of a BMP4 inhibitor leads to a decrease in bud outgrowth [72]. Ductal elongation and secondary branching development are induced among others by the progesterone receptor type A (PR-A) [73] via increasing *Msx2* expression [74]. A link between BMPs and PR-A involved in branching morphogenesis during postnatal mammary gland development has been reported [75]. In addition, BMPs are also involved in the myoepithelial compartmentalization and lumen formation [76]. Finally, an *in vitro* study using sorted undifferentiated mouse mammary epithelial cells demonstrated the importance of the BMP pathway in driving lactogenic differentiation [77].

All of these data demonstrate that BMP signaling constitutes an important regulator of the mammary gland during embryogenesis but most likely also during adulthood.

### 3.2. BMPs Are Key Embryonic Factors for Adult Tissue Modeling

In healthy tissues, epithelial cells, as well as cells of the mammary gland environment (fibroblasts, adipose tissue cells, hematopoietic cells), contribute to the production of soluble BMP2 and BMP4 molecules [78]. These two cytokines regulate normal mammary epithelial cell functions. Indeed, SCs and progenitors sorted according to their CD10 and EPCAM expressions [79] were shown to express the different elements of the BMP pathway, indicating that in a physiological context, BMP molecules likely play a role in the regulation of breast SC. This was formally demonstrated by functional assay following exposure of different human cell types to soluble BMP2 or BMP4 [78] and further substantiated by the use of TGF/BMP inhibitors allowing the expansion of immature epithelial basal cells [80]. Interestingly, as shown in the hematopoietic system [81], BMP2 and BMP4 molecules have distinct effects on mammary SC regulation. Indeed, while BMP4 modulates MaSC and myoepithelial progenitors, BMP2 controls the commitment and proliferation of luminal progenitors [78]. This is consistent with results reported in the context of mammary gland development in mice showing that

BMP2 was involved in the *in vivo* regulation of the luminal lineage [76]. Importantly, these results established that despite their close similarity, BMP2 and BMP4 exert different functions on the human mammary gland.

## 4. Early Events of Breast Carcinogenesis

### 4.1. BMP Signaling and Breast Cancer Initiation

BMP signaling is also a well-known pathway that orchestrates the development and homeostasis of adult tissues such as the neural system [82] and is involved in the protection against neurotoxic compounds [83–85]. Studies on BMP signaling dysregulations in the neural system have been remarkably pioneering in the identification of their importance in cancer SC phenotype in glioblastoma [86,87]. Modulations of BMP signaling by epigenetic mechanisms such as methylation of BMP-receptor promoters have been of particular clinical interest to further stratify patients and propose new therapeutic strategies [86]. Since then, the importance of the BMP signaling alterations in cancer SC features has been extended to breast cancer and leukemia [78,88]. Indeed, our group unveiled that the microenvironment of human primary luminal breast tumors produces abnormally high amounts of soluble BMP2 compared to healthy tissue. This higher level is associated with BMPR1B overexpression by the tumor cells. These two observations argued in favor of a potential over-activation of the BMP pathway in the luminal tumor cells. To test this hypothesis, a model of mammary SCs (the MCF10A human, non-transformed epithelial SC cell line) was chronically exposed to high BMP2 concentrations. This drove MCF10A transformation towards a luminal tumor phenotype. Interestingly, addition of the IL6 pro-inflammatory cytokine further stabilized the transformed phenotype. The luminal phenotype of the tumors derives at least in part from a BMPR1B-initiated signaling cascade involved in luminal commitment of human mammary SCs in the normal context and leading to a FOXA1/FOXC1 transcription factor balance switch in favor of FOXA1, simultaneously with an up-regulation of GATA3 [78].

Surprisingly, BMP2-mediated luminal transformation of MCF10A is accompanied by a strong activation of the estrogen signaling pathway despite the absence of ER $\alpha$ 66 in those cells. Our understanding of estrogen signaling is hindered by the existence of several isoforms generated by alternative splicing and different promoter usage [89]. These isoforms can be expressed in both ER $\alpha$ 66-positive and -negative cells and display different sub-cellular localizations [90,91]. For example, unlike ER $\alpha$ 66, ER $\alpha$ 36 is expressed mainly at the plasma membrane and activates estrogen non-genomic signaling by activating the ERK pathway through an interplay with the MKP3 phosphatase [92]. Interestingly, in the context of EDC research, ER $\alpha$ 36 displays altered ligand preference and causes distinct effects compared to ER $\alpha$ 66. For instance, the tamoxifen drug used as an estrogen antagonist in ER $\alpha$ 66 breast cancers behaves as an estrogen agonist for ER $\alpha$ 36 [93,94]. The importance of these different ER $\alpha$  isoforms in mammary epithelial SC features and in the context of breast cancer has been confirmed by a recent study [94].

In addition, BMP signaling has also been directly implicated in thyroid-lineage specification [95,96] as well as in thyroid carcinoma [97]. Of note, thyroid hormone status interferes with estrogen target gene expression in breast cancer samples in menopausal women [98]. This highlights shared interests in further investigating the importance of the BMP pathway for both thyroid and estrogen signaling in the context of exposure to EDCs. Altogether, these different examples illustrate how BMP signaling, by controlling stem cells, is at the interface of a number of fundamental physiological processes in humans and is directly involved in mammary stem cell transformation.

## 4.2. Involvement of Bisphenols in Breast Carcinogenesis

During development and organogenesis, tissue differentiation is tightly regulated by a series of precisely timed molecular and cellular events. It is now widely accepted that adverse environmental exposure during these processes might have significant life-long implications [99–101]. Some of the first steps of carcinogenesis are an increase in proliferation, apoptosis inhibition, and activation of survival signaling pathways. To do this, several tumor suppressor genes, like p53 or Brca1 for instance, need to be inactivated by different mechanisms including epigenetic changes.

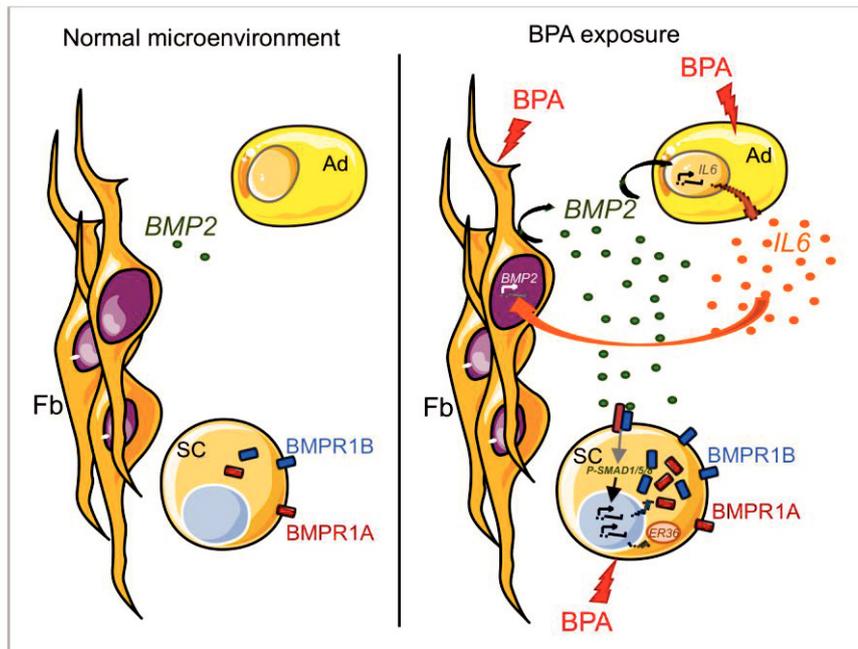
Evidence gathered from studies in experimental models and human populations have already confirmed that EDCs, including BPA, contribute to increased disease risk [102,103]. Given the significant involvement of estrogens in both normal and pathological conditions, EDCs able to interfere with the homeostasis of the estrogen endocrine system are a potential source of several health disorders. A positive relationship between BPA exposure and cancer development is reported in the literature [104]. Although there are growing evidence that exposure to BPA may be harmful for human health, understanding of the molecular mechanisms underlying BPA-dependent effects in cancer development is still limited. Of note, one study reported that exposure of normal human mammary epithelial cells to BPA induces proliferation and senescence [105]. In contrast to non-exposed cells, these BPA-treated cells generate bigger mammospheres and are able to maintain their proliferation for a longer period of time due to autocrine growth factor secretion. The authors also observed an increase in DNA hypermethylation of tumor suppressor genes, such as Brca1. All these data support that BPA can promote early pre-tumoral stages as also shown in studies performed on normal human breast epithelial cells (MCF-10F) [106]. When mice were treated at puberty with BPA (added in their drinking water to mimic typical exposure in humans), estrogen-dependent transcriptional events were perturbed in their offspring and the number of terminal end buds was altered in a dose-dependent fashion [107]. Moreover, pubertal BPA exposure altered the function of MaSCs, leading to the appearance in the regenerated glands of early neoplastic lesions with molecular alterations similar to the ones detected in early neoplastic breast cancer tissues [108]. In addition, BPA-treated human mammary stem cell lines, such as MCF-10F cells, upregulate their expression of genes involved in DNA repair and downregulate pro-apoptotic gene expression [109]. Altogether, these observations strongly support that MaSCs are directly susceptible to BPA-induced transformation [107–109].

Mechanistically, estrogens and estrogen-mimetics like BPA were mainly thought to act through the canonical ER $\alpha$ 66 receptor, a nuclear receptor that can initiate signaling pathways at the cell membrane and transcriptional responses in the nucleus. It was shown that BPA was capable of up-regulating the protein levels of steroid receptor coactivators (SRC-1, SRC-3), as well as promoting the activity of estrogen response elements [110]. Interestingly, it was demonstrated that in this case the addition of melatonin blocked the increase in steroid receptor coactivator expression and activity of estrogen response elements triggered by BPA [110]. Another study suggested that BPA stimulates the release of EGFR-ligands by directly targeting other molecules than ER, such as ADAM17 or ADAM10. A better understanding of BPA-specific effects on other molecules than ER $\alpha$ 66 is much required to improve our knowledge of its tumorigenic potential [111].

## 4.3. A New Concept: Bisphenol Molecules as Breast Cancer Drivers through the Perturbation of Alternative Signaling Such as the BMP Pathway

Works from our team and others suggest that bisphenols could act on multiples cell types of the mammary gland, and its effects may converge to provoke major dysregulations of the BMP pathway that could participate in luminal breast cancer initiation. Indeed, we observed a major impact of BPA on the mammary microenvironment (niche) equilibrium. BPA greatly increases BMP2 production by stromal cells of the human mammary SC microenvironment [78]. In this context, we also demonstrated that long-term exposure (60 days) of human mammary stem cells to BPA initiates fundamental

changes in stem cells, in particular by altering major BMP signaling elements such as receptor expression and localization [43]. This results in the “priming” of the SCs to exogenous activating molecules of the BMP pathway. Therefore, BPA sensitizes breast SCs to exogenous soluble BMP molecules. Collectively, these results suggest a possible model where non-genotoxic alterations in both the stem cells and their niche could act synergistically to initiate the transformation process (Figure 1).



**Figure 1.** BPA-induced modifications of the mammary gland ecosystem. In the absence of BPA (**left panel**), BMP2 production by the breast microenvironment and BMP receptor expression by mammary epithelial cells sustains the homeostasis of the mammary gland. In the presence of BPA (**right panel**), BMP2 production by mammary fibroblasts is stimulated and in turn activates, in conjunction with BPA, IL6 production by adipocytes. IL6 can then further increase BMP2 production by fibroblasts. In parallel, BPA primes epithelial SCs cells to the increased BMP2 signaling by acting on BMP receptor expression and localization. This dysregulated BMP signaling and the inflammatory context provided by IL6 cooperate to favor mammary stem cell transformation.

Interestingly, these previous studies showed that BPA impacts BMP signaling pathway members in both mammary epithelial and stromal cells that do not express ER $\alpha$ 66. At the mechanistic level, it then remains to understand how BPA signals in these cells and especially if it is through other ER $\alpha$  isoforms or through ER-independent pathways. These questions are of great interest for understanding the effects of both BPA and estrogens since it has been reported that some cell lines are able to respond to an estrogen signal despite their very low levels or complete absence of estrogen receptors [99]. In response to accumulating evidence in favor of adverse health effects following exposure to BPA, likely mediated by its activation of ER $\alpha$ 66, alternative bisphenols have been developed such as BPS and BPF that are considered safer due to their very low binding affinity to ER $\alpha$  [112]. However, an increasing number of studies are showing that these alternative bisphenol molecules are not as innocuous towards mammary gland biology and breast cancer as hoped [113]. We were indeed surprised to observe that BPA (high affinity binding to estrogen-receptors) as well as its substitute BPS (very weak affinity binding to estrogen-receptors) both induce BMP2 synthesis in the healthy breast stroma [78], raising the question whether these bisphenols mediate their transforming effects solely through a classical ER-dependent mechanism. Since then, other studies have shown that BPS, as well as BPF, induce similar effects as BPA [112,113]. Moreover, it was reported that BPA treatment increases aromatase expression and its activity in healthy breast fibroblasts, leading to an increase in

estrogen biosynthesis and secretion. The same observations were made after treatment with BPS [114].

These results are particularly interesting with regard to the important role of the microenvironment in the different steps of carcinogenesis. Our work thus indicates that the BMP pathway could be altered by EDCs such as BPA and its proposed alternatives, both at the level of the stem cells and their microenvironment. This suggests that early detection of increased BMP2 levels in the mammary microenvironment may constitute a reliable marker of early transformation process and could be a valuable indicator of exposure to EDCs such as bisphenols.

## 5. Conclusions

Different signaling pathways often engage in complex interactions synergistically mediating an appropriate cellular response. Estrogen signaling is no exception and is likely involved in a crosstalk with the BMP pathway at multiple levels in the mammary gland. BMPs are secreted proteins active in a very large number of organs and tissues during development, adulthood and pathogenesis [115]. Previous work suggested a close interaction between ER-mediated estrogen signaling and the BMP pathway in different cell types of the mammary gland. In a model of mammary epithelial SCs (MCF10A cell line), E2 or known EDCs like BPA or BPS were able to potentialize SMAD activation by BMP2 [43]. Deciphering dysregulations of the BMP pathway has been remarkably useful in unveiling its importance in regulating cancer SC phenotypes in the neural system [86,87]. The role of BMP signaling alterations in sustaining cancer SC features has been extended by our own work in breast cancer and leukemia [78,88]. We have shown that chronic exposure to high concentrations of BMP2 drives the transformation of mammary SCs toward the luminal tumor subtype [78] through the binding to its BMPRII receptor. We have also demonstrated that long-term exposure of human mammary SCs to pollutants such as BPA initiates fundamental changes in SCs by altering major BMP signaling components [43], thus “priming” the stem cells to exogenous BMP activation. In addition to this effect on epithelial stem cells we revealed an impact of BPA on the tumor microenvironment through the induction of the synthesis of high levels of BMP2 by normal fibroblasts and stromal cells [78].

This review focused on the early steps of the transformation. Tumor progression, metastasis, and resistance to treatments could also be regulated by bisphenols as briefly illustrated in the following chapters. Progression is generally characterized by elevated cell proliferation rates. Several studies have demonstrated the involvement of BPA in the proliferation of ER-positive as well as -negative cancer cells. However, it has also been shown that BPA can trigger proliferation via non-classical estrogen receptors, such as the estrogen-related receptor gamma (ERRγ) [116,117]. Several studies have demonstrated that BPS promotes breast cancer cell proliferation, notably through an ER-cyclin D1-CDK4/6-pRb-dependent pathway, but only in ER-positive breast cancer cells [118–120]. Moreover, it has also been reported that BPF has the same proliferative action as BPA, BPS, or estrogen treatment on ER-positive transformed cells, and as for BPS, this proliferative effect relies on cyclin D and E expression through ER-dependent pathways [118]. Similarly to BPA, BPS can also induce epigenetic and transcriptional changes in breast cancer cells, upregulating proliferation-, cellular attachment-, adhesion- and migration-related genes [121].

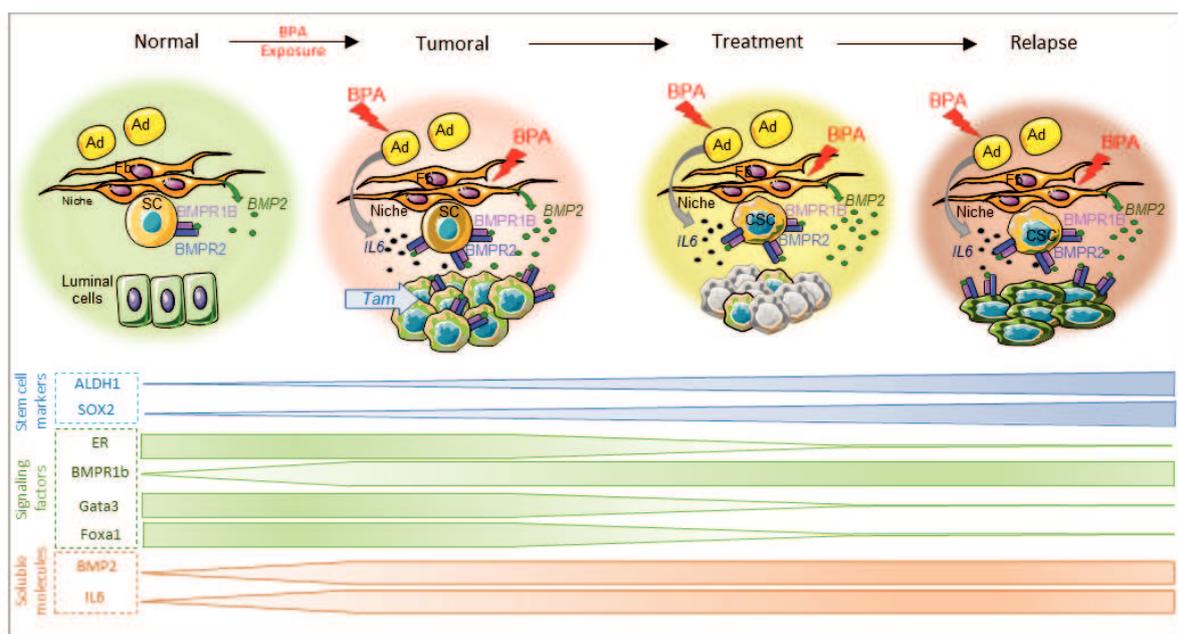
Metastasis has long been associated with late stages of cancer, but new hypotheses on the origin of metastasis have progressively emerged suggesting that it could be an inherent marker of tumor cells [122,123]. Metastasis dissemination is a dynamic process that involves several steps: Local invasion of cells from the primary tumor, intravasation leading to dissemination through the blood or lymph flux, extravasation to invade new tissues, implantation and finally new tumor growth. Numerous signaling pathways and programs are activated during this process, such as epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), anoikis, migration and proliferation among others (for review: [124,125]). It has been shown that ER-negative breast cancers are associated with an increased risk of metastasis

development [126]. Indeed, ER-negative breast cancers express more mesenchymal markers such as vimentin and N-cadherin or EMT-transcription factors that are required for metastasis initiation. Conversely, ER-positive tumors are associated with a more differentiated luminal phenotype, expressing epithelial markers (E-cadherin, ER, Foxa1 for instance). Accordingly, a down-regulation of the luminal-specific transcription factor Foxa1 was induced after BPA treatment in triple negative tumor cell lines leading to EMT induction and increased cell motility [127]. In this study, BPA treatment activated the PI3K/AKT pathway, leading to a down-regulation of epithelial genes associated with an up-regulation of mesenchymal genes.

Resistance and relapse can be due to tumor adaptation or evolution. Indeed, therapies elicit a selective pressure on cells, which in turn develop resistance, notably by acquiring mutations. Tamoxifen resistance of ER-positive tumors can be caused by a loss of ER [128], its mutation or post-translational modification [129], among others. It has been shown that BPA is involved in chemoresistance [130] and notably in tamoxifen resistance in ER-positive tumor cell lines [131] by decreasing tamoxifen-induced apoptosis and increasing gene expression of  $ERR\alpha$ , which contributes to tamoxifen resistance [132] and cell proliferation [117]. Another study has demonstrated that an  $ER\alpha$  variant can be induced by BMP2 [133] and could be involved in tamoxifen resistance [134]. We can hypothesize that in ER-positive tumors, under tamoxifen treatment and in a BPA-containing environment, some cells acquire resistance to treatment through a switch in signaling pathways in favor of a decrease in treatment cytotoxicity and a modification of estrogen receptor stoichiometry, e.g., an increase in  $ERR\alpha$  or  $ER\alpha$  isoform expression.

Treatment efficacy can then be bypassed and cells can start to proliferate again.

To conclude, the BMP signaling plays a major role in the regulation of SCs and of their microenvironment (niche), in both normal and tumor contexts. Multiple abnormalities of BMP signaling have been observed in cancer, but until recently had mostly focused on its role in advanced disease. However, due to the increasing documented importance of BMP signaling throughout breast cancer development (from initiation, progression, metastasis up to resistance), we suggest as a working model that BMP signaling alterations induced by exposure to BPA, such as increased levels of BMP2 and/or of BMP receptors activity, could participate to most stage of breast cancer development (Figure 2). This suggests that further investigating the alterations of the BMP pathway induced by exposure to bisphenols will improve our understanding of breast cancer etiology.



**Figure 2.** Putative mechanism of BPA involvement during mammary gland carcinogenesis. In the normal breast, the microenvironment secretes factors, BMP2 in particular, that regulate the luminal lineage [43]. Exposure to

BPA induces dysregulations in the synthesis of microenvironmental factors: Mammary fibroblasts increase their BMP2 secretion [78] and adipocytes establish an inflammatory environment by releasing IL6 [135]. The microenvironment then becomes permissive to transformation, and in concert with BPA, leads to the initiation and progression of breast tumor. Treatments can kill the tumor bulk, but not cancer stem cells, leading to proliferation and relapse. The relapsing tumor has an aggressive phenotype due to its cancer stem cell origin and/or to pollutants that promote a decrease in epithelial marker expression (Gata3, Foxa1) [127], an increase in mesenchymal markers and stem-like features (ALDH1, SOX2) [136,137] or a loss of ER [128]. Fb, fibroblast; SC, stem cell; Ad, adipocyte; CSC, cancer stem cell; Tam, tamoxifen.

**Funding:** We thank the following funding bodies for their support of the team's work mentioned in this review: The Association pour la Recherche contre le Cancer, La Ligue contre le Cancer, the Déchainé ton cœur association, the Région Rhône-Alpes and the Institut National du Cancer.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Pourteimoor, V.; Mohammadi-Yeganeh, S.; Paryan, M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 14479–14499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Goldhirsch, A.; Winer, E.P.; Coates, A.S.; Gelber, R.D.; Piccart-Gebhart, M.; Thurlimann, B.; Senn, H.J.; Panel, m. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.* **2013**, *24*, 2206–2223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sorlie, T.; Perou, C.M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H.; Hastie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10869–10874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lumachi, F.; Santeufemia, D.A.; Basso, S.M. Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *World J. Biol. Chem.* **2015**, *6*, 231–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lal, A.; Ramazzotti, D.; Weng, Z.; Liu, K.; Ford, J.M.; Sidow, A. Comprehensive genomic characterization of breast tumors with BRCA1 and BRCA2 mutations. *BMC Med. Genomics* **2019**, *12*, 84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lima, Z.S.; Ghadamzadeh, M.; Arashloo, F.T.; Amjad, G.; Ebadi, M.R.; Younesi, L. Recent advances of therapeutic targets based on the molecular signature in breast cancer: Genetic mutations and implications for current treatment paradigms. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Buys, S.S.; Sandbach, J.F.; Gammon, A.; Patel, G.; Kidd, J.; Brown, K.L.; Sharma, L.; Saam, J.; Lancaster, J.; Daly, M.B. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer* **2017**, *123*, 1721–1730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Tung, N.; Lin, N.U.; Kidd, J.; Allen, B.A.; Singh, N.; Wenstrup, R.J.; Hartman, A.R.; Winer, E.P.; Garber, J.E. Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 1460–1468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Stoppa-Lyonnet, D. The biological effects and clinical implications of BRCA mutations: Where do we go from here? *Eur. J. Hum. Genet.* **2016**, *24 Suppl 1*, S3–S9. [[CrossRef](#)]
10. Momenimovahed, Z.; Salehiniya, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer (Dove Med. Press)* **2019**, *11*, 151–164. [[CrossRef](#)]
11. Mallepell, S.; Krust, A.; Chambon, P.; Briskin, C. Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2196–2201. [[CrossRef](#)]
12. Renoir, J.M.; Marsaud, V.; Lazennec, G. Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 449–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Dall, G.V.; Britt, K.L. Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk. *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 110. [[CrossRef](#)]
14. Rodgers, K.M.; Udesky, J.O.; Rudel, R.A.; Brody, J.G. Environmental chemicals and breast cancer: An updated review of epidemiological literature informed by biological mechanisms. *Environ. Res.* **2018**, *160*, 152–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gore, A.C.; Chappell, V.A.; Fenton, S.E.; Flaws, J.A.; Nadal, A.; Prins, G.S.; Toppari, J.; Zoeller, R.T. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr. Rev.* **2015**, *36*, E1–E150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Rochester, J.R. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Rep. Toxicol.* **2013**, *42*, 132–155. [[CrossRef](#)]
17. Li, Y.; Perera, L.; Coons, L.A.; Burns, K.A.; Tyler Ramsey, J.; Pelch, K.E.; Houtman, R.; van Beuningen, R.; Teng, C.T.; Korach, K.S. Differential In Vitro Biological Action, Coregulator Interactions, and Molecular Dynamic Analysis of Bisphenol A (BPA), BPAF, and BPS Ligand-ERalpha Complexes. *Environ. Health Perspect.* **2018**, *126*, 017012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Routledge, E.J.; White, R.; Parker, M.G.; Sumpter, J.P. Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 35986–35993. [[CrossRef](#)]
19. Prat, A.; Parker, J.S.; Karginova, O.; Fan, C.; Livasy, C.; Herschkowitz, J.I.; He, X.; Perou, C.M. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2010**, *12*, R68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Silberstein, G.B.; Van Horn, K.; Shyamala, G.; Daniel, C.W. Essential role of endogenous estrogen in directly stimulating mammary growth demonstrated by implants containing pure antiestrogens. *Endocrinology* **1994**, *134*, 84–90. [[CrossRef](#)]
21. Feng, Y.; Manka, D.; Wagner, K.U.; Khan, S.A. Estrogen receptor-alpha expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14718–14723. [[CrossRef](#)]
22. Daniel, C.W.; Silberstein, G.B.; Strickland, P. Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 6052–6057.
23. Lydon, J.P.; Sivaraman, L.; Conneely, O.M. A reappraisal of progesterone action in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2000**, *5*, 325–338. [[CrossRef](#)]
24. Shyamala, G. Progesterone signaling and mammary gland morphogenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **1999**, *4*, 89–104. [[CrossRef](#)]
25. Holinka, C.F.; Diczfalusy, E.; Coelingh Bennink, H.J. Estetrol: A unique steroid in human pregnancy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *110*, 138–143. [[CrossRef](#)]
26. Ishikawa, T.; Glidewell-Kenney, C.; Jameson, J.L. Aromatase-independent testosterone conversion into estrogenic steroids is inhibited by a 5 alpha-reductase inhibitor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *98*, 133–138. [[CrossRef](#)]
27. Cui, J.; Shen, Y.; Li, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: From periphery to brain. *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 197–209. [[CrossRef](#)]
28. Plant, T.M. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *J. Endocrinol.* **2015**, *226*, T41–T54. [[CrossRef](#)]
29. Feldman, M.; Ruan, W.; Tappin, I.; Wieczorek, R.; Kleinberg, D.L. The effect of GH on estrogen receptor expression in the rat mammary gland. *J. Endocrinol.* **1999**, *163*, 515–522. [[CrossRef](#)]
30. Brisken, C. Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2002**, *7*, 39–48. [[CrossRef](#)]
31. Humphreys, R.C.; Lydon, J.P.; O'Malley, B.W.; Rosen, J.M. Use of PRKO mice to study the role of progesterone in mammary gland development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **1997**, *2*, 343–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Stingl, J. Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer. *Horm. Cancer* **2011**, *2*, 85–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Clarke, R.B.; Howell, A.; Potten, C.S.; Anderson, E. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4987–4991. [[PubMed](#)]
34. Zeps, N.; Bentel, J.M.; Papadimitriou, J.M.; D'Antuono, M.F.; Dawkins, H.J. Estrogen receptor-negative epithelial cells in mouse mammary gland development and growth. *Differentiation* **1998**, *62*, 221–226. [[CrossRef](#)]
35. Ciaroni, L.; Mallepell, S.; Brisken, C. Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5455–5460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. LaMarca, H.L.; Rosen, J.M. Estrogen regulation of mammary gland development and breast cancer: Amphiregulin takes center stage. *Breast Cancer Res.* **2007**, *9*, 304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Villadsen, R.; Fridriksdottir, A.J.; Ronnov-Jessen, L.; Gudjonsson, T.; Rank, F.; LaBarge, M.A.; Bissell, M.J.; Petersen, O.W. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *J. Cell Biol.* **2007**, *177*, 87–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Booth, B.W.; Smith, G.H. ERalpha and PR are expressed in label-retaining mammary epithelial cells that divide asymmetrically and retain their template DNA strands. *Breast Cancer Res.* **2006**, *8*, R49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Booth, B.W.; Boulanger, C.A.; Anderson, L.H.; Jimenez-Rojo, L.; Briskin, C.; Smith, G.H. Amphiregulin mediates self-renewal in an immortal mammary epithelial cell line with stem cell characteristics. *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 422–432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Sternlicht, M.D.; Sunnarborg, S.W.; Kouros-Mehr, H.; Yu, Y.; Lee, D.C.; Werb, Z. Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Development* **2005**, *132*, 3923–3933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Asselin-Labat, M.L.; Vaillant, F.; Sheridan, J.M.; Pal, B.; Wu, D.; Simpson, E.R.; Yasuda, H.; Smyth, G.K.; Martin, T.J.; Lindeman, G.J.; et al. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* **2010**, *465*, 798–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zoeller, R.T.; Brown, T.R.; Doan, L.L.; Gore, A.C.; Skakkebaek, N.E.; Soto, A.M.; Woodruff, T.J.; Vom Saal, F.S. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* **2012**, *153*, 4097–4110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Clement, F.; Xu, X.; Donini, C.F.; Clement, A.; Omarjee, S.; Delay, E.; Treilleux, I.; Fervers, B.; Le Romancer, M.; Cohen, P.A.; et al. Long-term exposure to bisphenol A or benzo(a)pyrene alters the fate of human mammary epithelial stem cells in response to BMP2 and BMP4, by pre-activating BMP signaling. *Cell Death Differ.* **2017**, *24*, 155–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kopras, E.; Potluri, V.; Bermudez, M.L.; Williams, K.; Belcher, S.; Kasper, S. Actions of endocrine-disrupting chemicals on stem/progenitor cells during development and disease. *Endocr. Relat. Cancer* **2014**, *21*, T1–T12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Bateman, M.E.; Strong, A.L.; McLachlan, J.A.; Burow, M.E.; Bunnell, B.A. The Effects of Endocrine Disruptors on Adipogenesis and Osteogenesis in Mesenchymal Stem Cells: A Review. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2016**, *7*, 171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Alonso-Magdalena, P.; Rivera, F.J.; Guerrero-Bosagna, C. Bisphenol-A and metabolic diseases: Epigenetic, developmental and transgenerational basis. *Environ. Epigenet.* **2016**, *2*, dvw022. [[CrossRef](#)]
47. Landero-Huerta, D.A.; Viguera-Villasenor, R.M.; Yokoyama-Rebollar, E.; Arechaga-Ocampo, E.; Rojas-Castaneda, J.C.; Jimenez-Trejo, F.; Chavez-Saldana, M. Epigenetic and risk factors of testicular germ cell tumors: A brief review. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **2017**, *22*, 1073–1098. [[PubMed](#)]
48. Corrales, J.; Kristofco, L.A.; Steele, W.B.; Yates, B.S.; Breed, C.S.; Williams, E.S.; Brooks, B.W. Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose Response* **2015**, *13*, 1559325815598308. [[CrossRef](#)]
49. Moral, R.; Wang, R.; Russo, I.H.; Lamartiniere, C.A.; Pereira, J.; Russo, J. Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. *J. Endocrinol.* **2008**, *196*, 101–112. [[CrossRef](#)]
50. Vandenberg, L.N.; Maffini, M.V.; Wadia, P.R.; Sonnenschein, C.; Rubin, B.S.; Soto, A.M. Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* **2007**, *148*, 116–127. [[CrossRef](#)]
51. Wadia, P.R.; Cabaton, N.J.; Borrero, M.D.; Rubin, B.S.; Sonnenschein, C.; Shioda, T.; Soto, A.M. Low-dose BPA exposure alters the mesenchymal and epithelial transcriptomes of the mouse fetal mammary gland. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Wang, R.N.; Green, J.; Wang, Z.; Deng, Y.; Qiao, M.; Peabody, M.; Zhang, Q.; Ye, J.; Yan, Z.; Denduluri, S.; et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* **2014**, *1*, 87–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Otsuka, F. Multifunctional bone morphogenetic protein system in endocrinology. *Acta Med. Okayama* **2013**, *67*, 75–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. La Rosa, I. Bone Morphogenetic Proteins in Preimplantation Embryos. *Vitam. Horm.* **2015**, *99*, 223–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Chang, H.M.; Qiao, J.; Leung, P.C. Oocyte-somatic cell interactions in the human ovary-novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Hum. Reprod. Update* **2016**, *23*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Persani, L.; Rossetti, R.; Di Pasquale, E.; Cacciatore, C.; Fabre, S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum. Reprod. Update* **2014**, *20*, 869–883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Huang, R.L.; Sun, Y.; Ho, C.K.; Liu, K.; Tang, Q.Q.; Xie, Y.; Li, Q. IL-6 potentiates BMP-2-induced osteogenesis and adipogenesis via two different BMPRI1A-mediated pathways. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Zhang, X.; Guo, J.; Zhou, Y.; Wu, G. The roles of bone morphogenetic proteins and their signaling in the osteogenesis of adipose-derived stem cells. *Tissue Eng. Part. B Rev.* **2014**, *20*, 84–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Gustafson, B.; Hammarstedt, A.; Hedjazifar, S.; Hoffmann, J.M.; Svensson, P.A.; Grimsby, J.; Rondinone, C.; Smith, U. BMP4 and BMP Antagonists Regulate Human White and Beige Adipogenesis. *Diabetes* **2015**, *64*, 1670–1681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Ribeiro, S.; Lopes, L.R.; Paula Costa, G.; Figueiredo, V.P.; Shrestha, D.; Batista, A.P.; Nicolato, R.L.C.; Oliveira, F.L.P.; Gomes, J.A.S.; Talvani, A. CXCL-16, IL-17, and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) are associated with overweight and obesity conditions in middle-aged and elderly women. *Immun. Ageing* **2017**, *14*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Zamani, N.; Brown, C.W. Emerging roles for the transforming growth factor- $\beta$  superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocr. Rev.* **2011**, *32*, 387–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Miyazono, K.; Maeda, S.; Imamura, T. BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2005**, *16*, 251–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Yadin, D.; Knaus, P.; Mueller, T.D. Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2016**, *27*, 13–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Nohe, A.; Hassel, S.; Ehrlich, M.; Neubauer, F.; Sebald, W.; Henis, Y.I.; Knaus, P. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5330–5338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Hassel, S.; Schmitt, S.; Hartung, A.; Roth, M.; Nohe, A.; Petersen, N.; Ehrlich, M.; Henis, Y.I.; Sebald, W.; Knaus, P. Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. *J. Bone Joint Surg. Am.* **2003**, *85-A Suppl 3*, 44–51. [[CrossRef](#)]
66. Miyazono, K.; Kamiya, Y.; Morikawa, M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem.* **2010**, *147*, 35–51. [[CrossRef](#)]
67. Gamell, C.; Osses, N.; Bartrons, R.; Ruckle, T.; Camps, M.; Rosa, J.L.; Ventura, F. BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 3960–3970. [[CrossRef](#)]
68. Guicheux, J.; Lemonnier, J.; Ghayor, C.; Suzuki, A.; Palmer, G.; Caverzasio, J. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J. Bone Miner. Res.* **2003**, *18*, 2060–2068. [[CrossRef](#)]
69. Hay, E.; Lemonnier, J.; Fromiguet, O.; Marie, P.J. Bone morphogenetic protein-2 promotes osteoblast apoptosis through a Smad-independent, protein kinase C-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 29028–29036. [[CrossRef](#)]
70. Vinals, F.; Lopez-Rovira, T.; Rosa, J.L.; Ventura, F. Inhibition of PI3K/p70 S6K and p38 MAPK cascades increases osteoblastic differentiation induced by BMP-2. *FEBS Lett.* **2002**, *510*, 99–104. [[CrossRef](#)]
71. Cho, K.W.; Kim, J.Y.; Song, S.J.; Farrell, E.; Eblaghie, M.C.; Kim, H.J.; Tickle, C.; Jung, H.S. Molecular interactions between Tbx3 and Bmp4 and a model for dorsoventral positioning of mammary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 16788–16793. [[CrossRef](#)]
72. Hens, J.R.; Dann, P.; Zhang, J.P.; Harris, S.; Robinson, G.W.; Wysolmerski, J. BMP4 and PTHrP interact to stimulate ductal outgrowth during embryonic mammary development and to inhibit hair follicle induction. *Development* **2007**, *134*, 1221–1230. [[CrossRef](#)]
73. Shyamala, G.; Yang, X.; Cardiff, R.D.; Dale, E. Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3044–3049. [[CrossRef](#)]

74. Satoh, K.; Hovey, R.C.; Malewski, T.; Warri, A.; Goldhar, A.S.; Ginsburg, E.; Saito, K.; Lydon, J.P.; Vonderhaar, B.K. Progesterone enhances branching morphogenesis in the mouse mammary gland by increased expression of *Msx2*. *Oncogene* **2007**, *26*, 7526–7534. [[CrossRef](#)]
75. Fleming, J.M.; Ginsburg, E.; Goldhar, A.S.; Plant, J.; Vonderhaar, B.K. Progesterone receptor activates *Msx2* expression by downregulating *TNAP/Akp2* and activating the *Bmp* pathway in Eph4 mouse mammary epithelial cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34058. [[CrossRef](#)]
76. Forsman, C.L.; Ng, B.C.; Heinze, R.K.; Kuo, C.; Sergi, C.; Gopalakrishnan, R.; Yee, D.; Graf, D.; Schwertfeger, K.L.; Petryk, A. BMP-binding protein twisted gastrulation is required in mammary gland epithelium for normal ductal elongation and myoepithelial compartmentalization. *Dev. Biol.* **2013**, *373*, 95–106. [[CrossRef](#)]
77. Perotti, C.; Karayazi, O.; Moffat, S.; Shemanko, C.S. The bone morphogenetic protein receptor-1A pathway is required for lactogenic differentiation of mammary epithelial cells in vitro. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* **2012**, *48*, 377–384. [[CrossRef](#)]
78. Chapellier, M.; Bachelard-Cascales, E.; Schmidt, X.; Clement, F.; Treilleux, I.; Delay, E.; Jammot, A.; Menetrier-Caux, C.; Pochon, G.; Besancon, R.; et al. Disequilibrium of BMP2 levels in the breast stem cell niche launches epithelial transformation by overamplifying BMPR1B cell response. *Stem Cell Rep.* **2015**, *4*, 239–254. [[CrossRef](#)]
79. Bachelard-Cascales, E.; Chapellier, M.; Delay, E.; Pochon, G.; Voeltzel, T.; Puisieux, A.; Caron, d.F.; Maguer-Satta, V. The CD10 enzyme is a key player to identify and regulate human mammary stem cells. *Stem Cells* **2010**, *28*, 1081–1088. [[CrossRef](#)]
80. Mou, H.; Vinarsky, V.; Tata, P.R.; Brazauskas, K.; Choi, S.H.; Crooke, A.K.; Zhang, B.; Solomon, G.M.; Turner, B.; Bihler, H.; et al. Dual SMAD Signaling Inhibition Enables Long-Term Expansion of Diverse Epithelial Basal Cells. *Cell Stem Cell* **2016**, *19*, 217–231. [[CrossRef](#)]
81. Zylbersztejn, F.; Flores-Violante, M.; Voeltzel, T.; Nicolini, F.E.; Lefort, S.; Maguer-Satta, V. The BMP pathway: A unique tool to decode the origin and progression of leukemia. *Exp. Hematol.* **2018**, *61*, 36–44. [[CrossRef](#)]
82. Bier, E.; De Robertis, E.M. EMBRYO DEVELOPMENT. BMP gradients: A paradigm for morphogen-mediated developmental patterning. *Science* **2015**, *348*, aaa5838. [[CrossRef](#)]
83. Reiner, D.J.; Yu, S.J.; Shen, H.; He, Y.; Bae, E.; Wang, Y. 9-Cis retinoic acid protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in nigrostriatal dopamine neurons. *Neurotox Res.* **2014**, *25*, 248–261. [[CrossRef](#)]
84. Ambegaokar, S.S.; Jackson, G.R. Functional genomic screen and network analysis reveal novel modifiers of tauopathy dissociated from tau phosphorylation. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 4947–4977. [[CrossRef](#)]
85. Howard, A.S.; Bucelli, R.; Jett, D.A.; Bruun, D.; Yang, D.; Lein, P.J. Chlorpyrifos exerts opposing effects on axonal and dendritic growth in primary neuronal cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *207*, 112–124. [[CrossRef](#)]
86. Lee, J.; Son, M.J.; Woolard, K.; Donin, N.M.; Li, A.; Cheng, C.H.; Kotliarova, S.; Kotliarov, Y.; Walling, J.; Ahn, S.; et al. Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer Cell* **2008**, *13*, 69–80. [[CrossRef](#)]
87. Piccirillo, S.G.; Reynolds, B.A.; Zanetti, N.; Lamorte, G.; Binda, E.; Broggi, G.; Brem, H.; Olivi, A.; Dimeco, F.; Vescovi, A.L. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* **2006**, *444*, 761–765. [[CrossRef](#)]
88. Laperrousaz, B.; Jeanpierre, S.; Sagorny, K.; Voeltzel, T.; Ramas, S.; Kaniewski, B.; Ffrench, M.; Salesse, S.; Nicolini, F.E.; Maguer-Satta, V. Primitive CML cell expansion relies on abnormal levels of BMPs provided by the niche and on BMPRIb overexpression. *Blood* **2013**, *122*, 3767–3777. [[CrossRef](#)]
89. Wang, Z.Y.; Yin, L. Estrogen receptor alpha-36 (ER-alpha36): A new player in human breast cancer. *Mol. Cell Endocrinol.* **2015**, *418 Pt. 3*, 193–206. [[CrossRef](#)]
90. Wang, Z.; Zhang, X.; Shen, P.; Loggie, B.W.; Chang, Y.; Deuel, T.F. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *336*, 1023–1027. [[CrossRef](#)]
91. Lee, L.M.; Cao, J.; Deng, H.; Chen, P.; Gatalica, Z.; Wang, Z.Y. ER-alpha36, a novel variant of ER-alpha, is expressed in ER-positive and -negative human breast carcinomas. *Anticancer Res.* **2008**, *28*, 479–483.
92. Omarjee, S.; Jacquemetton, J.; Poulard, C.; Rochel, N.; Dejaegere, A.; Chebaro, Y.; Treilleux, I.; Marangoni, E.; Corbo, L.; Romancer, M.L. The molecular mechanisms underlying the ERalpha-36-mediated signaling in breast cancer. *Oncogene* **2017**, *36*, 2503–2514. [[CrossRef](#)]

93. Lin, S.L.; Yan, L.Y.; Zhang, X.T.; Yuan, J.; Li, M.; Qiao, J.; Wang, Z.Y.; Sun, Q.Y. ER-alpha36, a variant of ER-alpha, promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9013. [[CrossRef](#)]
94. Wang, Q.; Jiang, J.; Ying, G.; Xie, X.Q.; Zhang, X.; Xu, W.; Zhang, X.; Song, E.; Bu, H.; Ping, Y.F.; et al. Tamoxifen enhances stemness and promotes metastasis of ERalpha36(+) breast cancer by upregulating ALDH1A1 in cancer cells. *Cell Res.* **2018**, *28*, 336–358. [[CrossRef](#)]
95. Serra, M.; Alysandratos, K.D.; Hawkins, F.; McCauley, K.B.; Jacob, A.; Choi, J.; Caballero, I.S.; Vedaie, M.; Kurmann, A.A.; Ikononou, L.; et al. Pluripotent stem cell differentiation reveals distinct developmental pathways regulating lung-versus thyroid-lineage specification. *Development* **2017**, *144*, 3879–3893. [[CrossRef](#)]
96. Villacorte, M.; Delmarcelle, A.S.; Lernoux, M.; Bouquet, M.; Lemoine, P.; Bolsee, J.; Umans, L.; de Sousa Lopes, S.C.; Van Der Smissen, P.; Sasaki, T.; et al. Thyroid follicle development requires Smad1/5- and endothelial cell-dependent basement membrane assembly. *Development* **2016**, *143*, 1958–1970. [[CrossRef](#)]
97. Meng, X.; Zhu, P.; Li, N.; Hu, J.; Wang, S.; Pang, S.; Wang, J. Expression of BMP-4 in papillary thyroid carcinoma and its correlation with tumor invasion and progression. *Pathol. Res. Pract.* **2017**, *213*, 359–363. [[CrossRef](#)]
98. Conde, S.J.; Luvizotto Rde, A.; de Sibio, M.T.; Nogueira, C.R. Thyroid hormone status interferes with estrogen target gene expression in breast cancer samples in menopausal women. *ISRN Endocrinol.* **2014**, *2014*, 317398. [[CrossRef](#)]
99. Wassenaar, P.N.H.; Legler, J. Systematic review and meta-analysis of early life exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and obesity related outcomes in rodents. *Chemosphere* **2017**, *188*, 174–181. [[CrossRef](#)]
100. Wassenaar, P.N.H.; Trasande, L.; Legler, J. Systematic Review and Meta-Analysis of Early-Life Exposure to Bisphenol A and Obesity-Related Outcomes in Rodents. *Environ. Health Perspect.* **2017**, *125*, 106001. [[CrossRef](#)]
101. Berghuis, S.A.; Bos, A.F.; Sauer, P.J.; Roze, E. Developmental neurotoxicity of persistent organic pollutants: An update on childhood outcome. *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 687–709. [[CrossRef](#)]
102. Holmes, D. Breast cancer: Increased risk with concurrent dietary and EDC exposures. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2017**, *13*, 378. [[CrossRef](#)]
103. Hussain, I.; Bhan, A.; Ansari, K.I.; Deb, P.; Bobzean, S.A.; Perrotti, L.I.; Mandal, S.S. Bisphenol-A induces expression of HOXC6, an estrogen-regulated homeobox-containing gene associated with breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1849*, 697–708. [[CrossRef](#)]
104. Hafezi, S.A.; Abdel-Rahman, W.M. The Endocrine Disruptor Bisphenol A (BPA) Exerts a Wide Range of Effects in Carcinogenesis and Response to Therapy. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
105. Qin, X.Y.; Fukuda, T.; Yang, L.; Zaha, H.; Akanuma, H.; Zeng, Q.; Yoshinaga, J.; Sone, H. Effects of bisphenol A exposure on the proliferation and senescence of normal human mammary epithelial cells. *Cancer Biol. Ther.* **2012**, *13*, 296–306. [[CrossRef](#)]
106. Fernandez, S.V.; Russo, J. Estrogen and xenoestrogens in breast cancer. *Toxicol. Pathol.* **2010**, *38*, 110–122. [[CrossRef](#)]
107. Ayyanan, A.; Laribi, O.; Schuepbach-Mallepell, S.; Schrick, C.; Gutierrez, M.; Tanos, T.; Lefebvre, G.; Rougemont, J.; Yalcin-Ozuyal, O.; Briskin, C. Perinatal exposure to bisphenol a increases adult mammary gland progesterone response and cell number. *Mol. Endocrinol.* **2011**, *25*, 1915–1923. [[CrossRef](#)]
108. Wang, D.; Gao, H.; Bandyopadhyay, A.; Wu, A.; Yeh, I.T.; Chen, Y.; Zou, Y.; Huang, C.; Walter, C.A.; Dong, Q.; et al. Pubertal bisphenol A exposure alters murine mammary stem cell function leading to early neoplasia in regenerated glands. *Cancer Prev. Res. (Phila)* **2014**, *7*, 445–455. [[CrossRef](#)]
109. Fernandez, S.V.; Huang, Y.; Snider, K.E.; Zhou, Y.; Pogash, T.J.; Russo, J. Expression and DNA methylation changes in human breast epithelial cells after bisphenol A exposure. *Int. J. Oncol.* **2012**, *41*, 369–377. [[CrossRef](#)]
110. Wang, T.; Liu, B.; Guan, Y.; Gong, M.; Zhang, W.; Pan, J.; Liu, Y.; Liang, R.; Yuan, Y.; Ye, L. Melatonin inhibits the proliferation of breast cancer cells induced by bisphenol A via targeting estrogen receptor-related pathways. *Thorac Cancer* **2018**, *9*, 368–375. [[CrossRef](#)]
111. Urriola-Munoz, P.; Li, X.; Maretzky, T.; McIlwain, D.R.; Mak, T.W.; Reyes, J.G.; Blobel, C.P.; Moreno, R.D. The xenoestrogens biphenol-A and nonylphenol differentially regulate metalloprotease-mediated shedding of EGFR ligands. *J. Cell Physiol.* **2018**, *233*, 2247–2256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Eladak, S.; Grisin, T.; Moison, D.; Guerin, M.J.; N'Tumba-Byn, T.; Pozzi-Gaudin, S.; Benachi, A.; Livera, G.; Rouiller-Fabre, V.; Habert, R. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil Steril* **2015**, *103*, 11–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

113. Rochester, J.R.; Bolden, A.L. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ. Health Perspect.* **2015**, *123*, 643–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Williams, G.P.; Darbre, P.D. Low-dose environmental endocrine disruptors, increase aromatase activity, estradiol biosynthesis and cell proliferation in human breast cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **2019**, *486*, 55–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Katagiri, T.; Watabe, T. Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Pupo, M.; Pisano, A.; Lappano, R.; Santolla, M.F.; De Francesco, E.M.; Abonante, S.; Rosano, C.; Maggiolini, M. Bisphenol A induces gene expression changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Environ. Health Perspect.* **2012**, *120*, 1177–1182. [[CrossRef](#)]
117. Song, H.; Zhang, T.; Yang, P.; Li, M.; Yang, Y.; Wang, Y.; Du, J.; Pan, K.; Zhang, K. Low doses of bisphenol A stimulate the proliferation of breast cancer cells via ERK1/2/ERKgamma signals. *Toxicol. In Vitro* **2015**, *30*, 521–528. [[CrossRef](#)]
118. Kim, J.Y.; Choi, H.G.; Lee, H.M.; Lee, G.A.; Hwang, K.A.; Choi, K.C. Effects of bisphenol compounds on the growth and epithelial mesenchymal transition of MCF-7 CV human breast cancer cells. *J. Biomed. Res.* **2017**, *31*, 358–369. [[CrossRef](#)]
119. Deng, Q.; Jiang, G.; Wu, Y.; Li, J.; Liang, W.; Chen, L.; Su, Q.; Li, W.; Du, J.; Wong, C.K.C.; et al. GPER/Hippo-YAP signal is involved in Bisphenol S induced migration of triple negative breast cancer (TNBC) cells. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *355*, 1–9. [[CrossRef](#)]
120. Lin, Z.; Zhang, X.; Zhao, F.; Ru, S. Bisphenol S promotes the cell cycle progression and cell proliferation through ERalpha-cyclin D-CDK4/6-pRb pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2019**, *366*, 75–82. [[CrossRef](#)]
121. Huang, W.; Zhao, C.; Zhong, H.; Zhang, S.; Xia, Y.; Cai, Z. Bisphenol S induced epigenetic and transcriptional changes in human breast cancer cell line MCF-7. *Environ. Pollut.* **2019**, *246*, 697–703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Seyfried, T.N.; Huysentruyt, L.C. On the origin of cancer metastasis. *Crit. Rev. Oncog.* **2013**, *18*, 43–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Weigelt, B.; Peterse, J.L.; van 't Veer, L.J. Breast cancer metastasis: Markers and models. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 591–602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Gupta, G.P.; Massague, J. Cancer metastasis: Building a framework. *Cell* **2006**, *127*, 679–695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Jin, X.; Mu, P. Targeting Breast Cancer Metastasis. *Breast Cancer (Auckl)* **2015**, *9*, 23–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Rangel, R.; Guzman-Rojas, L.; Kodama, T.; Kodama, M.; Newberg, J.Y.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A. Identification of new tumor suppressor genes in triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Zhang, X.L.; Wang, H.S.; Liu, N.; Ge, L.C. Bisphenol A stimulates the epithelial mesenchymal transition of estrogen negative breast cancer cells via FOXA1 signals. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *585*, 10–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Kuukasjarvi, T.; Kononen, J.; Helin, H.; Holli, K.; Isola, J. Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. *J. Clin. Oncol.* **1996**, *14*, 2584–2589. [[CrossRef](#)]
129. Le Romancer, M.; Poulard, C.; Cohen, P.; Sentis, S.; Renoir, J.M.; Corbo, L. Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr. Rev.* **2011**, *32*, 597–622. [[CrossRef](#)]
130. Lapensee, E.W.; Tuttle, T.R.; Fox, S.R.; Ben-Jonathan, N. Bisphenol A at low nanomolar doses confers chemoresistance in estrogen receptor-alpha-positive and -negative breast cancer cells. *Environ. Health Perspect.* **2009**, *117*, 175–180. [[CrossRef](#)]
131. Huang, B.; Luo, N.; Wu, X.; Xu, Z.; Wang, X.; Pan, X. The modulatory role of low concentrations of bisphenol A on tamoxifen-induced proliferation and apoptosis in breast cancer cells. *Environ. Sci Pollut Res. Int* **2019**, *26*, 2353–2362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Riggins, R.B.; Lan, J.P.; Zhu, Y.; Klimach, U.; Zwart, A.; Cavalli, L.R.; Haddad, B.R.; Chen, L.; Gong, T.; Xuan, J.; et al. ERKgamma mediates tamoxifen resistance in novel models of invasive lobular breast cancer. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 8908–8917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Wang, D.; Huang, P.; Zhu, B.; Sun, L.; Huang, Q.; Wang, J. Induction of estrogen receptor alpha-36 expression by bone morphogenetic protein 2 in breast cancer cell lines. *Mol. Med. Rep.* **2012**, *6*, 591–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Gu, W.; Dong, N.; Wang, P.; Shi, C.; Yang, J.; Wang, J. Tamoxifen resistance and metastasis of human breast cancer cells were mediated by the membrane-associated estrogen receptor ER-alpha36 signaling in vitro. *Cell Biol. Toxicol.* **2017**, *33*, 183–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Ben Jonathan, N.; Hugo, E.R.; Brandebourg, T.D. Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Mol. Cell Endocrinol.* **2009**, *304*, 49–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

136. Ginestier, C.; Hur, M.H.; Charafe-Jauffret, E.; Monville, F.; Dutcher, J.; Brown, M.; Jacquemier, J.; Viens, P.; Kleer, C.G.; Liu, S.; et al. ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* **2007**, *1*, 555–567. [[CrossRef](#)]
137. Lillo, M.A.; Nichols, C.; Seagroves, T.N.; Miranda-Carboni, G.A.; Krum, S.A. Bisphenol A Induces Sox2 in ER(+) Breast Cancer Stem-Like Cells. *Horm. Cancer* **2017**, *8*, 90–99. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

---

---

---

---

# BIBLIOGRAPHIE

---

---

---

---

- Abrahamsson, A., Rzepecka, A., and Dabrosin, C. (2017). Increased nutrient availability in dense breast tissue of postmenopausal women in vivo. *Sci Rep* 7, 42733.
- Aisenberg, A.C., Finkelstein, D.M., Doppke, K.P., Koerner, F.C., Boivin, J.F., and Willett, C.G. (1997). High risk of breast carcinoma after irradiation of young women with Hodgkin's disease. *Cancer* 79, 1203–1210.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 3983–3988.
- Alokail, M.S., Al-Daghri, N.M., Al-Attas, O.S., and Hussain, T. (2009). Combined effects of obesity and type 2 diabetes contribute to increased breast cancer risk in premenopausal women. *Cardiovascular Diabetology* 8, 33.
- Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Soriano, S., García-Arévalo, M., Ripoll, C., Fuentes, E., Quesada, I., and Nadal, Á. (2012). Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 355, 201–207.
- Al-Sader, H., Abdul-Jabar, H., Allawi, Z., and Haba, Y. (2009). Alcohol and breast cancer: the mechanisms explained. *J Clin Med Res* 1, 125–131.
- Alvi, A.J., Clayton, H., Joshi, C., Enver, T., Ashworth, A., Vivanco, M. d M., Dale, T.C., and Smalley, M.J. (2003). Functional and molecular characterisation of mammary side population cells. *Breast Cancer Res.* 5, R1-8.
- Amsalem, A.R., Marom, B., Shapira, K.E., Hirschhorn, T., Preisler, L., Paarmann, P., Knaus, P., Henis, Y.I., and Ehrlich, M. (2016). Differential regulation of translation and endocytosis of alternatively spliced forms of the type II bone morphogenetic protein (BMP) receptor. *Mol. Biol. Cell* 27, 716–730.
- Anderson, W.F., Chatterjee, N., Ershler, W.B., and Brawley, O.W. (2002). Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Res. Treat.* 76, 27–36.
- Andres, A.C., and Strange, R. (1999). Apoptosis in the estrous and menstrual cycles. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4, 221–228.
- Aranda, A., and Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* 81, 1269–1304.
- Arendt, L.M., Keller, P.J., Skibinski, A., Goncalves, K., Naber, S.P., Buchsbaum, R.J., Gilmore, H., Come, S.E., and Kuperwasser, C. (2014). Anatomical localization of progenitor cells in human breast tissue reveals enrichment of uncommitted cells within immature lobules. *Breast Cancer Res.* 16, 453.
- Ariazi, E.A., Brailoiu, E., Yerrum, S., Shupp, H.A., Slifker, M.J., Cunliffe, H.E., Black, M.A., Donato, A.L., Arterburn, J.B., Oprea, T.I., et al. (2010). The G Protein-Coupled Receptor GPR30 Inhibits Proliferation of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 70, 1184–1194.
- Ariemma, F., D'Esposito, V., Liguoro, D., Oriente, F., Cabaro, S., Liotti, A., Cimmino, I., Longo, M., Beguinot, F., Formisano, P., et al. (2016). Low-Dose Bisphenol-A Impairs Adipogenesis and Generates Dysfunctional 3T3-L1 Adipocytes. *PLOS ONE* 11, e0150762.
- Arner, P., and Spalding, K.L. (2010). Fat cell turnover in humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396, 101–104.

- Asselin-Labat, M.-L., Sutherland, K.D., Barker, H., Thomas, R., Shackleton, M., Forrest, N.C., Hartley, L., Robb, L., Grosveld, F.G., van der Wees, J., et al. (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat. Cell Biol.* *9*, 201–209.
- Asselin-Labat, M.-L., Vaillant, F., Sheridan, J.M., Pal, B., Wu, D., Simpson, E.R., Yasuda, H., Smyth, G.K., Martin, T.J., Lindeman, G.J., et al. (2010). Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* *465*, 798–802.
- Attia, S.M. (2010). Deleterious effects of reactive metabolites. *Oxid Med Cell Longev* *3*, 238–253.
- Aupperlee, M.D., Leipprandt, J.R., Bennett, J.M., Schwartz, R.C., and Haslam, S.Z. (2013). Amphiregulin mediates progesterone-induced mammary ductal development during puberty. *Breast Cancer Res.* *15*, R44.
- Bachelard-Cascales, E., Chapellier, M., Delay, E., Pochon, G., Voeltzel, T., Puisieux, A., Caron de Fromental, C., and Maguer-Satta, V. (2010). The CD10 enzyme is a key player to identify and regulate human mammary stem cells. *Stem Cells* *28*, 1081–1088.
- Badia, E., Oliva, J., Balaguer, P., and Cavallès, V. (2007). Tamoxifen resistance and epigenetic modifications in breast cancer cell lines. *Curr. Med. Chem.* *14*, 3035–3045.
- Bagatell, R., Khan, O., Paine-Murrieta, G., Taylor, C.W., Akinaga, S., and Whitesell, L. (2001). Destabilization of steroid receptors by heat shock protein 90-binding drugs: a ligand-independent approach to hormonal therapy of breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *7*, 2076–2084.
- Bai, S., and Cao, X. (2002). A nuclear antagonistic mechanism of inhibitory Smads in transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* *277*, 4176–4182.
- Ballard, O., and Morrow, A.L. (2013). Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. North Am.* *60*, 49–74.
- Barbareschi, M., Pecciarini, L., Cangì, M.G., Macrì, E., Rizzo, A., Viale, G., and Doglioni, C. (2001). p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *Am. J. Surg. Pathol.* *25*, 1054–1060.
- Barbieri, C.E., and Pietsenpol, J.A. (2006). p63 and epithelial biology. *Exp. Cell Res.* *312*, 695–706.
- Barkhem, T., Andersson-Ross, C., Höglund, M., and Nilsson, S. (1997). Characterization of the “estrogenicity” of tamoxifen and raloxifene in HepG2 cells: regulation of gene expression from an ERE controlled reporter vector versus regulation of the endogenous SHBG and PS2 genes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *62*, 53–64.
- Bartlett, J., Mallon, E., and Cooke, T. (2003). The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? *J. Pathol.* *199*, 411–417.
- Basson, M.A. (2012). Signaling in cell differentiation and morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *4*.
- Beck, A., Haeuw, J.-F., Wurch, T., Goetsch, L., Bailly, C., and Corvaia, N. (2010). The next generation of antibody-drug conjugates comes of age. *Discov Med* *10*, 329–339.

- Beleut, M., Rajaram, R.D., Caikovski, M., Ayyanan, A., Germano, D., Choi, Y., Schneider, P., and Briskin, C. (2010). Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 2989–2994.
- Ben-Jonathan, N., Hugo, E.R., and Brandebourg, T.D. (2009). Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* *304*, 49–54.
- Berkey, C.S., Gardner, J.D., Frazier, A.L., and Colditz, G.A. (2000). Relation of childhood diet and body size to menarche and adolescent growth in girls. *Am. J. Epidemiol.* *152*, 446–452.
- Berns, K., Horlings, H.M., Hennessy, B.T., Madiredjo, M., Hijmans, E.M., Beelen, K., Linn, S.C., Gonzalez-Angulo, A.M., Stemke-Hale, K., Hauptmann, M., et al. (2007). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* *12*, 395–402.
- Bernstein, J.L., WECARE Study Collaborative Group, and Concannon, P. (2017). ATM, radiation, and the risk of second primary breast cancer. *Int. J. Radiat. Biol.* *93*, 1121–1127.
- Besedovsky, L., Lange, T., and Born, J. (2012). Sleep and immune function. *Pflugers Arch* *463*, 121–137.
- Birnbaum, L.S., and Fenton, S.E. (2003). Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ. Health Perspect.* *111*, 389–394.
- Bjerkvig, R., Tysnes, B.B., Aboody, K.S., Najbauer, J., and Terzis, A.J.A. (2005). Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 899–904.
- Björnström, L., and Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol.* *19*, 833–842.
- Blaney Davidson, E.N., Vitters, E.L., van Lent, P.L.E.M., van de Loo, F.A.J., van den Berg, W.B., and van der Kraan, P.M. (2007). Elevated extracellular matrix production and degradation upon bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) stimulation point toward a role for BMP-2 in cartilage repair and remodeling. *Arthritis Res. Ther.* *9*, R102.
- Bocchinfuso, W.P., Lindzey, J.K., Hewitt, S.C., Clark, J.A., Myers, P.H., Cooper, R., and Korach, K.S. (2000). Induction of mammary gland development in estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology* *141*, 2982–2994.
- de Boer, M.C., Wörner, E.A., Verlaan, D., and van Leeuwen, P.A.M. (2017). The Mechanisms and Effects of Physical Activity on Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* *17*, 272–278.
- Bonnette, S.G., and Hadsell, D.L. (2001). Targeted disruption of the IGF-I receptor gene decreases cellular proliferation in mammary terminal end buds. *Endocrinology* *142*, 4937–4945.
- Bonor, J., Adams, E.L., Bragdon, B., Moseychuk, O., Czymmek, K.J., and Nohe, A. (2012). Initiation of BMP2 signaling in domains on the plasma membrane. *J. Cell. Physiol.* *227*, 2880–2888.
- Boucher, J.G., Ahmed, S., and Atlas, E. (2016). Bisphenol S Induces Adipogenesis in Primary Human Preadipocytes From Female Donors. *Endocrinology* *157*, 1397–1407.

- Bourguet, W., Germain, P., and Gronemeyer, H. (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol. Sci.* *21*, 381–388.
- Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., and Nohe, A. (2011). Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell. Signal.* *23*, 609–620.
- Braunstein, S., Karpisheva, K., Pola, C., Goldberg, J., Hochman, T., Yee, H., Cangiarella, J., Arju, R., Formenti, S.C., and Schneider, R.J. (2007). A Hypoxia-Controlled Cap-Dependent to Cap-Independent Translation Switch in Breast Cancer. *Molecular Cell* *28*, 501–512.
- Brenner, D.R., Brockton, N.T., Kotsopoulos, J., Cotterchio, M., Boucher, B.A., Courneya, K.S., Knight, J.A., Olivotto, I.A., Quan, M.L., and Friedenreich, C.M. (2016). Breast cancer survival among young women: a review of the role of modifiable lifestyle factors. *Cancer Causes Control* *27*, 459–472.
- Briskin, C., and Duss, S. (2007). Stem cells and the stem cell niche in the breast: an integrated hormonal and developmental perspective. *Stem Cell Rev* *3*, 147–156.
- Briskin, C., and O'Malley, B. (2010). *Hormone Action in the Mammary Gland*. Cold Spring Harb Perspect Biol *2*.
- Briskin, C., Park, S., Vass, T., Lydon, J.P., O'Malley, B.W., and Weinberg, R.A. (1998). A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 5076–5081.
- Briskin, C., Kaur, S., Chavarria, T.E., Binart, N., Sutherland, R.L., Weinberg, R.A., Kelly, P.A., and Ormandy, C.J. (1999). Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev. Biol.* *210*, 96–106.
- Briskin, C., Ayyannan, A., Nguyen, C., Heineman, A., Reinhardt, F., Tan, J., Dey, S.K., Dotto, G.P., Weinberg, R.A., and Jan, T. (2002). IGF-2 is a mediator of prolactin-induced morphogenesis in the breast. *Developmental Cell* *3*, 877–887.
- Britt, K., Ashworth, A., and Smalley, M. (2007). Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* *14*, 907–933.
- Broselid, S., Cheng, B., Sjöström, M., Lövgren, K., Klug-De Santiago, H.L.P., Belting, M., Jirström, K., Malmström, P., Olde, B., Bendahl, P.-O., et al. (2013). G protein-coupled estrogen receptor is apoptotic and correlates with increased distant disease-free survival of estrogen receptor-positive breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* *19*, 1681–1692.
- Brownfield, D.G., Venugopalan, G., Lo, A., Mori, H., Tanner, K., Fletcher, D.A., and Bissell, M.J. (2013). Patterned collagen fibers orient branching mammary epithelium through distinct signaling modules. *Curr. Biol.* *23*, 703–709.
- von Bubnoff, A., and Cho, K.W. (2001). Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev. Biol.* *239*, 1–14.
- Bunone, G., Briand, P.A., Miksicek, R.J., and Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* *15*, 2174–2183.

- Burnett, J.P., Korkaya, H., Ouzounova, M.D., Jiang, H., Conley, S.J., Newman, B.W., Sun, L., Connarn, J.N., Chen, C.-S., Zhang, N., et al. (2015). Trastuzumab resistance induces EMT to transform HER2(+) PTEN(-) to a triple negative breast cancer that requires unique treatment options. *Sci Rep* 5, 15821.
- Burstein, M.D., Tsimelzon, A., Poage, G.M., Covington, K.R., Contreras, A., Fuqua, S.A.W., Savage, M.I., Osborne, C.K., Hilsenbeck, S.G., Chang, J.C., et al. (2015). Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 21, 1688–1698.
- Caballero-Casero, N., Lunar, L., and Rubio, S. (2016). Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review. *Analytica Chimica Acta* 908, 22–53.
- Cabaton, N., Zalko, D., Rathahao, E., Canlet, C., Delous, G., Chagnon, M.-C., Cravedi, J.-P., and Perdu, E. (2008). Biotransformation of bisphenol F by human and rat liver subcellular fractions. *Toxicol In Vitro* 22, 1697–1704.
- Cabaton, N., Dumont, C., Severin, I., Perdu, E., Zalko, D., Cherkaoui-Malki, M., and Chagnon, M.-C. (2009). Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology* 255, 15–24.
- Cabodi, S., Moro, L., Baj, G., Smeriglio, M., Di Stefano, P., Gippone, S., Surico, N., Silengo, L., Turco, E., Tarone, G., et al. (2004). p130Cas interacts with estrogen receptor alpha and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells. *J. Cell. Sci.* 117, 1603–1611.
- Callery, E.M., Park, C.Y., Xu, X., Zhu, H., Smith, J.C., and Thomsen, G.H. (2012). Eps15R is required for bone morphogenetic protein signalling and differentially compartmentalizes with Smad proteins. *Open Biol* 2, 120060.
- Cariou, S., Donovan, J.C., Flanagan, W.M., Milic, A., Bhattacharya, N., and Slingerland, J.M. (2000). Down-regulation of p21WAF1/CIP1 or p27Kip1 abrogates antiestrogen-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9042–9046.
- Carmeci, C., Thompson, D.A., Ring, H.Z., Francke, U., and Weigel, R.J. (1997). Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 45, 607–617.
- Carpenter, K.D., and Korach, K.S. (2006). Potential biological functions emerging from the different estrogen receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092, 361–373.
- Castillo Sanchez, R., Gomez, R., and Perez Salazar, E. (2016). Bisphenol A Induces Migration through a GPER-, FAK-, Src-, and ERK2-Dependent Pathway in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 285–295.
- Catsburg, C., Miller, A.B., and Rohan, T.E. (2015). Active cigarette smoking and risk of breast cancer. *Int. J. Cancer* 136, 2204–2209.
- Chakrabarti, R., Wei, Y., Romano, R.-A., DeCoste, C., Kang, Y., and Sinha, S. (2012). Elf5 regulates mammary gland stem/progenitor cell fate by influencing notch signaling. *Stem Cells* 30, 1496–1508.
- Chamkasem, A., and Toniti, W. (2015). Sequence to structure approach of estrogen receptor alpha and ligand interactions. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 16, 2161–2166.

- Chantalat, E., Boudou, F., Laurell, H., Paliarne, G., Houtman, R., Melchers, D., Rochaix, P., Filleron, T., Stella, A., Burlet-Schiltz, O., et al. (2016). The AF-1-deficient estrogen receptor ER $\alpha$ 46 isoform is frequently expressed in human breast tumors. *Breast Cancer Res.* *18*, 123.
- Chapellier, M., Bachelard-Cascales, E., Schmidt, X., Clément, F., Treilleux, I., Delay, E., Jammot, A., Ménétrier-Caux, C., Pochon, G., Besançon, R., et al. (2015). Disequilibrium of BMP2 Levels in the Breast Stem Cell Niche Launches Epithelial Transformation by Overamplifying BMPR1B Cell Response. *Stem Cell Reports* *4*, 239–254.
- Chaudhri, R.A., Olivares-Navarrete, R., Cuenca, N., Hadadi, A., Boyan, B.D., and Schwartz, Z. (2012). Membrane estrogen signaling enhances tumorigenesis and metastatic potential of breast cancer cells via estrogen receptor- $\alpha$ 36 (ER $\alpha$ 36). *J. Biol. Chem.* *287*, 7169–7181.
- Chavey, C., Bibeau, F., Gourgou-Bourgade, S., Burlincho, S., Boissière, F., Laune, D., Roques, S., and Lazennec, G. (2007). Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Research* *9*, R15.
- Che, Q., Liu, B.-Y., Liao, Y., Zhang, H.-J., Yang, T.-T., He, Y.-Y., Xia, Y.-H., Lu, W., He, X.-Y., Chen, Z., et al. (2014). Activation of a positive feedback loop involving IL-6 and aromatase promotes intratumoral 17 $\beta$ -estradiol biosynthesis in endometrial carcinoma microenvironment. *International Journal of Cancer* *135*, 282–294.
- Che, Q., Xiao, X., Xu, J., Liu, M., Lu, Y., Liu, S., and Dong, X. (2019). 17 $\beta$ -Estradiol promotes endometrial cancer proliferation and invasion through IL-6 pathway. *Endocr Connect* *8*, 961–968.
- Chen, C.-C., Stairs, D.B., Boxer, R.B., Belka, G.K., Horseman, N.D., Alvarez, J.V., and Chodosh, L.A. (2012). Autocrine prolactin induced by the Pten-Akt pathway is required for lactation initiation and provides a direct link between the Akt and Stat5 pathways. *Genes & Development* *26*, 2154–2168.
- Chen, S., Guttridge, D.C., Tang, E., Shi, S., Guan, K., and Wang, C.Y. (2001). Suppression of tumor necrosis factor-mediated apoptosis by nuclear factor kappaB-independent bone morphogenetic protein/Smad signaling. *J. Biol. Chem.* *276*, 39259–39263.
- Chen, X., Xu, B., Han, X., Mao, Z., Talbot, P., Chen, M., Du, G., Chen, A., Liu, J., Wang, X., et al. (2013). Effect of bisphenol A on pluripotency of mouse embryonic stem cells and differentiation capacity in mouse embryoid bodies. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* *27*, 2249–2255.
- Chen, Z.-J., Wei, W., Jiang, G.-M., Liu, H., Wei, W.-D., Yang, X., Wu, Y.-M., Liu, H., Wong, C.K.C., Du, J., et al. (2016). Activation of GPER suppresses epithelial mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells via NF- $\kappa$ B signals. *Mol Oncol* *10*, 775–788.
- Cheung, C.P., Yu, S., Wong, K.B., Chan, L.W., Lai, F.M.M., Wang, X., Suetsugi, M., Chen, S., and Chan, F.L. (2005). Expression and functional study of estrogen receptor-related receptors in human prostatic cells and tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *90*, 1830–1844.
- Chia, S., Norris, B., Speers, C., Cheang, M., Gilks, B., Gown, A.M., Huntsman, D., Olivotto, I.A., Nielsen, T.O., and Gelmon, K. (2008). Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J. Clin. Oncol.* *26*, 5697–5704.
- Choi, M., Kipps, T., and Kurzrock, R. (2016). ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol. Cancer Ther.* *15*, 1781–1791.

- Choi, Y.S., Chakrabarti, R., Escamilla-Hernandez, R., and Sinha, S. (2009). E1f5 conditional knockout mice reveal its role as a master regulator in mammary alveolar development: failure of Stat5 activation and functional differentiation in the absence of E1f5. *Developmental Biology* 329, 227–241.
- Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., and Palucka, A.K. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat. Immunol.* 1, 510–514.
- Chow, D., He, X., Snow, A.L., Rose-John, S., and Garcia, K.C. (2001). Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex. *Science* 291, 2150–2155.
- Chu, D.-T., Nguyen Thi Phuong, T., Tien, N.L.B., Tran, D.-K., Nguyen, T.-T., Thanh, V.V., Luu Quang, T., Minh, L.B., Pham, V.H., Ngoc, V.T.N., et al. (2019). The Effects of Adipocytes on the Regulation of Breast Cancer in the Tumor Microenvironment: An Update. *Cells* 8.
- Ciarloni, L., Mallepell, S., and Briskin, C. (2007). Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 5455–5460.
- Cimmino, I., Oriente, F., D’Esposito, V., Liguoro, D., Liguoro, P., Ambrosio, M.R., Cabaro, S., D’Andrea, F., Beguinot, F., Formisano, P., et al. (2019). Low-dose Bisphenol-A regulates inflammatory cytokines through GPR30 in mammary adipose cells. *J. Mol. Endocrinol.* 63, 273–283.
- Clarke, R.B., Howell, A., Potten, C.S., and Anderson, E. (1997). Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res.* 57, 4987–4991.
- Clément, F., Xu, X., Donini, C.F., Clément, A., Omarjee, S., Delay, E., Treilleux, I., Fervers, B., Le Romancer, M., Cohen, P.A., et al. (2017). Long-term exposure to bisphenol A or benzo(a)pyrene alters the fate of human mammary epithelial stem cells in response to BMP2 and BMP4, by pre-activating BMP signaling. *Cell Death Differ* 24, 155–166.
- Cogliano, V., Grosse, Y., Baan, R., Straif, K., Secretan, B., El Ghissassi, F., and WHO International Agency for Research on Cancer (2005). Carcinogenicity of combined oestrogen-progestagen contraceptives and menopausal treatment. *Lancet Oncol.* 6, 552–553.
- Colditz, G.A., Bohlke, K., and Berkey, C.S. (2014). Breast cancer risk accumulation starts early: prevention must also. *Breast Cancer Res. Treat.* 145, 567–579.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2012). Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol.* 13, 1141–1151.
- Combarrous, Y., and Nguyen, T.M.D. (2019). Comparative Overview of the Mechanisms of Action of Hormones and Endocrine Disruptor Compounds. *Toxics* 7.
- Corradini, E., Babitt, J.L., and Lin, H.Y. (2009). THE RGM/DRAGON FAMILY OF BMP CO-RECEPTORS. *Cytokine Growth Factor Rev* 20, 389–398.
- Curtis, C., Shah, S.P., Chin, S.-F., Turashvili, G., Rueda, O.M., Dunning, M.J., Speed, D., Lynch, A.G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., et al. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486, 346–352.

Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A.Z., Müller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., Ellenberg, J., Hyman, A.A., and Gerlich, D.W. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature* 535, 308–312.

Dagdemiir, A., Durif, J., Ngollo, M., Bignon, Y.-J., and Bernard-Gallon, D. (2013). Breast cancer: mechanisms involved in action of phytoestrogens and epigenetic changes. *In Vivo* 27, 1–9.

Dai, X., Chen, A., and Bai, Z. (2014). Integrative investigation on breast cancer in ER, PR and HER2-defined subgroups using mRNA and miRNA expression profiling. *Sci Rep* 4, 6566.

Dai, X., Xiang, L., Li, T., and Bai, Z. (2016). Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer* 7, 1281–1294.

D’Alterio, C., Scala, S., Sozzi, G., Roz, L., and Bertolini, G. (2020). Paradoxical effects of chemotherapy on tumor relapse and metastasis promotion. *Semin. Cancer Biol.* 60, 351–361.

Daniel, C.W., and Silberstein, G.B. (2000). Working with the Mouse Mammary End Bud. In *Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer Research*, M.M. Ip, and B.B. Asch, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 155–162.

Daniel, C.W., Silberstein, G.B., and Strickland, P. (1987). Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography. *Cancer Res.* 47, 6052–6057.

Daubisse-Marliac, L., Delafosse, P., Boitard, J.B., Poncet, F., Grosclaude, P., and Colonna, M. (2011). Breast cancer incidence and time trend in France from 1990 to 2007: a population-based study from two French cancer registries. *Ann. Oncol.* 22, 329–334.

De Francesco, E.M., Pellegrino, M., Santolla, M.F., Lappano, R., Ricchio, E., Abonante, S., and Maggiolini, M. (2014). GPER mediates activation of HIF1 $\alpha$ /VEGF signaling by estrogens. *Cancer Res.* 74, 4053–4064.

Delpuch, Y., Wu, Y., Hess, K.R., Hsu, L., Ayers, M., Natowicz, R., Coutant, C., Rouzier, R., Barranger, E., Hortobagyi, G.N., et al. (2012). Ki67 expression in the primary tumor predicts for clinical benefit and time to progression on first-line endocrine therapy in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 135, 619–627.

Delrieu, L., Pérol, O., Fervers, B., Friedenreich, C., Vallance, J., Febvey-Combes, O., Pérol, D., Canada, B., Roitmann, E., Dufresne, A., et al. (2018). A Personalized Physical Activity Program With Activity Trackers and a Mobile Phone App for Patients With Metastatic Breast Cancer: Protocol for a Single-Arm Feasibility Trial. *JMIR Res Protoc* 7, e10487.

Denduluri, S.K., Idowu, O., Wang, Z., Liao, Z., Yan, Z., Mohammed, M.K., Ye, J., Wei, Q., Wang, J., Zhao, L., et al. (2015). Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance. *Genes Dis* 2, 13–25.

Deng, H., Zhang, X.-T., Wang, M.-L., Zheng, H.-Y., Liu, L.-J., and Wang, Z.-Y. (2014). ER- $\alpha$ 36-mediated rapid estrogen signaling positively regulates ER-positive breast cancer stem/progenitor cells. *PLoS ONE* 9, e88034.

Deng, Q., Jiang, G., Wu, Y., Li, J., Liang, W., Chen, L., Su, Q., Li, W., Du, J., Wong, C.K.C., et al. (2018). GPER/Hippo-YAP signal is involved in Bisphenol S induced migration of triple negative breast cancer (TNBC) cells. *J. Hazard. Mater.* 355, 1–9.

- Deome, K.B., Faulkin, L.J., Bern, H.A., and Blair, P.B. (1959). Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res.* *19*, 515–520.
- DeSantis, C., Siegel, R., Bandi, P., and Jemal, A. (2011). Breast cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin* *61*, 409–418.
- DeSantis, C., Ma, J., Bryan, L., and Jemal, A. (2014). Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* *64*, 52–62.
- Dethlefsen, C., Højfeldt, G., and Hojman, P. (2013). The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *138*, 657–664.
- Deugnier, M.-A., Teulière, J., Faraldo, M.M., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2002). The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res* *4*, 224–230.
- Ding, X., Wu, J., and Jiang, C. (2010). ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life Sci.* *86*, 631–637.
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y.Y., Meulle, A., Salles, B., Le Gonidec, S., et al. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* *71*, 2455–2465.
- Dittrich, E., Rose-John, S., Gerhartz, C., Müllberg, J., Stoyan, T., Yasukawa, K., Heinrich, P.C., and Graeve, L. (1994). Identification of a region within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand-induced endocytosis of the IL-6 receptor. *J. Biol. Chem.* *269*, 19014–19020.
- Docquier, A., Harmand, P.-O., Fritsch, S., Chanrion, M., Darbon, J.-M., and Cavallès, V. (2010). The transcriptional coregulator RIP140 represses E2F1 activity and discriminates breast cancer subtypes. *Clin. Cancer Res.* *16*, 2959–2970.
- Dontu, G., Abdallah, W.M., Foley, J.M., Jackson, K.W., Clarke, M.F., Kawamura, M.J., and Wicha, M.S. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* *17*, 1253–1270.
- Du, J., Chen, X., Liang, X., Zhang, G., Xu, J., He, L., Zhan, Q., Feng, X.-Q., Chien, S., and Yang, C. (2011). Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 9466–9471.
- Dumont, C., Perdu, E., de Sousa, G., Debrauwer, L., Rahmani, R., Cravedi, J.-P., and Chagnon, M.-C. (2011). Bis(hydroxyphenyl)methane-bisphenol F-metabolism by the HepG2 human hepatoma cell line and cryopreserved human hepatocytes. *Drug Chem Toxicol* *34*, 445–453.
- Dunbar, M.E., and Wysolmerski, J.J. (1999). Parathyroid hormone-related protein: a developmental regulatory molecule necessary for mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *4*, 21–34.
- Dunnwald, L.K., Rossing, M.A., and Li, C.I. (2007). Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* *9*, R6.

- Durando, M., Kass, L., Piva, J., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Luque, E.H., and Muñoz-de-Toro, M. (2007). Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ. Health Perspect.* *115*, 80–86.
- Ehrlich, M. (2016). Endocytosis and trafficking of BMP receptors: Regulatory mechanisms for fine-tuning the signaling response in different cellular contexts. *Cytokine Growth Factor Rev.* *27*, 35–42.
- Eichten, A., Su, J., Adler, A.P., Zhang, L., Ioffe, E., Parveen, A.A., Yancopoulos, G.D., Rudge, J., Lowy, I., Lin, H.C., et al. (2016). Resistance to Anti-VEGF Therapy Mediated by Autocrine IL6/STAT3 Signaling and Overcome by IL6 Blockade. *Cancer Res.* *76*, 2327–2339.
- Eirew, P., Stingl, J., Raouf, A., Turashvili, G., Aparicio, S., Emerman, J.T., and Eaves, C.J. (2008). A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability. *Nat. Med.* *14*, 1384–1389.
- Eketunde, A.O. (2020). Diabetes as a Risk Factor for Breast Cancer. *Cureus* *12*, e8010.
- Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M.-J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., and Habert, R. (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil. Steril.* *103*, 11–21.
- Engin, A. (2017). Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. *Adv. Exp. Med. Biol.* *960*, 571–606.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* *126*, 677–689.
- Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J.A., and Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* *38*, 698–707.
- Esquivel-Velázquez, M., Ostoa-Saloma, P., Palacios-Arreola, M.I., Nava-Castro, K.E., Castro, J.I., and Morales-Montor, J. (2015). The role of cytokines in breast cancer development and progression. *J. Interferon Cytokine Res.* *35*, 1–16.
- Euhus, D.M., and Robinson, L. (2013). Genetic predisposition syndromes and their management. *Surg. Clin. North Am.* *93*, 341–362.
- Faraldo, M.M., Teulière, J., Deugnier, M.-A., Taddei-De La Hossieraye, I., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2005). Myoepithelial cells in the control of mammary development and tumorigenesis: data from genetically modified mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *10*, 211–219.
- Fata, J.E., Kong, Y.Y., Li, J., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Moorehead, R.A., Elliott, R., Scully, S., Voura, E.B., Lacey, D.L., et al. (2000). The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* *103*, 41–50.
- Feldman, M., Ruan, W., Tappin, I., Wiczorek, R., and Kleinberg, D.L. (1999). The effect of GH on estrogen receptor expression in the rat mammary gland. *J. Endocrinol.* *163*, 515–522.
- Feng, Y., Manka, D., Wagner, K.-U., and Khan, S.A. (2007). Estrogen receptor-alpha expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 14718–14723.

- Fernandez, S.V., and Russo, J. (2010). Estrogen and Xenoestrogens in Breast Cancer. *Toxicol Pathol* 38, 110–122.
- Fernandez, S.V., Huang, Y., Snider, K.E., Zhou, Y., Pogash, T.J., and Russo, J. (2012). Expression and DNA methylation changes in human breast epithelial cells after bisphenol A exposure. *Int. J. Oncol.* 41, 369–377.
- Fernandez-Valdivia, R., Mukherjee, A., Creighton, C.J., Buser, A.C., DeMayo, F.J., Edwards, D.P., and Lydon, J.P. (2008). Transcriptional response of the murine mammary gland to acute progesterone exposure. *Endocrinology* 149, 6236–6250.
- Fernandez-Valdivia, R., Mukherjee, A., Ying, Y., Li, J., Paquet, M., DeMayo, F.J., and Lydon, J.P. (2009). The RANKL signaling axis is sufficient to elicit ductal side-branching and alveologenesis in the mammary gland of the virgin mouse. *Dev. Biol.* 328, 127–139.
- Filardo, E.J. (2018). A role for G-protein coupled estrogen receptor (GPER) in estrogen-induced carcinogenesis: Dysregulated glandular homeostasis, survival and metastasis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 176, 38–48.
- Filardo, E.J., and Thomas, P. (2005). GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 362–367.
- Filardo, E., Quinn, J., Pang, Y., Graeber, C., Shaw, S., Dong, J., and Thomas, P. (2007). Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* 148, 3236–3245.
- Filardo, E.J., Quinn, J.A., Frackelton, A.R., and Bland, K.I. (2002). Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol. Endocrinol.* 16, 70–84.
- Filardo, E.J., Graeber, C.T., Quinn, J.A., Resnick, M.B., Giri, D., DeLellis, R.A., Steinhoff, M.M., and Sabo, E. (2006). Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin. Cancer Res.* 12, 6359–6366.
- Fillmore, C., and Kuperwasser, C. (2007). Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? *Breast Cancer Res.* 9, 303.
- Fitzpatrick, V., Fourel, L., Destaing, O., Gilde, F., Albigès-Rizo, C., Picart, C., and Boudou, T. (2017). Signal mingle: Micropatterns of BMP-2 and fibronectin on soft biopolymeric films regulate myoblast shape and SMAD signaling. *Sci Rep* 7, 41479.
- Fleury, V., and Watanabe, T. (2002). Morphogenesis of fingers and branched organs: how collagen and fibroblasts break the symmetry of growing biological tissue. *C. R. Biol.* 325, 571–583.
- Flint, D.J., Boutinaud, M., Tonner, E., Wilde, C.J., Hurley, W., Accorsi, P.A., Kolb, A.F., Whitelaw, C.B.A., Beattie, J., and Allan, G.J. (2005). Insulin-like growth factor binding proteins initiate cell death and extracellular matrix remodeling in the mammary gland. *Domestic Animal Endocrinology* 29, 274–282.
- Fliss, A.E., Benzeno, S., Rao, J., and Caplan, A.J. (2000). Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 72, 223–230.

- Flouriou, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V., and Gannon, F. (2000). Identification of a new isoform of the human estrogen receptor- $\alpha$  (hER- $\alpha$ ) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER- $\alpha$  activation function 1. *EMBO J.* *19*, 4688–4700.
- Foschini, M.P., Scarpellini, F., Gown, A.M., and Eusebi, V. (2000). Differential Expression of Myoepithelial Markers in Salivary, Sweat and Mammary Glands. *Int. J. Surg. Pathol.* *8*, 29–37.
- Foulkes, W.D., Stefansson, I.M., Chappuis, P.O., Bégin, L.R., Goffin, J.R., Wong, N., Trudel, M., and Akslen, L.A. (2003). Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *95*, 1482–1485.
- Francis, W.R., Owens, S.E., Wilde, C., Pallister, I., Kanamarlapudi, V., Zou, W., and Xia, Z. (2014). The temporal expression of estrogen receptor  $\alpha$ -36 and runx2 in human bone marrow derived stromal cells during osteogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *453*, 552–556.
- Fu, S.C., Wong, Y.P., Chan, B.P., Pau, H.M., Cheuk, Y.C., Lee, K.M., and Chan, K.-M. (2003). The roles of bone morphogenetic protein (BMP) 12 in stimulating the proliferation and matrix production of human patellar tendon fibroblasts. *Life Sci.* *72*, 2965–2974.
- Gallardo, A., Lerma, E., Escuin, D., Tibau, A., Muñoz, J., Ojeda, B., Barnadas, A., Adrover, E., Sánchez-Tejada, L., Giner, D., et al. (2012). Increased signalling of EGFR and IGF1R, and deregulation of PTEN/PI3K/Akt pathway are related with trastuzumab resistance in HER2 breast carcinomas. *Br. J. Cancer* *106*, 1367–1373.
- García-Arevalo, M., Alonso-Magdalena, P., Santos, J.R.D., Quesada, I., Carneiro, E.M., and Nadal, A. (2014). Exposure to Bisphenol-A during Pregnancy Partially Mimics the Effects of a High-Fat Diet Altering Glucose Homeostasis and Gene Expression in Adult Male Mice. *PLOS ONE* *9*, e100214.
- Gayraud Véronique, Lacroix Marlène Z., Grandin Flore C., Collet Séverine H., Mila Hanna, Viguié Catherine, Gély Clémence A., Rabozzi Blandine, Bouchard Michèle, Léandri Roger, et al. Oral Systemic Bioavailability of Bisphenol A and Bisphenol S in Pigs. *Environmental Health Perspectives* *127*, 077005.
- Gazzerro, E., and Canalis, E. (2006). Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord* *7*, 51–65.
- Geng, A., Wu, T., Cai, C., Song, W., Wang, J., Yu, Q.C., and Zeng, Y.A. (2020). A novel function of R-spondin1 in regulating estrogen receptor expression independent of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Elife* *9*.
- Gerber, H.-P., and Ferrara, N. (2005). Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res.* *65*, 671–680.
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., and Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* *31*, 13–20.
- Ghandadi, M., and Sahebkar, A. (2016). Interleukin-6: A Critical Cytokine in Cancer Multidrug Resistance. *Curr. Pharm. Des.* *22*, 518–526.
- Giguère, V., Yang, N., Segui, P., and Evans, R.M. (1988). Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* *331*, 91–94.

- Gilde, F., Fourel, L., Guillot, R., Pignot-Paintrand, I., Okada, T., Fitzpatrick, V., Boudou, T., Albiges-Rizo, C., and Picart, C. (2016). Stiffness-dependent cellular internalization of matrix-bound BMP-2 and its relation to Smad and non-Smad signaling. *Acta Biomater* 46, 55–67.
- Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., et al. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555–567.
- Gleason, R.J., Akintobi, A.M., Grant, B.D., and Padgett, R.W. (2014). BMP signaling requires retromer-dependent recycling of the type I receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 2578–2583.
- Glukhova, M., Koteliansky, V., Sastre, X., and Thiery, J.P. (1995). Adhesion systems in normal breast and in invasive breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* 146, 706–716.
- Goh, J.B., Wallace, D.F., Hong, W., and Nathan Subramaniam, V. (2015). Endofin, a novel BMP-SMAD regulator of the iron-regulatory hormone, hepcidin. *Sci Rep* 5.
- Gómez-Cuadrado, L., Tracey, N., Ma, R., Qian, B., and Brunton, V.G. (2017). Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis Model Mech* 10, 1061–1074.
- Gould, J.C., Leonard, L.S., Maness, S.C., Wagner, B.L., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonnell, D.P., and Gaido, K.W. (1998). Bisphenol A interacts with the estrogen receptor  $\alpha$  in a distinct manner from estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology* 142, 203–214.
- Gram, I.T., Braaten, T., Terry, P.D., Sasco, A.J., Adami, H.-O., Lund, E., and Weiderpass, E. (2005). Breast cancer risk among women who start smoking as teenagers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14, 61–66.
- Gramec Skledar, D., Troberg, J., Lavdas, J., Peterlin Mašič, L., and Finel, M. (2015). Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10. *Xenobiotica* 45, 511–519.
- Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., and Shine, J. (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1150–1154.
- Grockowiak, E., Laperrousaz, B., Jeanpierre, S., Voeltzel, T., Guyot, B., Gobert, S., Nicolini, F.E., and Maguer-Satta, V. (2017). Immature CML cells implement a BMP autocrine loop to escape TKI treatment. *Blood* 130, 2860–2871.
- Grossmann, M.E., and Cleary, M.P. (2012). The balance between leptin and adiponectin in the control of carcinogenesis - focus on mammary tumorigenesis. *Biochimie* 94, 2164–2171.
- Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., and Huber, J.C. (2002). Production and actions of estrogens. *N. Engl. J. Med.* 346, 340–352.
- Gruber, C.J., Gruber, D.M., Gruber, I.M.L., Wieser, F., and Huber, J.C. (2004). Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 73–78.
- Gudjonsson, T., Rønnov-Jessen, L., Villadsen, R., Rank, F., Bissell, M.J., and Petersen, O.W. (2002). Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *J. Cell. Sci.* 115, 39–50.

- Gudjonsson, T., Adriance, M.C., Sternlicht, M.D., Petersen, O.W., and Bissell, M.J. (2005). Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10, 261–272.
- Guo, D., Huang, J., and Gong, J. (2012a). Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is required for migration and invasion of breast cancer. *Mol. Cell. Biochem.* 363, 179–190.
- Guo, M., Wang, M., Deng, H., Zhang, X., and Wang, Z.-Y. (2013a). A novel anticancer agent Brousoflavonol B downregulates estrogen receptor (ER)- $\alpha$ 36 expression and inhibits growth of ER-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 714, 56–64.
- Guo, M., Wang, M., Zhang, X., Deng, H., and Wang, Z.-Y. (2013b). Brousoflavonol B restricts growth of ER-negative breast cancer stem-like cells. *Anticancer Res* 33, 1873–1879.
- Guo, Y., Xu, F., Lu, T., Duan, Z., and Zhang, Z. (2012b). Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat. Rev.* 38, 904–910.
- Gupta, G.P., and Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679–695.
- Gusterson, B.A., Warburton, M.J., Mitchell, D., Ellison, M., Neville, A.M., and Rudland, P.S. (1982). Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the normal breast and in benign and malignant breast diseases. *Cancer Res.* 42, 4763–4770.
- Guzman, A., Femiak, M.Z., Boergemann, J.H., Paschkowsky, S., Kreuzaler, P.A., Fratzi, P., Harms, G.S., and Knaus, P. (2012). SMAD versus Non-SMAD Signaling Is Determined by Lateral Mobility of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Receptors. *J. Biol. Chem.* 287, 39492–39504.
- Gyamfi, J., Lee, Y.-H., Eom, M., and Choi, J. (2018). Interleukin-6/STAT3 signalling regulates adipocyte induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Sci Rep* 8, 8859.
- Haeuw, J.-F., Caussanel, V., and Beck, A. (2009). [Immunoconjugates, drug-armed antibodies to fight against cancer]. *Med Sci (Paris)* 25, 1046–1052.
- Hafezi, S.A., and Abdel-Rahman, W.M. (2019). The Endocrine Disruptor Bisphenol A (BPA) Exerts a Wide Range of Effects in Carcinogenesis and Response to Therapy. *Curr Mol Pharmacol* 12, 230–238.
- Haldosén, L.-A., Zhao, C., and Dahlman-Wright, K. (2014). Estrogen receptor beta in breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382, 665–672.
- Hall, J.M., Couse, J.F., and Korach, K.S. (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 36869–36872.
- Hamilton, D.J., Minze, L.J., Kumar, T., Cao, T.N., Lyon, C.J., Geiger, P.C., Hsueh, W.A., and Gupte, A.A. (2016). Estrogen receptor alpha activation enhances mitochondrial function and systemic metabolism in high-fat-fed ovariectomized mice. *Physiol Rep* 4.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Handorf, A.M., Zhou, Y., Halanski, M.A., and Li, W.-J. (2015). Tissue Stiffness Dictates Development, Homeostasis, and Disease Progression. *Organogenesis* 11, 1–15.
- Hanioka, N., Naito, T., and Narimatsu, S. (2008). Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere* 74, 33–36.

Hartung, A., Bitton-Worms, K., Rechtman, M.M., Wenzel, V., Boergermann, J.H., Hassel, S., Henis, Y.I., and Knaus, P. (2006). Different Routes of Bone Morphogenic Protein (BMP) Receptor Endocytosis Influence BMP Signaling. *Mol Cell Biol* 26, 7791–7805.

Hayashi, Y., Katoh, T., Asano, K., Onozaki, A., Sakurai, K., Asahi, K., Nakayama, M., and Watanabe, T. (2012). Mechanical stretch down-regulates expression of the Smad6 gene in cultured rat mesangial cells. *Clin. Exp. Nephrol.* 16, 690–696.

He, Y.-Y., Cai, B., Yang, Y.-X., Liu, X.-L., and Wan, X.-P. (2009). Estrogenic G protein-coupled receptor 30 signaling is involved in regulation of endometrial carcinoma by promoting proliferation, invasion potential, and interleukin-6 secretion via the MEK/ERK mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Sci.* 100, 1051–1061.

Hecht, S.S. (2002). Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environ. Mol. Mutagen.* 39, 119–126.

Heckman, B.M., Chakravarty, G., Vargo-Gogola, T., Gonzales-Rimbau, M., Hadsell, D.L., Lee, A.V., Settleman, J., and Rosen, J.M. (2007). Crosstalk between the p190-B RhoGAP and IGF signaling pathways is required for embryonic mammary bud development. *Dev Biol* 309, 137–149.

Heinrich, P.C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334 ( Pt 2), 297–314.

Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374, 1–20.

Heinze, J.E. (2003). Adverse health effects of bisphenol A in early life. *Environ. Health Perspect.* 111, A382-383; author reply A383.

Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., et al. (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.* 87, 905–931.

Hens, J., Dann, P., Hiremath, M., Pan, T.-C., Chodosh, L., and Wysolmerski, J. (2009). Analysis of Gene Expression in PTHrP-/- Mammary Buds Supports a Role for BMP Signaling and MMP2 in the Initiation of Ductal Morphogenesis. *Dev Dyn* 238, 2713–2724.

Hens, J.R., Dann, P., Zhang, J.-P., Harris, S., Robinson, G.W., and Wysolmerski, J. (2007). BMP4 and PTHrP interact to stimulate ductal outgrowth during embryonic mammary development and to inhibit hair follicle induction. *Development* 134, 1221–1230.

Herbstman, J.B., Sjödin, A., Kurzon, M., Lederman, S.A., Jones, R.S., Rauh, V., Needham, L.L., Tang, D., Niedzwiecki, M., Wang, R.Y., et al. (2010). Prenatal exposure to PBDEs and neurodevelopment. *Environ. Health Perspect.* 118, 712–719.

Hilakivi-Clarke, L. (2014). Maternal exposure to diethylstilbestrol during pregnancy and increased breast cancer risk in daughters. *Breast Cancer Res.* 16, 208.

Hirata, S., Shoda, T., Kato, J., and Hoshi, K. (2001). The multiple untranslated first exons system of the human estrogen receptor beta (ER beta) gene. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 78, 33–40.

Hiremath, M., Dann, P., Fischer, J., Butterworth, D., Boras-Granic, K., Hens, J., Van Houten, J., Shi, W., and Wysolmerski, J. (2012). Parathyroid hormone-related protein activates Wnt signaling to specify the embryonic mammary mesenchyme. *Development* 139, 4239–4249.

Hirschhorn, T., Levi-Hofman, M., Danziger, O., Smorodinsky, N.I., and Ehrlich, M. (2017). Differential molecular regulation of processing and membrane expression of Type-I BMP receptors: implications for signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2645–2662.

Hou, C.-H., Hsiao, Y.-C., Fong, Y.-C., and Tang, C.-H. (2009). Bone morphogenetic protein-2 enhances the motility of chondrosarcoma cells via activation of matrix metalloproteinase-13. *Bone* 44, 233–242.

Hou, J., Deng, M., Li, X., Liu, W., Chu, X., Wang, J., Chen, F., and Meng, S. (2015). Chaperone gp96 mediates ER- $\alpha$ 36 cell membrane expression. *Oncotarget* 6, 31857–31867.

Hsu, L.-H., Chu, N.-M., Lin, Y.-F., and Kao, S.-H. (2019). G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 20.

Huang, R.-L., Chen, G., Wang, W., Herller, T., Xie, Y., Gu, B., and Li, Q. (2015). Synergy between IL-6 and soluble IL-6 receptor enhances bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge-induced bone regeneration via regulation of BMPRIA distribution and degradation. *Biomaterials* 67, 308–322.

Huang, R.-L., Sun, Y., Ho, C.-K., Liu, K., Tang, Q.-Q., Xie, Y., and Li, Q. (2018). IL-6 potentiates BMP-2-induced osteogenesis and adipogenesis via two different BMPR1A-mediated pathways. *Cell Death Dis* 9, 144.

Huang, W., Zhao, C., Zhong, H., Zhang, S., Xia, Y., and Cai, Z. (2019). Bisphenol S induced epigenetic and transcriptional changes in human breast cancer cell line MCF-7. *Environmental Pollution* 246, 697–703.

Huggins, C., and Yang, N.C. (1962). Induction and extinction of mammary cancer. A striking effect of hydrocarbons permits analysis of mechanisms of causes and cure of breast cancer. *Science* 137, 257–262.

Humphreys, R.C., Lydon, J.P., O'Malley, B.W., and Rosen, J.M. (1997). Use of PRKO mice to study the role of progesterone in mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2, 343–354.

Ignatov, A., Ignatov, T., Roessner, A., Costa, S.D., and Kalinski, T. (2010). Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 123, 87–96.

Iliopoulos, D., Hirsch, H.A., and Struhl, K. (2009). An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 139, 693–706.

Ingman, W.V., Wyckoff, J., Gouon-Evans, V., Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages promote collagen fibrillogenesis around terminal end buds of the developing mammary gland. *Dev. Dyn.* 235, 3222–3229.

Israel, D.I., Nove, J., Kerns, K.M., Kaufman, R.J., Rosen, V., Cox, K.A., and Wozney, J.M. (1996). Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors* 13, 291–300.

- Ito, Y., and Miyazono, K. (2003). RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *13*, 43–47.
- Jacenic, D., Cygankiewicz, A.I., and Krajewska, W.M. (2016). The G protein-coupled estrogen receptor as a modulator of neoplastic transformation. *Mol. Cell. Endocrinol.* *429*, 10–18.
- Jaeg, J.P., Perdu, E., Dolo, L., Debrauwer, L., Cravedi, J.-P., and Zalko, D. (2004). Characterization of new bisphenol a metabolites produced by CD1 mice liver microsomes and S9 fractions. *J. Agric. Food Chem.* *52*, 4935–4942.
- Javed, A., and Lteif, A. (2013). Development of the human breast. *Semin Plast Surg* *27*, 5–12.
- Jeffy, B.D., Chirnomas, R.B., and Romagnolo, D.F. (2002). Epigenetics of breast cancer: polycyclic aromatic hydrocarbons as risk factors. *Environ. Mol. Mutagen.* *39*, 235–244.
- Jenkins, S., Wang, J., Eltoum, I., Desmond, R., and Lamartiniere, C.A. (2011). Chronic Oral Exposure to Bisphenol A Results in a Nonmonotonic Dose Response in Mammary Carcinogenesis and Metastasis in MMTV-erbB2 Mice. *Environ Health Perspect* *119*, 1604–1609.
- Jeong, B.-C., Lee, Y.-S., Park, Y.-Y., Bae, I.-H., Kim, D.-K., Koo, S.-H., Choi, H.-R., Kim, S.-H., Franceschi, R.T., Koh, J.-T., et al. (2009). The orphan nuclear receptor estrogen receptor-related receptor gamma negatively regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and bone formation. *J. Biol. Chem.* *284*, 14211–14218.
- Jia, M., Dahlman-Wright, K., and Gustafsson, J.-Å. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *29*, 557–568.
- Jin, X., and Mu, P. (2015). Targeting Breast Cancer Metastasis. *Breast Cancer (Auckl)* *9*, 23–34.
- Jindal, S., Gao, D., Bell, P., Albrektsen, G., Edgerton, S.M., Ambrosone, C.B., Thor, A.D., Borges, V.F., and Schedin, P. (2014). Postpartum breast involution reveals regression of secretory lobules mediated by tissue-remodeling. *Breast Cancer Research: BCR* *16*, R31.
- Johnson, K.C., Miller, A.B., Collishaw, N.E., Palmer, J.R., Hammond, S.K., Salmon, A.G., Cantor, K.P., Miller, M.D., Boyd, N.F., Millar, J., et al. (2011). Active smoking and secondhand smoke increase breast cancer risk: the report of the Canadian Expert Panel on Tobacco Smoke and Breast Cancer Risk (2009). *Tob Control* *20*, e2.
- Johnson, M.D., Zuo, H., Lee, K.-H., Trebley, J.P., Rae, J.M., Weatherman, R.V., Desta, Z., Flockhart, D.A., and Skaar, T.C. (2004). Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.* *85*, 151–159.
- Jones, S.A., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N., and Fuller, G.M. (2001). The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J.* *15*, 43–58.
- Jonsson, P., Katchy, A., and Williams, C. (2014). Support of a bi-faceted role of estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) in ER $\alpha$ -positive breast cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* *21*, 143–160.
- Jorgensen, E.M., Alderman, M.H., and Taylor, H.S. (2016). Preferential epigenetic programming of estrogen response after in utero xenoestrogen (bisphenol-A) exposure. *The FASEB Journal* *30*, 3194–3201.

Joshi, P.A., Jackson, H.W., Beristain, A.G., Di Grappa, M.A., Mote, P.A., Clarke, C.L., Stingl, J., Waterhouse, P.D., and Khokha, R. (2010). Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature* 465, 803–807.

Joshi, P.A., Waterhouse, P.D., Kannan, N., Narala, S., Fang, H., Di Grappa, M.A., Jackson, H.W., Penninger, J.M., Eaves, C., and Khokha, R. (2015). RANK Signaling Amplifies WNT-Responsive Mammary Progenitors through R-SPONDIN1. *Stem Cell Reports* 5, 31–44.

Jostock, T., Müllberg, J., Ozbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M.F., and Rose-John, S. (2001). Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur. J. Biochem.* 268, 160–167.

Kahlert, S., Nuedling, S., van Eickels, M., Vetter, H., Meyer, R., and Grohe, C. (2000). Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 18447–18453.

Kamimura, D., Ishihara, K., and Hirano, T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 149, 1–38.

Kampa, M., Pelekanou, V., Notas, G., Stathopoulos, E.N., and Castanas, E. (2013). The estrogen receptor: two or more molecules, multiple variants, diverse localizations, signaling and functions. Are we undergoing a paradigm-shift as regards their significance in breast cancer? *Hormones (Athens)* 12, 69–85.

Kang, L., Zhang, X., Xie, Y., Tu, Y., Wang, D., Liu, Z., and Wang, Z.-Y. (2010). Involvement of estrogen receptor variant ER-alpha36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling. *Mol. Endocrinol.* 24, 709–721.

Kang, L., Guo, Y., Zhang, X., Meng, J., and Wang, Z.-Y. (2011a). A Positive Cross-Regulation of HER2 and ER- $\alpha$ 36 Controls ALDH1 Positive Breast Cancer Cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127, 262–268.

Kang, L., Wang, L., and Wang, Z.-Y. (2011b). Opposite regulation of estrogen receptor- $\alpha$  and its variant ER- $\alpha$ 36 by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Oncol Lett* 2, 337–341.

Karapanou, O., and Papadimitriou, A. (2010). Determinants of menarche. *Reprod Biol Endocrinol* 8, 115.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., et al. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491–1494.

Katsuno, Y., Hanyu, A., Kanda, H., Ishikawa, Y., Akiyama, F., Iwase, T., Ogata, E., Ehata, S., Miyazono, K., and Imamura, T. (2008). Bone morphogenetic protein signaling enhances invasion and bone metastasis of breast cancer cells through Smad pathway. *Oncogene* 27, 6322–6333.

Katt, M.E., Wong, A.D., and Searson, P.C. (2018). Dissemination from a solid tumor: examining the multiple parallel pathways. *Trends Cancer* 4, 20–37.

Keklikoglou, I., Cianciaruso, C., Güç, E., Squadrito, M.L., Spring, L.M., Tazzyman, S., Lambein, L., Poissonnier, A., Ferraro, G.B., Baer, C., et al. (2019). Chemotherapy elicits pro-metastatic extracellular vesicles in breast cancer models. *Nat. Cell Biol.* 21, 190–202.

Key, T.J., Verkasalo, P.K., and Banks, E. (2001). Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol.* 2, 133–140.

Kim, J.-Y., Choi, H.-G., Lee, H.-M., Lee, G.-A., Hwang, K.-A., and Choi, K.-C. (2017). Effects of bisphenol compounds on the growth and epithelial mesenchymal transition of MCF-7 CV human breast cancer cells. *J Biomed Res* 31, 358–369.

Kim, S.-Y., Kang, J.W., Song, X., Kim, B.K., Yoo, Y.D., Kwon, Y.T., and Lee, Y.J. (2013). Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells. *Cell. Signal.* 25, 961–969.

Kimura, K., Toyooka, S., Tsukuda, K., Yamamoto, H., Suehisa, H., Soh, J., Otani, H., Kubo, T., Aoe, K., Fujimoto, N., et al. (2008). The aberrant promoter methylation of BMP3b and BMP6 in malignant pleural mesotheliomas. *Oncol. Rep.* 20, 1265–1268.

Kishimoto, T. (2006). Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res. Ther.* 8 Suppl 2, S2.

Kitamura, T., Qian, B.-Z., Soong, D., Cassetta, L., Noy, R., Sugano, G., Kato, Y., Li, J., and Pollard, J.W. (2015). CCL2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages. *J. Exp. Med.* 212, 1043–1059.

Klein, E.A., Yin, L., Kothapalli, D., Castagnino, P., Byfield, F.J., Xu, T., Levental, I., Hawthorne, E., Janmey, P.A., and Assoian, R.K. (2009). Cell-cycle control by physiological matrix elasticity and in vivo tissue stiffening. *Curr. Biol.* 19, 1511–1518.

Kleinberg, D.L., and Barcellos-Hoff, M.H. (2011). The pivotal role of insulin-like growth factor I in normal mammary development. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 40, 461–471, vii.

Kleinberg, D.L., Feldman, M., and Ruan, W. (2000). IGF-I: an essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5, 7–17.

Klinge, C.M., Riggs, K.A., Wickramasinghe, N.S., Emberts, C.G., McConda, D.B., Barry, P.N., and Magnusen, J.E. (2010). Estrogen receptor alpha 46 is reduced in tamoxifen resistant breast cancer cells and re-expression inhibits cell proliferation and estrogen receptor alpha 66-regulated target gene transcription. *Mol. Cell. Endocrinol.* 323, 268–276.

Klinowska, T.C., Soriano, J.V., Edwards, G.M., Oliver, J.M., Valentijn, A.J., Montesano, R., and Streuli, C.H. (1999). Laminin and beta1 integrins are crucial for normal mammary gland development in the mouse. *Dev. Biol.* 215, 13–32.

Kopf, J., Paarmann, P., Hiepen, C., Horbelt, D., and Knaus, P. (2014). BMP growth factor signaling in a biomechanical context. *Biofactors* 40, 171–187.

Korkaya, H., Kim, G.-I., Davis, A., Malik, F., Henry, N.L., Ithimakin, S., Quraishi, A.A., Tawakkol, N., D'Angelo, R., Paulson, A.K., et al. (2012). Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Mol. Cell* 47, 570–584.

Kos, M., Reid, G., Denger, S., and Gannon, F. (2001). Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol. Endocrinol.* 15, 2057–2063.

Kouros-Mehr, H., Slorach, E.M., Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2006). GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell* 127, 1041–1055.

- Kozłowski, L., Zakrzewska, I., Tokajuk, P., and Wojtukiewicz, M.Z. (2003). Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz. Akad. Med. Białymst.* 48, 82–84.
- Kretschmar, M., Doody, J., and Massagué, J. (1997). Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* 389, 618–622.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5925–5930.
- Kumar, R., and Thompson, E.B. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64, 310–319.
- Kumar, R., Zakharov, M.N., Khan, S.H., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., Singh, R., Bhasin, S., and Jasuja, R. (2011). The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids* 2011, 812540.
- Kumari, N., Dwarakanath, B.S., Das, A., and Bhatt, A.N. (2016). Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol.* 37, 11553–11572.
- Kuukasjärvi, T., Kononen, J., Helin, H., Holli, K., and Isola, J. (1996). Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. *J. Clin. Oncol.* 14, 2584–2589.
- Kwan, M.L., Bernard, P.S., Kroenke, C.H., Factor, R.E., Habel, L.A., Weltzien, E.K., Castillo, A., Gunderson, E.P., Maxfield, K.S., Stijleman, I.J., et al. (2015). Breastfeeding, PAM50 tumor subtype, and breast cancer prognosis and survival. *J. Natl. Cancer Inst.* 107.
- Lai, C.-F., and Cheng, S.-L. (2005). Alphasbeta integrins play an essential role in BMP-2 induction of osteoblast differentiation. *J. Bone Miner. Res.* 20, 330–340.
- Lam, H.-M., Suresh Babu, C.V., Wang, J., Yuan, Y., Lam, Y.-W., Ho, S.-M., and Leung, Y.-K. (2012). Phosphorylation of human estrogen receptor-beta at serine 105 inhibits breast cancer cell migration and invasion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 358, 27–35.
- LaMarca, H.L., and Rosen, J.M. (2007). Estrogen regulation of mammary gland development and breast cancer: amphiregulin takes center stage. *Breast Cancer Res.* 9, 304.
- Land, C.E., Tokunaga, M., Koyama, K., Soda, M., Preston, D.L., Nishimori, I., and Tokuoka, S. (2003). Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-1990. *Radiat. Res.* 160, 707–717.
- Laperrousaz, B., Jeanpierre, S., Sagorny, K., Voeltzel, T., Ramas, S., Kaniewski, B., Ffrench, M., Salesse, S., Nicolini, F.E., and Maguer-Satta, V. (2013). Primitive CML cell expansion relies on abnormal levels of BMPs provided by the niche and on BMPRIb overexpression. *Blood* 122, 3767–3777.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648.
- Lapierre, M., Docquier, A., Castet-Nicolas, A., Gitenay, D., Jalaguier, S., Teyssier, C., and Cavailles, V. (2015). The emerging role of the transcriptional coregulator RIP140 in solid tumors. *Biochim. Biophys. Acta* 1856, 144–150.

- Lapierre, M., Linares, A., Dalvai, M., Duraffourd, C., Bonnet, S., Boulahtouf, A., Rodriguez, C., Jalaguier, S., Assou, S., Orsetti, B., et al. (2016). Histone deacetylase 9 regulates breast cancer cell proliferation and the response to histone deacetylase inhibitors. *Oncotarget* 7, 19693–19708.
- Layde, P.M., Webster, L.A., Baughman, A.L., Wingo, P.A., Rubin, G.L., and Ory, H.W. (1989). The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer. Cancer and Steroid Hormone Study Group. *J Clin Epidemiol* 42, 963–973.
- Lazard, D., Sastre, X., Frid, M.G., Glukhova, M.A., Thiery, J.P., and Kotliansky, V.E. (1993). Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 999–1003.
- Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J.-M., and Corbo, L. (2011). Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr. Rev.* 32, 597–622.
- Lee, G.T., Kwon, S.J., Lee, J.-H., Jeon, S.S., Jang, K.T., Choi, H.Y., Lee, H.M., Kim, W.-J., Kim, S.J., and Kim, I.Y. (2010). Induction of Interleukin-6 Expression by Bone Morphogenetic Protein-6 in Macrophages Requires Both SMAD and p38 Signaling Pathways. *J Biol Chem* 285, 39401–39408.
- Lee, H.-R., Kim, T.-H., and Choi, K.-C. (2012). Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Lab Anim Res* 28, 71–76.
- Lee, J., Son, M.J., Woolard, K., Donin, N.M., Li, A., Cheng, C.H., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Walling, J., Ahn, S., et al. (2008a). Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer Cell* 13, 69–80.
- Lee, J.J., Loh, K., and Yap, Y.-S. (2015). PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biol Med* 12, 342–354.
- Lee, L.M.J., Cao, J., Deng, H., Chen, P., Gatalica, Z., and Wang, Z.-Y. (2008b). ER-alpha36, a novel variant of ER-alpha, is expressed in ER-positive and -negative human breast carcinomas. *Anticancer Res.* 28, 479–483.
- Lee, N.Y., Kirkbride, K.C., Sheu, R.D., and Blobe, G.C. (2009). The transforming growth factor-beta type III receptor mediates distinct subcellular trafficking and downstream signaling of activin-like kinase (ALK)3 and ALK6 receptors. *Mol. Biol. Cell* 20, 4362–4370.
- Li, L., and Naves, W.B. (2006). Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res.* 66, 4553–4557.
- Li, C.I., Malone, K.E., Daling, J.R., Potter, J.D., Bernstein, L., Marchbanks, P.A., Strom, B.L., Simon, M.S., Press, M.F., Ursin, G., et al. (2008). Timing of menarche and first full-term birth in relation to breast cancer risk. *Am. J. Epidemiol.* 167, 230–239.
- Li, Y., Perera, L., Coons, L.A., Burns, K.A., Tyler Ramsey, J., Pelch, K.E., Houtman, R., van Beuningen, R., Teng, C.T., and Korach, K.S. (2018). Differential In Vitro Biological Action, Coregulator Interactions, and Molecular Dynamic Analysis of Bisphenol A (BPA), BPAF, and BPS Ligand-ER $\alpha$  Complexes. *Environ. Health Perspect.* 126, 017012.

- Lian, C., Wang, X., Qiu, X., Wu, Z., Gao, B., Liu, L., Liang, G., Zhou, H., Yang, X., Peng, Y., et al. (2019). Collagen type II suppresses articular chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis progression by promoting integrin  $\beta$ 1-SMAD1 interaction. *Bone Res* 7, 8.
- Liang, S., Chen, Z., Jiang, G., Zhou, Y., Liu, Q., Su, Q., Wei, W., Du, J., and Wang, H. (2017). Activation of GPER suppresses migration and angiogenesis of triple negative breast cancer via inhibition of NF- $\kappa$ B/IL-6 signals. *Cancer Lett.* 386, 12–23.
- Liao, C., Liu, F., and Kannan, K. (2012). Bisphenol s, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol a residues. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6515–6522.
- Lillo, M.A., Nichols, C., Seagroves, T.N., Miranda-Carboni, G.A., and Krum, S.A. (2017). Bisphenol A Induces Sox2 in ER+ Breast Cancer Stem-Like Cells. *Horm Cancer* 8, 90–99.
- Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N.C., Pal, B., Hart, A.H., Asselin-Labat, M.-L., Gyorki, D.E., Ward, T., Partanen, A., et al. (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat. Med.* 15, 907–913.
- Lin, A.H.Y., Li, R.W.S., Ho, E.Y.W., Leung, G.P.H., Leung, S.W.S., Vanhoutte, P.M., and Man, R.Y.K. (2013). Differential ligand binding affinities of human estrogen receptor- $\alpha$  isoforms. *PLoS ONE* 8, e63199.
- Lin, S.-L., Yan, L.-Y., Zhang, X.-T., Yuan, J., Li, M., Qiao, J., Wang, Z.-Y., and Sun, Q.-Y. (2010a). ER- $\alpha$ 36, a Variant of ER- $\alpha$ , Promotes Tamoxifen Agonist Action in Endometrial Cancer Cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt Pathways. *PLoS One* 5.
- Lin, S.-L., Yan, L.-Y., Zhang, X.-T., Yuan, J., Li, M., Qiao, J., Wang, Z.-Y., and Sun, Q.-Y. (2010b). ER-alpha36, a variant of ER-alpha, promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *PLoS ONE* 5, e9013.
- Lin, Z., Zhang, X., Zhao, F., and Ru, S. (2019). Bisphenol S promotes the cell cycle progression and cell proliferation through ER $\alpha$ -cyclin D-CDK4/6-pRb pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 366, 75–82.
- Linnemann, J.R., Miura, H., Meixner, L.K., Irmeler, M., Kloos, U.J., Hirschi, B., Bartsch, H.S., Sass, S., Beckers, J., Theis, F.J., et al. (2015). Quantification of regenerative potential in primary human mammary epithelial cells. *Development* 142, 3239–3251.
- Lipworth, L., Bailey, L.R., and Trichopoulos, D. (2000). History of breast-feeding in relation to breast cancer risk: a review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 302–312.
- Little, S.C., and Mullins, M.C. (2009). Bone morphogenetic protein heterodimers assemble heteromeric type I receptor complexes to pattern the dorsoventral axis. *Nat. Cell Biol.* 11, 637–643.
- Liu, G., Chen, Y., Qi, F., Jia, L., Lu, X., He, T., Fu, Y., Li, L., and Luo, Y. (2015a). Specific chemotherapeutic agents induce metastatic behaviour through stromal- and tumour-derived cytokine and angiogenic factor signalling. *J. Pathol.* 237, 190–202.
- Liu, S., Ginestier, C., Charafe-Jauffret, E., Foco, H., Kleer, C.G., Merajver, S.D., Dontu, G., and Wicha, M.S. (2008). BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1680–1685.

- Liu, S., Ginestier, C., Ou, S.J., Clouthier, S.G., Patel, S.H., Monville, F., Korkaya, H., Heath, A., Dutcher, J., Kleer, C.G., et al. (2011). Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res.* *71*, 614–624.
- Liu, Y., Colditz, G.A., Rosner, B., Berkey, C.S., Collins, L.C., Schnitt, S.J., Connolly, J.L., Chen, W.Y., Willett, W.C., and Tamimi, R.M. (2013). Alcohol intake between menarche and first pregnancy: a prospective study of breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* *105*, 1571–1578.
- Liu, Y., Nguyen, N., and Colditz, G.A. (2015b). Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. *Womens Health (Lond)* *11*, 65–77.
- Loladze, A.V., Stull, M.A., Rowzee, A.M., Demarco, J., Lantry, J.H., Rosen, C.J., Leroith, D., Wagner, K.-U., Hennighausen, L., and Wood, T.L. (2006). Epithelial-specific and stage-specific functions of insulin-like growth factor-I during postnatal mammary development. *Endocrinology* *147*, 5412–5423.
- Long, J., Badal, S.S., Wang, Y., Chang, B.H.J., Rodriguez, A., and Danesh, F.R. (2013). MicroRNA-22 Is a Master Regulator of Bone Morphogenetic Protein-7/6 Homeostasis in the Kidney. *J Biol Chem* *288*, 36202–36214.
- Lotti, N., Colonna, M., Fiorini, M., Finelli, L., and Berti, C. (2011). Poly(butylene terephthalate) modified with ethoxylated bisphenol S with increased glass transition temperature and improved thermal stability. *Polymer* *52*, 904–911.
- Lou, J., Tu, Y., Burns, M., Silva, M.J., and Manske, P. (2001). BMP-12 gene transfer augmentation of lacerated tendon repair. *J. Orthop. Res.* *19*, 1199–1202.
- Lühr, I., Friedl, A., Overath, T., Tholey, A., Kunze, T., Hilpert, F., Sebens, S., Arnold, N., Rösel, F., Oberg, H.-H., et al. (2012). Mammary fibroblasts regulate morphogenesis of normal and tumorigenic breast epithelial cells by mechanical and paracrine signals. *Cancer Lett.* *325*, 175–188.
- Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R., Mani, S.K., Hughes, A.R., Montgomery, C.A., Shyamala, G., Conneely, O.M., and O'Malley, B.W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* *9*, 2266–2278.
- Lydon, J.P., Sivaraman, L., and Conneely, O.M. (2000). A reappraisal of progesterone action in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *5*, 325–338.
- Ma, J., Zeng, S., Zhang, Y., Deng, G., Qu, Y., Guo, C., Yin, L., Han, Y., Cai, C., Li, Y., et al. (2017). BMP4 promotes oxaliplatin resistance by an induction of epithelial-mesenchymal transition via MEK1/ERK/ELK1 signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* *411*, 117–129.
- Machado, H.L., Kittrell, F.S., Edwards, D., White, A.N., Atkinson, R.L., Rosen, J.M., Medina, D., and Lewis, M.T. (2013). Separation by Cell Size Enriches for Mammary Stem Cell Repopulation Activity. *Stem Cells Transl Med* *2*, 199–203.
- Maczys, M.A., Maceyka, M., Waters, M.R., Newton, J., Singh, M., Rigsby, M.F., Turner, T.H., Alzubi, M.A., Harrell, J.C., Milstien, S., et al. (2018). Sphingosine kinase 1 activation by estrogen receptor  $\alpha$ 36 contributes to tamoxifen resistance in breast cancer. *J. Lipid Res.* *59*, 2297–2307.
- Makki, K., Froguel, P., and Wolowczuk, I. (2013). Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflamm* *2013*.

Mallepell, S., Krust, A., Chambon, P., and Briskin, C. (2006). Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 2196–2201.

Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., and Skinner, M.K. (2013). Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations. *PLOS ONE* *8*, e55387.

Mannelli, C., Ietta, F., Avanzati, A.M., Skarzynski, D., and Paulesu, L. (2015). Biological Tools to Study the Effects of Environmental Contaminants at the Feto-Maternal Interface. *Dose Response* *13*, 1559325815611902.

Marino, M., Galluzzo, P., and Ascenzi, P. (2006). Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr. Genomics* *7*, 497–508.

Marjon, N.A., Hu, C., Hathaway, H.J., and Prossnitz, E.R. (2014). G protein-coupled estrogen receptor regulates mammary tumorigenesis and metastasis. *Mol. Cancer Res.* *12*, 1644–1654.

Markey, C.M., Luque, E.H., Munoz De Toro, M., Sonnenschein, C., and Soto, A.M. (2001). In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol. Reprod.* *65*, 1215–1223.

Marsell, R., and Einhorn, T.A. (2009). The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury* *40 Suppl 3*, S4-7.

Masjedi, A., Hashemi, V., Hojjat-Farsangi, M., Ghalamfarsa, G., Azizi, G., Yousefi, M., and Jadidi-Niaragh, F. (2018). The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* *108*, 1415–1424.

Massagué, J., and Wotton, D. (2000). NEW EMBO MEMBER'S REVIEW. *EMBO J* *19*, 1745–1754.

Massagué, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* *19*, 2783–2810.

Matsunaga, T., Takemoto, N., Sato, T., Takimoto, R., Tanaka, I., Fujimi, A., Akiyama, T., Kuroda, H., Kawano, Y., Kobune, M., et al. (2003). Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nature Medicine* *9*, 1158–1165.

Matthews, J.B., Twomey, K., and Zacharewski, T.R. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* *14*, 149–157.

Mayeur, C., Lohmeyer, L.K., Leyton, P., Kao, S.M., Pappas, A.E., Kolodziej, S.A., Spagnolli, E., Yu, B., Galdos, R.L., Yu, P.B., et al. (2014). The type I BMP receptor Alk3 is required for the induction of hepatic hepcidin gene expression by interleukin-6. *Blood* *123*, 2261–2268.

McCormack, V.A., and dos Santos Silva, I. (2006). Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *15*, 1159–1169.

McCready, J., Arendt, L.M., Rudnick, J.A., and Kuperwasser, C. (2010). The contribution of dynamic stromal remodeling during mammary development to breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res* *12*, 205.

- McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1960). The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat. Res.* *13*, 115–125.
- McDonnell, D.P., Wijayaratne, A., Chang, C., and Norris, J.D. (2002). Elucidation of the molecular mechanism of action of selective estrogen receptor modulators. *Am. J. Cardiol.* *90*, 35F–43F.
- McNally, S., and Stein, T. (2017). Overview of Mammary Gland Development: A Comparison of Mouse and Human. *Methods Mol. Biol.* *1501*, 1–17.
- McPherson, K., Steel, C.M., and Dixon, J.M. (2000). ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* *321*, 624–628.
- Merrell, A.J., and Stanger, B.Z. (2016). Adult cell plasticity in vivo: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 413–425.
- Merzoug-Larabi, M., Youssef, I., Bui, A.T., Legay, C., Loiodice, S., Lognon, S., Babajko, S., and Ricort, J.-M. (2020). Protein Kinase D1 (PKD1) Is a New Functional Non-Genomic Target of Bisphenol A in Breast Cancer Cells. *Front Pharmacol* *10*.
- Millikan, R.C., Newman, B., Tse, C.-K., Moorman, P.G., Conway, K., Dressler, L.G., Smith, L.V., Labbok, M.H., Geradts, J., Bensen, J.T., et al. (2008). Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *109*, 123–139.
- Mitsiades, N., Yu, W.H., Poulaki, V., Tsokos, M., and Stamenkovic, I. (2001). Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res.* *61*, 577–581.
- Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2017). Regulation of TGF- $\beta$  Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *9*.
- Miyazono, K., Kamiya, Y., and Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem.* *147*, 35–51.
- Mo, Z., Liu, M., Yang, F., Luo, H., Li, Z., Tu, G., and Yang, G. (2013). GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer. *Breast Cancer Res.* *15*, R114.
- Molina-Molina, J.-M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J.-M., Real, M., Fernández, M.F., Balaguer, P., and Olea, N. (2013). In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *272*, 127–136.
- Monroe, D.G., Jin, D.F., and Sanders, M.M. (2000). Estrogen opposes the apoptotic effects of bone morphogenetic protein 7 on tissue remodeling. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4626–4634.
- Montes-Grajales, D., and Olivero-Verbel, J. (2013). Computer-aided identification of novel protein targets of bisphenol A. *Toxicol. Lett.* *222*, 312–320.
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* *3*, e2888.
- Mori, H., Lo, A.T., Inman, J.L., Alcaraz, J., Ghajar, C.M., Mott, J.D., Nelson, C.M., Chen, C.S., Zhang, H., Bascom, J.L., et al. (2013). Transmembrane/cytoplasmic, rather than catalytic, domains of Mmp14

signal to MAPK activation and mammary branching morphogenesis via binding to integrin  $\beta 1$ . *Development* 140, 343–352.

Moritani, S., Kushima, R., Sugihara, H., Bamba, M., Kobayashi, T.K., and Hattori, T. (2002). Availability of CD10 immunohistochemistry as a marker of breast myoepithelial cells on paraffin sections. *Mod. Pathol.* 15, 397–405.

Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 392, 49–53.

Mukherjee, A., Soyal, S.M., Li, J., Ying, Y., He, B., DeMayo, F.J., and Lydon, J.P. (2010). Targeting RANKL to a specific subset of murine mammary epithelial cells induces ordered branching morphogenesis and alveologenesis in the absence of progesterone receptor expression. *FASEB J.* 24, 4408–4419.

Muñoz-de-Toro, M., Markey, C.M., Wadia, P.R., Luque, E.H., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., and Soto, A.M. (2005). Perinatal Exposure to Bisphenol-A Alters Peripubertal Mammary Gland Development in Mice. *Endocrinology* 146, 4138–4147.

Murakami, K., and Etlinger, J.D. (2019). Role of SMURF1 ubiquitin ligase in BMP receptor trafficking and signaling. *Cell. Signal.* 54, 139–149.

Murphy, C. (2007). Endo-fin-ally a SARA for BMP receptors. *J. Cell. Sci.* 120, 1153–1155.

Murray, T.J., Maffini, M.V., Ucci, A.A., Sonnenschein, C., and Soto, A.M. (2007). Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod. Toxicol.* 23, 383–390.

Nagata, Y., Lan, K.-H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F.J., Sahin, A.A., Klos, K.S., Li, P., Monia, B.P., Nguyen, N.T., et al. (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6, 117–127.

Nagayama, A., Vidula, N., Ellisen, L., and Bardia, A. (2020). Novel antibody–drug conjugates for triple negative breast cancer. *Ther Adv Med Oncol* 12.

Nahta, R., Yuan, L.X.H., Zhang, B., Kobayashi, R., and Esteva, F.J. (2005). Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res.* 65, 11118–11128.

Nakamura, S., Tezuka, Y., Ushiyama, A., Kawashima, C., Kitagawara, Y., Takahashi, K., Ohta, S., and Mashino, T. (2011). Ipso substitution of bisphenol A catalyzed by microsomal cytochrome P450 and enhancement of estrogenic activity. *Toxicol. Lett.* 203, 92–95.

Naylor, M.J., Li, N., Cheung, J., Lowe, E.T., Lambert, E., Marlow, R., Wang, P., Schatzmann, F., Wintermantel, T., Schüetz, G., et al. (2005). Ablation of  $\beta 1$  integrin in mammary epithelium reveals a key role for integrin in glandular morphogenesis and differentiation. *J Cell Biol* 171, 717–728.

Nelsen, S.M., and Christian, J.L. (2009). Site-specific cleavage of BMP4 by furin, PC6, and PC7. *J. Biol. Chem.* 284, 27157–27166.

Nemer, G., and Nemer, M. (2003). Transcriptional activation of BMP-4 and regulation of mammalian organogenesis by GATA-4 and -6. *Dev. Biol.* 254, 131–148.

- Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J.A. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.* *81*, 1535–1565.
- Ning, L., Guo-Chun, Z., Sheng-Li, A., Xue-Rui, L., Kun, W., Jian, Z., Chong-Yang, R., Ling-Zhu, W., and Hai-Tong, L. (2016). Inhibition of autophagy induced by PTEN loss promotes intrinsic breast cancer resistance to trastuzumab therapy. *Tumour Biol.* *37*, 5445–5454.
- Nishiyama, T., Ogura, K., Nakano, H., Kaku, T., Takahashi, E., Ohkubo, Y., Sekine, K., Hiratsuka, A., Kadota, S., and Watabe, T. (2002). Sulfation of environmental estrogens by cytosolic human sulfotransferases. *Drug Metab. Pharmacokinet.* *17*, 221–228.
- Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y.I., and Knaus, P. (2002). The Mode of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Receptor Oligomerization Determines Different BMP-2 Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* *277*, 5330–5338.
- Nohe, A., Keating, E., Underhill, T.M., Knaus, P., and Petersen, N.O. (2005). Dynamics and interaction of caveolin-1 isoforms with BMP-receptors. *J. Cell. Sci.* *118*, 643–650.
- Novaro, V., Roskelley, C.D., and Bissell, M.J. (2003). Collagen-IV and laminin-1 regulate estrogen receptor alpha expression and function in mouse mammary epithelial cells. *J. Cell. Sci.* *116*, 2975–2986.
- Nunez, A.A., Kannan, K., Giesy, J.P., Fang, J., and Clemens, L.G. (2001). Effects of Bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere* *42*, 917–922.
- Oakes, S.R., Naylor, M.J., Asselin-Labat, M.-L., Blazek, K.D., Gardiner-Garden, M., Hilton, H.N., Kazlauskas, M., Pritchard, M.A., Chodosh, L.A., Pfeffer, P.L., et al. (2008). The Ets transcription factor Elf5 specifies mammary alveolar cell fate. *Genes Dev.* *22*, 581–586.
- O'Brien, J., Lyons, T., Monks, J., Lucia, M.S., Wilson, R.S., Hines, L., Man, Y., Borges, V., and Schedin, P. (2010). Alternatively Activated Macrophages and Collagen Remodeling Characterize the Postpartum Involuting Mammary Gland across Species. *Am J Pathol* *176*, 1241–1255.
- Ohe, K., Miyajima, S., Abe, I., Tanaka, T., Hamaguchi, Y., Harada, Y., Horita, Y., Beppu, Y., Ito, F., Yamasaki, T., et al. (2018). HMGA1a induces alternative splicing of estrogen receptor alpha in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *182*, 21–26.
- Ohore, O.E., and Zhang, S. (2019). Endocrine disrupting effects of bisphenol A exposure and recent advances on its removal by water treatment systems. A review. *Scientific African* *5*, e00135.
- Ohshiro, K., Schwartz, A.M., Levine, P.H., and Kumar, R. (2012). Alternate estrogen receptors promote invasion of inflammatory breast cancer cells via non-genomic signaling. *PLoS ONE* *7*, e30725.
- Okamoto, M., and Mizukami, Y. (2016). GPER negatively regulates TNF $\alpha$ -induced IL-6 production in human breast cancer cells via NF- $\kappa$ B pathway. *Endocr. J.* *63*, 485–493.
- Omarjee, S., Jacquemetton, J., Poulard, C., Rochel, N., Dejaegere, A., Chebaro, Y., Treilleux, I., Marangoni, E., Corbo, L., and Romancer, M.L. (2017). The molecular mechanisms underlying the ER $\alpha$ -36-mediated signaling in breast cancer. *Oncogene* *36*, 2503–2514.

Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massagué, J., and Niehrs, C. (1999). Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* *401*, 480–485.

Owczarek, K., Kudlak, B., Simeonov, V., Mazerska, Z., and Namieśnik, J. (2018). Binary Mixtures of Selected Bisphenols in the Environment: Their Toxicity in Relationship to Individual Constituents. *Molecules* *23*.

Paine, I.S., and Lewis, M.T. (2017). The Terminal End Bud: the Little Engine that Could. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *22*, 93–108.

Pandolfi, P.P. (2004). Breast cancer--loss of PTEN predicts resistance to treatment. *N. Engl. J. Med.* *351*, 2337–2338.

Parent, A.-S., Teilmann, G., Juul, A., Skakkebaek, N.E., Toppari, J., and Bourguignon, J.-P. (2003). The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr. Rev.* *24*, 668–693.

Park, S.-J., Nakagawa, T., Kitamura, H., Atsumi, T., Kamon, H., Sawa, S.-I., Kamimura, D., Ueda, N., Iwakura, Y., Ishihara, K., et al. (2004). IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J. Immunol.* *173*, 3844–3854.

Parsa, P., and Parsa, B. (2009). Effects of reproductive factors on risk of breast cancer: a literature review. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* *10*, 545–550.

Parsa, S., Ramasamy, S.K., De Langhe, S., Gupte, V.V., Haigh, J.J., Medina, D., and Bellusci, S. (2008). Terminal end bud maintenance in mammary gland is dependent upon FGFR2b signaling. *Dev. Biol.* *317*, 121–131.

Parton, R.G., and del Pozo, M.A. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 98–112.

Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., et al. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* *8*, 241–254.

Pattabiraman, D.R., and Weinberg, R.A. (2014). Tackling the cancer stem cells – what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov* *13*, 497–512.

Pelekanou, V., Kampa, M., Kiagiadaki, F., Deli, A., Theodoropoulos, P., Agrogiannis, G., Patsouris, E., Tsapis, A., Castanas, E., and Notas, G. (2016). Estrogen anti-inflammatory activity on human monocytes is mediated through cross-talk between estrogen receptor ER $\alpha$ 36 and GPR30/GPER1. *J. Leukoc. Biol.* *99*, 333–347.

Penot, G., Le Péron, C., Mérot, Y., Grimaud-Fanouillère, E., Ferrière, F., Boujrad, N., Kah, O., Saligaut, C., Ducouret, B., Métivier, R., et al. (2005). The Human Estrogen Receptor- $\alpha$  Isoform hER $\alpha$ 46 Antagonizes the Proliferative Influence of hER $\alpha$ 66 in MCF7 Breast Cancer Cells. *Endocrinology* *146*, 5474–5484.

Perou, C.M., Sørli, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslén, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *406*, 747–752.

- Peters, M., Blinn, G., Solem, F., Fischer, M., Meyer zum Büschenfelde, K.H., and Rose-John, S. (1998). In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6. *J. Immunol.* *161*, 3575–3581.
- Petrakis, N.L. (1954). Bone Marrow Pressure in Leukemic and Non-Leukemic Patients. *J Clin Invest* *33*, 27–34.
- Pietras, R.J., and Szego, C.M. (1977). Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* *265*, 69–72.
- Pivnenko, K., Pedersen, G.A., Eriksson, E., and Astrup, T.F. (2015). Bisphenol A and its structural analogues in household waste paper. *Waste Manag* *44*, 39–47.
- Pizot, C., Boniol, M., Mullie, P., Koechlin, A., Boniol, M., Boyle, P., and Autier, P. (2016). Physical activity, hormone replacement therapy and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. *Eur. J. Cancer* *52*, 138–154.
- Pluchino, L.A., and Wang, H.-C.R. (2014). Chronic exposure to combined carcinogens enhances breast cell carcinogenesis with mesenchymal and stem-like cell properties. *PLoS ONE* *9*, e108698.
- Pond, A.C., Bin, X., Batts, T., Roarty, K., Hilsenbeck, S., and Rosen, J.M. (2013). Fibroblast growth factor receptor signaling is essential for normal mammary gland development and stem cell function. *Stem Cells* *31*, 178–189.
- Ponglikitmongkol, M., Green, S., and Chambon, P. (1988). Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J* *7*, 3385–3388.
- Poola, I., Abraham, J., Liu, A., Marshalleck, J.J., and DeWitty, R.L. (2008). The Cell Surface Estrogen Receptor, G Protein- Coupled Receptor 30 (GPR30), is Markedly Down Regulated During Breast Tumorigenesis. *Breast Cancer (Auckl)* *1*, 65–78.
- Pourteimoor, V., Mohammadi-Yeganeh, S., and Paryan, M. (2016). Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumour Biol.* *37*, 14479–14499.
- Prat, A., and Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* *5*, 5–23.
- Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* *12*, R68.
- Provenzano, P.P., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., and Keely, P.J. (2009). Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage. *Oncogene* *28*, 4326–4343.
- Pupo, M., Pisano, A., Lappano, R., Santolla, M.F., De Francesco, E.M., Abonante, S., Rosano, C., and Maggiolini, M. (2012). Bisphenol A induces gene expression changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Environ. Health Perspect.* *120*, 1177–1182.

- Purohit, A., Singh, A., Ghilchik, M.W., Serlupi-Crescenzi, O., and Reed, M.J. (2003). Inhibition of IL-6+IL-6 soluble receptor-stimulated aromatase activity by the IL-6 antagonist, Sant 7, in breast tissue-derived fibroblasts. *Br. J. Cancer* *88*, 630–635.
- Putti, T.C., El-Rehim, D.M.A., Rakha, E.A., Paish, C.E., Lee, A.H.S., Pinder, S.E., and Ellis, I.O. (2005). Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. *Mod. Pathol.* *18*, 26–35.
- Qian, B.-Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L.R., Kaiser, E.A., Snyder, L.A., and Pollard, J.W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* *475*, 222–225.
- Qin, X.-Y., Fukuda, T., Yang, L., Zaha, H., Akanuma, H., Zeng, Q., Yoshinaga, J., and Sone, H. (2012). Effects of bisphenol A exposure on the proliferation and senescence of normal human mammary epithelial cells. *Cancer Biol. Ther.* *13*, 296–306.
- Quénel, N., Wafflart, J., Bonichon, F., de Mascarel, I., Trojani, M., Durand, M., Avril, A., and Coindre, J.M. (1995). The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res. Treat.* *35*, 283–291.
- Quinn, J.A., Graeber, C.T., Frackelton, A.R., Kim, M., Schwarzbauer, J.E., and Filardo, E.J. (2009). Coordinate Regulation of Estrogen-Mediated Fibronectin Matrix Assembly and Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation by the G Protein-Coupled Receptor, GPR30. *Mol Endocrinol* *23*, 1052–1064.
- Rajaram, R.D., Buric, D., Caikovski, M., Ayyanan, A., Rougemont, J., Shan, J., Vainio, S.J., Yalcin-Ozuysal, O., and Briskin, C. (2015). Progesterone and Wnt4 control mammary stem cells via myoepithelial crosstalk. *EMBO J.* *34*, 641–652.
- Rajaram, S., Murawala, H., Buch, P., Patel, S., and Balakrishnan, S. (2016). Inhibition of BMP signaling reduces MMP-2 and MMP-9 expression and obstructs wound healing in regenerating fin of teleost fish *Poecilia latipinna*. *Fish Physiol. Biochem.* *42*, 787–794.
- Raje, M.M., and Ashma, R. (2019). Epigenetic regulation of BMP2 gene in osteoporosis: a DNA methylation study. *Mol. Biol. Rep.* *46*, 1667–1674.
- Rakha, E.A., El-Sayed, M.E., Green, A.R., Paish, E.C., Powe, D.G., Gee, J., Nicholson, R.I., Lee, A.H.S., Robertson, J.F.R., and Ellis, I.O. (2007). Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. *J. Clin. Oncol.* *25*, 4772–4778.
- Ramirez, F., and Rifkin, D.B. (2009). Extracellular microfibrils: contextual platforms for TGFbeta and BMP signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 616–622.
- Rancière Fanny, Botton Jérémie, Slama Rémy, Lacroix Marlène Z., Debrauwer Laurent, Charles Marie Aline, Roussel Ronan, Balkau Beverley, Magliano Dianna J., and null null Exposure to Bisphenol A and Bisphenol S and Incident Type 2 Diabetes: A Case–Cohort Study in the French Cohort D.E.S.I.R. *Environmental Health Perspectives* *127*, 107013.
- Rangel, R., Guzman-Rojas, L., Kodama, T., Kodama, M., Newberg, J.Y., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (2017). Identification of new tumor suppressor genes in triple-negative breast cancer. *Cancer Res.*

- Rao, J., Jiang, X., Wang, Y., and Chen, B. (2011). Advances in the understanding of the structure and function of ER- $\alpha$ 36, a novel variant of human estrogen receptor- $\alpha$ . *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *127*, 231–237.
- Reid, G., Denger, S., Kos, M., and Gannon, F. (2002). Human estrogen receptor- $\alpha$ : regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* *59*, 821–831.
- Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., and Prossnitz, E.R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* *307*, 1625–1630.
- Reversi, A., Cassoni, P., and Chini, B. (2005). Oxytocin receptor signaling in myoepithelial and cancer cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* *10*, 221–229.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* *414*, 105–111.
- Reyal, F., Hajage, D., Savignoni, A., Feron, J.-G., Bollet, M.A., Kirova, Y., Fourquet, A., Pierga, J.-Y., Cottu, P., Dieras, V., et al. (2013). Long-term prognostic performance of Ki67 rate in early stage, pT1-pT2, pN0, invasive breast carcinoma. *PLoS ONE* *8*, e55901.
- Reynolds, P. (2013). Smoking and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *18*, 15–23.
- Riggs, B.L., and Hartmann, L.C. (2003). Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N. Engl. J. Med.* *348*, 618–629.
- Rios, A.C., Fu, N.Y., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2014). In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature* *506*, 322–327.
- Rizzati, V., Briand, O., Guillou, H., and Gamet-Payrastre, L. (2016). Effects of pesticide mixtures in human and animal models: An update of the recent literature. *Chemico-Biological Interactions* *254*, 231–246.
- Robertson, J.F. (2001). ICI 182,780 (Fulvestrant)--the first oestrogen receptor down-regulator--current clinical data. *Br. J. Cancer* *85 Suppl 2*, 11–14.
- Rochester, J.R., and Bolden, A.L. (2015). Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ Health Perspect* *123*, 643–650.
- Rose-John, S. (2012). IL-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Importance for the Pro-Inflammatory Activities of IL-6. *Int J Biol Sci* *8*, 1237–1247.
- Rousset-Jablonski, C., and Gompel, A. (2017). Screening for familial cancer risk: Focus on breast cancer. *Maturitas* *105*, 69–77.
- Ruan, W., Catanese, V., Wiczorek, R., Feldman, M., and Kleinberg, D.L. (1995). Estradiol enhances the stimulatory effect of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on mammary development and growth hormone-induced IGF-I messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* *136*, 1296–1302.
- Rubin, B.S. (2011). Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *127*, 27–34.
- Rubin, B.S., and Soto, A.M. (2009). Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Molecular and Cellular Endocrinology* *304*, 55–62.

- Runswick, S.K., O'Hare, M.J., Jones, L., Streuli, C.H., and Garrod, D.R. (2001). Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning. *Nat. Cell Biol.* 3, 823–830.
- Russo, J., and Russo, I.H. (2004). Development of the human breast. *Maturitas* 49, 2–15.
- Russo, J., and Russo, I.H. (2006). THE ROLE OF ESTROGEN IN THE INITIATION OF BREAST CANCER. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102, 89–96.
- Russo, J., Hasan Lareef, M., Balogh, G., Guo, S., and Russo, I.H. (2003). Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 87, 1–25.
- Sadikovic, B., and Rodenhiser, D.I. (2006). Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 458–468.
- Sagorny, K., Chapellier, M., Laperrousaz, B., and Maguer-Satta, V. (2012). [BMP and cancer: the Yin and Yang of stem cells]. *Med Sci (Paris)* 28, 416–422.
- Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D.G., Egeblad, M., Evans, R.M., Fearon, D., Greten, F.R., Hingorani, S.R., Hunter, T., et al. (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Cancer* 20, 174–186.
- Sakakura, T., Nishizuka, Y., and Dawe, C.J. (1976). Mesenchyme-dependent morphogenesis and epithelium-specific cytodifferentiation in mouse mammary gland. *Science* 194, 1439–1441.
- Samartzis, E.P., Noske, A., Meisel, A., Varga, Z., Fink, D., and Imesch, P. (2014). The G protein-coupled estrogen receptor (GPER) is expressed in two different subcellular localizations reflecting distinct tumor properties in breast cancer. *PLoS ONE* 9, e83296.
- Samavat, H., and Kurzer, M.S. (2015). Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett.* 356, 231–243.
- Sammar, M., Stricker, S., Schwabe, G.C., Sieber, C., Hartung, A., Hanke, M., Oishi, I., Pohl, J., Minami, Y., Sebald, W., et al. (2004). Modulation of GDF5/BRI-b signalling through interaction with the tyrosine kinase receptor Ror2. *Genes Cells* 9, 1227–1238.
- Sammar, M., Sieber, C., and Knaus, P. (2009). Biochemical and functional characterization of the Ror2/BRIb receptor complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 1–6.
- Sanchez, R., Nguyen, D., Rocha, W., White, J.H., and Mader, S. (2002). Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. *Bioessays* 24, 244–254.
- Sanders, L.N., Schoenhard, J.A., Saleh, M.A., Mukherjee, A., Ryzhov, S., McMaster, W.G., Nolan, K., Gumina, R.J., Thompson, T.B., Magnuson, M.A., et al. (2016). BMP Antagonist Gremlin 2 Limits Inflammation After Myocardial Infarction. *Circ. Res.* 119, 434–449.
- Sansone, P., Storci, G., Tavolari, S., Guarnieri, T., Giovannini, C., Taffurelli, M., Ceccarelli, C., Santini, D., Paterini, P., Marcu, K.B., et al. (2007). IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J. Clin. Invest.* 117, 3988–4002.
- Santolla, M.F., Lappano, R., De Marco, P., Pupo, M., Vivacqua, A., Sisci, D., Abonante, S., Iacopetta, D., Cappello, A.R., Dolce, V., et al. (2012). G Protein-coupled Estrogen Receptor Mediates the Up-regulation of Fatty Acid Synthase Induced by 17 $\beta$ -Estradiol in Cancer Cells and Cancer-associated Fibroblasts. *J Biol Chem* 287, 43234–43245.

- Santoro, A., Vlachou, T., Carminati, M., Pelicci, P.G., and Mapelli, M. (2016). Molecular mechanisms of asymmetric divisions in mammary stem cells. *EMBO Rep.* *17*, 1700–1720.
- Sapkota, G., Alarcón, C., Spagnoli, F.M., Brivanlou, A.H., and Massagué, J. (2007). Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker. *Mol. Cell* *25*, 441–454.
- Sauvé, K., Lepage, J., Sanchez, M., Heveker, N., and Tremblay, A. (2009). Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer Res.* *69*, 5793–5800.
- Saville, B., Wormke, M., Wang, F., Nguyen, T., Enmark, E., Kuiper, G., Gustafsson, J.A., and Safe, S. (2000). Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J. Biol. Chem.* *275*, 5379–5387.
- Schmidt, J., Kotnik, P., Trontelj, J., Knez, Ž., and Mašič, L.P. (2013a). Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes. *Toxicol In Vitro* *27*, 1267–1276.
- Schmidt, J., Kotnik, P., Trontelj, J., Knez, Ž., and Mašič, L.P. (2013b). Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes. *Toxicol In Vitro* *27*, 1267–1276.
- Schönfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C.E., Paul, M., and Chahoud, I. (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ. Health Perspect.* *110*, A703-707.
- Schug, T.T., Janesick, A., Blumberg, B., and Heindel, J.J. (2011). Endocrine Disrupting Chemicals and Disease Susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol* *127*, 204–215.
- Scully, K.M., Gleiberman, A.S., Lindzey, J., Lubahn, D.B., Korach, K.S., and Rosenfeld, M.G. (1997). Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. *Mol. Endocrinol.* *11*, 674–681.
- Sekiguchi, R., and Yamada, K.M. (2018). Basement membranes in development and disease. *Curr Top Dev Biol* *130*, 143–191.
- Sengle, G., Charbonneau, N.L., Ono, R.N., Sasaki, T., Alvarez, J., Keene, D.R., Bächinger, H.P., and Sakai, L.Y. (2008). Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *J. Biol. Chem.* *283*, 13874–13888.
- Sethi, T., Rintoul, R.C., Moore, S.M., MacKinnon, A.C., Salter, D., Choo, C., Chilvers, E.R., Dransfield, I., Donnelly, S.C., Strieter, R., et al. (1999). Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat. Med.* *5*, 662–668.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* *439*, 84–88.
- Shapiro, S. (2005). Oral oestrogen-progestagen contraceptives, menopausal treatment, and cancer. *Lancet Oncol.* *6*, 736; author reply 737.
- Shearer, W.T., Reuben, J.M., Mullington, J.M., Price, N.J., Lee, B.N., Smith, E.O., Szuba, M.P., Van Dongen, H.P., and Dinges, D.F. (2001). Soluble TNF-alpha receptor 1 and IL-6 plasma levels in humans subjected to the sleep deprivation model of spaceflight. *J. Allergy Clin. Immunol.* *107*, 165–170.

- Shi, L., Dong, B., Li, Z., Lu, Y., Ouyang, T., Li, J., Wang, T., Fan, Z., Fan, T., Lin, B., et al. (2009). Expression of ER- $\alpha$ 36, a novel variant of estrogen receptor  $\alpha$ , and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* *27*, 3423–3429.
- Shi, W., Chang, C., Nie, S., Xie, S., Wan, M., and Cao, X. (2007). Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling. *Journal of Cell Science* *120*, 1216–1224.
- Shi, Y.E., Chen, Y., Dackour, R., Potters, L., Wang, S., Ding, Q., Wang, Z., and Liu, Y.E. (2010). Synuclein gamma stimulates membrane-initiated estrogen signaling by chaperoning estrogen receptor (ER)- $\alpha$ 36, a variant of ER- $\alpha$ . *Am. J. Pathol.* *177*, 964–973.
- Shibayama, O., Yoshiuchi, K., Inagaki, M., Matsuoka, Y., Yoshikawa, E., Sugawara, Y., Akechi, T., Wada, N., Imoto, S., Murakami, K., et al. (2014). Association between adjuvant regional radiotherapy and cognitive function in breast cancer patients treated with conservation therapy. *Cancer Med* *3*, 702–709.
- Shield, K.D., Soerjomataram, I., and Rehm, J. (2016). Alcohol Use and Breast Cancer: A Critical Review. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *40*, 1166–1181.
- Shim, Y., and Song, J.M. (2015). Spectral overlap-free quantum dot-based determination of benzo[a]pyrene-induced cancer stem cells by concurrent monitoring of CD44, CD24 and aldehyde dehydrogenase 1. *Chem. Commun. (Camb.)* *51*, 2118–2121.
- Shinde, S.S., Forman, M.R., Kuerer, H.M., Yan, K., Peintinger, F., Hunt, K.K., Hortobagyi, G.N., Pusztai, L., and Symmans, W.F. (2010). Higher parity and shorter breastfeeding duration: association with triple-negative phenotype of breast cancer. *Cancer* *116*, 4933–4943.
- Shoker, B.S., Jarvis, C., Sibson, D.R., Walker, C., and Sloane, J.P. (1999). Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancerous breast. *The Journal of Pathology* *188*, 237–244.
- Shou, J., Massarweh, S., Osborne, C.K., Wakeling, A.E., Ali, S., Weiss, H., and Schiff, R. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *96*, 926–935.
- Shyamala, G. (1999). Progesterone signaling and mammary gland morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *4*, 89–104.
- Siddiqui, N., and Sonenberg, N. (2015). Signalling to eIF4E in cancer. *Biochem Soc Trans* *43*, 763–772.
- Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., and Knaus, P. (2009). Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* *20*, 343–355.
- Silberstein, G.B., Van Horn, K., Shyamala, G., and Daniel, C.W. (1994). Essential role of endogenous estrogen in directly stimulating mammary growth demonstrated by implants containing pure antiestrogens. *Endocrinology* *134*, 84–90.
- Silberstein, G.B., Van Horn, K., Hrabeta-Robinson, E., and Compton, J. (2006). Estrogen-triggered delays in mammary gland gene expression during the estrous cycle: evidence for a novel timing system. *J. Endocrinol.* *190*, 225–239.
- Silvestri, L., Nai, A., Dulja, A., and Pagani, A. (2019). Hepcidin and the BMP-SMAD pathway: An unexpected liaison. *Vitam. Horm.* *110*, 71–99.

- Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D.P., Ley, K., Chin, W.W., and Liao, J.K. (2000). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* *407*, 538–541.
- Singh, A., Purohit, A., Wang, D.Y., Duncan, L.J., Ghilchik, M.W., and Reed, M.J. (1995). IL-6sR: release from MCF-7 breast cancer cells and role in regulating peripheral oestrogen synthesis. *J. Endocrinol.* *147*, R9-12.
- Singh, A., Purohit, A., Ghilchik, M.W., and Reed, M.J. (1999). The regulation of aromatase activity in breast fibroblasts: the role of interleukin-6 and prostaglandin E2. *Endocr. Relat. Cancer* *6*, 139–147.
- Skakkebaek, N.E. (2002). Endocrine disrupters and testicular dysgenesis syndrome. *Horm. Res.* *57 Suppl 2*, 43.
- Skledar, D.G., Schmidt, J., Fic, A., Klopčič, I., Trontelj, J., Dolenc, M.S., Finel, M., and Mašič, L.P. (2016). Influence of metabolism on endocrine activities of bisphenol S. *Chemosphere* *157*, 152–159.
- Skliris, G.P., Leygue, E., Curtis-Snell, L., Watson, P.H., and Murphy, L.C. (2006). Expression of oestrogen receptor-beta in oestrogen receptor-alpha negative human breast tumours. *Br. J. Cancer* *95*, 616–626.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* *235*, 177–182.
- Sleeman, K.E., Kendrick, H., Ashworth, A., Isacke, C.M., and Smalley, M.J. (2006). CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res* *8*, R7.
- Sleeman, K.E., Kendrick, H., Robertson, D., Isacke, C.M., Ashworth, A., and Smalley, M.J. (2007). Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. *J Cell Biol* *176*, 19–26.
- Smith, C.L. (1998). Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol. Reprod.* *58*, 627–632.
- Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (2004). Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr. Rev.* *25*, 45–71.
- Song, H., Zhang, T., Yang, P., Li, M., Yang, Y., Wang, Y., Du, J., Pan, K., and Zhang, K. (2015). Low doses of bisphenol A stimulate the proliferation of breast cancer cells via ERK1/2/ERR $\gamma$  signals. *Toxicol In Vitro* *30*, 521–528.
- Song, R.X., Barnes, C.J., Zhang, Z., Bao, Y., Kumar, R., and Santen, R.J. (2004). The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 2076–2081.
- Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 10869–10874.
- Sotobori, T., Ueda, T., Myoui, A., Yoshioka, K., Nakasaki, M., Yoshikawa, H., and Itoh, K. (2006). Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and

- osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin beta1 into lipid rafts. *Exp. Cell Res.* 312, 3927–3938.
- Sountoulidis, A., Stavropoulos, A., Giaglis, S., Apostolou, E., Monteiro, R., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Chen, H., Stripp, B.R., Mummery, C., Andreakos, E., et al. (2012). Activation of the canonical bone morphogenetic protein (BMP) pathway during lung morphogenesis and adult lung tissue repair. *PLoS ONE* 7, e41460.
- Spaeth, E.L., Dembinski, J.L., Sasser, A.K., Watson, K., Klopp, A., Hall, B., Andreeff, M., and Marini, F. (2009). Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts Contributes to Fibrovascular Network Expansion and Tumor Progression. *PLoS One* 4.
- Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783–787.
- Srinivasan, K., Strickland, P., Valdes, A., Shin, G.C., and Hinck, L. (2003). Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev. Cell* 4, 371–382.
- Srivastava, S., Matsuda, M., Hou, Z., Bailey, J.P., Kitazawa, R., Herbst, M.P., and Horseman, N.D. (2003). Receptor activator of NF-kappaB ligand induction via Jak2 and Stat5a in mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278, 46171–46178.
- Steiman, J., Peralta, E.A., Louis, S., and Kamel, O. (2013). Biology of the estrogen receptor, GPR30, in triple negative breast cancer. *Am. J. Surg.* 206, 698–703.
- Stendahl, M., Rydén, L., Nordenskjöld, B., Jönsson, P.E., Landberg, G., and Jirström, K. (2006). High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 12, 4614–4618.
- Sternlicht, M.D., Sunnarborg, S.W., Kouros-Mehr, H., Yu, Y., Lee, D.C., and Werb, Z. (2005). Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Development* 132, 3923–3933.
- Stevenson, J.C. (2011). A woman's journey through the reproductive, transitional and postmenopausal periods of life: impact on cardiovascular and musculo-skeletal risk and the role of estrogen replacement. *Maturitas* 70, 197–205.
- Stingl, J. (2011). Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer. *Horm Cancer* 2, 85–90.
- Stingl, J., Eaves, C.J., Zandieh, I., and Emerman, J.T. (2001). Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* 67, 93–109.
- Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., and Wahl, G.M. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J* 18, 1660–1672.
- Stoneley, M., Chappell, S.A., Jopling, C.L., Dickens, M., MacFarlane, M., and Willis, A.E. (2000). c-Myc Protein Synthesis Is Initiated from the Internal Ribosome Entry Segment during Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 20, 1162–1169.

- Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Altieri, A., Benbrahim-Tallaa, L., Cogliano, V., and WHO International Agency For Research on Cancer Monograph Working Group (2007). Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting. *Lancet Oncol.* *8*, 1065–1066.
- Street, S., Z, Z., M, F., and Mh, C. (2017). Bisphenol-A Glucuronidation in Human Liver and Breast: Identification of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) and Influence of Genetic Polymorphisms (Xenobiotica).
- Su, X., Xu, X., Li, G., Lin, B., Cao, J., and Teng, L. (2014). ER- $\alpha$ 36: a novel biomarker and potential therapeutic target in breast cancer. *Onco Targets Ther* *7*, 1525–1533.
- Suiko, M., Sakakibara, Y., and Liu, M.-C. (2000). Sulfation of Environmental Estrogen-like Chemicals by Human Cytosolic Sulfotransferases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *267*, 80–84.
- Suman, S., Johnson, M.D., Fornace, A.J., and Datta, K. (2012). Exposure to Ionizing Radiation Causes Long-Term Increase in Serum Estradiol and Activation of PI3K-Akt Signaling Pathway in Mouse Mammary Gland. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* *84*, 500–507.
- Sumbal, J., and Koledova, Z. (2019). FGF signaling in mammary gland fibroblasts regulates multiple fibroblast functions and mammary epithelial morphogenesis. *Development* *146*.
- Taddei, I., Deugnier, M.-A., Faraldo, M.M., Petit, V., Bouvard, D., Medina, D., Fässler, R., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2008a).  $\beta$ 1 Integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nature Cell Biology* *10*, 716–722.
- Taddei, I., Deugnier, M.-A., Faraldo, M.M., Petit, V., Bouvard, D., Medina, D., Fässler, R., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2008b). Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat. Cell Biol.* *10*, 716–722.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663–676.
- Tanaka, T., Narazaki, M., and Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *6*.
- Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S.J., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. (2009). Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin. Cancer Res.* *15*, 4234–4241.
- Tanos, T., Sflomos, G., Echeverria, P.C., Ayyanan, A., Gutierrez, M., Delaloye, J.-F., Raffoul, W., Fiche, M., Dougall, W., Schneider, P., et al. (2013). Progesterone/RANKL is a major regulatory axis in the human breast. *Sci Transl Med* *5*, 182ra55.
- Taylor-Papadimitriou, J., Stampfer, M., Bartek, J., Lewis, A., Boshell, M., Lane, E.B., and Leigh, I.M. (1989). Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium. *J. Cell. Sci.* *94 ( Pt 3)*, 403–413.
- Tecalco-Cruz, A.C., and Ramírez-Jarquín, J.O. (2018). Polyubiquitination inhibition of estrogen receptor alpha and its implications in breast cancer. *World J Clin Oncol* *9*, 60–70.

- Thawani, J.P., Wang, A.C., Than, K.D., Lin, C.-Y., La Marca, F., and Park, P. (2010). Bone morphogenetic proteins and cancer: review of the literature. *Neurosurgery* 66, 233–246; discussion 246.
- Theodoropoulos, P.A., Polioudaki, H., Agelaki, S., Kallergi, G., Saridaki, Z., Mavroudis, D., and Georgoulas, V. (2010). Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Lett.* 288, 99–106.
- Thiebaut, C., Chamard-Jovenin, C., Chesnel, A., Morel, C., Djermoune, E.-H., Boukhobza, T., and Dumond, H. (2017). Mammary epithelial cell phenotype disruption in vitro and in vivo through ER $\alpha$ 36 overexpression. *PLoS One* 12.
- Thiebaut, C., Chesnel, A., Merlin, J.-L., Chesnel, M., Leroux, A., Harlé, A., and Dumond, H. (2019). Dual Epigenetic Regulation of ER $\alpha$ 36 Expression in Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 20.
- Thomas, C., Rajapaksa, G., Nikolos, F., Hao, R., Katchy, A., McCollum, C.W., Bondesson, M., Quinlan, P., Thompson, A., Krishnamurthy, S., et al. (2012). ERbeta1 represses basal breast cancer epithelial to mesenchymal transition by destabilizing EGFR. *Breast Cancer Res.* 14, R148.
- Tohmé, M., Prud'homme, S.M., Boulahtouf, A., Samarut, E., Brunet, F., Bernard, L., Bourguet, W., Gibert, Y., Balaguer, P., and Laudet, V. (2014). Estrogen-related receptor  $\gamma$  is an in vivo receptor of bisphenol A. *FASEB J.* 28, 3124–3133.
- Tong, J.-S., Zhang, Q.-H., Wang, Z.-B., Li, S., Yang, C.-R., Fu, X.-Q., Hou, Y., Wang, Z.-Y., Sheng, J., and Sun, Q.-Y. (2010). ER- $\alpha$ 36, a novel variant of ER- $\alpha$ , mediates estrogen-stimulated proliferation of endometrial carcinoma cells via the PKC $\delta$ /ERK pathway. *PLoS ONE* 5, e15408.
- Tonkelaar, I. den, Peeters, P.H.M., and Noord, P.A.H. van (2004). Increase in breast size after menopause: prevalence and determinants. *Maturitas* 48, 51–57.
- Tosini, G., Ferguson, I., and Tsubota, K. (2016). Effects of blue light on the circadian system and eye physiology. *Mol. Vis.* 22, 61–72.
- Tremblay, A., Tremblay, G.B., Labrie, F., and Giguère, V. (1999). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol. Cell* 3, 513–519.
- Trivedi, S., Piccart, M., Muquardt, C., Gilot, N., Hadiy, S., Patel, D., and Leclercq, G. (1996). Tamoxifen aziridine labeling of the estrogen receptor-potential utility in detecting biologically aggressive breast tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* 40, 231–241.
- Trott, J.F., Vonderhaar, B.K., and Hovey, R.C. (2008). Historical perspectives of prolactin and growth hormone as mammogens, lactogens and galactagogues--agog for the future! *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13, 3–11.
- Truitt, M.L., Conn, C.S., Shi, Z., Pang, X., Tokuyasu, T., Coady, A.M., Seo, Y., Barna, M., and Ruggero, D. (2015). Differential Requirements for eIF4E Dose in Normal Development and Cancer. *Cell* 162, 59–71.
- Tudurí, E., Marroqui, L., Dos Santos, R.S., Quesada, I., Fuentes, E., and Alonso-Magdalena, P. (2018). Timing of Exposure and Bisphenol-A: Implications for Diabetes Development. *Front. Endocrinol.* 9.

- Turner, N.C., and Reis-Filho, J.S. (2006). Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene* 25, 5846–5853.
- Urist, M.R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893–899.
- Urriola-Muñoz, P., Li, X., Maretzky, T., McIlwain, D.R., Mak, T.W., Reyes, J.G., Blobel, C.P., and Moreno, R.D. (2018). The xenoestrogens biphenol-A and nonylphenol differentially regulate metalloprotease-mediated shedding of EGFR ligands. *J. Cell. Physiol.* 233, 2247–2256.
- Van Keymeulen, A., Rocha, A.S., Ousset, M., Beck, B., Bouvencourt, G., Rock, J., Sharma, N., Dekoninck, S., and Blanpain, C. (2011). Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* 479, 189–193.
- Van Snick, J. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 253–278.
- Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Wadia, P.R., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., and Soto, A.M. (2007). Exposure to Environmentally Relevant Doses of the Xenoestrogen Bisphenol-A Alters Development of the Fetal Mouse Mammary Gland. *Endocrinology* 148, 116–127.
- Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., and Soto, A.M. (2009). Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. *Endocr Rev* 30, 75–95.
- Verheus, M., Peeters, P.H.M., Kaaks, R., van Noord, P.A.H., Grobbee, D.E., and van Gils, C.H. (2007). Premenopausal insulin-like growth factor-I serum levels and changes in breast density over menopause. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16, 451–457.
- Villadsen, R., Fridriksdottir, A.J., Rønnov-Jessen, L., Gudjonsson, T., Rank, F., LaBarge, M.A., Bissell, M.J., and Petersen, O.W. (2007). Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *J. Cell Biol.* 177, 87–101.
- Vilquin, P., Villedieu, M., Grisard, E., Ben Larbi, S., Ghayad, S.E., Heudel, P.-E., Bachelot, T., Corbo, L., Treilleux, I., Vendrell, J.A., et al. (2013). Molecular characterization of anastrozole resistance in breast cancer: pivotal role of the Akt/mTOR pathway in the emergence of de novo or acquired resistance and importance of combining the allosteric Akt inhibitor MK-2206 with an aromatase inhibitor. *Int. J. Cancer* 133, 1589–1602.
- Viñas, R., and Watson, C.S. (2013). Bisphenol S Disrupts Estradiol-Induced Nongenomic Signaling in a Rat Pituitary Cell Line: Effects on Cell Functions. *Environ Health Perspect* 121, 352–358.
- Visvader, J.E. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev.* 23, 2563–2577.
- Voeltzel, T., Flores-Violante, M., Zylbersztejn, F., Lefort, S., Billandon, M., Jeanpierre, S., Joly, S., Fossard, G., Milenkov, M., Mazurier, F., et al. (2018). A new signaling cascade linking BMP4, BMPR1A, ΔNp73 and NANOG impacts on stem-like human cell properties and patient outcome. *Cell Death Dis* 9, 1011.
- Volaklis, K.A., Halle, M., and Tokmakidis, S.P. (2013). Exercise in the prevention and rehabilitation of breast cancer. *Wien. Klin. Wochenschr.* 125, 297–301.
- Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., and Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochem Med (Zagreb)* 24, 329–342.

- Wagner, D.O., Sieber, C., Bhushan, R., Börgermann, J.H., Graf, D., and Knaus, P. (2010). BMPs: From Bone to Body Morphogenetic Proteins. *Sci. Signal.* 3, mr1–mr1.
- Wakeling, A.E., and Bowler, J. (1992). ICI 182,780, a new antioestrogen with clinical potential. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43, 173–177.
- Wakeling, A.E., Dukes, M., and Bowler, J. (1991). A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res.* 51, 3867–3873.
- Wang, Z.-Y., and Yin, L. (2015). Estrogen receptor alpha-36 (ER- $\alpha$ 36): A new player in human breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 418 Pt 3, 193–206.
- Wang, D., Huang, P., Zhu, B., Sun, L., Huang, Q., and Wang, J. (2012). Induction of estrogen receptor  $\alpha$ -36 expression by bone morphogenetic protein 2 in breast cancer cell lines. *Mol Med Rep* 6, 591–596.
- Wang, D., Gao, H., Bandyopadhyay, A., Wu, A., Yeh, I.-T., Chen, Y., Zou, Y., Huang, C., Walter, C.A., Dong, Q., et al. (2014a). Pubertal bisphenol A exposure alters murine mammary stem cell function leading to early neoplasia in regenerated glands. *Cancer Prev Res (Phila)* 7, 445–455.
- Wang, L., Xue, J., and Kannan, K. (2015). Widespread Occurrence and Accumulation of Bisphenol A Diglycidyl Ether (BADGE), Bisphenol F Diglycidyl Ether (BFDGE) and Their Derivatives in Human Blood and Adipose Fat. *Environ. Sci. Technol.* 49, 3150–3157.
- Wang, L., Li, H., Yang, S., Ma, W., Liu, M., Guo, S., Zhan, J., Zhang, H., Tsang, S.Y., Zhang, Z., et al. (2016). Cyanidin-3-o-glucoside directly binds to ER $\alpha$ 36 and inhibits EGFR-positive triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 7, 68864–68882.
- Wang, Q., Jiang, J., Ying, G., Xie, X.-Q., Zhang, X., Xu, W., Zhang, X., Song, E., Bu, H., Ping, Y.-F., et al. (2018). Tamoxifen enhances stemness and promotes metastasis of ER $\alpha$ 36 + breast cancer by upregulating ALDH1A1 in cancer cells. *Cell Res* 28, 336–358.
- Wang, R.N., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., Zhang, Q., Ye, J., Yan, Z., Denduluri, S., et al. (2014b). Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis* 1, 87–105.
- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., and Deuel, T.F. (2005). Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 1023–1027.
- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., and Deuel, T.F. (2006). A variant of estrogen receptor- $\alpha$ , hER- $\alpha$ 36: Transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9063–9068.
- Ward, L.D., Howlett, G.J., Discolo, G., Yasukawa, K., Hammacher, A., Moritz, R.L., and Simpson, R.J. (1994). High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *J. Biol. Chem.* 269, 23286–23289.
- Watanabe, T., Inoue, S., Ogawa, S., Ishii, Y., Hiroi, H., Ikeda, K., Orimo, A., and Muramatsu, M. (1997). Agonistic effect of tamoxifen is dependent on cell type, ERE-promoter context, and estrogen receptor subtype: functional difference between estrogen receptors alpha and beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 140–145.

- Watson, C.S., Jeng, Y.-J., and Kochukov, M.Y. (2010). Nongenomic signaling pathways of estrogen toxicity. *Toxicol. Sci.* *115*, 1–11.
- Wei, L.-H., Kuo, M.-L., Chen, C.-A., Chou, C.-H., Lai, K.-B., Lee, C.-N., and Hsieh, C.-Y. (2003). Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene* *22*, 1517–1527.
- Weigelt, B., and Reis-Filho, J.S. (2009). Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol* *6*, 718–730.
- Weißborn, C., Ignatov, T., Poehlmann, A., Wege, A.K., Costa, S.D., Zenclussen, A.C., and Ignatov, A. (2014). GPER functions as a tumor suppressor in MCF-7 and SK-BR-3 breast cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *140*, 663–671.
- Welsh, P.L., and King, M.C. (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 705–713.
- Welshons, W.V., Nagel, S.C., and vom Saal, F.S. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* *147*, S56-69.
- Wetherill, Y.B., Akingbemi, B.T., Kanno, J., McLachlan, J.A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C.S., Zoeller, R.T., and Belcher, S.M. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology* *24*, 178–198.
- Wijayaratne, A.L., and McDonnell, D.P. (2001). The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J. Biol. Chem.* *276*, 35684–35692.
- van den Wijngaard, A., Mulder, W.R., Dijkema, R., Boersma, C.J., Mosselman, S., van Zoelen, E.J., and Olijve, W. (2000). Antiestrogens specifically up-regulate bone morphogenetic protein-4 promoter activity in human osteoblastic cells. *Mol. Endocrinol.* *14*, 623–633.
- Williams, G.P., and Darbre, P.D. (2019). Low-dose environmental endocrine disruptors, increase aromatase activity, estradiol biosynthesis and cell proliferation in human breast cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* *486*, 55–64.
- Williams, J.M., and Daniel, C.W. (1983). Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev. Biol.* *97*, 274–290.
- Williams, C.M., Engler, A.J., Slone, R.D., Galante, L.L., and Schwarzbauer, J.E. (2008). Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. *Cancer Res.* *68*, 3185–3192.
- Wiseman, B.S., Sternlicht, M.D., Lund, L.R., Alexander, C.M., Mott, J., Bissell, M.J., Soloway, P., Itohara, S., and Werb, Z. (2003). Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *J. Cell Biol.* *162*, 1123–1133.
- Wolf, I., Sadetzki, S., Catane, R., Karasik, A., and Kaufman, B. (2005). Diabetes mellitus and breast cancer. *The Lancet. Oncology* *6*, 103–111.

- Wolff Mary S., Engel Stephanie M., Berkowitz Gertrud S., Ye Xiaoyun, Silva Manori J., Zhu Chenbo, Wetmur James, and Calafat Antonia M. (2008). Prenatal Phenol and Phthalate Exposures and Birth Outcomes. *Environmental Health Perspectives* 116, 1092–1097.
- Wolstenholme, J.T., Edwards, M., Shetty, S.R.J., Gatewood, J.D., Taylor, J.A., Rissman, E.F., and Connelly, J.J. (2012). Gestational exposure to bisphenol a produces transgenerational changes in behaviors and gene expression. *Endocrinology* 153, 3828–3838.
- Wong, S.C., Chan, J.K., Lee, K.C., and Hsiao, W.L. (2001). Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast. *J. Pathol.* 194, 35–42.
- Wong, W.K.P., Knowles, J.A., and Morse, J.H. (2005). Bone morphogenetic protein receptor type II C-terminus interacts with c-Src: implication for a role in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33, 438–446.
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., and Wang, E.A. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528–1534.
- Wozniak, A.L., Bulayeva, N.N., and Watson, C.S. (2005). Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor- $\alpha$ -mediated  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ. Health Perspect.* 113, 431–439.
- Wu, D.H., and Hatzopoulos, A.K. (2019). Bone morphogenetic protein signaling in inflammation. *Exp Biol Med (Maywood)* 244, 147–156.
- Wu, L., Wu, Y., Gathings, B., Wan, M., Li, X., Grizzle, W., Liu, Z., Lu, C., Mao, Z., and Cao, X. (2003). Smad4 as a transcription corepressor for estrogen receptor  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 278, 15192–15200.
- Wu, Q., Li, B., Li, Z., Li, J., Sun, S., and Sun, S. (2019). Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression. *J Hematol Oncol* 12.
- Wunderle, M., Pretscher, J., Brucker, S.Y., Volz, B., Hartmann, A., Fiessler, C., Hein, A., Häberle, L., Jud, S.M., Lux, M.P., et al. (2019). Association between breast cancer risk factors and molecular type in postmenopausal patients with hormone receptor-positive early breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 174, 453–461.
- Xiao, Y.-T., Xiang, L.-X., and Shao, J.-Z. (2007). Bone morphogenetic protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 550–553.
- Xin, F., Susiarjo, M., and Bartolomei, M.S. (2015). Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation? *Semin Cell Dev Biol* 43, 66–75.
- Xiong, S., Wang, Y., Li, H., and Zhang, X. (2017). Low Dose of Bisphenol A Activates NF- $\kappa$ B/IL-6 Signals to Increase Malignancy of Neuroblastoma Cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* 37, 1095–1103.
- Yadin, D., Knaus, P., and Mueller, T.D. (2016). Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev.* 27, 13–34.

- Yaguchi, T. (2019). The endocrine disruptor bisphenol A promotes nuclear ER $\alpha$  translocation, facilitating cell proliferation of Grade I endometrial cancer cells via EGF-dependent and EGF-independent pathways. *Mol. Cell. Biochem.* *452*, 41–50.
- Yalcin-Ozuyal, O., Fiche, M., Guitierrez, M., Wagner, K.-U., Raffoul, W., and Brisken, C. (2010). Antagonistic roles of Notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates. *Cell Death Differ.* *17*, 1600–1612.
- Yamamoto, T., Saatcioglu, F., and Matsuda, T. (2002). Cross-talk between bone morphogenic proteins and estrogen receptor signaling. *Endocrinology* *143*, 2635–2642.
- Yang, H., Yu, N., Xu, J., Ding, X., Deng, W., Wu, G., Li, X., Hou, Y., Liu, Z., Zhao, Y., et al. (2018). SMURF1 facilitates estrogen receptor  $\alpha$  signaling in breast cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *37*, 24.
- Yang, R., Masters, A.R., Fortner, K.A., Champagne, D.P., Yanguas-Casás, N., Silberger, D.J., Weaver, C.T., Haynes, L., and Rincon, M. (2016). IL-6 promotes the differentiation of a subset of naive CD8<sup>+</sup> T cells into IL-21-producing B helper CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* *213*, 2281–2291.
- Ye, X., Kuklenyik, Z., Needham, L.L., and Calafat, A.M. (2005). Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* *383*, 638–644.
- Ye, X., Zhou, X., Needham, L.L., and Calafat, A.M. (2011). In-vitro oxidation of bisphenol A: Is bisphenol A catechol a suitable biomarker for human exposure to bisphenol A? *Anal Bioanal Chem* *399*, 1071–1079.
- Ye, X., Wong, L.-Y., Kramer, J., Zhou, X., Jia, T., and Calafat, A.M. (2015). Urinary Concentrations of Bisphenol A and Three Other Bisphenols in Convenience Samples of U.S. Adults during 2000-2014. *Environ. Sci. Technol.* *49*, 11834–11839.
- Yin, L., Zhang, X.-T., Bian, X.-W., Guo, Y.-M., and Wang, Z.-Y. (2014). Disruption of the ER- $\alpha$ 36-EGFR/HER2 positive regulatory loops restores tamoxifen sensitivity in tamoxifen resistance breast cancer cells. *PLoS ONE* *9*, e107369.
- Yin, L., Pan, X., Zhang, X.-T., Guo, Y.-M., Wang, Z.-Y., Gong, Y., and Wang, M. (2015). Downregulation of ER- $\alpha$ 36 expression sensitizes HER2 overexpressing breast cancer cells to tamoxifen. *Am J Cancer Res* *5*, 530–544.
- Yin, Q., Wang, X., Fewell, C., Cameron, J., Zhu, H., Baddoo, M., Lin, Z., and Flemington, E.K. (2010). MicroRNA miR-155 inhibits bone morphogenetic protein (BMP) signaling and BMP-mediated Epstein-Barr virus reactivation. *J. Virol.* *84*, 6318–6327.
- Yoo, S.D., Shin, B.S., Lee, B.M., Lee, K.C., Han, S.Y., Kim, H.S., Kwack, S.J., and Park, K.L. (2001). Bioavailability and mammary excretion of bisphenol a in Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* *64*, 417–426.
- Yoshida, Y., Tanaka, S., Umemori, H., Minowa, O., Usui, M., Ikematsu, N., Hosoda, E., Imamura, T., Kuno, J., Yamashita, T., et al. (2000). Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell* *103*, 1085–1097.

- Yu, L., Das, P., Vall, A.J., Yan, Y., Gao, X., Sifre, M.I., Bortner, C.D., Castro, L., Kissling, G.E., Moore, A.B., et al. (2019). Bisphenol A induces human uterine leiomyoma cell proliferation through membrane-associated ER $\alpha$ 36 via nongenomic signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol* 484, 59–68.
- Yu, T., Liu, M., Luo, H., Wu, C., Tang, X., Tang, S., Hu, P., Yan, Y., Wang, Z., and Tu, G. (2014). GPER mediates enhanced cell viability and motility via non-genomic signaling induced by 17 $\beta$ -estradiol in triple-negative breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143, 392–403.
- Yue, X., Lu, M., Lancaster, T., Cao, P., Honda, S.-I., Staufenbiel, M., Harada, N., Zhong, Z., Shen, Y., and Li, R. (2005). Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 19198–19203.
- Zalko, D., Soto, A.M., Dolo, L., Dorio, C., Rathahao, E., Debrauwer, L., Faure, R., and Cravedi, J.-P. (2003). Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ. Health Perspect.* 111, 309–319.
- Zassadowski, F., Rochette-Egly, C., Chomienne, C., and Cassinat, B. (2012). Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cellular Signalling* 24, 2369–2377.
- Zeman, F.A., Boudet, C., Tack, K., Floch Barneaud, A., Brochot, C., Péry, A.R.R., Oleko, A., and Vandentorren, S. (2013). Exposure assessment of phthalates in French pregnant women: results of the ELFE pilot study. *Int J Hyg Environ Health* 216, 271–279.
- Zeng, S., Zhang, Y., Ma, J., Deng, G., Qu, Y., Guo, C., Han, Y., Yin, L., Cai, C., Li, Y., et al. (2017). BMP4 promotes metastasis of hepatocellular carcinoma by an induction of epithelial-mesenchymal transition via upregulating ID2. *Cancer Lett.* 390, 67–76.
- Zeps, N., Bentel, J.M., Papadimitriou, J.M., D'Antuono, M.F., and Dawkins, H.J. (1998). Estrogen receptor-negative epithelial cells in mouse mammary gland development and growth. *Differentiation* 62, 221–226.
- Zhang, M.H., Man, H.T., Zhao, X.D., Dong, N., and Ma, S.L. (2014a). Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials (Review). *Biomed Rep* 2, 41–52.
- Zhang, X., Martinez, D., Koledova, Z., Qiao, G., Streuli, C.H., and Lu, P. (2014b). FGF ligands of the postnatal mammary stroma regulate distinct aspects of epithelial morphogenesis. *Development* 141, 3352–3362.
- Zhang, X.-L., Wang, H.-S., Liu, N., and Ge, L.-C. (2015). Bisphenol A stimulates the epithelial mesenchymal transition of estrogen negative breast cancer cells via FOXA1 signals. *Arch. Biochem. Biophys.* 585, 10–16.
- Zhang, X.-L., Liu, N., Weng, S.-F., and Wang, H.-S. (2016). Bisphenol A Increases the Migration and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells via Oestrogen-related Receptor Gamma. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 119, 389–395.
- Zhang, Y., Moerkens, M., Ramaiahgari, S., de Bont, H., Price, L., Meerman, J., and van de Water, B. (2011). Elevated insulin-like growth factor 1 receptor signaling induces antiestrogen resistance through the MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling routes. *Breast Cancer Res.* 13, R52.
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K., and Gustafsson, J.-Å. (2008). Estrogen receptor  $\beta$ : an overview and update. *Nuclear Receptor Signaling* 6.

- Zhao, C., Tang, Z., Yan, J., Fang, J., Wang, H., and Cai, Z. (2017). Bisphenol S exposure modulate macrophage phenotype as defined by cytokines profiling, global metabolomics and lipidomics analysis. *Sci. Total Environ.* *592*, 357–365.
- Zhao, Z.-C., Zhou, Y., Tan, G., and Li, J. (2018). Research progress about the effect and prevention of blue light on eyes. *Int J Ophthalmol* *11*, 1999–2003.
- Zhong, Q., Peng, H.-L., Zhao, X., Zhang, L., and Hwang, W.-T. (2015). Effects of BRCA1- and BRCA2-related mutations on ovarian and breast cancer survival: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* *21*, 211–220.
- Zhou, J., Lee, P.-L., Lee, C.-I., Wei, S.-Y., Lim, S.H., Lin, T.-E., Chien, S., and Chiu, J.-J. (2013). BMP receptor-integrin interaction mediates responses of vascular endothelial Smad1/5 and proliferation to disturbed flow. *J. Thromb. Haemost.* *11*, 741–755.
- Zhou, S., Schuetz, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., et al. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* *7*, 1028–1034.
- Zhou, X., Kramer, J.P., Calafat, A.M., and Ye, X. (2014). Automated on-line column-switching high performance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry method for the quantification of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, and 11 other phenols in urine. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* *944*, 152–156.
- Zhu, L., Zou, J., Zhao, Y., Jiang, X., Wang, Y., Wang, X., and Chen, B. (2018). ER- $\alpha$ 36 mediates cisplatin resistance in breast cancer cells through EGFR/HER-2/ERK signaling pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *37*, 123.
- Zimmerman, M.A., Budish, R.A., Kashyap, S., and Lindsey, S.H. (2016). GPER - novel membrane estrogen receptor. *Clin Sci (Lond)* *130*, 1005–1016.
- Zivadinovic, D., and Watson, C.S. (2005). Membrane estrogen receptor- $\alpha$  levels predict estrogen-induced ERK1/2 activation in MCF-7 cells. *Breast Cancer Res* *7*, R130–R144.
- Zou, Y., Ding, L., Coleman, M., and Wang, Z. (2009). Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) suppresses expression of its variant ER-alpha 36. *FEBS Lett.* *583*, 1368–1374.
- Zylbersztein, F., Flores-Violante, M., Voeltzel, T., Nicolini, F.-E., Lefort, S., and Maguer-Satta, V. (2018). The BMP pathway: A unique tool to decode the origin and progression of leukemia. *Exp. Hematol.* *61*, 36–44.