



**HAL**  
open science

# Coopération des voies de signalisation des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) et des oestrogènes dans la dynamique de transformation des cellules souches mammaires à l'origine des cancers du sein

Laura Billon

► **To cite this version:**

Laura Billon. Coopération des voies de signalisation des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) et des oestrogènes dans la dynamique de transformation des cellules souches mammaires à l'origine des cancers du sein. Cancer. Université Claude Bernard - Lyon I, 2024. Français. NNT : 2024LYO10248 . tel-04960703

**HAL Id: tel-04960703**

**<https://theses.hal.science/tel-04960703v1>**

Submitted on 21 Feb 2025

**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.

**THESE de DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**École Doctorale N° 340  
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (ED BMIC)**

**Discipline** : Biologie Moléculaire et Cellulaire/Cancérologie

Soutenue publiquement le 27/11/2024, par :  
**Laura BILLON**

---

**Coopération des voies de signalisation  
des protéines morphogénétiques  
osseuses (BMP) et des œstrogènes  
dans la dynamique de transformation  
des cellules souches mammaires à  
l'origine des cancers du sein.**

---

Devant le jury composé de :

MOYRET-LALLE, Caroline	<b>Professeure</b> Université Claude Bernard Lyon1	Présidente
DI CLEMENTE RENAULD- BESSE, Nathalie	<b>Directrice de recherche</b> Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA)	Rapporteuse
GINESTIER, Christophe	<b>Directeur de recherche</b> Centre de Cancérologie de Marseille	Rapporteur
LAGADEC, Chann	<b>Chargé de recherche</b> Institut ONCOLille	Examineur
VANACKER, Jean Marc	<b>Directeur de recherche</b> Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon	Examineur
MAGUER-SATTA, Véronique	<b>Directrice de recherche</b> Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon	Directrice de thèse
GUYOT, Boris	<b>Chargé de recherche</b> Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon	Co-directeur de thèse (Invité)



## Remerciements

Je remercie tous les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'en faire partie et me permettre de pouvoir présenter mon projet. Je remercie particulièrement Nathalie DI CLEMENTE RENAULD-BESSE ainsi que Christophe GINESTIER d'avoir acceptés d'évaluer mon travail afin que je puisse soutenir ma thèse dans les meilleures conditions. Je remercie également Chann LAGADEC et Jean Marc VANACKER d'avoir accepté de faire partie de mon jury de soutenance afin de faire avancer ma réflexion scientifique sur mon travail lors de ma soutenance. Je tiens aussi à remercier Caroline MOYRET-LALLE, d'abord pour m'avoir permise d'accéder au Master Cancer qui m'a conduit par la suite à réaliser mon doctorat et également pour présider mon jury de soutenance.

Je tiens à grandement remercier ma directrice de thèse Véronique MAGUER-SATTA. Merci de m'avoir offert la chance de pouvoir continuer à travailler sur ce projet et d'avoir pu réaliser mon doctorat dans cette équipe dans laquelle je me suis pleinement épanouie. Nous savons tous à quel point les financements sont précieux encore plus dans le domaine de la recherche publique donc je te suis vraiment reconnaissante de m'avoir offert cette bourse de thèse grâce à ton travail et ta persévérance qui ton permis de gagner ce prix auprès de l'association Ruban Rose. Tu aurais pu utiliser cet argent pour tout un tas d'autres projets donc j'espère vraiment avoir été à la mesure de tes attentes. En tant que femme cheffe d'équipe et maintenant directrice adjoint du CRCL, je pense sincèrement que tu représentes un modèle inspirant de réussite pour toutes les jeunes femmes comme moi travaillant dans la science. Ton attachement pour la vulgarisation scientifique a fait naître en moi un réel intérêt dans la communication et le partage scientifique avec le grand public qui me semble aujourd'hui essentiel et que j'ai pu expérimenter grâce à divers évènements tout au long de ma thèse. Enfin je te remercie pour tout ton investissement dans le suivi de mon projet, ton expertise et ton optimisme et pour m'avoir offert la possibilité de participer à des congrès jusqu'à Montréal.

Ensuite, je tiens également à remercier mon autre directeur de thèse « non officiel » Boris GUYOT. Vraiment un grand merci pour ton temps et ta disponibilité, je ne compte pas le nombre de questions que j'ai pu te poser pendant ces presque 4 années ! Je te remercie de ta patience et de ta bienveillance qui m'ont permis de prendre un peu plus confiance en moi par rapport au début de mes stages. J'ai beaucoup appris à tes côtés, tu m'as laissé la place de proposer mes idées tout en me conseillant afin de réussir au mieux. Bien sûr comme chaque projet, ce n'était pas toujours facile (par exemple les shRNA ...) mais tu m'as permise de garder la motivation et de toujours tenter de nouvelles choses. J'ai beaucoup apprécié ton calme et ton honnêteté et, quoi qu'on en dise, moi ça me va très bien les gens calmes ! Scientifiquement parlant tu as toujours été très pertinent et je suis contente de t'avoir eu dans ma team pour éviter les questions en lab meeting auxquelles personne n'a pensé mais qui remettent tout en question. Avec Véro vous avez fait une bonne équipe pour ma supervision de thèse, entre le fonctionnel et le moléculaire j'étais bien occupée ! Et pour finir si ça ne tenait qu'à moi je trouve que tu mériterais largement ton HDR ;).

Dans la même lignée, je remercie tous les membres de l'équipe qu'ils soient anciens ou nouveaux et que j'ai pu croiser sur ma route. Vous avez tous contribué à maintenir une ambiance de travail qui me donnait toujours envie de venir au labo malgré les nombreux rebondissements techniques et biologiques que j'ai pu rencontrer durant cette thèse. Je tiens plus particulièrement à remercier Nora, qui m'a accompagné lors de mes premiers pas dans

cette équipe lorsque je n'étais encore que stagiaire. Tu as fourni un travail monstre dans des conditions par toujours faciles (Covid, conta ...) qui a permis d'ouvrir des portes et a conduit à l'établissement de mon propre projet de thèse.

Dans cette équipe, je tiens également à remercier 3 personnes qui sont devenues au fil du temps de vraies amies. Je parle évidemment de vous Cristina, Laura et Sophia ! Vous avez été d'un soutien inconditionnel pour moi du début à la fin ! Un début qui date un peu plus pour toi Cristina. On s'est suivi enfin, je t'ai suivi du début de mon stage jusqu'à la fin. Tu as été un modèle de travail et de résilience pour moi. Je te remercie pour avoir toujours répondu avec enthousiasme à mes nombreuses questions (en particulier sur la microscopie JAJA). Laura, ma jumelle maléfique (ou pas) on était faite pour s'entendre ! Tout ce que tu décides de faire, tu le fais toujours à fond et avec passion. Tu es là pour faire bouger les choses et tu m'as aidé à sortir de mon quotidien parfois trop calme et de vivre à fond comme toi. Sophia, j'admire ton engagement, ta curiosité, tu t'intéresses à plein de choses, tu t'instruis beaucoup et tu es toujours cohérente avec tes valeurs. Tu es une personne, comme qui dirait, droite dans ses bottes, qui sait ce qu'elle veut et je sais que tu atteindras tes objectifs. Initiatrices, avec Laura, du groupe CARE2S ou CARE-VS bref, vous m'avez permise d'évoluer en tant que personne en aidant à notre façon, celles et ceux qui en ont besoin et j'en suis super fière. Globalement, vous êtes toutes des meufs badass et ambitieuses et vous me motivez à l'être aussi. Pour résumer, je suis très reconnaissante de faire partie de ce quatuor infernal et je nous souhaite toutes, que du meilleur pour la suite.

Parmi, mes amies je voudrais aussi remercier celles que j'ai rencontré durant mon master, Ruxanda, Linda, et Edelweiss, qui m'ont également grandement soutenu durant toute cette période. En particulier, je veux te remercier Roxy. Tu es une véritable amie, toujours à l'écoute des autres, tu es une des personnes les plus emphatique et attentionnée que je connaisse. Nous nous sommes suivies dans ce parcours qu'est la thèse mais dans des équipes différentes, maintenant c'est à mon tour de t'apporter tout mon soutien et j'ai hâte de venir à ta soutenance car je sais que tu vas gérer et que ce sera passionnant à écouter.

Ensuite, je tiens à te remercier Killian, tu partages mon quotidien depuis quelques années maintenant. Tu as compris que ce projet était très important pour moi et parfois engageant émotionnellement et en termes de temps aussi. Mais tu as su comprendre les enjeux et t'impliquer à ta façon pour m'accompagner au mieux. Tu es venu aux événements grands publics auxquels j'ai participé, tu t'es même engagé à lire mon manuscrit alors que je sais que c'est parfois difficile de comprendre tout ce qu'on fait ici au laboratoire. Je sais que ça n'a pas toujours été facile pour toi non plus, surtout dans les périodes plus stressantes que j'ai pu traverser, mais tu as toujours été là et je n'aurais pas vécu les choses de la même façon si je ne t'avais pas rencontré avant, alors je te remercie d'être toi et je t'aime.

A ma famille, je sais à quel point ce sujet est particulier pour nous. J'ai appris au fil du temps que malheureusement nous sommes loin d'être seul dans ce cas. Mais, évoluer dans ce domaine qu'est la cancérologie, m'a permis d'apprendre, de mieux comprendre et de rencontrer un grand nombre de personnes, qui sont autant concerné que nous, et qui travaillent tous les jours à faire bouger les choses à leur échelle. Tout cela n'enlève pas la peine, mais elle m'a donné de l'espoir et la sensation de participer à ma manière, à cet espoir pour toutes les autres personnes qui pourront être touché de près comme de loin par cette maladie.

A ma mère et à mon grand-père, je pense à vous et je vous dédie ce travail en espérant que vous serez fiers de moi.

### **Coopération des voies de signalisation des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) et des œstrogènes dans la dynamique de transformation des cellules souches mammaires à l'origine des cancers du sein.**

L'incidence des cancers du sein augmente, ce qui souligne l'importance de la détection des mécanismes d'initiation qui sont encore mal connus. Une des cibles majeures d'initiation tumorale sont les cellules souches car elles partagent de grandes similarités avec les cellules souches cancéreuses et leur longue durée de vie les rend plus sensibles aux expositions aux polluants comme les bisphénols. Nous avons démontré au laboratoire que l'exposition à des bisphénols entraînait des altérations du microenvironnement et du fonctionnement des cellules souches en perturbant la voie des BMP. Ce projet vise à développer de nouvelles approches plus pertinentes pour évaluer l'effet de l'utilisation du bisphénol S en remplacement du bisphénol A. Pour cela nous avons utilisé un modèle de cellules souches mammaires saines (MCF10A). Nous avons démontré qu'il y avait des interactions possibles entre les récepteurs BMPR1b et GPER et que le BPS en combinaison avec le BMP2 augmentait spécifiquement leur capacité souche après une exposition courte. Nous avons également réalisé des expositions chroniques de 5 mois. Bien que nous n'ayons pas pu associer l'exposition aux bisphénols à une réelle transformation, nous avons confirmé que le BPS pouvait induire des effets spécifiques par rapport au BPA, sur la perturbation de l'expression des gènes et des voies de signalisation grâce à des approches -omiques. Au-delà de ces connaissances fondamentales, ce projet a pour objectif de contribuer aux bases scientifiques sous-jacentes aux futures actions de régulation et de prévention liées aux bisphénols pour réduire l'incidence des cancers du sein et pourrait dégager de nouvelles cibles thérapeutiques.

**Mots clés** : Cellules souches, voies des BMP, Œstrogènes, Bisphénols, Cancers du sein

## Abstract and keywords

### **Cooperation of bone morphogenetic protein (BMP) and estrogen signalling pathways in the transformation dynamics of mammary stem cells at the origin of breast cancer.**

The significant increase of breast cancer highlights the importance of identifying the mechanisms underlying cancer initiation which are still unknown. One of the major targets of cancer initiation corresponds to stem cells as they share many features with cancer stem cells and they have a long lifespan, making them more sensitive to pollutants. In the laboratory, we have demonstrated that bisphenols treatment had a significant impact on the microenvironment and stem cells function perturbing BMP signalling pathway. This project aims to develop new relevant approaches to evaluate the impact of using bisphenol S as a substitute for bisphenol A. For that purpose, we have used a healthy stem mammary cell line model (MCF10A). We have demonstrated the possible interaction between BMPRIb and GPER receptors. The short exposure to BPS in combination with BMP2 specifically increased cell stemness. Additionally, we have performed chronic exposures for 5 months. Although we have not been able to correlate the exposition of bisphenols to cells transformation, we have confirmed that BPS can specifically affect the alteration of genes expression and signalling pathways, as shown by OMIC approaches, when compared to BPA. In addition to the acquisition of this fundamental knowledge, this project aims to contribute to the scientific basis guiding future actions of regulation and prevention related to bisphenols in order to reduce breast cancer incidence and likely identify new therapeutic targets.

**Keywords:** Stem cells, BMP pathway, Estrogens, Bisphenols, Breast Cancer

## Avant-propos

### Laboratoire

BMP, Ecosystème, Cellules Souches & Dynamique du Cancer  
Equipe Véronique Maguer-Satta, Cheney D, 4ème étage  
Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL)  
UMR INSERM 1052 CNRS 5286 - Centre Léon Bérard - Université Claude Bernard Lyon 1  
28 Rue Laennec, 69008 Lyon  
France

### Communications scientifiques

Congrès Aurastem (03 au 04/10/2024) Montréal – **Poster**  
Réunion du département scientifique CITI du CRCL (15/02/2024) – **Communication orale**  
Congrès FSTM GDR3697 Micronit (20/12/2023) Le Croisic – **Communication orale**  
Congrès Aurastem (20/10/2023) Lyon – **Communication orale**  
Symposium du CRCL (02 au 04/11/2022) Lyon – **Poster**  
Congrès Aurastem (16 au 14/05/2022) Lyon – **Poster**

### Communications scientifiques vulgarisées

Participation à 2 demi-journées Declics pour la médiation sur la recherche scientifique à destination des lycéens (29/11 et 12/12/2023) Lyon  
Participation à la gestion des ateliers du stand du CRCL lors du Festival Pop'Sciences (13 au 14/05/2023) Villeurbanne  
Participation à la fête de la Science dans l'accueil et la réalisation d'ateliers pour le grand public au laboratoire du CRCL (10/2022) Lyon  
Poster vulgarisé pour la soirée grand public organisée par le Cancéropôle Lyon Auvergne-Rhône-Alpes (CLARA) (31/05/2022) Lyon

## Table des matières

Remerciements.....	2
Résumé et mots clés.....	4
Abstract and keywords .....	5
Avant-propos .....	6
Liste des Figures et Tableaux .....	9
Liste des abréviations .....	10
Introduction.....	13
Chapitre 1. La glande mammaire .....	14
I. Développement de la glande mammaire.....	14
A. Origine.....	14
B. Stade embryonnaire.....	15
C. Puberté.....	18
D. Modification de la glande mammaire chez l'adulte.....	20
E. La Grossesse .....	21
F. La Ménopause .....	22
Chapitre 2. Les cancers du sein .....	22
I. Généralités .....	22
A. Incidence .....	22
B. Classification .....	23
II. Origine des cancers du sein.....	27
A. Facteurs de risques .....	28
B. Hypothèses sur l'origine des cancers du sein .....	29
Chapitre 3. Les cellules souches .....	31
I. Les cellules souches mammaires normales .....	32
A. Identification des cellules souches .....	32
B. Différenciation des cellules souches .....	33
C. Régulation hormonale.....	34
II. Les cellules souches cancéreuse du sein (bCSC) .....	35
Chapitre 4. La signalisation œstrogénique .....	37
I. Les œstrogènes.....	37
A. Biosynthèse .....	37
B. Les récepteurs .....	38
C. La signalisation .....	41



D.	Implication de GPER dans les cancers du sein .....	44
II.	Les Bisphénols .....	46
A.	Origine.....	46
B.	Exposition.....	47
C.	Métabolisme du BPA.....	49
D.	Législation .....	51
III.	Toxicité des bisphénols .....	52
A.	Notion d'affinité .....	52
B.	Mode d'action des bisphénols .....	54
C.	Implication dans la tumorigenèse.....	56
Chapitre 5. Les Bone Morphogenetic Proteins (BMP) .....		61
I.	Le mécanisme d'action des BMP .....	61
A.	Généralités .....	61
B.	Interaction ligand récepteur .....	63
C.	Voies de signalisation.....	66
D.	Les régulateurs des BMP .....	68
II.	Les BMP dans la glande mammaire .....	70
A.	Rôle physiologique .....	70
B.	Implication dans les cancers du sein.....	72
C.	Coopération entre les œstrogènes et les BMP .....	76
Contexte scientifique – Objectifs de la thèse .....		79
Scientific paper .....		81
Discussion .....		123
Perspectives.....		137
Références .....		141

## Liste des Figures et Tableaux

Figure 1. Les crêtes mammaires chez l'embryon. ....	15
Figure 2. Stades du développement mammaire embryonnaire .....	16
Figure 3. Signalisation en aval engagée par PTHrP pendant le développement mammaire embryonnaire.....	17
Figure 4. Vue schématique des événements survenant au cours du développement pubertaire .....	20
Figure 5. Diagrammes représentant la répartition des cas et des décès pour les principaux cancers dans le monde en 2022 pour les femmes.....	23
Figure 6. Les différents stades de développement des cancers du sein .....	24
Figure 7. Les différentes classifications des cancers du sein.....	27
Figure 8. Hypothèses sur l'origine des cellules souches cancéreuses (CSC). ....	31
Figure 9. Représentation schématique de la hiérarchie des cellules souches dans la glande mammaire .....	34
Figure 10. Rôle et synthèse des œstrogènes.....	38
Figure 11. Représentation schématique de la structure des récepteurs nucléaires aux œstrogènes.....	39
Figure 12. Les voies de signalisation en aval de GPER. ....	44
Figure 13. Tableau récapitulatif de plusieurs études à travers le monde détectant la présence de BPA dans les conserves et les cannettes. ....	48
Figure 14. Sources d'exposition et métabolisme du BPA dans le foie.....	50
Figure 15. Représentation de la liaison du ligand et tableau des affinités de liaison relative par rapport à l'E2.....	53
Figure 16. Exemple de courbe Dose-réponse monotone et non monotones.....	55
Figure 17. Mécanismes d'action du BPA via son activité oestrogénique, favorisant l'initiation et la progression tumorale. ....	59
Figure 18. Représentation des membres de la superfamille du TFG- $\beta$ .....	62
Figure 19. Représentation non exhaustive des rôles des BMP dans l'organisme. ....	63
Figure 20. Mécanismes de signalisation possibles induits par le ligand BMP.....	66
Figure 21. Représentation des voies de signalisation induite par les BMP. ....	68
Figure 22. Les différents régulateurs de la voie des BMP.....	70
Figure 23. Rôles des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) dans le cancer.....	74
Figure 24. Implication de BMP2 et BMP4 dans la régulation des cellules souches mammaires dans un contexte normal et tumoral.....	76
Figure 25. Résultats de RNA-seq montrant le profil d'expression transcriptomique des gènes ESRR A, ESRR B et ESRR G.....	128
Figure 26. Résultats concernant l'activation de la voie NF-kB par l'exposition au BMP2/BPS. ....	130
Figure 27. Voies canoniques et non canoniques de la signalisation NF-KB. ....	134
Figure 28. Schéma de conclusion représentant une coupe d'un canal de la glande mammaire ainsi que son microenvironnement.....	139

## Liste des abréviations

ADAM17: A Disintegrin And Metalloprotease 17  
AF-1/2: Activation Function 1/2 domain  
AMPC: cyclic Adenosine Monophosphate  
AREG: Amphiregulin  
 $\alpha$ -SMA: alpha Smooth Muscle Actin  
bCSC: breast Cancer Stem Cells  
BMP: Bone Morphogenetic protein  
BMPR1a/b: Bone Morphogenetic Protein Receptor type I a/b  
BPA, BPS: Bisphenols A, S  
BPA-G: BPA-Glucuronide  
BRCA1/2: Breast Cancer 1/2  
CAF: Cancer-Associated Fibroblast  
CK: Cytokeratin  
CREB: C-AMP Response Element-Binding protein  
CSC : Cancer Stem Cells  
DBD: DNA Binding Domain  
DCIS: Ductal Carcinoma *In Situ*  
DES: Diethylstilbestrol  
E1: Estrone  
E2: Estradiol  
E3: Estriol  
EGF: Epidermal Growth Factor  
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor  
EMT: Epithelial-mesenchymal transition  
EPCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule  
ER $\alpha$ / $\beta$ : Estrogens Receptor  $\alpha$ / $\beta$   
ERR: Estrogens-Related Receptor  
ESR1/2: Estrogens Receptor 1/2 gene

FGF: Fibroblast Growth Factor  
GATA-3: GATA Binding Protein 3  
GDF: Growth Differentiation Factor  
GH: Growth Hormone  
GPCR: G-Protein Coupled Receptor  
GPER: G-Protein coupled Estrogens Receptor  
HER: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2  
HIF-1 $\alpha$ : Hypoxia-Inducible Factor 1 subunit  $\alpha$   
ID: Inhibitor of Differentiation  
IGF1: Insulin-like Growth Factor-1  
IP3: Inositol-trisphosphate  
LBD: Ligand Binding Domain  
LCIS: Lobular Carcinoma *In Situ*  
LH: Luteinizing Hormone  
MaSC: Mammary Stem Cells  
MMP2: Matrix Metalloproteinase-2  
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase  
MRU: Mammary Repopulating Units  
MSX1/2: Msh Homeobox 1/2  
NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor-Kappa B  
NST: No Special Type  
PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinases  
PLC: Phospholipase C  
PR: Progesterone Receptor  
PTHrP: Parathyroid hormone related protein  
PTHR1: Type 1 PTHrP receptor  
SERM: Selective Estrogens Receptor Modulator  
SMAD: Small Mother Against Decapentaplegic protein  
Tbx3: T-box transcription factor 3  
TEB : Terminal End Buds  
TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor-beta

THS: Traitements Hormonaux Substitutifs

TNBC: Triple-Negative Breast Cancer

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

YAP: Yes-Associated Protein

# Introduction

## Chapitre 1. La glande mammaire

La glande mammaire est une glande exocrine présente chez les mammifères. Elle a pour fonction la production et la sécrétion de lait offrant l'alimentation nécessaire à la progéniture des différentes espèces. C'est un organe unique car il atteint son stade de développement complet seulement après la naissance sous l'influence de signaux hormonaux, notamment des œstrogènes. De part cette particularité, la glande mammaire a servi de modèle pour l'étude du développement et des cellules souches adultes. En effet, c'est un organe très dynamique pouvant subir de nombreux changements au cours de la vie. Par exemple, elle est soumise à de petites variations régulières induites par le cycle menstruel. Mais elle est également capable de subir des remaniements majeurs, comme ceux observés lors d'une grossesse, avec l'instauration puis l'arrêt de la lactation. C'est cette grande plasticité, qui a mis en évidence l'importance de la présence de cellules souches/progénitrices persistantes après l'embryogenèse (Inman et al., 2015) .

### I. Développement de la glande mammaire

Une grande partie de nos connaissances au niveau de l'embryogenèse de la glande mammaire est basée sur l'étude de modèles murins. Malgré des différences anatomiques notables, les principaux gènes associés au développement de la glande mammaire sont très conservés entre les espèces (Spina & Cowin, 2021). La génération de modèles de souris génétiquement modifiées ont également permis d'identifier des gènes impliqués dans des troubles liés au développement chez l'Homme ou encore, dans des processus de tumorigenèse mammaire humaine (Dravis et al., 2018). Ces données ont pu être confirmées et précisées par certaines équipes travaillant directement sur des embryons humains obtenus après une interruption de grossesse. Cette introduction compilera donc des études menées à la fois chez l'humain et dans des modèles murins.

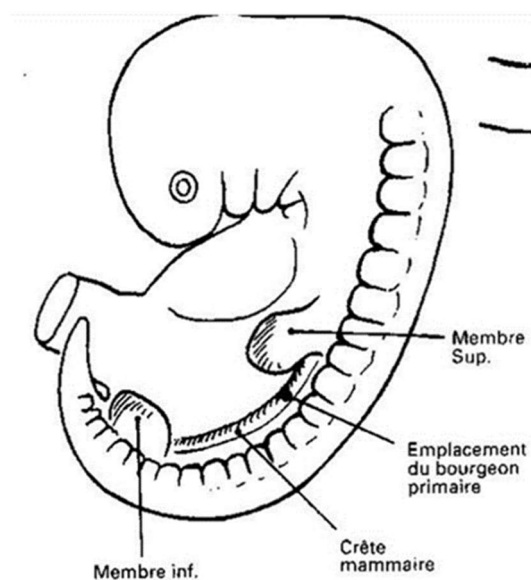
#### A. Origine

En comparant l'anatomie de divers espèces, l'origine des glandes mammaires semblent provenir de glandes apocrines ancestrales associées aux poils. En effet, des preuves moléculaires suggèrent que des sécrétions cutanées impliquées dans la protection des œufs,

ont évolué afin d'assurer la lactation. Ce processus permet un transfert direct à la progéniture de 10% des réserves de calcium maternel grâce à des mécanismes de résorption osseuse, conférant un avantage évolutif en assurant une croissance rapide de la descendance (Wysolmerski, 2003). Cela explique également le fait que de nombreuses protéines impliquées dans le développement de la glande mammaire soient aussi impliquées dans le métabolisme osseux, comme les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) qui sont essentielles à différents stades de la physiologie du sein.

## B. Stade embryonnaire

Chez l'Homme comme chez la souris, le développement de la glande mammaire débute par l'épaississement de l'ectoderme donnant naissance à deux crêtes mammaires qui s'étendent des bourgeons des membres supérieurs, aux membres inférieurs de l'embryon. Ces crêtes seraient le résultat de l'expression antagoniste simultanée du ligand BMP4 au niveau ventral et du facteur de transcription Tbx3 au niveau dorsal (Cho et al., 2006). Chez l'Homme elles apparaissent à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine du développement embryonnaire. Des études suggèrent que les cellules de la lignée mammaire migreraient le long de ces crêtes pour former par la suite des bourgeons mammaires (J. R. Hens & Wysolmerski, 2005) (**Fig. 1**).

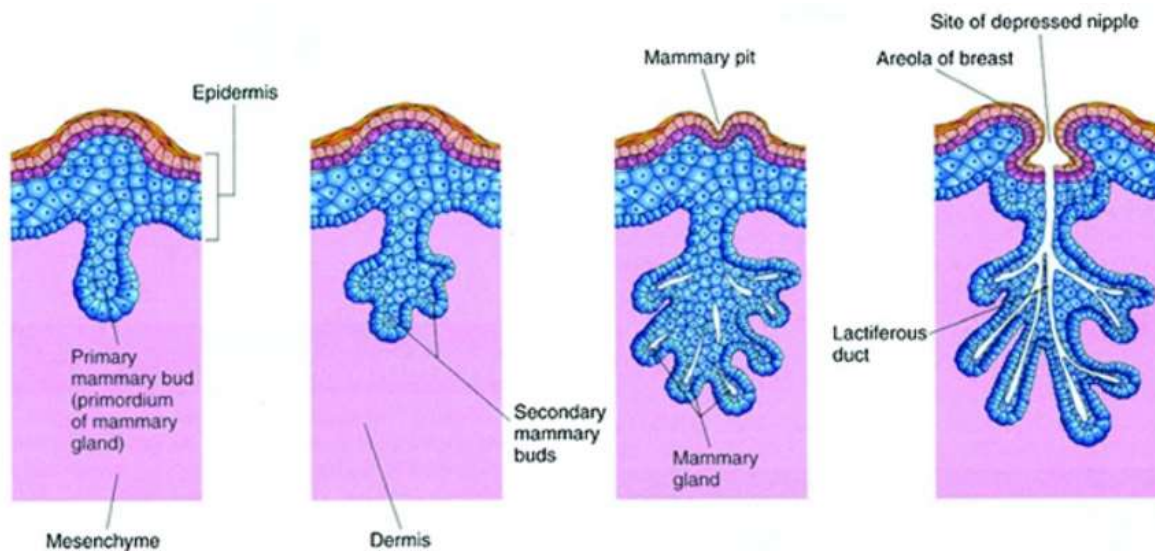


**Figure 1. Les crêtes mammaires chez l'embryon.**

Schéma représentant l'emplacement des crêtes mammaires chez l'embryon humain. D'après (Anatomie de la glande mammaire, s. d.)



Autour de la 6<sup>ème</sup> semaine, les crêtes mammaires disparaissent laissant place à deux bourgeons mammaires persistants formant l'aréole grâce à l'implication de la signalisation Wnt. Les cellules du bourgeons mammaires vont par la suite, proliférer et s'invaginer dans le mésenchyme sous-jacent afin de donner naissance à entre 15 et 20 prolongements formés de cellules épithéliales jusqu'à atteindre le coussinet adipeux en formation (**Fig. 2**).



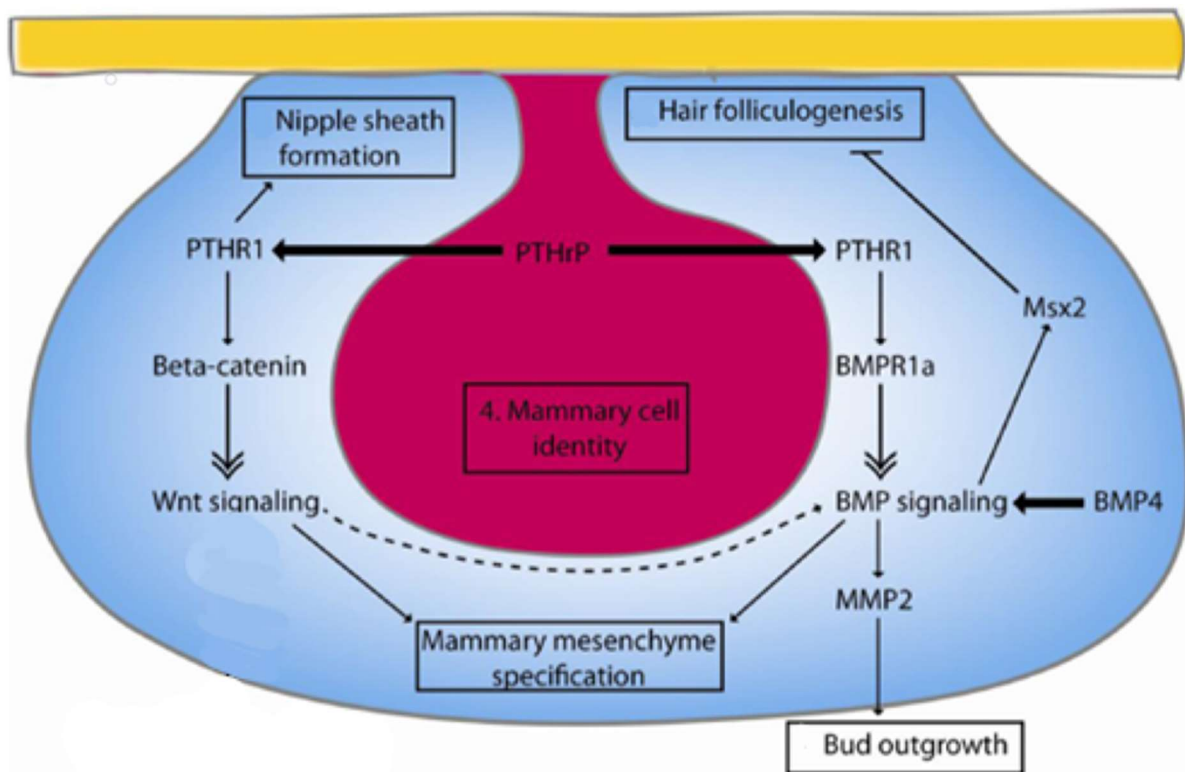
**Figure 2. Stades du développement mammaire embryonnaire**

*Coupes transversales d'une crête mammaire au niveau du site de développement de la glande mammaire montrant les stades successifs du développement mammaire. D'après (Javed & Lteif, 2013).*

Ce processus implique encore une fois la signalisation des BMP, associée à celle de la protéine liée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP). En effet, les cellules épithéliales mammaires expriment PTHrP et son récepteur PTHR1 est exprimé par les cellules du mésenchyme. Ce dialogue entraîne une augmentation de l'expression du récepteur BMPR1a par les cellules du mésenchyme sous-jacent. Cela conduit à l'augmentation de leur sensibilité à la signalisation autocrine et paracrine du ligand BMP4 et à la production de la métalloprotéase matricielle 2 (MMP2). Le relargage de MMP2 induit l'inhibition de follicules pileux autour du canal mammaire permettant la production de plusieurs ramifications canalaire. Cet effet du BMP4 est également retrouvé dans la morphogénèse de ramifications se produisant dans d'autres organes comme dans les poumons, les reins ou encore les glandes salivaires. En parallèle, la

signalisation PTHrP induit la signalisation Wnt/beta-caténine impliquée dans la différenciation du mésenchyme mammaire (J. Hens et al., 2009).

La signalisation PTHrP est également impliquée dans la formation du mamelon. Elle induit la surexpression de certains kératinocytes conduisant à l'épaississement local de l'épiderme et inhibant la formation de follicules pileux via l'expression de Msx2 (**Fig. 3**).



**Figure 3. Signalisation en aval engagée par PTHrP pendant le développement mammaire embryonnaire**

La PTHrP est sécrétée par l'épithélium mammaire (rouge) et agit sur le mésenchyme mammaire (bleu) pour activer la signalisation via la  $\beta$ -caténine. La signalisation PTHrP, via PTHR1, régule également à la hausse BMPR1a et sensibilise les cellules mésenchymateuses mammaires à BMP4, régulant peut-être à la hausse la signalisation BMP dans le mésenchyme mammaire. Cette voie est nécessaire à la croissance des bourgeons, via MMP2 et à l'inhibition de la folliculogenèse pileuse dans le mamelon, via Msx2. La signalisation PTHrP maintient également l'identité épithéliale mammaire via la signalisation dans le mésenchyme mammaire, bien que le mécanisme exact reste inconnu. Figure modifiée de (Hiremath & Wysolmerski, 2013).

A partir du 7<sup>ème</sup> mois, une lumière se forme donnant naissance à l'ébauche des premiers canaux galactophores. Des données d'immunohistochimie ont permis de suivre l'apparition de deux types cellulaires distincts : les cellules primaires centrales des bourgeons et les cellules primaires basales (adjacentes à la membrane basale). Ces cellules dériveraient d'un progéniteur commun présent dans les structures terminales des bourgeons et exprimant la cytokératine 19 (CK19). Plus les excroissances épithéliales se développent en profondeur du bourgeon primaire, plus on observe une différenciation des types cellulaires. Progressivement, certaines cellules vont perdre leur expression de CK19 pour exprimer un marqueur connu des cellules basales : la cytokératine 14 (CK14). Par la suite, une différenciation précoce de certaines cellules basales en cellules myoépithéliales est permise par un changement morphologique et l'expression d'une protéine d'actine impliquée dans la contraction des muscles lisses : l' $\alpha$ -SMA (alpha smooth muscle actin). La différenciation en cellule luminale, est quant à elle marquée par l'expression des cytokératines 8 et 18 au niveau des cellules en contact direct avec la lumière des canaux.

A ce stade, aucune différence n'est observée entre les sexes chez l'espèce humaine. La glande mammaire va rester dans cet état quiescent jusqu'au stade de la puberté (Howard & Gusterson, 2000).

### C. Puberté

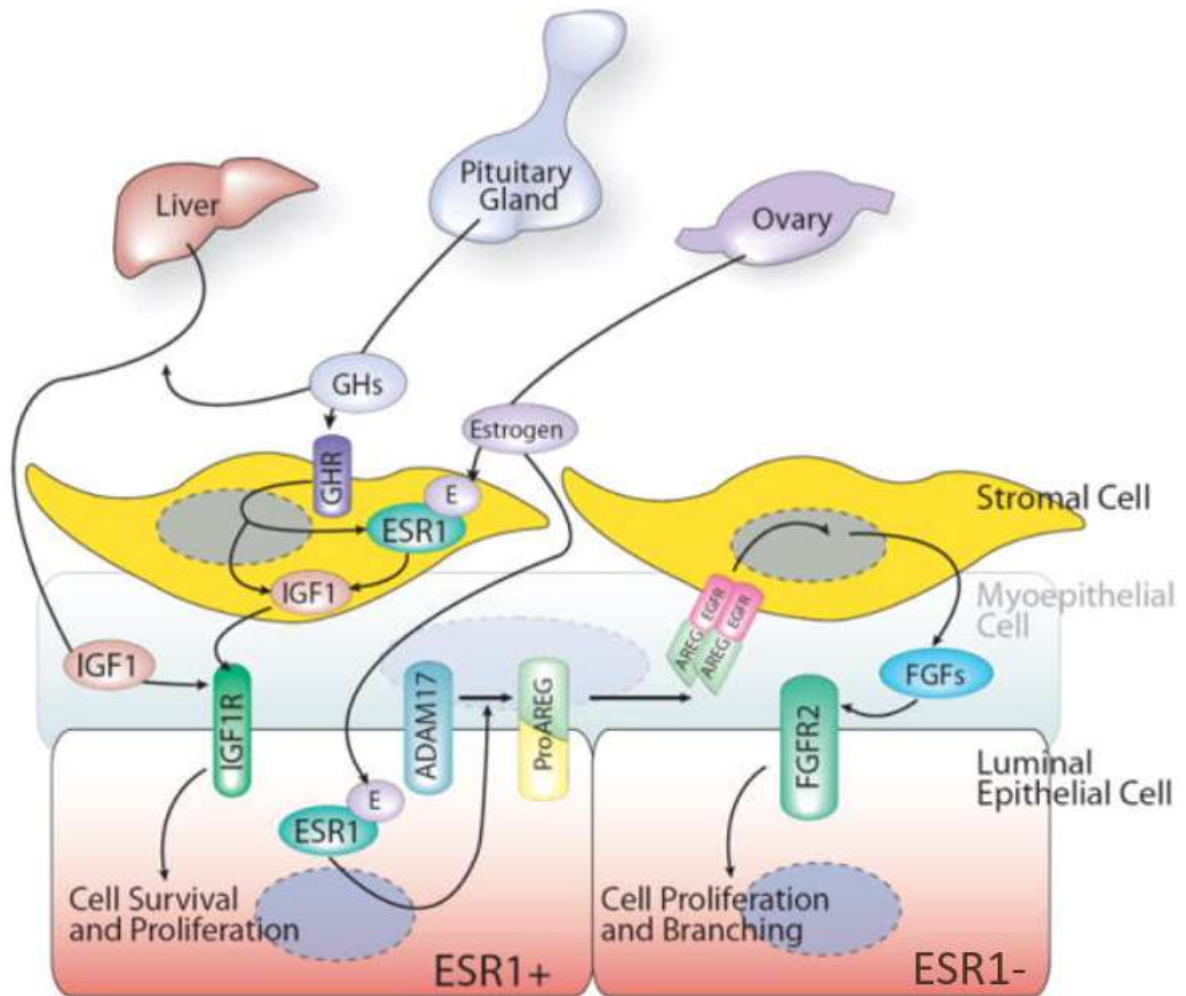
La phase de puberté est marquée par l'exposition aux hormones et aux facteurs de croissance induisant la prolifération des cellules mammaires. Les cellules vont subir une phase d'expansion en envahissant jusqu'à 60% du coussinet adipeux. Les 40% restant seront disponibles dans le cas d'une éventuelle grossesse pour la mise en place de la lactation. Des branches secondaires vont se former à partir des canaux primaires. Sous l'influence des œstrogènes des branches tertiaires apparaissent. Cette arborescence donne naissance à des structures terminales appelées unités lobulaires terminales ou encore TEB (Terminal End Buds). A partir de ce stade, on commence à observer des différences entre les sexes : chez l'homme l'arborescence se met en place mais de nombreux canaux se forment sans la présence de TEB contrairement aux femmes, ces terminaisons simples sont alors appelées acini (Macias & Hinck, 2012a).

## Effets des hormones

Lors de la puberté, l'hormone de croissance (GH) sécrétée par l'hypophyse, va agir directement sur le foie et le stroma mammaire afin d'induire l'expression du facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (IGF1). Ce facteur est impliqué dans la survie et la prolifération des cellules de la glande mammaire. En effet, des études ont démontré que les souris *igf1<sup>-/-</sup>* présentaient des défauts importants de développement canalaire.

D'autre part, l'activation du cycle ovarien va entraîner la production d'œstrogènes sécrétés par les ovaires, appelé estradiol (E2). L'estradiol devient alors l'œstrogène majoritaire chez la femme jusqu'à la ménopause.

Les œstrogènes agissent avec l'IGF1 pour réguler la morphogenèse canalaire et stimuler directement la prolifération des cellules épithéliales. Il a été démontré que des cellules épithéliales mammaires étaient sensibles aux œstrogènes. Pourtant, seule une sous-population de cellules luminales semblent exprimer le récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$ . Une des explications, est que les cellules ER $\alpha$ <sup>+</sup> transmettent la signalisation de manière paracrine aux autres cellules ER $\alpha$ <sup>-</sup>. En effet, ER $\alpha$  activé induirait la libération d'un membre de la famille des facteurs de croissance épidermique (EGF) : l'amphiréguline (AREG). Cette libération se produirait via l'activation de la métalloprotéase ADAM 17 entraînant le clivage et le relargage de AREG activé. Par la suite, les cellules stromales vont pouvoir capter ce signal via leurs récepteurs EGFR. Cela conduira à la sécrétion du facteur de croissance des fibroblastes (FGF) induisant un signal de prolifération au sein des cellules ER $\alpha$ <sup>-</sup>, comme les progéniteurs bipotents ou encore les cellules souches. Ces dernières n'expriment pas les récepteurs aux œstrogènes ER $\alpha$  mais les signaux paracrines qu'elles reçoivent sont essentiels pour le développement de l'arborescence mammaire (Hannan et al., 2023). Tout cela démontre l'importance du dialogue entre les cellules de la glande mammaires et les cellules de son microenvironnement (**Fig. 4**).



**Figure 4. Vue schématique des événements survenant au cours du développement pubertaire**

L'hormone de croissance (GH) régule la prolifération cellulaire en induisant l'expression du facteur de croissance analogue à l'insuline-1 (IGF1) dans le foie et le stroma mammaire. L'IGF1 agit, avec l'œstrogène sécrété par l'ovaire, pour induire la prolifération des cellules épithéliales. La signalisation des œstrogènes par son récepteur (ESR1) agit de manière paracrine pour stimuler la libération d'un membre de la famille des facteurs de croissance épidermiques (EGF), AREG, qui se lie à son récepteur sur les cellules stromales et induit l'expression des FGF. Les FGF, à leur tour, stimulent la prolifération des cellules luminales. D'après (Macias & Hinck, 2012b).

#### D. Modification de la glande mammaire chez l'adulte

Le cycle menstruel est régi par des fluctuations d'hormones comme les œstrogènes et la progestérone. Ce cycle est composé de plusieurs phases pouvant impacter la physiologie de la

glande mammaire. La phase folliculaire est marquée par la présence majoritaire des œstrogènes. Ils exercent une activité proliférative sur les canaux épithéliaux via leur fixation aux récepteurs ER $\alpha$  et à leur signalisation paracrine, comme nous l'avons vu précédemment. Ce taux élevé d'œstrogènes entraîne la production d'une autre hormone : l'hormone lutéinisante (LH). Cette augmentation va atteindre un pic déclenchant l'ovulation. Après la libération de l'ovule, la phase lutéale débute avec la stimulation de la synthèse d'une nouvelle hormone : la progestérone. Lors de cette phase un deuxième pic d'œstrogènes va avoir lieu afin de stimuler l'expression des récepteurs à la progestérone (PR).

La progestérone possède également un effet mitotique sur les cellules épithéliales permettant le développement de bourgeons alvéolaires. Il a été démontré que la prolifération des cellules mammaires était positivement corrélée au taux sérique de progestérone (Söderqvist et al., 1997). L'objectif de cette phase est de préparer la glande mammaire en cas d'éventuelle grossesse. Les bourgeons alvéolaires nouvellement formés nécessitent un apport continu de progestérone pour perdurer. Lorsqu'il n'y a pas de fécondation, le taux de progestérone diminue entraînant la régression de ces bourgeons par apoptose (Atashgaran et al., 2016).

A cause de leurs effets mitotiques, les œstrogènes et la progestérone ont été associés à un risque de cancer du sein plus élevé. En effet, il a été démontré qu'une puberté précoce et une ménopause tardive augmentait le risque de cancers du sein (« Menarche, menopause, and breast cancer risk », 2012). Plus les cellules épithéliales sont soumises à un nombre de cycles prolifératifs importants plus le risque d'apparition de mutations est élevé (Henderson & Feigelson, 2000).

## E. La Grossesse

Si lors du cycle menstruel une fécondation a lieu, alors la synthèse de progestérone induite après l'ovulation va se maintenir et agir avec d'autres facteurs comme la prolactine pour orchestrer l'expansion de la glande mammaire. Durant la grossesse, un profond réarrangement va se mettre en place, conduisant à la différenciation de l'épithélium alvéolaire en cellules productrices de lait. Le potentiel régénératif et d'expansion de l'épithélium mammaire a suggéré la présence de populations hétérogènes de cellules souches et de progéniteurs. Dans chaque alvéole, plusieurs cellules souches/progéniteurs mammaires contribuent aux

populations clonales luminales et basales. Ces cellules sont également préservés lors de l'involution de la glande mammaire pour favoriser le cycle suivant (Davis et al., 2016).

## F. La Ménopause

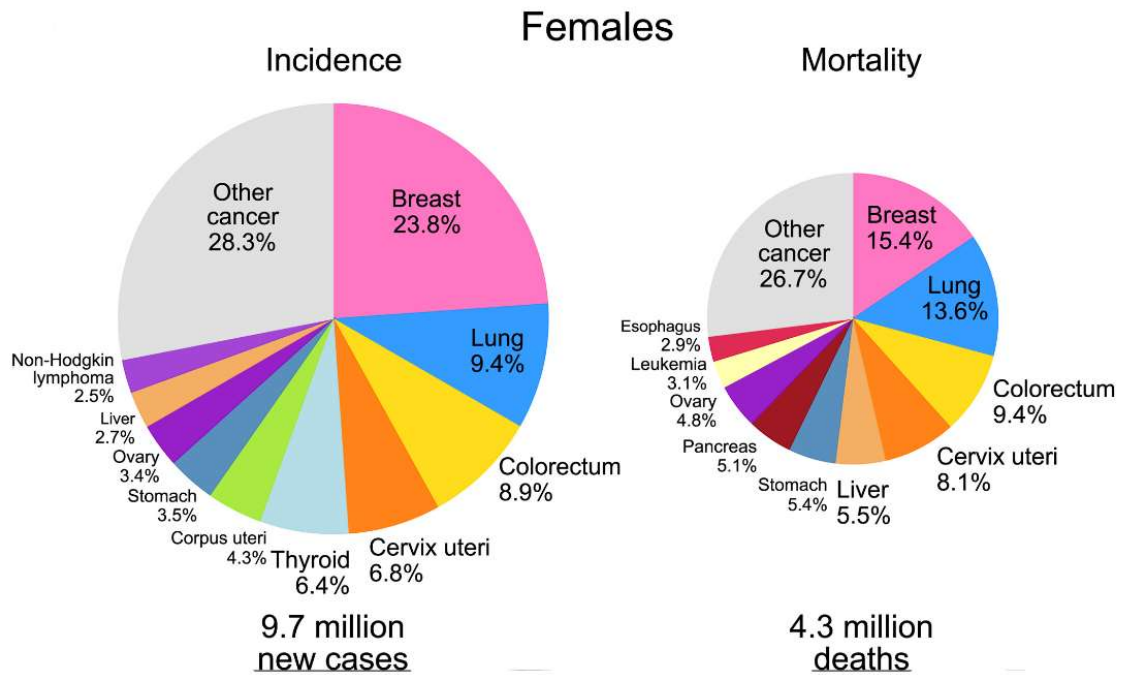
La ménopause est définie par l'arrêt du cycle ovarien et donc l'arrêt de la production d'estradiol et de progestérone par les ovaires. Cependant il existe toujours une synthèse d'un autre type d'œstrogènes, appelé estrone (E1), qui devient majoritaire et est produit par les tissus périphériques. Ces changements endocriniens conduisent à la réduction du nombre et de la taille des lobules de la glande mammaire : c'est l'involution lobulaire. Ils induisent également l'augmentation de cellules épithéliales mammaires exprimant le récepteur ER $\alpha$ . En effet, on passe de 10% de cellules ER $\alpha$ + à près de 90% en phase post ménopause (McCready et al., 2010). Le microenvironnement mammaire subit également des changements. Le tissu mammaire s'enrichit en adipocytes permettant notamment la synthèse d'E1.

## Chapitre 2. Les cancers du sein

### I. Généralités

#### A. Incidence

En 2022, les cancers du sein représentent la plus forte incidence et la première cause de mortalité par cancer chez les femmes (**Fig. 5**). Les hommes peuvent aussi être concernés, bien que les cas restent rares, car ils représentent moins de 1% de tous les cancers du sein. Au niveau mondial, les cancers du sein sont le deuxième type de cancer les plus fréquemment diagnostiqués. De plus, son incidence ne cesse d'augmenter ce qui en fait un enjeu majeur de santé publique. Cette augmentation s'explique principalement par l'accroissement et le vieillissement général de la population mais il existe également d'autres facteurs de risques connus (Bray et al., 2024).



**Figure 5. Diagrammes représentant la répartition des cas et des décès pour les principaux cancers dans le monde en 2022 pour les femmes.**

La surface de chaque part du diagramme reflète la proportion du nombre total de cas ou de décès. Les cancers cutanés non mélanocytaires (à l'exclusion du carcinome basocellulaire) sont inclus dans la catégorie « Other cancer ». D'après (Bray et al., 2024).

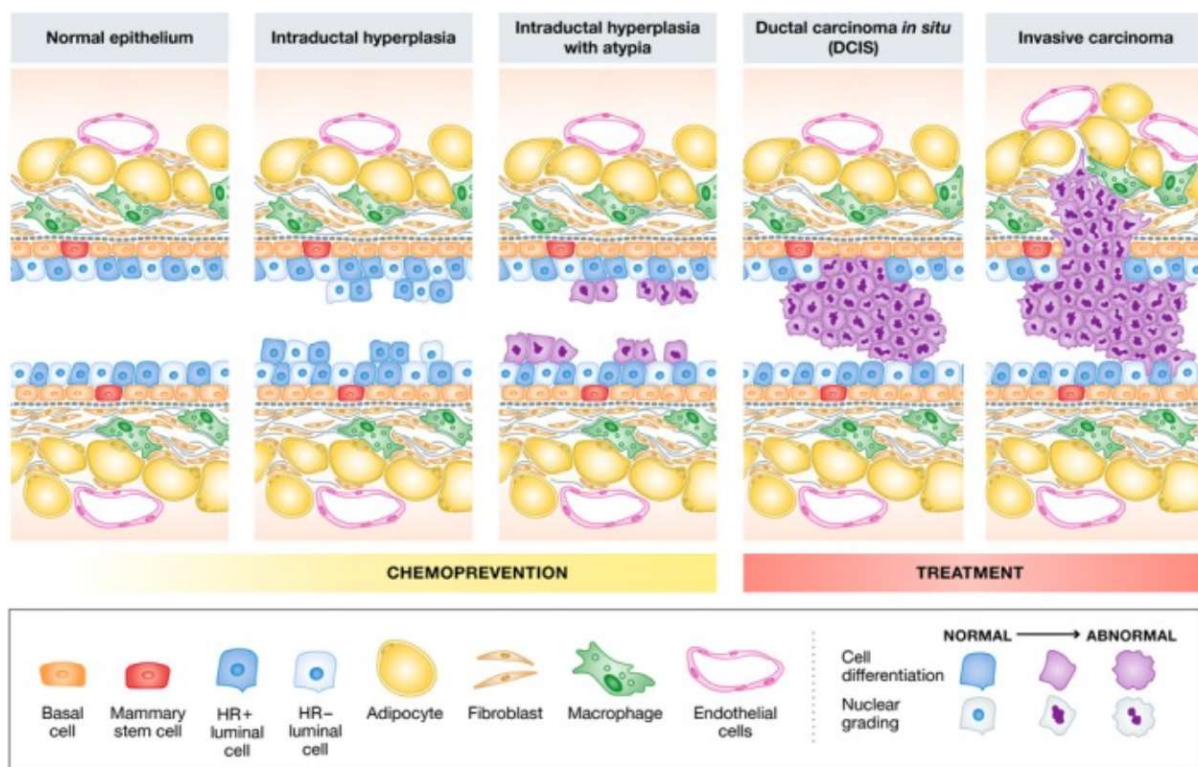
## B. Classification

Il existe de nombreux types de cancers du sein. C'est cette grande hétérogénéité qui rend difficile le choix du traitement car les cellules cancéreuses ne possèdent pas les mêmes sensibilités. Pour aider à la bonne prise en charge des patients, différentes classifications ont été mises en place.

La classification histologique est basée sur l'apparence et le comportement des cellules cancéreuses. Il existe 2 types principaux de cancers du sein : le carcinome in situ et le carcinome invasif. 15 à 30 % des cancers du sein diagnostiqués sont des carcinomes in situ. Ils peuvent être d'origine lobulaire ou canalaire. S'ils ne sont pas pris en charge à temps, les carcinomes in situ peuvent évoluer en une forme invasive. On parle de carcinome in situ



lorsque les cellules cancéreuses restent confinées dans le système ductolobulaire, et de carcinome invasif, lorsqu'elles traversent la membrane basale pour envahir le tissu environnant (**Fig. 6**). Pour les carcinomes mammaires invasifs, dans 70% des cas ce sont ce qu'on appelle des carcinomes canaux sans type particulier (NST), mais il existe aussi de façon plus rare des carcinomes lobulaires invasifs ou encore des carcinome dits microinvasifs (Taurin & Alkhalifa, 2020a).



**Figure 6. Les différents stades de développement des cancers du sein**

*Schéma d'une coupe transversale d'un canal, illustrant la progression du cancer du sein, de l'épithélium normal bicouche à l'hyperplasie, à l'hyperplasie avec atypies, au carcinome canalaire in situ, et enfin à la maladie invasive. Le DCIS est une lésion précoce dans laquelle des cellules cancéreuses anormales se développent et restent dans les canaux mammaires. Par la suite, les cellules cancéreuses peuvent se développer et devenir invasives, évoluant vers un carcinome canalaire invasif lorsqu'elles s'étendent au-delà de la membrane basale et envahissent le tissu stromal environnant. D'après (Tharmapalan et al., 2019)*

Pour compléter cette première classification, il existe également une classification moléculaire détaillée qui permet de regrouper les tumeurs mammaires en différents sous-types en

fonction de l'expression de certains marqueurs. La première classification a été définie par Perou et al. en 2000, elle est basée sur le profil d'expression génique de 65 échantillons de tumeurs mammaires humaines. Par la suite, d'autres travaux ont permis de compléter cette classification permettant de former 4 principaux sous-types moléculaires (**Fig. 7**).

Les sous-types luminaux représentent à eux seuls 60% des cancers du sein. Ils sont caractérisés par l'expression des récepteurs ER $\alpha$  et PR. On distingue deux groupes de tumeurs lumineales.

Les tumeurs lumineales A : Elles expriment assez fortement les récepteurs ER $\alpha$  et PR mais ne surexpriment pas le facteur de croissance épidermique 2 (HER2). Ces tumeurs sont sensibles à l'hormonothérapies avec un taux de récidence faible, ce qui en fait une catégorie de cancers de bon pronostic. Les mutations les plus fréquentes touchent les gènes GATA3, MAP3K1, PIK3CA et p53.

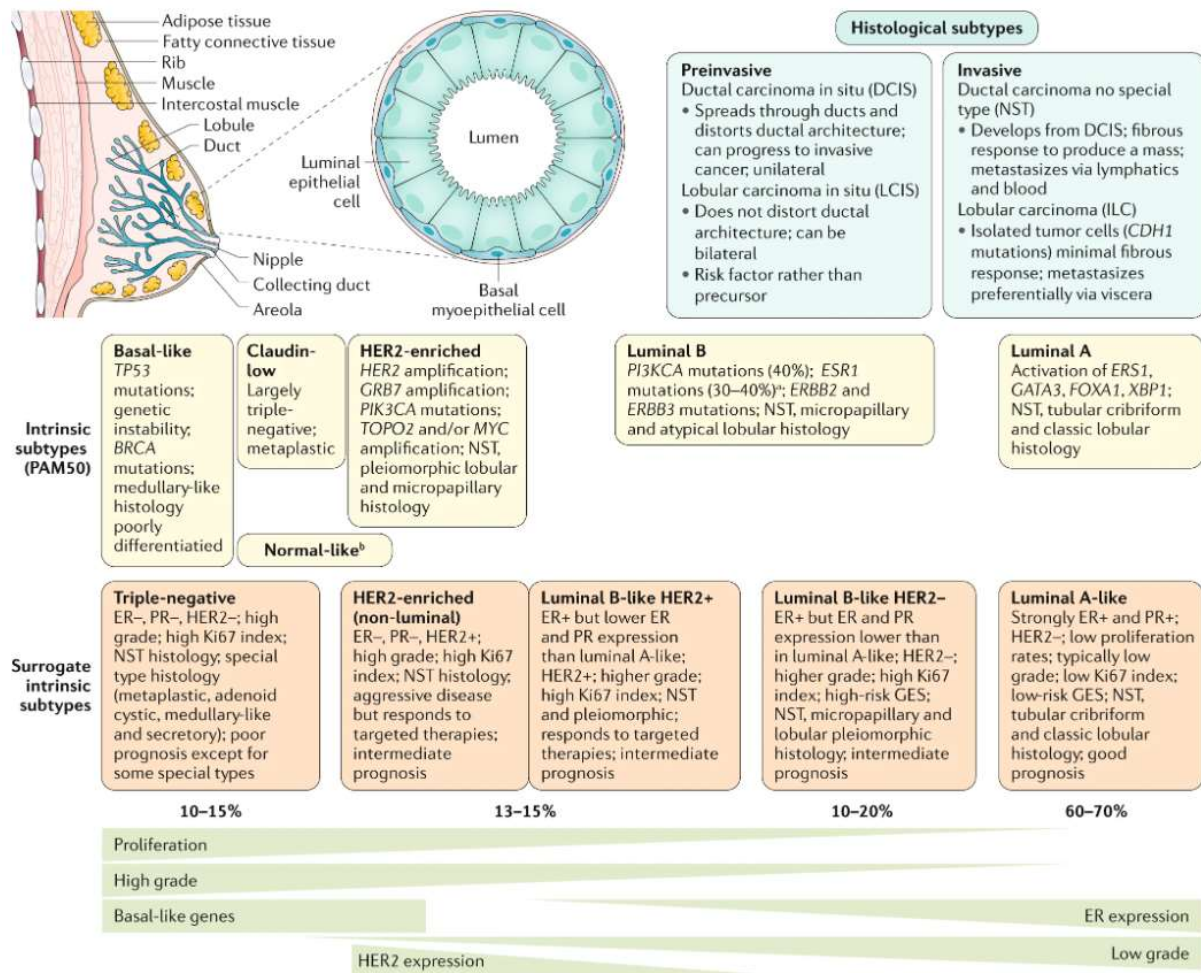
Les tumeurs lumineales B : Ces tumeurs expriment également le récepteur ER $\alpha$  mais elles expriment plus faiblement PR et environ 20% des tumeurs sont positives pour HER2. Elles sont caractérisées par un taux de prolifération plus élevé avec des mutations fréquentes de p53. Elles sont également moins sensibles à l'hormonothérapies, ce qui peut entraîner l'utilisation de combinaisons de traitements notamment avec un traitement anti-HER2 pour les tumeurs HER2<sup>+</sup>. Le risque de rechute est plus élevé que pour les tumeurs lumineales A.

Le sous-type enrichi en HER2 : Ces tumeurs sont caractérisées par la surexpression de HER2 consécutive à l'amplification du gène ERBB2. Ce récepteur est impliqué dans la promotion de la croissance et de la survie cellulaire ce qui en fait un oncogène puissant lorsque son expression est dérégulée. Ce sous-type n'exprime pas les récepteurs ER $\alpha$  et PR contrairement aux sous-types luminaux. Ces tumeurs présentent un grade histologique élevé et sont assez agressives. Leur traitement consiste souvent en une chimiothérapie conventionnelle couplée à l'utilisation d'un antagoniste d'HER2 comme le trastuzumab.

Le sous-type basal like : Ce sous- groupe est très hétérogène et caractérisé par l'expression de marqueurs de cellules basales comme les cytokératines 5/6, 14 et 17 ou encore par l'EGFR. De plus, comme les cellules basales, ces tumeurs sont négatives pour l'expression des récepteurs ER $\alpha$  et PR par immunohistochimie avec une absence de surexpression de HER2. Cependant, certaines tumeurs basal-like peuvent exprimer un de ces récepteur. Elles possèdent également un index mitotique élevé et un taux de mutations important, ce qui en font des tumeurs de mauvais pronostics avec un risque de rechute fréquemment observé. Ce sous-type contient

un sous-groupe de tumeurs appelées cancers du sein triples négatifs (TNBC). C'est pour cela que les cancers dits basal-like sont fréquemment associés au groupe TNBC. Comme la plupart des tumeurs basal-like, les TNBC n'expriment pas les récepteurs ER $\alpha$ , PR et HER2. Il existe une prévalence de TNBC chez les personnes portant des mutations du gène BRCA1. (Taurin & Alkhalifa, 2020a) (Zhang, 2023)

Plus récemment, en 2021, Lehmann et al. réalisent de nouvelles analyses multi-omiques à partir de données publiques issues des cohortes du TCGA, METABRIC, CPTAC et MET500, permettant de confirmer la division du sous-groupe des TNBC en 4 sous-types supplémentaires : deux sous-types de type basal (BL1, BL2), un sous-type mésenchymateux (M) et un sous-type de récepteur d'androgène luminal (LAR). Chaque sous-type présente une biologie unique et répond différemment à la chimiothérapie standard. (Lehmann et al., 2021).



**Figure 7. Les différentes classifications des cancers du sein**

La classification histologique, en haut à droite, permet de distinguer les carcinomes in situ canalaire (DCIS) et lobulaire (LCIS), qui peuvent évoluer en carcinomes invasif dont le plus fréquent est le carcinome invasif « no special type » (NST). Ensuite, en jaune, il s’agit de la première classification de Perou & al (2000), basée sur la signature d’expression de 50 gènes (PAM50). Enfin en orange, il s’agit de la nouvelle classification permettant de classer les tumeurs en différents sous-types en fonction de l’analyse histologique et immunohistochimique de l’expression de certaines protéines clés : ER, PR, HER2 et le marqueur de prolifération Ki67. GES = signature d’expression génique. D’après (Harbeck et al., 2019)

## II. Origine des cancers du sein

## A. Facteurs de risques

Les cancers du sein sont des maladies multifactorielles. Ils existent des facteurs de risques intrinsèques connus non modifiables mais également un certain nombre de facteurs extrinsèques modifiables sur lesquels il est possible d'intervenir afin de réduire l'incidence des cancers.

Bien que les progrès concernant le dépistage aient permis une détection plus précoce et une meilleure prise en charge de la maladie, les effets secondaires liés aux traitements et les coûts liés à ces prises en charge représentent des contraintes majeures. C'est pour cela que l'identification des facteurs de risques permettant la mise en place de politiques publiques de prévention efficaces reste la meilleure option pour protéger les populations.

Parmi les facteurs de risques non modifiables, il existe des causes intrinsèques génétiques. Cela représente 5 à 10% des cancers du sein. Les mutations génétiques les plus connues touchent les gènes BRCA1 et BRCA2 qui sont impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Lorsqu'une femme hérite d'un de ces gènes mutés, elle a 85% de risque de développer un cancer du sein au cours de sa vie (Obeagu & Obeagu, 2024). Avec l'amélioration des techniques de séquençages, de nouveaux panels de mutations de gènes augmentant le risque héréditaire de cancers du sein ont pu être mis en évidence, comprenant les gènes ATM, CHEK2, PALB2, PTEN, STK11 et TP53 (Taylor et al., 2018). Pour ces femmes, les meilleurs moyens de prévention restent la mise en place d'une surveillance rapprochée ou encore des mastectomies préventives.

Un autre des facteurs de risques non modifiables important est l'âge, en effet le risque de cancers du sein augmente avec l'âge. Près de 80% des cancers du sein se développent après 50 ans et cela semble étroitement lié à l'exposition aux œstrogènes. En effet, l'exposition aux œstrogènes endogènes a été reconnu comme un facteur de risque. Des études ont établi des liens entre l'alimentation et la puberté précoce. L'augmentation du niveau de vie des populations entrainerait des alimentations plus riches en protéine conduisant à une ménarche précoce. Au contraire, l'insécurité alimentaire entraîne des retards dans le développement de la puberté (Tang et al., 2022). Une des conséquences de ces pubertés précoces est l'exposition de la glande mammaire à un plus grand nombre de cycles oestrogéniques et à un risque accru de développer un cancer. Une ménopause tardive augmente également ce risque car il a été démontré que la survenue de cancers du sein notamment hormonaux dépendants, diminuent

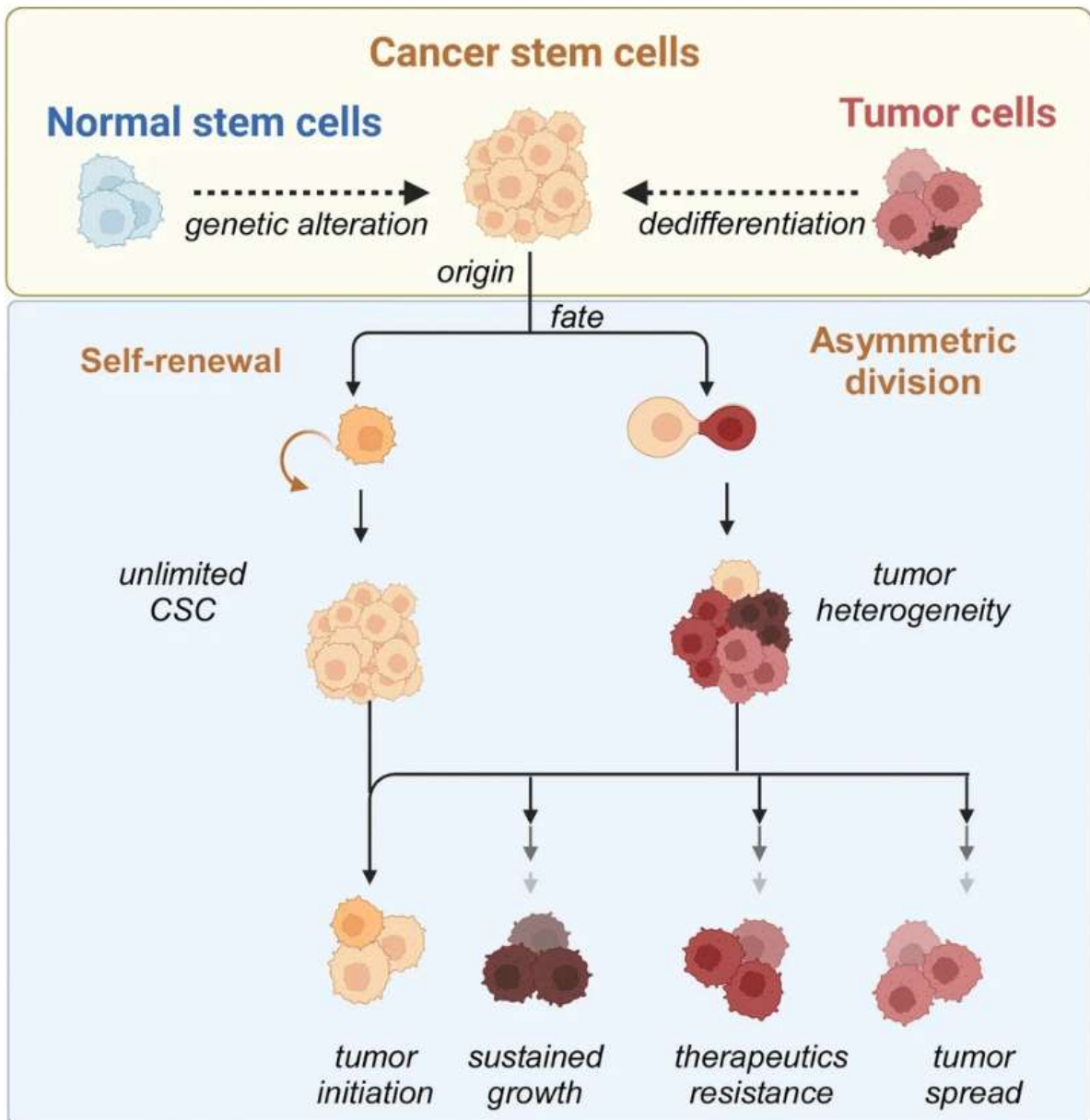
après la ménopause et donc après l'arrêt du cycle menstruel (« Menarche, menopause, and breast cancer risk », 2012).

Enfin, 20 à 30% des cancers du sein seraient attribués uniquement à des facteurs extrinsèques modifiables. En effet, le mode de vie, incluant le tabagisme, la consommation d'alcool ou encore le manque d'activité physique peuvent favoriser l'apparition de cancer. Par exemple, la consommation d'alcool augmenterait la sensibilité de la glande mammaire aux dommages à l'ADN en augmentant le stress oxydatif mais il pourrait également augmenter la sensibilité aux œstrogènes en favorisant l'expression de ER $\alpha$  (Jung et al., 2016) (Singletary et al., 2001). Tout cela semble mettre en évidence l'importance de l'impact de l'exposition aux œstrogènes endogènes, mais soulève également la question des œstrogènes exogènes. L'exposition aux œstrogènes exogènes peut être considéré comme un autre facteur de risques extrinsèques important sur lequel des actions de santé publique sont envisageables. Parmi ces œstrogènes exogènes, les contraceptifs oraux sont liés à une faible augmentation du risque de cancers du sein et ce grâce à leur amélioration au cours des années (Barańska et al., 2021). L'utilisation de traitements hormonaux substitutifs (THS) afin de contrer les effets indésirables liés à la ménopause augmenterait également le risque relatif de 1,66 par rapport aux personnes ne prenant pas de THS. Cependant, ce risque diminue significativement après l'arrêt des THS (Y.-S. Sun et al., 2017). Enfin, une autre source d'exposition aux œstrogènes exogènes est l'exposition aux polluants environnementaux. En effet, l'exposition aux bisphénols, notamment au bisphénol A (BPA) été associé à un risque accru de cancer du sein (S. V. Fernandez & Russo, 2010). Il a été identifié comme un perturbateur endocrinien et serait impliqué dans la prolifération des cellules cancéreuses et dans la résistance aux thérapies hormonales. Mais cela sera détaillé plus précisément dans le chapitre 4.

## B. Hypothèses sur l'origine des cancers du sein

Les mécanismes exacts impliqués dans l'initiation des cancers du sein sont encore aujourd'hui insuffisamment connus. Concernant les cellules à l'origine des cancers du sein, deux théories persistent et ne sont pas exclusives. Dans la première théorie, l'apparition progressive de mutations dans des cellules différenciées favorise la reprogrammation et l'acquisition de capacités souches cancéreuses. Dans le deuxième modèle, ce sont les cellules souches/progénitrices elles-mêmes qui acquièrent des mutations du fait de leur longue durée

de vie et de leur exposition à divers facteurs extérieurs. Par la suite, ces cellules souches transformées pourraient alors transmettre leurs mutations lors de la différenciation donnant naissance à des phénotypes tumoraux divers (**Fig. 8**). Il est probable que ces deux modèles coexistent (Taurin & Alkhalifa, 2020). Dans tous les cas les cellules souches cancéreuses semblent être essentielles dans les mécanismes précoces d'initiation tumorale.



**Figure 8. Hypothèses sur l'origine des cellules souches cancéreuses (CSC).**

Deux hypothèses possibles : les CSC proviennent de la transformation des cellules souches normales ou de cellules tumorales dont les mutations permettent une dédifférenciation leur permettant d'acquérir des caractéristiques de cellules souches. Ainsi les CSC ont la capacité de s'autorenouveler et de réaliser des divisions asymétriques donnant un nombre illimité de nouvelles CSC. Cela génère une hétérogénéité tumorale avec des cellules phénotypiquement différentes qui peuvent soutenir la croissance tumorale, être résistantes aux thérapies actuelles ou avoir la motilité nécessaire pour se propager dans tout le corps et former des tumeurs secondaires. D'après (Nuñez-Rios et al., 2023).

### Chapitre 3. Les cellules souches



## I. Les cellules souches mammaires normales

La grande plasticité de la glande mammaire, mise en évidence par les nombreux changements physiologiques qu'elle peut subir au cours de la vie, repose en partie sur la présence de cellules souches épithéliales mammaires. Il existe de fortes similitudes entre la différenciation mammaire chez la souris et chez l'Homme. Cependant les marqueurs d'identification des cellules souches peuvent varier selon l'espèce.

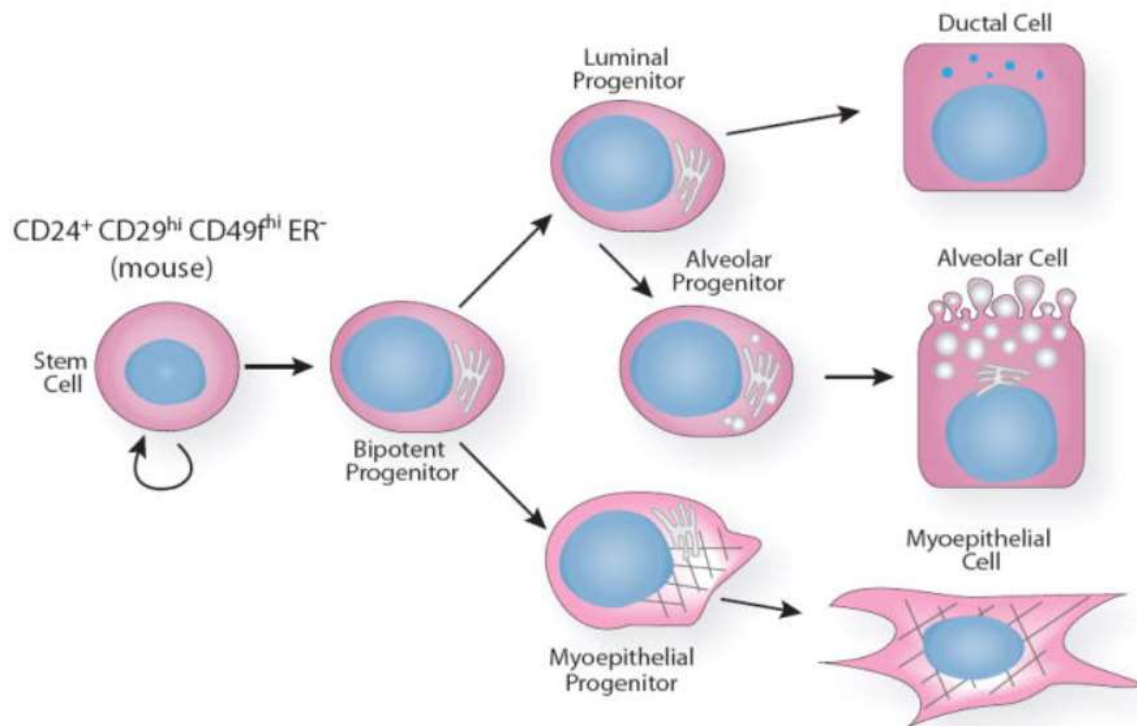
### A. Identification des cellules souches

Pour prouver l'existence de ces cellules, des expériences de transplantations *in vivo* chez la souris ont été réalisées. Un fragment d'une glande mammaire de souris greffé dans un coussinet adipeux après ablation du tissu épithélial d'origine, est capable de reconstituer l'entièreté de l'arborescence mammaire. Par la suite, cette expérience a été réalisée en série à partir d'un fragment initial, ce qui a démontré la persistance d'un pool de cellules souches multipotentes capables de s'auto-renouveler (Daniel et al., 1968). Cependant, ce n'est que plus récemment en 2006, que les premières cellules souches mammaires (MaSC) de souris ont pu être isolé par FACS, grâce à l'identification de marqueurs spécifiques comme CD24, ou encore CD29. CD24 (antigène thermostable) avait déjà été identifié comme un marqueur des cellules souches neurales et CD29 (intégrine  $\beta 1$ ) comme un marqueur des cellules souches de la peau. Ces deux protéines étaient très enrichies dans ce qu'on appelle les unités de repeuplement mammaires (MRU). Ces MRU correspondent à la sous-population capable de reformer la glande après implantation dans un coussinet adipeux. De plus, ces marqueurs étaient maintenus sur des temps longs ce qui suggère que la capacité d'auto-renouvellement de ces cellules a permis de transmettre ces marqueurs aux cellules filles. Mais cela peut aussi suggérer la présence de cellules souches quiescentes à longue durée de vie. Toutes ces caractéristiques correspondent aux critères définissant les cellules souches. Finalement, après différentes étapes de tri, une glande mammaire complète et fonctionnelle a pu être obtenue à partir d'une seule cellule appartenant à cette population préalablement définie. Cette dernière étape a permis de confirmer l'existence de MaSC adultes (Shackleton et al., 2006).

Chez l'Homme, certaines études ont également permis de faire l'hypothèse de l'existence de MaSC. Par exemple, grâce à des expériences de perte d'hétérozygotie. Il a été démontré que cette perte du même allèle était présente de manière indépendante à la fois dans des cellules luminales et myoépithéliales des mêmes lobules, ce qui suggère la présence d'un progéniteur commun capable de transmettre cette perte et de se différencier en plusieurs types cellulaires différents (Lakhani et al., 1999). De plus, les mêmes expériences de transplantation in vivo effectuées pour la souris, ont été réalisées avec des cellules mammaires humaines triées avec les marqueurs CD49<sup>hi</sup> et EpCAM<sup>-</sup>. Ces cellules ont été transplantées dans des coussinets adipeux humanisés de souris, auxquels on avait préalablement retiré la glande mammaire. Après transplantation, elles ont été capables de reformer l'arborescence mammaire, démontrant ainsi leurs capacités souches (Lim et al., 2009).

## B. Différenciation des cellules souches

Suivant les études, la fréquence des MaSC a été estimée être entre 1 cellule souche pour 100 cellules totales à 1 cellule souche pour 4900 cellules totales, ce qui explique les difficultés liées à leur étude. Il est admis qu'une cellule souche est capable de donner naissance à des progéniteurs engagés vers la lignée luminaire ou myoépithéliale. Cependant il existe encore à l'heure actuelle de nombreuses parts d'ombre sur les processus de différenciation mammaire. Par exemple, il semblerait qu'il existerait un progéniteur bipotent entre la cellule souches et les progéniteurs engagés unipotents mais son positionnement dans la différenciation n'est pas clair. De plus, l'identification d'un progéniteur myoépithélial reste insaisissable car les marqueurs basaux exprimés par les cellules myoépithéliales sont similaires à ceux des cellules souches (Macias & Hinck, 2012). Des expériences de traçage de lignées ont permis de mettre en évidence un progéniteur commun engagé dans la lignée luminaire et capable de se différencier en deux types cellulaires distincts : les cellules canalaire et les cellules alvéolaires (Fig. 9).



**Figure 9. Représentation schématique de la hiérarchie des cellules souches dans la glande mammaire**  
 Une cellule souche se divise de manière symétrique ou asymétrique pour générer une cellule progénitrice bipotente qui donne naissance à la fois à une cellule progénitrice luminaire et à une cellule progénitrice myoépithéliale. Des études suggèrent que les cellules progénitrices lumineuses se différencient en cellules limitées aux lignées canalaire ou alvéolaires et que des cellules intermédiaires non encore identifiées peuvent être nécessaires à la différenciation terminale. En revanche, on pense que les cellules progénitrices myoépithéliales se différencient directement en cellules myoépithéliales.  
 D'après (Macias & Hinck, 2012)

### C. Régulation hormonale

Les MaSC n'expriment ni le récepteur à la progestérone (PR), ni le récepteur aux œstrogènes ( $ER\alpha$ ) (Taurin & Alkhalifa, 2020c). Pourtant il a été démontré qu'elles sont sensibles aux hormones stéroïdes et notamment aux œstrogènes. Par exemple, une étude a démontré que les cellules souches provenant d'une glande mammaire de souris ovariectomisées avaient une capacité de repeuplement mammaire beaucoup plus faible que des cellules souches ayant reçu une signalisation ovarienne normale. Ceci s'explique au moins en partie par le fait que les cellules souches dépendent d'une signalisation paracrine induite par les cellules lumineuses exprimant PR et  $ER\alpha$ . Il a également été démontré que même si ces cellules sont réintroduites

dans un environnement hormonal normal, elles conservaient des perturbations de leur capacité proliférative. De plus, en bloquant de manière spécifique la signalisation de la progestérone et des œstrogènes, ils ont démontré que c'est l'inhibition de la synthèse d'œstrogène qui avait l'impact le plus important sur la croissance des MaSC. Cela souligne l'importance de la signalisation oestrogénique même sur des cellules n'exprimant pas directement le récepteur classique des œstrogènes ER $\alpha$ . De façon intéressante, cette étude démontre également que l'inhibition de la voie de l'EGF, connu pour être facteur important de la signalisation paracrine des œstrogènes, n'a pas eu un effet très important sur les capacités de repeuplement des MaSC. Cela suggère que la perte de la signalisation EGF seule ne suffit pas pour expliquer les effets observés après une privation oestrogénique des MaSC (Asselin-Labat et al., 2010). Une hypothèse serait que l'expression d'un autre type de récepteur aux œstrogènes moins connu comme le récepteur aux œstrogènes couplé aux protéines G (GPER), qui est exprimé par les cellules souches cancéreuses du sein, pourrait également participer à la sensibilité des MaSC aux œstrogènes (Chan et al., 2020).

Enfin, la sensibilité des MaSC aux signaux oestrogéniques permet d'expliquer l'effet protecteur connu d'une ovariectomie ou de l'utilisation d'inhibiteur de la synthèse oestrogénique vis-à-vis du risque de cancers du sein. En effet, une exposition réduite aux œstrogènes serait associée à un effet protecteur car comme nous l'avons observé dans la première partie les MaSC possèdent une durée de vie importante et plus elles subissent un nombre cycles mitotiques important sous l'influence des œstrogènes, plus le risque d'apparition de mutations est élevé (Henderson & Feigelson, 2000). Avec tout cela, des similitudes entre les cellules souches cancéreuses du sein et les MaSC ont été rapportées, renforçant l'idée qu'elles pourraient être à l'origine des cancers du sein.

## II. Les cellules souches cancéreuses du sein (bCSC)

Les cellules souches ont été identifiées comme des cibles idéales pour la tumorigenèse. Leur longue durée de vie les rend susceptibles d'accumuler des mutations contrairement à des cellules différenciées à durée de vie courte. De plus, certains travaux proposent l'hypothèse que les variations de risque de cancer entre les différents tissus seraient corrélées directement au nombre de division des cellules souches (Tomasetti & Vogelstein, 2015). Les premières bCSC ont été identifiées par Al-Hajj, qui a démontré que seulement un certain type de cellules

tumorales humaines étaient capables de former de nouvelles tumeurs dans des souris immunodéprimées. Ces cellules cancéreuses particulières, ont d'abord été appelées cellules cancéreuses « tumorigènes » pour les distinguer des cellules cancéreuses dites « non tumorigènes ». En effet, il suffisait seulement d'une centaine de cellules tumorigènes pour former des tumeurs chez la souris alors que des dizaines de milliers de cellules cancéreuses non tumorigènes n'étaient pas capables de former de nouvelles tumeurs. Ces cellules partageaient des caractéristiques communes avec les cellules souches normales comme l'auto-renouvellement ou encore la capacité à donner naissance à différents types cellulaires (Al-Hajj et al., 2003). Des travaux supplémentaires ont permis d'identifier des voies de signalisation impliquées dans l'auto-renouvellement, la prolifération et l'invasion des bCSC, comme les voies Wnt, Notch, ou Hedgehog (El Helou et al., 2017) (Shukla et al., 2017) (Kasper et al., 2009). De plus des marqueurs de surfaces cellulaires similaires aux MaSC ont été identifiés comme CD29<sup>+</sup> ou encore CD49f<sup>+</sup>.

Les bCSC seraient donc impliquées dans l'initiation tumorale. Par ailleurs, une autre caractéristique des bCSC est leur capacité à réaliser la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et inversement. Cela a été mis en évidence par l'identification de 2 états des bCSC : les bCSC de type épithélial qui possèdent une activité de l'Aldéhyde Déshydrogénase importante et les bCSC de type mésenchymateux caractérisées par les marqueurs CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. Ces mêmes cellules sont capables de transiter d'un état à l'autre en fonctions de différents signaux du microenvironnement afin d'acquérir des capacités prolifératives, lorsqu'elles sont de type épithélial, ou de passer à un état quiescent mésenchymateux. Par exemple, Choi et al. ont démontré que l'activation de la voie Notch dépendante de la signalisation de BMP4, permettait d'améliorer l'EMT ainsi que les capacités souches à la fois dans une lignée de cellules souches mammaires non transformées mais également dans une lignée de cellules mammaires transformées (Choi et al., 2019). Ces transitions dynamiques d'un état à l'autre, favoriseraient l'invasion, la dissémination ainsi que la prolifération des bCSC aux sites métastatiques. Cela montre que les bCSC interviennent à différents niveaux de la carcinogenèse mammaire comme l'initiation et la dissémination métastatique des cancers du sein (S. Liu et al., 2014). Cette grande plasticité ainsi que leur proximité avec les cellules souches normales rend particulièrement difficile le ciblage spécifique des bCSC.

## Chapitre 4. La signalisation œstrogénique

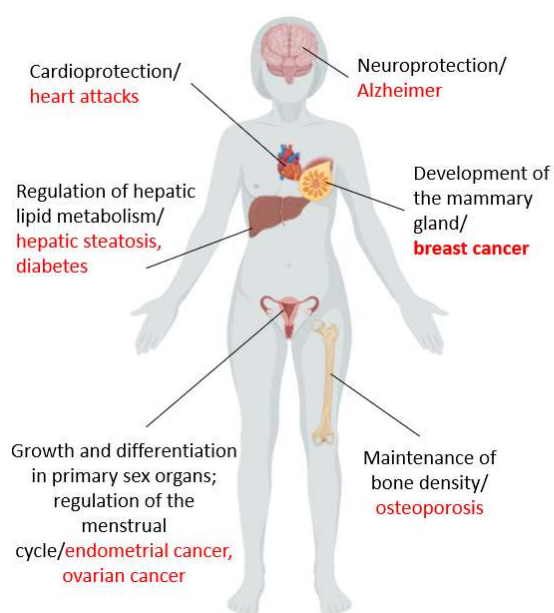
### I. Les œstrogènes

#### A. Biosynthèse

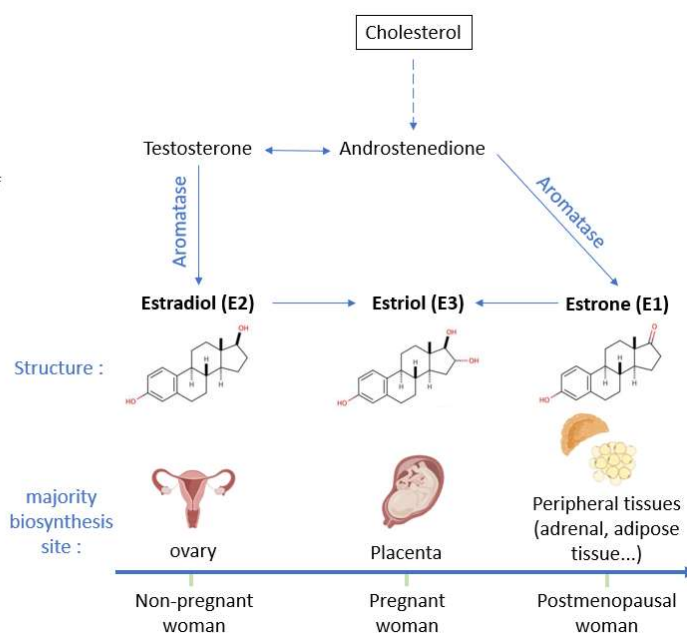
Les œstrogènes sont des hormones stéroïdes synthétisés à partir du cholestérol. Le cholestérol va être converti en prégnénolone au sein des mitochondries. Par la suite, ce précurseur des hormones stéroïdes, va permettre la synthèse soit de progestérone, soit d'androstènedione. Enfin, c'est le métabolisme de l'androstènedione qui donne naissance aux différents types d'œstrogènes. Il existe 3 types principaux d'œstrogènes circulant chez l'Homme : l'œstrone (E1), le 17 $\beta$ -œstradiol (E2) et l'œstriol (E3). L'E2 est l'œstrogène le plus actif biologiquement. Chez les femmes préménopausées, l'E2 synthétisé par les ovaires lors du cycle menstruel est majoritaire. Lors de l'arrêt du cycle, le taux d'E2 baisse et l'E1 synthétisé principalement par les tissus périphériques devient l'œstrogène majoritaire. Enfin, l'E3 est l'œstrogène majeur au moment de la grossesse notamment via sa production par le placenta (**Fig 10.**) (Samavat & Kurzer, 2015).

Les œstrogènes ont un effet pléiotrope dans le corps. Ils sont principalement connus pour leur rôle dans la régulation des fonctions reproductrices féminines et le développement des caractères sexuelles secondaires, comme le développement des glandes mammaires. Mais d'autres fonctions leurs sont associées comme la régulation de l'homéostasie squelettique, leur implication dans le métabolisme, ou encore dans le système cardiovasculaire et le système nerveux central. L'importance majeure du système endocrinien nécessite donc la mise en place de systèmes de régulations précis. Des perturbations au sein de ces processus peuvent être impliquées dans divers maladies connues comme le diabète, des maladies cardiovasculaires, un risque de maladie d'Alzheimer accru, ou encore des cancers (**Fig 10.**) (Hamilton et al., 2016) (Valencia-Olvera et al., 2023).

## The pleiotropic role of estrogens



## Biosynthesis of estrogens



**Figure 10. Rôle et synthèse des œstrogènes.**

La partie gauche montre l'implication des œstrogènes dans différents organes et les maladies associées (en rouge) en cas de dérégulation. La partie droite présente la voie de biosynthèse à partir du cholestérol, la structure et le site de production des 3 principaux œstrogènes chez l'Homme.

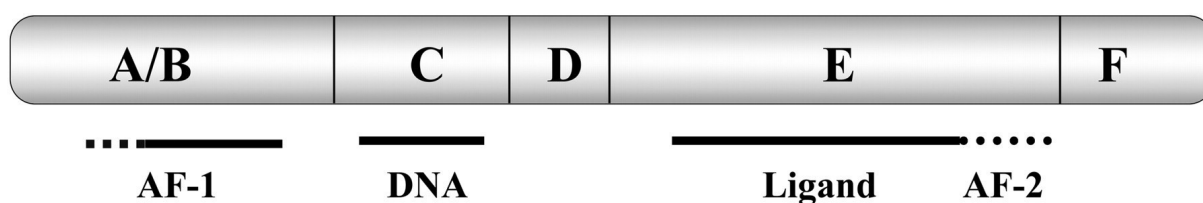
## B. Les récepteurs

Une fois synthétisés, les œstrogènes circulent dans le sang et vont activer différentes voies de signalisation sur les organes cibles en se fixant à des récepteurs cellulaires spécifiques. Ils existent différents types de récepteurs qui seront détaillés par la suite. Les récepteurs les plus connus sont ER $\alpha$ 66 et ER $\beta$ , qui font tous les deux partie de la famille des récepteurs nucléaires. Mais il existe d'autres types de récepteurs moins connus comme le récepteur aux œstrogènes couplé aux protéines G (GPER) qui est un récepteur transmembranaire. Un aspect intéressant de ce type de récepteur est qu'il peut être exprimé par des cellules dites ER négatives, qualification désignant dans la littérature l'absence d'expression du récepteur ER $\alpha$ 66.

### Les récepteurs aux œstrogènes (ER)

Le premier récepteur aux œstrogènes a été découvert dans les années 80 (Green et al., 1986). Pendant une dizaine d'année, on pensait que c'était le seul récepteur existant. Cependant en 1995, un deuxième type de récepteur a été mis en évidence grâce au clonage d'une banque

d'ADNc de prostate de rat (Kuiper et al., 1996). Cette découverte, a conduit à renommer le premier récepteur découvert ER $\alpha$  et le deuxième, ER $\beta$ . Ces récepteurs font tous les deux partie de la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes, dont les membres possèdent des structures communes. Ils possèdent tous les deux un domaine A/B, N-terminal, permettant l'activation indépendante du ligand AF-1 (Activation function 1). Le domaine C/D quant à lui, contient une structure à deux doigts de zinc permettant la liaison à l'ADN (DBD). Enfin, le domaine E/F constitue le domaine de liaison au ligand (LBD), il assure également la dimérisation du récepteur, la translocation nucléaire et la transactivation de l'expression du gène cible. Ce domaine contient la fonction d'activation 2 (AF-2) dont la conformation varie en fonction de la fixation du ligand et permet le recrutement ou non, de coactivateurs (**Fig.11**) (Nilsson et al., 2001).



**Figure 11. Représentation schématique de la structure des récepteurs nucléaires aux œstrogènes.**

*Le domaine A/B contient le site AF-1 d'activation indépendante du ligand. Le domaine C/D constitue la structure à deux doigts de zinc qui se lie à l'ADN, et le domaine E/F contient la poche de liaison du ligand ainsi que le domaine AF-2 qui entre directement en contact avec les peptides coactivateurs. D'après (Nilsson et al., 2001)*

Ces deux récepteurs sont codés par des gènes différents : le gène ESR1 pour ER $\alpha$ , et le gène ESR2 pour ER $\beta$ . Plusieurs isoformes issues des épissages alternatifs de ces deux gènes, ont été découvertes. Actuellement, on dénombre 3 isoformes pour ER $\alpha$ . La forme classique qui est régulièrement appelé ER $\alpha$  est en réalité ER $\alpha$ 66 (protéine de 66 kDa). Mais il existe deux isoformes plus courtes appelées ER $\alpha$ 46 et ER $\alpha$ 36, de respectivement 46 et 36 kDa. Il existe également quatre isoformes de ER $\beta$  qui sont également plus courtes au niveau de leur domaine LBD, ce qui fait qu'elles ne peuvent pas se lier aux ligands et avoir une activité transcriptionnelle. Ces isoformes peuvent se dimériser avec les formes complète afin de réguler leur activité. Par exemple, elles peuvent réduire l'activité de ER $\alpha$ 66. Il existe des



hétérodimère ER $\alpha$ / $\beta$  qui peuvent avoir des influences très diverses sur la cellule en fonction de leur liaison aux ligands et de la forme des récepteurs dimérisés (Vrtačnik et al., 2014).

Des études plus approfondies, ont permis de montrer que le rôle et les effets sur la cellule étaient complètement différents entre ces deux récepteurs. Il est suggéré que ER $\beta$  exercerait un effet d'inhibiteur de la signalisation ER $\alpha$ 66. Par exemple, l'E2 lié à ER $\alpha$ 66 active la transcription à partir d'un site AP1 alors que l'E2 lié à ER $\beta$  l'inhibe (Paech et al., 1997). De plus, l'expression de ER $\beta$  est prédominante dans le sein humain normal par rapport à ER $\alpha$ 66. Cependant dans 80% des cancers du sein, ce ratio s'inverse via une hyperméthylation de la région promotrice de ER $\beta$ . Contrairement à ER $\alpha$ 66 qui est connue pour promouvoir la prolifération des cellules cancéreuses du sein sous l'effet de l'E2, ER $\beta$  exercerait une activité antiproliférative (Hartman et al., 2009).

### Le récepteur aux œstrogènes couplé aux protéines G (GPER)

GPER est un récepteur membranaire appartenant à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Initialement appelé GPR30 pour récepteur orphelin couplé à la protéine G 30 (GPR30), il a été identifié la première fois en 1997 comme un gène partageant une forte homologie avec ceux de la famille des GPCR et étant associé à l'expression des récepteurs aux œstrogènes dans les cancers du sein (Carmeci et al., 1997). Mais il faudra attendre 2005 pour avoir la preuve que GPR30 est capable de fixer directement l'E2, notamment en observant des réponses positives à l'E2 dans des lignées n'exprimant ni ER $\alpha$ , ni ER $\beta$  (Thomas et al., 2005). C'est pour cela qu'il a été finalement renommé GPER.

Cette protéine présente sept passages transmembranaires et induit une signalisation via l'activation des protéines G. Il a été suggéré que GPER était associé aux membranes plasmiques comme les autres GPCR. Cependant, des études couplant directement GPER à la protéine de fluorescence verte (GFP), ont démontré qu'une grande partie des récepteurs GPER étaient localisés au niveau intracellulaire. Notamment, des images de microscopies ont montré que GPER pouvaient être localisé au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi ou encore nucléaire. En utilisant des dérivés fluorescent de l'E2, il a été également mis en évidence que GPER pouvait directement lier l'E2 au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi pour médier une signalisation non génomique rapide (Revankar et al., 2005). D'autres études ont montré que GPER pouvait être principalement localisé à la membrane plasmique dans certains types cellulaires comme dans l'épithélium utérin (Gao et al., 2011), ou encore dans celui du myomètre (Maiti et al., 2011). La localisation

de GPER semble donc être dynamique et dépendre du type cellulaire dans lequel il est exprimé. Par exemple, une étude montre qu'au sein d'une lignée rénale embryonnaire, GPER peut passer d'une localisation à la membrane plasmique vers une localisation périnucléaire (Cheng et al., 2011). Cela montre encore la spécificité de ce GPCR atypique, car la plupart des récepteurs à sept passages transmembranaires sont connus pour être recyclés dans le cytoplasme ou dans les lysosomes. Au niveau de la glande mammaire, cette même étude montre par immunohistochimie une localisation plutôt intracellulaire de GPER dans l'épithélium mammaire sain mais aussi dans un tissu d'adénocarcinome mammaire invasif (Cheng et al., 2011). Un autre article, montre également une localisation intracellulaire de GPER dans la lignée de cancer du sein SKBR3. Cependant, la possibilité de l'existence d'une petite fraction non détectable de GPER au niveau de la membrane plasmique n'est pas exclue (Revankar et al., 2007). Etant donné la capacité de l'E2 à traverser librement la membrane, il ne semble pas incohérent que GPER puissent activer des voies de signalisation directement depuis des sites intracellulaires. De façon surprenante, une localisation intranucléaire de GPER a été mise en lumière dans l'étude des fibroblastes associés aux cancers (CAF) du sein. En effet, la fixation de l'E2 au GPER entraînerait une interaction avec le récepteur EGFR capable d'agir directement comme un facteur de transcription au sein des cellules notamment au niveau du promoteur du gène de la cycline D1. Cette fixation conduirait à promouvoir la prolifération et la migration des CAF (Madeo & Maggiolini, 2010).

#### Les récepteurs apparentés aux œstrogènes (Estrogen-Related receptors)

Il existe également la famille des Estrogen-Related receptors ( $ERR\alpha$ ,  $ERR\beta$  et  $ERR\gamma$ ), codée respectivement par les gènes *ESRRA*, *ESRRB* et *ESRRG*, qui a été découverte grâce à leur similitude de séquence avec le récepteur  $ER\alpha$  (Giguère et al., 1988). Ces trois protéines sont des récepteurs nucléaires orphelins, car leur ligand endogène reste inconnu. En tant que facteurs de transcription, ils partagent de nombreux cofacteurs et gènes cibles avec  $ER\alpha$  et sont considérés comme pouvant interférer avec ce dernier (Cheung et al., 2005). Je ne rentrerai pas dans la description en détail de ces récepteurs dans le cadre de ma thèse, mais il est intéressant de noter qu'il a été démontré que le bisphénol A pourrait se fixer sur  $ERR\gamma$  et induire la prolifération de cellules cancéreuses du sein (Song et al., 2015).

### C. La signalisation

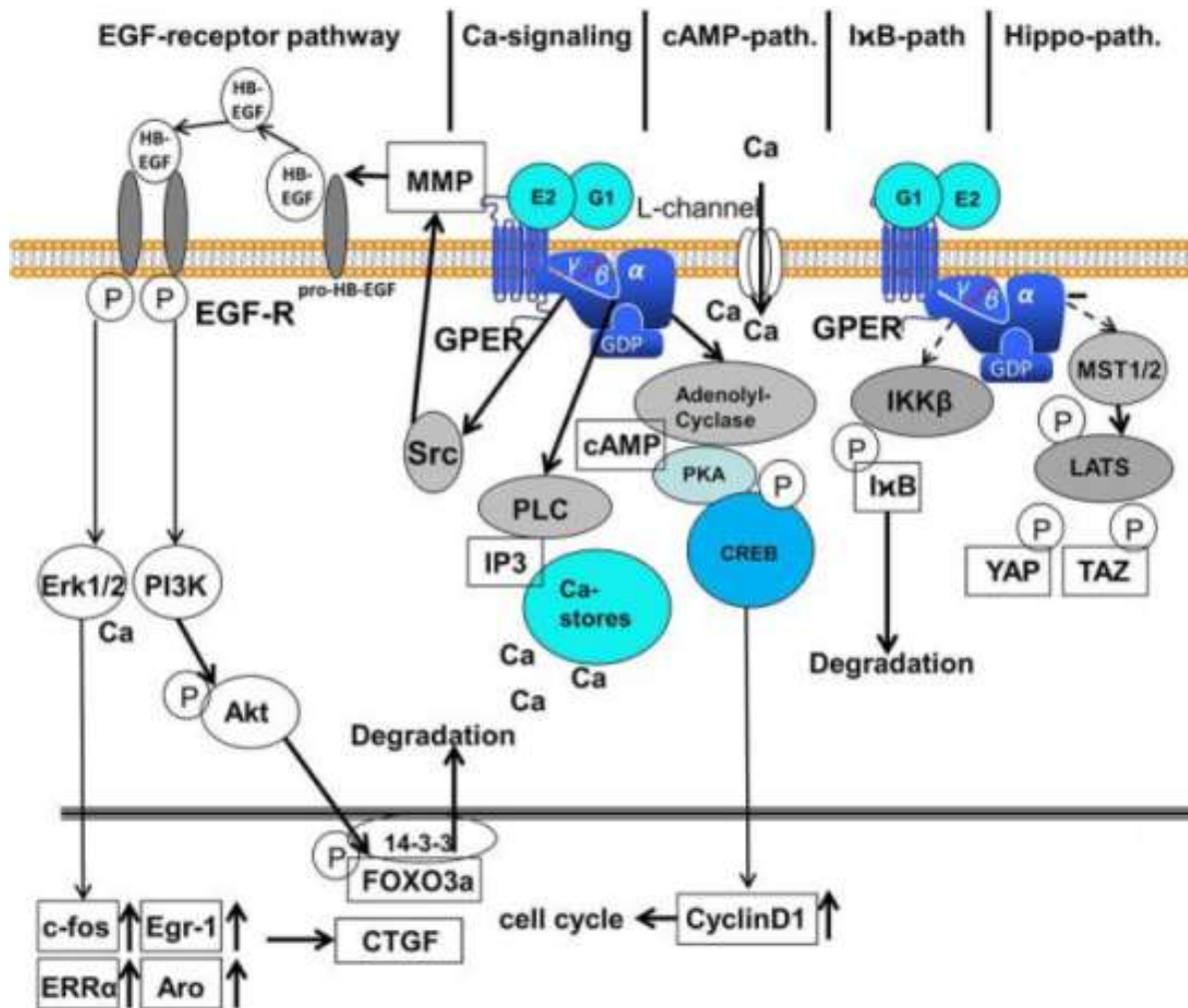
### Signalisation génomique (ER)

Les récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  peuvent transmettre leur signal via une signalisation dite génomique. Le ligand naturel E2 est capable de diffuser librement à travers la membrane et de se fixer sur ces récepteurs au niveau cytosolique. Cette fixation entraîne un changement de conformation ainsi qu'une dimérisation des récepteurs pouvant transloquer dans le noyau afin de réguler la transcription de gènes cibles. Pour cela, les récepteurs peuvent agir directement en tant que facteur de transcription grâce à leur domaine de liaison à l'ADN ou médier une signalisation génomique indirecte en tant que cofacteur en se liant à des facteurs de transcription déjà présent sur la chromatine (Sanchez et al., 2002). Cette liaison permet l'expression de gènes cibles conduisant notamment à la régulation du cycle cellulaire et de la prolifération. Cette signalisation génomique nécessite quelques minutes à quelques heures pour avoir lieu. Pourtant, des réponses très rapides (de quelques secondes à quelques minutes) aux œstrogènes ont été décrites, ce qui suggère l'existence d'un autre type de signalisation dit non génomique.

### Signalisation non génomique (GPER)

Les signalisations non génomiques sont communes aux hormones stéroïdiennes et impliquent généralement des cascades de signalisation impliquant des protéines kinases. Une des premières études à mettre en évidence une signalisation non génomique de GPER est celle menée par Lieberherr et al. L'exposition à l'E2 induit une capture de calcium en quelques secondes au sein des ostéoblastes de rat femelle. Cette capture était induite grâce à un récepteur de surface cellulaire non conventionnel sensible aux œstrogènes et capable d'induire une signalisation via l'activation de protéines G. De plus, cette signalisation est insensible au tamoxifène, qui est un antagoniste de ER $\alpha$  utilisé généralement dans le traitement des cancers du sein hormono-dépendants (Lieberherr et al., 1993). Par la suite, ce récepteur non conventionnel s'est avéré être GPER. En effet, aujourd'hui le rôle de GPER dans l'augmentation du niveau calcique des cellules est bien décrit. L'activation de GPER induit la libération de la sous unité  $\alpha$  des protéines G, qui active la phospholipase C (PLC). La PLC entraîne la libération de diacylglycérol et d'inositol-triphosphate (IP3). L'IP3 va ensuite permettre l'augmentation du niveau de calcium intracellulaire via l'ouverture des canaux calciques (Tica et al., 2011). GPER peut également activer la voie la voie MAPK/ERK (Filardo et al., 2000). Pour cela, la sous-unité  $\beta\gamma$  des protéines G va stimuler la protéine SRC qui va permettre l'activation des voies en aval du récepteur EGFR comme les voies MAPK et PI3K.

L'activation de la voie MAPK/ERK régule l'expression de gènes cibles impliqués dans la survie cellulaire. Dans un contexte de cancer du sein, cette signalisation peut induire la survie des cellules cancéreuses mammaires. L'activation de GPER peut aussi activer la signalisation dépendante de l'AMPc conduisant à l'activation du facteur de transcription CREB qui induit l'expression de la cycline D1 impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. Enfin, GPER pourrait agir sur d'autres voies comme la voie NF- $\kappa$ B et la voie Hippo. Par exemple, une étude montre que GPER pourrait inhiber la voie NF- $\kappa$ B ce qui entrainerait un blocage de la transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules du cancer du sein triple négatif (Z.-J. Chen et al., 2016). Pour la voie Hippo, Zhou et al. ont montré que GPER induisait l'activation des deux coactivateurs transcriptionnels YAP et TAZ conduisant à la prolifération et la migration cellules cancéreuses du sein, ainsi que la croissance des tumeurs (Zhou et al., 2015) (**Fig. 12**).



**Figure 12. Les voies de signalisation en aval de GPER.**

La fixation de l'E2 ou de l'agoniste de GPER, G1 permet l'activation de différentes voies de signalisation permettent notamment la régulation de processus cellulaires importants, comme la régulation du cycle cellulaire ou encore du niveau de calcium intracellulaire. Figure modifiée d'après (Girgert et al., 2019).

#### D. Implication de GPER dans les cancers du sein

Comme nous l'avons vu précédemment, GPER peut être exprimé à la fois dans les cellules saines et dans les cellules cancéreuses. Il a été démontré que GPER pouvait être impliqué dans de nombreuses maladies mais également dans le développement de cancers (Prossnitz & Barton, 2023). Je m'intéresserai ici principalement à l'implication de GPER dans la carcinogenèse mammaire. GPER est exprimé dans 50 à 60% des cancers du sein, comprenant également les tumeurs triple négatives. Il a été observé que l'expression de GPER pouvait être positivement corrélée à la taille tumorale, à la résistance au tamoxifène et la présence de

métastases (Hsu et al., 2019). Pourtant encore aujourd'hui, le rôle de GPER dans les tumeurs du sein n'est pas clairement défini. Certains articles rapportent que GPER pourraient avoir des fonctions antitumorales tandis que d'autres rapportent des effets pro-tumoraux. Par exemple, un article a montré que GPER inhibait la prolifération de la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 mais induisait celle de la lignée SKBR3. Cela peut s'expliquer par le statut d'expression de ER $\alpha$ , qui est exprimé dans la lignée MCF7 mais pas dans SKBR3. En effet, il a été montré dans ces cellules que la présence d'ER $\alpha$  activé par l'E2 entraînait une régulation négative de l'expression de GPER (Ariazi et al., 2010). Un autre article montre que l'expression de GPER serait positivement corrélée à la survie sans rechute de patientes ayant des tumeurs ER-positives contrairement à celles ayant des tumeurs ER-négative. Cela s'expliquerait par l'action pro-apoptotique induite par GPER dans les cellules cancéreuses du sein ER-positives (Broselid et al., 2013). Cependant dans le cas de patientes traitées au tamoxifène, l'expression de GPER est associée à une survie sans rechute plus faible (Ignatov et al., 2011). Des données démontrent que les modulateurs sélectifs des ER (SERM) comme le tamoxifène et le raloxifène, ou encore des antagonistes comme le fulvestrant, utilisés fréquemment dans le traitement des cancers du sein ER-positifs, se sont avérés être des agonistes de GPER (Jacenik et al., 2016). Par exemple, une étude démontre que dans les cellules MCF7 résistantes au tamoxifène, la signalisation GPER via MAPK/ERK conduit à la réduction de la protéine pro-apoptotique Bim induisant leur survie (Yin et al., 2017). De plus, il a été démontré que GPER est impliqué dans la promotion de l'angiogenèse dans le microenvironnement des tumeurs mammaires. En effet, l'IGF1 active à la fois l'expression du facteur inductible par l'hypoxie 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) et GPER, tous deux nécessaires à la régulation du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) dans les CAF et dans les cellules cancéreuses SKBR3. Cette production de VEGF va permettre la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au sein de la tumeur (De Francesco et al., 2017). Pour confirmer le rôle pro-tumoral de GPER dans la carcinogenèse mammaire, Marjon et al. ont réalisé des tests in vivo dans des modèles murins transgéniques MMTV-PyMT capables de développer de manière spontanée des tumeurs mammaires qui métastasent au niveau des poumons. Dans cette étude, les souris KO pour GPER, développaient des tumeurs de plus petites tailles avec une prolifération réduite et un nombre de métastases pulmonaires plus faible (Marjon et al., 2014). GPER semble donc impliqué dans la progression tumorale, la résistance aux traitements ainsi que dans la formation de métastases.

Mais quand est-il du rôle de GPER dans l'initiation tumorale ? L'implication de GPER dans les premières étapes de développement de cancers du sein reste assez floue. Cependant, des

articles ont montré que GPER pouvait promouvoir un microenvironnement pro-tumoral en agissant sur d'autres types cellulaires que les cellules épithéliales mammaires. Par exemple, comme évoqué plus haut, GPER serait capable d'induire la prolifération et la migration des CAF qui sont impliqués à la fois dans l'initiation et la progression des cancers (Madeo & Maggiolini, 2010). De plus, un article démontre que la signalisation induite par GPER était essentielle dans le maintien des caractéristiques des cellules souches cancéreuses du sein (bcSC). En effet, ils ont montré que les xénogreffes dérivées de patients dans lesquelles des populations de cellules souches cancéreuses avaient été identifiées, étaient enrichies en GPER par rapport à celles qui ne contenaient pas de bcSC. De plus, GPER semblait entraîner la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique BAD, conduisant à son inactivation et donc à un signal de survie des bcSC (Chan et al., 2020). L'implication de GPER dans l'initiation des cancers du sein pourrait aussi être liée à la capacité de GPER à fixer des perturbateurs endocriniens comme les bisphénols.

## II. Les Bisphénols

### A. Origine

Le premier bisphénol à avoir été synthétisé, est le bisphénol A (2,2-bis (4-hydroxyphényl) propane). C'est en 1891 que le chimiste russe Alexandre Dianin crée les premières molécules de bisphénols via la condensation de deux groupes phénols et d'une molécule d'acétone. Par la suite, le bisphénol A (BPA) a été étudié dans les années 1930 lors de recherches sur les œstrogènes synthétiques. Mais son utilisation pharmaceutique a été rapidement abandonnée au profit du diéthylstilbestrol (DES), plus puissant, prescrit pour prévenir les avortements spontanés à répétition et réduire les risques d'accouchement prématuré. Cependant, le DES a fini par être retiré car il augmentait les risques d'infertilité, de tumeurs vaginales chez les filles et de tumeurs des testicules chez les garçons qui avaient été exposés in utero (Monneret, 2017).

Depuis les années 1940, le BPA est utilisé pour la fabrication de nombreux objets de notre quotidien. Il sert de monomère entrant dans la composition de plastiques comme le polycarbonate (PC) et le polychlorure de vinyle (PVC). Il permet aussi la synthèse de résine

époxy servant à la fabrication de nombreux revêtements notamment pour les boîtes de conserves. On peut donc retrouver du BPA dans de nombreux objets comme les contenants alimentaires, les jouets, les conduits d'eau, les équipements médicaux, ainsi que les produits électroniques grand public. Aujourd'hui, le BPA est l'un des produits chimiques les plus produits en volume dans le monde. Ainsi, plus de 3 millions de tonnes de BPA produites par an dans le monde sont susceptibles de se retrouver dans notre environnement et de contaminer l'air, l'eau, le sol et donc la faune et la flore.

Depuis la première étude menée par Dodds et Lawon en 1938, un grand nombre de recherches complémentaires ont permis de mettre en lumière les propriétés oestrogéniques du BPA et notamment leurs implications dans des dérégulations du système endocrinien et la promotion de la carcinogénèse.

## B. Exposition

La principale source d'exposition au BPA est la source alimentaire. Les contenants alimentaires peuvent être composés d'un revêtement en résine époxy ou en PVC. Cela permet d'éviter le contact direct des aliments aux parois métalliques afin d'éviter la rouille et la corrosion. A cause de processus de polymérisation incomplets, des résidus de monomère BPA peuvent migrer dans les aliments. Plusieurs études menées à travers le monde ont détecté la présence de BPA dans la majorité des aliments en conserve (**Fig. 13**). De plus, certaines études ont révélé que le chauffage accentuerait la migration du BPA dans les aliments (Munguia-Lopez & Soto-Valdez, 2001).



Country	Sample size	Detection freq. (%)	Range	Refs.
<i>Canned food (ng/g)</i>				
US	78	91	<2-730	Noonan et al. (2011)
US	97	59	<0.2-65	Schechter et al. (2010)
Canada	78	99	<0.6-534	Cao et al. (2010)
Japan	48	92	<1-842	Sajiki et al. (2007)
Korea	61	64	<3-136	Lim et al. (2009a)
Belgium	21	100	0.2-169	Geens et al. (2010)
<i>Beverage cans (ng/mL)</i>				
Spain	11	64	<0.05-0.61	Gallart-Ayala et al. (2010)
Canada	69	100	0.03-4.5	Cao et al. (2009a)
Belgium	45	91	<0.02-8.1	Geens et al. (2010)
Portugal	30	70	<0.01-4.7	Cunha et al. (2011)

**Figure 13. Tableau récapitulatif de plusieurs études à travers le monde détectant la présence de BPA dans les conserves et les cannettes.**

Ce tableau résume la taille de l'échantillon, la fréquence de détection et la plage de concentration définie dans chaque étude. D'après (Geens et al., 2012)

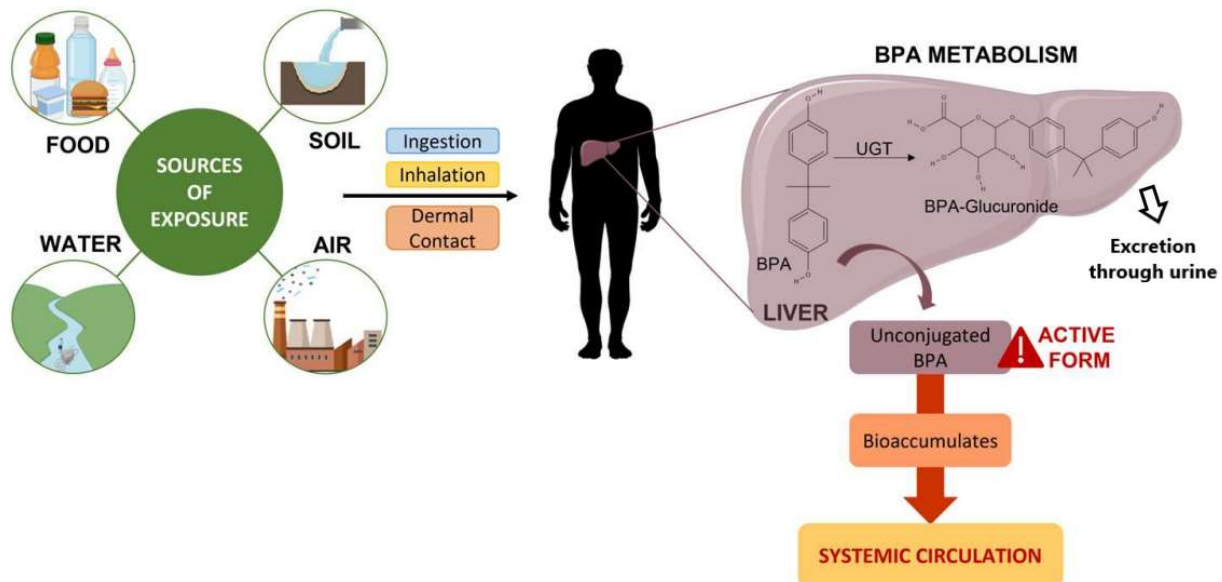
Carwile et al. ont réalisé un essai randomisé chez des volontaires qui devaient consommer quotidiennement soit une soupe en conserve, soit une soupe fraîche préparée sans ingrédients en conserve pendant 5 jours. Cette étude a démontré que le groupe ayant consommé des soupes en conserve avait une augmentation importante du taux urinaire de BPA par rapport à ceux ayant consommé des soupes fraîches. Cela prouve bien qu'une transition du BPA peut se faire à l'Homme par l'ingestion d'aliments contaminés (Carwile et al., 2011).

D'autres sources d'exposition sont possibles comme l'exposition cutanée par le contact direct avec des objets contenant du BPA. Par exemple, les papiers thermiques comme les tickets de caisse contiennent une couche de poudre de BPA servant de révélateur de couleur lors de l'impression. Des études ont montré un taux urinaire de BPA plus élevé chez les cassiers et les caissières qui sont quotidiennement en contact avec des papiers thermiques (Ndaw et al., 2016).

Enfin une troisième source d'exposition au BPA est l'inhalation. L'utilisation généralisée du BPA dans une variété d'applications intérieures et de produits de consommation, tels que les revêtements de sols à base d'époxy, les adhésifs, les peintures ainsi que les équipements électroniques conduisent à la détection de BPA dans les poussières intérieures. Cependant, l'inhalation de poussière semble être un contributeur mineur à l'exposition total de BPA (<10% de l'exposition total au BPA). L'exposition majoritaire reste l'ingestion (Geens et al., 2009).

### C. Métabolisme du BPA

Comme la voie principale d'exposition au BPA est la voie par ingestion, nous nous intéresserons d'abord au métabolisme du BPA après administration par voie orale. Une fois ingéré, le BPA est absorbé par le tractus gastro-intestinal et il va rapidement subir des métabolismes de détoxification. Pour cela le BPA va se trouver principalement sous forme conjuguée avec l'acide glucuronique, et plus rarement avec du sulfate pour donner respectivement du glucuronide de BPA (BPA-G) et du sulfate de BPA. Ces formes conjuguées sont synthétisées dans le foie puis elles vont passer dans la circulation sanguine afin d'atteindre les reins dans lesquels elles seront excrétées dans l'urine (Geens et al., 2012). Les formes conjuguées du BPA ont d'abord été considérées comme n'ayant pas d'activité oestrogénique. Ce qui semble être le cas du métabolite principal, le BPA-G (Matthews et al., 2001). Cependant, une étude a démontré que ce n'est pas parce qu'il est dépourvu d'activité oestrogénique, que ce métabolite est biologiquement inactif. En effet, le BPA-G serait capable d'induire l'adipogénèse dans des préadipocytes murins et humains, ce qui suggère que l'effet des métabolites du BPA doivent aussi être pris en compte dans l'évaluation des risques induits par l'exposition au BPA (Boucher et al., 2015). Une autre étude récente a démontré que certaines formes de métabolites du BPA comme le 4-méthyl-2,4-bis(4-hydroxyphényl)pent-1-ène (MBP) pouvaient induire une activité oestrogénique dans des cellules de cancer du sein MCF7 (Hirao-Suzuki et al., 2023). Il faut aussi prendre en compte qu'une petite partie du BPA ingéré reste sous forme libre et peut diffuser dans le sang et les tissus (**Fig. 14**). Ce BPA sous forme libre est détecté en partie dans les urines, mais le BPA étant un composé lipophile, des études ont montré qu'il était également stocké dans les tissus adipeux des femmes (M. F. Fernandez et al., 2007). Nous pouvons donc déduire que le tissu adipeux entourant la glande mammaire pourrait être une source d'exposition des cellules épithéliales aux bisphénols.



**Figure 14. Sources d'exposition et métabolisme du BPA dans le foie.**

La source principale d'exposition au BPA est l'alimentation. Mais le BPA peut aussi être retrouvé dans l'eau, l'air et le sol à cause des contaminations dues aux activités humaines. Chez l'homme, le BPA ingéré par voie orale est rapidement et efficacement absorbé par le tube digestif (> 95 % de la dose) puis métabolisé dans le foie. L'enzyme uridine diphosphate glycuronosyltransférase (UGT) permet la formation de BPA conjugué qui sera éliminé dans l'urine mais une partie du BPA libre peut rejoindre la circulation sanguine et avoir des activités oestrogéniques dans les tissus. D'après (Presunto et al., 2023)

Pour ce qui est de l'exposition cutanée, elle représente une voie d'exposition moins importante que la voie orale mais l'absorption par le foie étant moins directe cela a pour conséquence d'augmenter la concentration de BPA sous forme libre dans le sang (Pottenger et al., 2000).

Même si la détection de BPA sous forme libre reste minime, la littérature a démontré que ce composé est capable d'agir à très faibles concentrations et d'induire des effets néfastes pour la santé humaine.

Les alternatives du BPA, comme le bisphénol S suivent un métabolisme similaire avec la formation principalement de glucuronide de BPS et de sulfate de BPS. Tout comme le BPA, une partie de BPS sous forme libre peut circuler dans l'organisme (Gramec Skledar & Peterlin Mašič, 2016).

## D. Législation

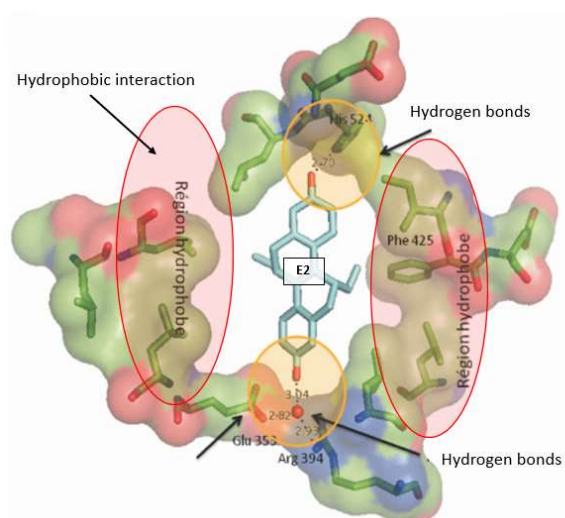
Ces nombreuses études réalisées sur les voies d'exposition ainsi que les risques sur la santé liés au BPA ont conduit à faire évoluer la réglementation concernant son utilisation. Depuis 2002, le BPA était classé comme substance suspectée d'être toxique pour la reproduction (catégorie 2) au niveau européen. En 2014, le comité d'évaluation des risques de l'Agence européenne des substances chimiques a émis un avis favorable permettant la classification du BPA à la catégorie 1B comme substance présumée toxique pour la reproduction humaine. Cette évolution en catégorie 1, a renforcé les mesures de prévention favorisant sa substitution ou au moins sa limitation à des taux plus faibles dans les produits destinés aux consommateurs. Cela a permis la mise en place de nouvelles mesures, comme depuis janvier 2020, avec l'interdiction de la mise sur le marché de papiers thermiques contenant du BPA afin de protéger les travailleurs qui doivent manipuler quotidiennement ce genre de papiers (*Bisphénol A*, Anses, 2017). En France, les travaux de l'Agence nationale de sécurité sanitaire (Anses) de 2011, ont conduit à l'interdiction de l'utilisation du BPA dans tous les conditionnements, contenants et ustensiles destinés à entrer en contact direct avec des denrées alimentaires pour les nourrissons et enfants en bas âge. Puis cette loi a été étendue en 2015 à tout autres conditionnements, contenants ou ustensiles destinés à entrer en contact direct avec des denrées alimentaires, afin de limiter la voie d'exposition principale du BPA par ingestion. En parallèle, les nombreux rapports de l'Anses ont permis en 2017, la classification du BPA comme substance extrêmement préoccupante au titre de ses propriétés en tant que perturbateur endocrinien. Cette décision a conduit à l'obligation des industriels d'informer l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA), sur la présence de BPA dans les articles qu'ils produisent ou importent. Ces durcissements en termes de législations ont conduit les industriels à se tourner vers des substituts du BPA. Généralement ce sont d'autres types de bisphénols, comme les bisphénols S, F, M, B, AP ou encore AF qui sont utilisés comme substituts. Le bisphénol S (BPS) est une des alternatives principales du BPA, notamment dans la conception des papiers thermiques ou encore de différents textiles. En effet, il était considéré comme une alternative plus sûre car il possède une affinité plus faible pour le récepteur canonique des œstrogènes (ER $\alpha$ 66) et possède une meilleure stabilité à la chaleur et la lumière (Kuruto-Niwa et al., 2005). Cependant, en 2021 et 2023, deux alternatives du BPA, le BPB et le BPS ont été ajoutés à la liste des substances extrêmement préoccupantes pour leurs propriétés de perturbateur endocrinien au niveau national. Malheureusement, aujourd'hui au niveau

européen, seulement le BPA et le BPB sont officiellement reconnus comme des perturbateurs endocriniens. La France a donc un rôle important à jouer dans l'identification du BPS comme perturbateur endocrinien au niveau européen (*Bisphénols*. Ministère du travail, de la santé et des solidarités, 2024).

### III. Toxicité des bisphénols

#### A. Notion d'affinité

Les bisphénols sont capables d'agir comme des œstrogéno-mimétiques en se liant aux récepteurs aux œstrogènes à la place des hormones endogènes. Cette activité œstrogénique est permise par leurs similarités structurelles avec les ligands endogènes comme l'E2. En effet, les bisphénols sont composés de deux groupes phénols qu'on retrouve également sur la molécule d'œstradiol, leur permettant d'établir des liaisons hydrogènes avec la poche des différents récepteurs aux œstrogènes ER $\alpha$ , ER $\beta$  et GPER. Cependant, les autres groupements présents sur les molécules du BPA et de ces alternatives comme le BPS, divergent de la structure de l'E2. Les bisphénols vont donc pouvoir établir des interactions hydrophobes plus ou moins fortes avec la poche du récepteur (**Fig. 15**).



Ligands	Relative binding affinity			Structure
	ER $\alpha$ 66	ER $\beta$	GPER	
E2	100	100	100	
BPA	0,01	0,01	1,1	
BPS	0,001	-	0,6	

**Figure 15. Représentation de la liaison du ligand et tableau des affinités de liaison relative par rapport à l'E2.**

A gauche, structure déterminée par diffraction des rayons X de la poche hydrophobe de ER $\alpha$ 66 avec son ligand naturel E2. A droite, tableau représentant les affinités de liaison relative au ligand naturel E2 par rapport au BPA et au BPS sur les différents récepteurs ER $\alpha$ 66, ER $\beta$  et GPER. Cette affinité est déterminée à partir d'expériences de compétition sur des récepteurs solubilisés et/ou par fluorescence. Figure modifiée d'après (Reproduction et environnement, Inserm 2011) et (Rouhimoghadam et al., 2020).

Comme le montre la Figure 15, le bisphénol A possède une affinité 10 000 fois plus faible que l'E2, pour le récepteur canonique des œstrogènes ER $\alpha$ 66. C'est pour cela qu'il était auparavant considéré comme ayant un pouvoir œstrogénique faible. Pourtant, des études ont révélé que le BPA pouvait activer des réponses cellulaires à de très faibles concentrations (Hong et al., 2017). Cela peut s'expliquer par le fait que la fixation du BPA conduit à un changement de conformation unique des récepteurs aux œstrogènes qui vont pouvoir recruter des coactivateurs de manière efficace. En effet, une étude a montré que le BPA arrivait à recruter, de manière similaire pour ER $\alpha$  et ER $\beta$ , le coactivateur SRC malgré une différence d'affinité pour ces deux récepteurs. Cela suggère que l'affinité seule n'est pas suffisante pour prédire l'activité œstrogénique des bisphénols. De plus, même si le BPA semblait potentialiser de manière préférentielle le recrutement du coactivateur SRC par rapport au coactivateur TIF2, l'activité du gène rapporteur était plus importante avec le recrutement de TIF2. Cela suggère que la capacité à recruter des coactivateurs n'est pas non plus un critère suffisant pour prédire la réponse cellulaire finale (Routledge et al., 2000). Malgré cela, après les limitations sur

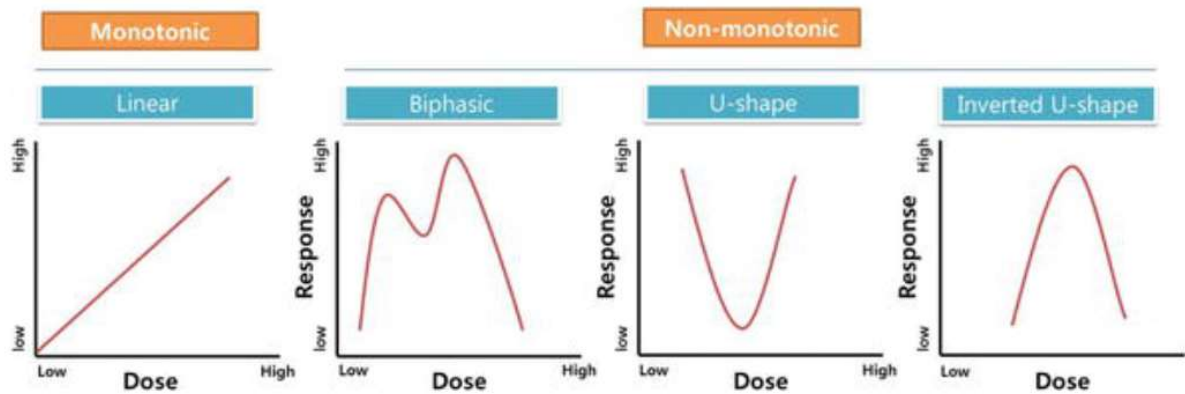
l'utilisation du BPA vu précédemment dans la partie législation, les industriels ont commencé à utiliser de plus en plus des bisphénols alternatifs comme le BPS car ils avaient une affinité plus faible que le BPA pour ER $\alpha$ 66 (**Fig. 15**).

Ces études remettent donc en question la sureté des alternatives du BPA basée sur des tests d'affinité. D'autant plus que pour la fixation sur des récepteurs aux œstrogènes non canoniques comme GPER, on remarque que cette différence est beaucoup plus faible entre le BPA et le BPS (**Fig.15**). Enfin, une dernière question subsiste quant à l'effet de ces polluants sur des cellules n'exprimant pas ER $\alpha$ , ni ER $\beta$  mais uniquement GPER comme les cellules souches mammaires.

## B. Mode d'action des bisphénols

Un autre point important qui pourrait expliquer les effets médiés par les bisphénols même s'ils sont présents en très faibles quantités dans le corps, est qu'ils n'agissent pas de façon linéaire par rapport à leur concentration (Vandenberg et al., 2012).

Un principe de base de la toxicologie est la relation dose-effet, qui signifie généralement qu'un produit va être toxique à partir d'une certaine dose et plus cette dose est importante, plus les effets sont grands : on parle de relation dose-effet monotone ou linéaire. Cependant, certains composés comme les hormones ne suivent pas ce principe et suivre une courbe dose-effet dite non monotone. Par exemple, un composé peut avoir des effets à des doses très faibles et très fortes, mais pas d'effet à des doses moyennes, alors on dira qu'il suit une relation dose-effet non monotone formant une courbe en U (**Fig. 16**).



**Figure 16. Exemple de courbe Dose-réponse monotone et non monotones.**

*D'après (Hong et al., 2017).*

En raison de la fixation à des récepteurs communs, il a été proposé que les perturbateurs endocriniens suivent les mêmes règles que les hormones concernant leur relation dose-réponse. Pour les bisphénols, des études ont montré que comme les œstrogènes, le BPA suivait une relation dose-effet non monotone. Par exemple, une étude a démontré que seules l'administration de faibles doses de BPA chez des souris transgéniques MMTV-erbB2 (développant des tumeurs mammaires spontanées), permettait d'augmenter la tumorigénèse, alors que les plus fortes doses induisait une apoptose plus forte (Jenkins et al., 2011).

En plus de cela, les hormones sont capables d'induire des réponses cellulaires efficaces à très faibles concentrations, leur synthèse est très régulé ce qui fait qu'elles circulent à des niveaux de l'ordre du nanogramme ou du picogramme par millilitre dans le sang (Vandenberg et al., 2012). Cela s'explique par le fait que les récepteurs aux hormones ont une affinité très forte à leur ligand et il existe une relation non linéaire entre le nombre de récepteurs liés et l'effet biologique le plus fort observable. Ainsi, même des changements modérés de la concentration hormonale dans la gamme des faibles doses peuvent produire des changements importants dans l'occupation des récepteurs et donc générer des changements significatifs dans les effets biologiques.

Cela pose 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 pour réguler les autorisations concernant son utilisation.



## C. Implication dans la tumorigenèse

Comme nous l'avons vu précédemment, le BPA ainsi que son alternative le BPS ont tous les deux été reconnus pour leurs effets en tant que perturbateur endocrinien en France. Les œstrogènes ayant un rôle pléiotrope dans l'organisme, les conséquences d'une perturbation de leur signalisation via les bisphénols peuvent être multiples. En effet, de nombreuses études notamment menées sur des modèles murins, ont montré que le BPA et le BPS pouvaient induire des dysfonctionnements à différents niveaux. Par exemple, ils peuvent induire des troubles au niveau de la reproduction (Siracusa et al., 2018), du métabolisme avec un risque accru de diabète et d'obésité (Alharbi et al., 2022), altérer le comportement des souris avec des conséquences sur les fonctions cérébrales (Moon et al., 2023), ou encore impacter le système immunitaire (Hong et al., 2017). Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, les signalisations des œstrogènes peuvent être aussi impliquées dans la tumorigenèse. Si on se réfère au site du ministère du travail, de la santé et des solidarités, il est décrit que le BPA et le BPS pourrait avoir un impact sur le développement des cancers hormono-dépendants. Pourtant ils n'ont pas été classés comme des composés ayant des propriétés cancérigènes. Seul un dérivé du BPA, le 2,2',6,6'-tétrabromobisphénol A employé comme retardateur de flamme, et entrant dans la composition de résines polymères dans des produits tels que les cartes de circuits imprimés, le papier et les textiles, a été ajouté en 2023, à la liste des substances extrêmement préoccupantes (SVHC) pour ses propriétés cancérigènes.

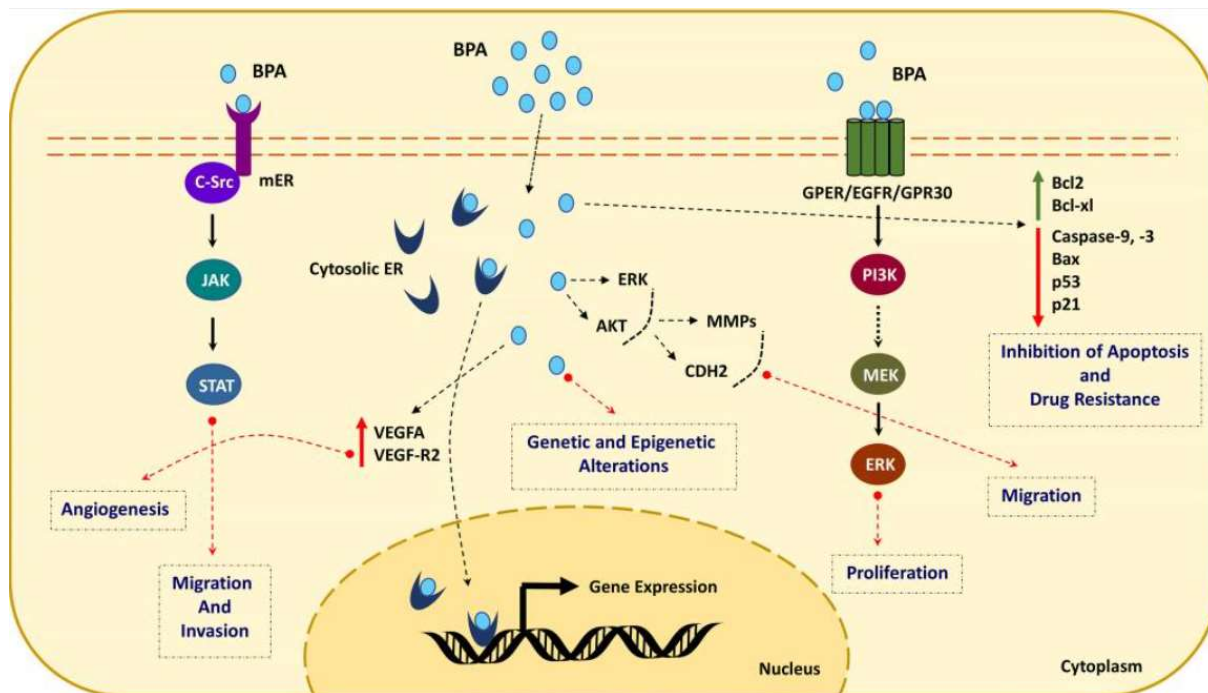
### 1. Implication du BPA

De nombreuses études ont déjà établi un lien entre l'exposition du BPA et la carcinogenèse. Le BPA peut agir à différents niveaux pour promouvoir l'initiation et la progression tumorale. L'initiation des cancers est souvent progressive et peut résulter de l'accumulation de dysfonctionnements au sein des cellules conduisant à une prolifération dérégulée et à la formation d'une tumeur. Dans le chapitre 2, nous avons vu que les cellules souches mammaires pourraient être une cible de choix pour initier les cancers, d'autant plus que l'exposition au BPA est chronique et que la durée de vie des MaSC est beaucoup plus longue que celle des cellules différenciées. Cela pourrait favoriser l'accumulation des perturbations générées par le BPA. Par exemple, une étude a démontré que l'exposition de souris à du BPA pendant une phase critique de forte sensibilité aux signaux oestrogéniques comme la puberté, altérerait la fonction des MaSC. Ils ont démontré que les glandes mammaires générées à partir

de MaSC exposées au BPA formaient davantage de lésions hyperplasiques et que cette exposition induisait une signature génétique précancéreuse (D. Wang et al., 2014). Cependant, de telles lésions hyperplasiques pourraient également être induites par une exposition encore plus précoce puisqu'un article montre que l'exposition prénatale de rat perturbe la formation de la glande mammaire qui forme alors un nombre accru de canaux hyperplasiques au moment de la puberté (Durando et al., 2007). Ces observations sont importantes puisque l'exposition au BPA peut avoir lieu même avant la naissance considérant qu'il est capable de traverser le placenta humain (Balakrishnan et al., 2010). Un deuxième processus fréquemment mis en place dans l'initiation tumorale est la répression des gènes suppresseur de tumeurs. Le BPA serait capable de réprimer l'expression du gène suppresseur de tumeur p53 dans cellules épithéliales mammaires humaines non cancéreuses à haut risque prélevées sur le sein non affecté de patientes. Ces régulations prédisposent ces cellules à un développement tumoral en réduisant l'apoptose et en favorisant une prolifération dérégulée (Dairkee et al., 2013). Ensuite, des preuves suggèrent que le BPA n'impacte pas seulement les cellules épithéliales mammaires mais également le microenvironnement. Le BPA serait capable d'altérer la formation du coussinet adipeux et la localisation du collagène autour de la glande mammaire fœtale de souris exposées pendant la période périnatale (Vandenberg et al., 2007). Un microenvironnement dérégulé va alors conférer un avantage aux cellules pré-transformées ou déjà transformées. D'ailleurs, une étude montre également que le BPA modifie le microenvironnement tumoral pour favoriser la progression du cancer du sein. Il est capable de moduler la réponse immunitaire via le biais des récepteurs aux œstrogènes qui sont exprimés par la plupart des cellules immunitaires. Il peut également favoriser la prolifération de fibroblastes ainsi que la production de collagène augmentant la rigidité de la glande mammaire, qui est souvent associée au développement tumoral, et altérer l'adipogenèse (Kwon, 2022).

Le BPA peut donc également être impliqué dans la progression tumorale. Fait intéressant, il peut agir aussi bien sur des cellules cancéreuses mammaires ER positives que dans des cancers du sein triples négatifs avec des cellules n'exprimant pas les récepteurs aux œstrogènes nucléaires. Pour les cellules cancéreuses ER positives, des articles ont démontré que le BPA favorisait la viabilité et le taux de prolifération de la lignée MCF-7 (Krishnan et al., 1993) (Ricupito et al., 2009). Il a été révélé que les effets prolifératifs induit par le BPA pourrait être dû à l'activation du récepteur GPER qui peut être exprimé par les cellules dites ER négatives. Un article a montré que le BPA était capable d'activer la voie de l'EGFR/ERK dans plusieurs

lignées cancéreuses mammaires. Ils ont montré que cet effet n'était pas inhibé via l'ajout d'un antagoniste de ER $\alpha$  et ER $\beta$  (ICI 182,780) dans la lignée MCF7 (ER $\alpha$  et ER $\beta$  positive) ce qui signifie que cet effet est dépendant d'un autre récepteur des œstrogènes. Puis ils ont montré que cette activation avait lieu également dans la lignée SKBR3 qui n'expriment ni ER $\alpha$ , ni ER $\beta$  mais GPER. L'utilisation d'un siRNA spécifique de GPER a confirmé son implication dans l'activation de la voie via la fixation du BPA (S. Dong et al., 2011). Un autre article confirme l'implication de cette voie de signalisation permettant la prolifération des cellules cancéreuses SKBR3 et des fibroblastes associés au cancer (Pupo et al., 2012). Le BPA peut également favoriser la migration/invasion des cellules cancéreuses du sein et l'apparition de métastases pulmonaires via l'induction de la sécrétion des métalloprotéinases MMP-2 et de MMP-9 dans les cellules murines de TNBC (4T1) (Torres-Alamilla et al., 2023). Enfin le BPA est capable de conférer une chimiorésistance aux cellules cancéreuses en augmentant l'expression de protéines anti-apoptotiques comme BCL2, réduisant les effets cytotoxiques des thérapies. **(Fig. 17)**



**Figure 17. Mécanismes d'action du BPA via son activité oestrogénique, favorisant l'initiation et la progression tumorale.**

Le BPA se lie aux différents récepteurs d'œstrogènes : les récepteurs membranaires (mER) comme l'isoforme ERα36 qui est capable de s'ancrer à la membrane, les récepteurs nucléaires (ER) et le récepteur GPER. Cette fixation modifie des voies de signalisation génomiques et non génomiques altérant les fonctions biologiques normales. D'après (Khan et al., 2021).

Malgré toutes ces preuves, il est encore difficile de pouvoir classer le BPA comme substance cancérigène pour l'Homme. La grande majorité des études démontrant ces effets ont été menées sur des modèles murins ou *in vitro*. Si on regarde les méta-analyses d'études épidémiologiques observés chez l'Homme, les résultats obtenus ne permettent pas d'affirmer une association statistique significative entre l'exposition au BPA et l'apparition d'un cancer du sein (G. Liu et al., 2021) (Fauconnier et al., 2023). Un biais potentiel de ces études est que les cohortes considérées sont assez hétérogènes entre elles, tant sur l'âge moyen des groupes, les taux d'exposition entre les populations en fonction des réglementations mises en place dans les différents pays ou encore sur les techniques de dosages du BPA. Toutes ces différences dans la prise en compte de ces paramètres diminuent la puissance de ces méta-analyses. De plus, il paraît difficile de réaliser des études prospectives afin d'établir un lien direct de causalité entre l'exposition au BPA et le cancer du sein chez l'Homme puisque nous sommes tous exposés au BPA tout au long de notre vie. Cependant les expérimentations chez l'animal et *in vitro* donnent des arguments en faveur d'un possible lien de causalité. Il semble donc nécessaire de

continuer à alimenter les recherches concernant les effets potentiellement cancérigènes du BPA chez l'Homme.

## 2. Implication du BPS

Pour le BPS, les recherches menées sur le sujet sont encore plus récentes. En effet, les données de la littérature restent faibles aujourd'hui, mais certaines suggèrent déjà l'existence d'un lien entre l'exposition au BPS et le développement tumoral (Zhao et al., 2021). Il n'existe pas encore assez de données pour établir des méta-analyses d'études épidémiologiques comme pour le BPA, afin d'évaluer l'association entre le BPS et les cancers du sein chez l'Homme. Cependant, une première méta-analyse, sortie en 2023 sur des recherches menées *in vitro*, a mis en évidence une association entre l'exposition au BPS et l'augmentation du stress oxydatif ainsi que sur la toxicité pour le système reproducteur (Abouhamzeh et al., 2023). Ces premières données renforcent la nécessité d'étudier plus en détail l'innocuité théorique du BPS chez l'homme.

Si on se focalise plus particulièrement sur la glande mammaire, des études ont démontré que le BPA ainsi que le BPS était capable de perturber la morphogenèse des cellules épithéliales saines. Par exemple, les données de Atlas et al. montrent une augmentation du volume et la perte d'une lumière bien structurée au sein d'acini générés à partir de cellules MCF12A exposées au BPA ou au BPS pendant plusieurs jours (Atlas & Dimitrova, 2019). Un autre article démontre une désorganisation architecturale au sein d'organoïdes humains formés à partir de tissus obtenus grâce à des réductions mammaires. Ce même article montre également que les bisphénols induisent des modifications du protéome avec des protéines différentiellement exprimées spécifiques du traitement par le BPA ou par le BPS. Cela signifie que bien que ces deux molécules soient proches elles n'activent pas forcément les mêmes signalisations (Winkler et al., 2022). Au sein de l'équipe, il a été également montré que l'exposition au BPA ou au BPS perturbait la signalisation des BMP qui pouvait conduire à la transformation d'une lignée de cellules souches/progéniteurs mammaires (MCF10A) (Chapellier et al., 2015). Ces perturbations pourraient participer à l'initiation tumorale. En plus des changements protéomiques, le BPS pourrait induire des changements transcriptionnels et épigénétiques afin de promouvoir le développement tumoral. Des résultats ont mis en évidence la capacité du BPS à diminuer le niveau de méthylation de promoteur de gènes liés au cancer du sein et donc

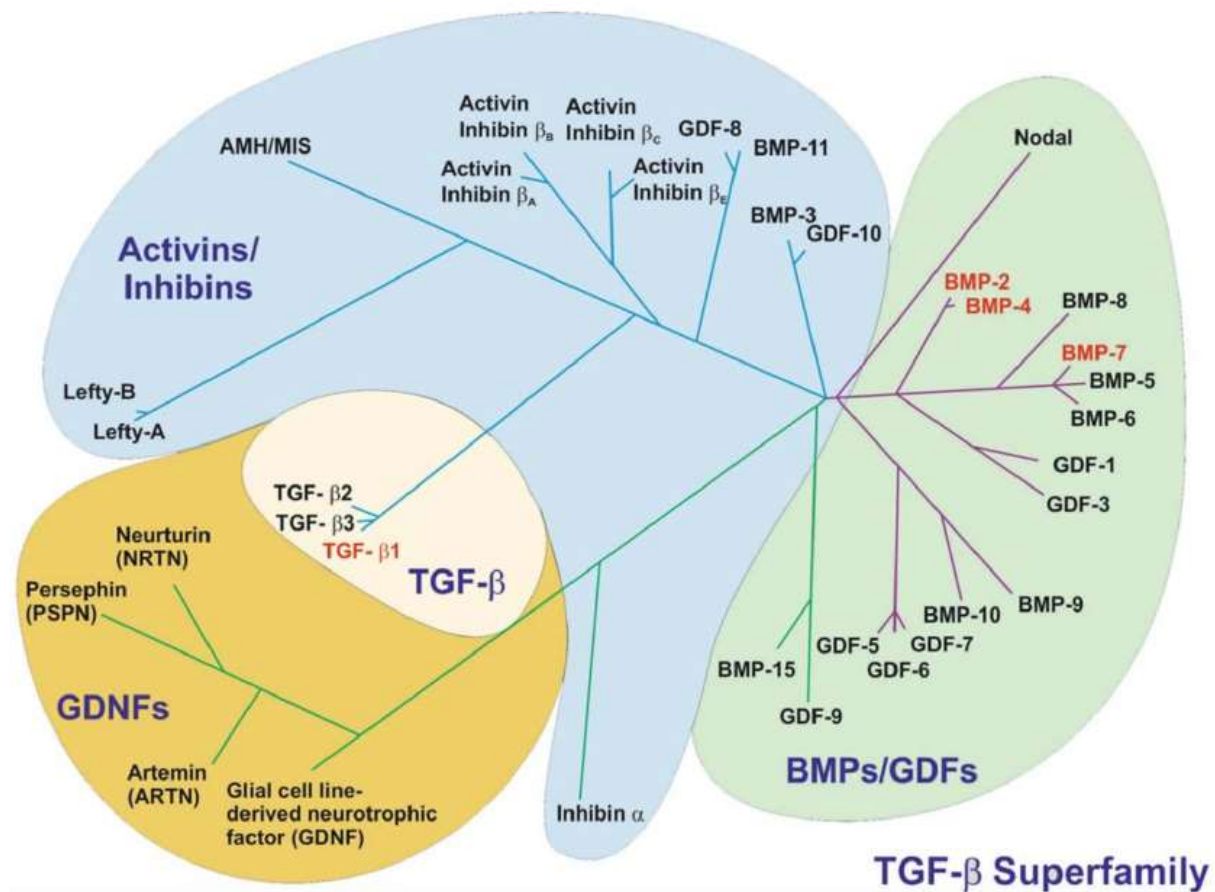
d'augmenter leur expression dans la lignée de cancer MCF-7. Il s'agirait notamment de gènes enrichis dans la voie de signalisation PI3K-Akt et dans la matrice extracellulaire (W. Huang et al., 2019). Au même titre que le BPA, le BPS peut donc aussi être impliqué dans la progression tumorale comme le souligne l'article de Kim et al. Ces données montrent que le BPS, comme le BPA, favorise la prolifération et la migration des cellules MCF-7 en régulant l'expression protéique de gènes liés au cycle cellulaire et de marqueurs d'EMT via une signalisation dépendante des œstrogènes (Kim et al., 2017). Tout comme le BPA, le BPS peut également se fixer à GPER et favoriser la progression de TNBC n'exprimant pas les ER. Par exemple, le BPS peut induire la migration des cellules MDA-MB-231 via l'activation spécifique de la signalisation GPER/Hippo-YAP (Deng et al., 2018).

## Chapitre 5. Les Bone Morphogenetic Proteins (BMP)

### I. Le mécanisme d'action des BMP

#### A. Généralités

Les BMP sont des membres solubles de la superfamille des facteurs de croissance transformants  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Cette superfamille est composée de quatre sous-groupes : le plus important est constitué des BMP et des facteurs de croissance et de différenciation (GDF), ensuite il y a le sous-groupe des TGF- $\beta$ , celui des activines/inhibines et les « outsider ». Parmi le sous-groupe des BMP et GDF, des sous-divisions existent en fonctions des similarités de séquence entre les différentes protéines (**Fig.18**).

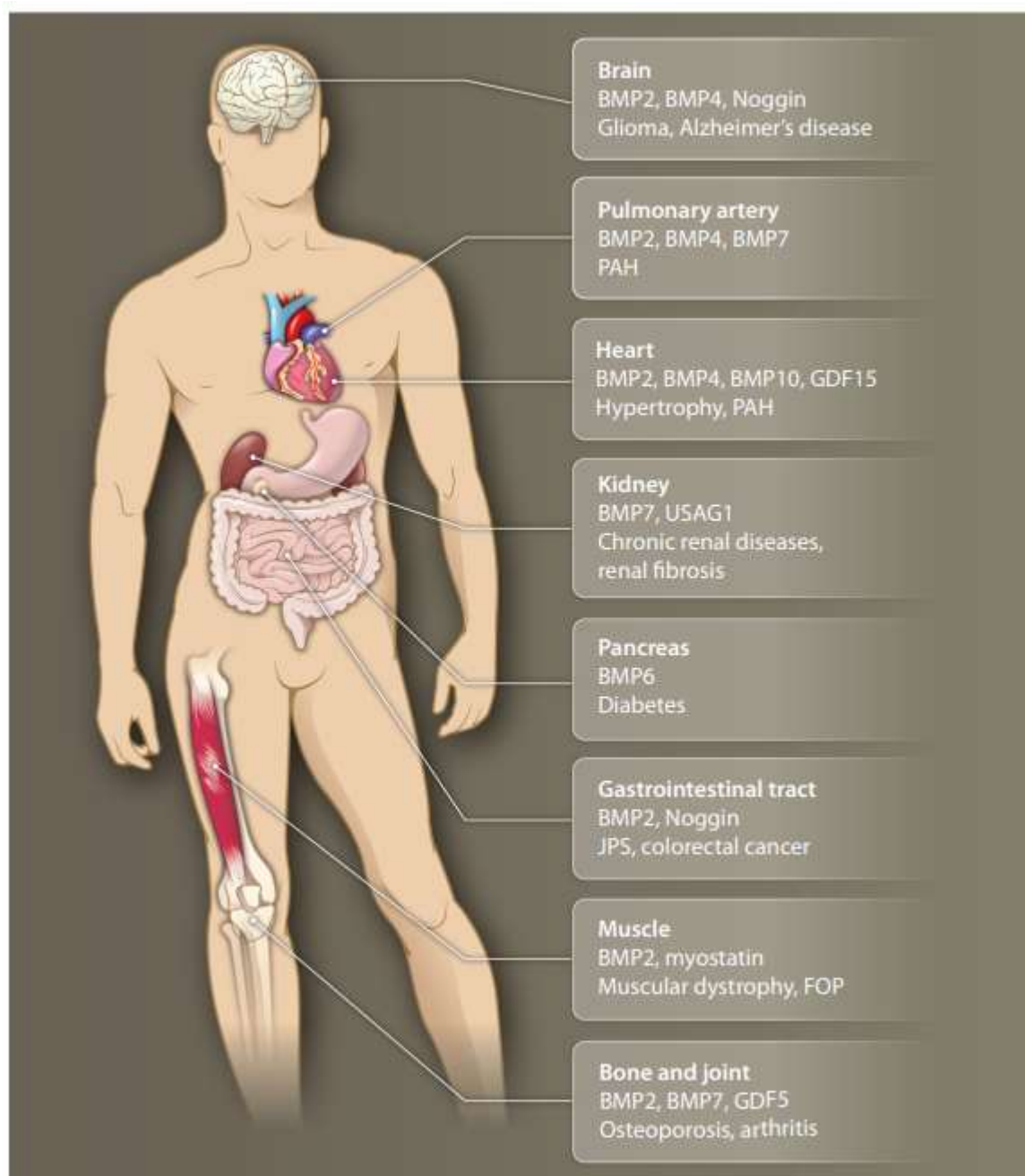


**Figure 18. Représentation des membres de la superfamille du TGF- $\beta$ .**

Arbre phylogénétique basé sur les similarités de séquences protéiques et leur fonction, séparant les membres de cette superfamille en 4 sous-groupes : le groupe BMP/GDF, le groupe Activines/inhibines, le groupe TGF- $\beta$  et le groupe des « outsider » ou GDNF. D'après (Weiskirchen et al., 2009)

Les BMP ont été découverts pour la première fois par Urist en 1965, qui a mis en évidence la présence de facteurs bioactifs dans la matrice osseuse déminéralisée responsables de l'induction de la formation osseuse. C'est pour cela qu'il les a nommés protéines morphogénétiques osseuses (Urist, 1965). Cependant, tous les membres des BMP n'induisent pas forcément la croissance osseuse. Il a été découvert que leurs rôles étaient beaucoup plus variés. Par exemple, ils participent à l'embryogenèse, comme nous l'avons vu avec l'implication du BMP4 dans la mise en place des crêtes mammaires (voir chapitre 1), mais aussi dans le maintien de l'organisme adulte. Les BMP agissent sur la régulation de diverses cellules souches, notamment les cellules souches neurales, hématopoïétiques, mésenchymateuses, cutanées et épithéliales. Des perturbations dans la régulation de la signalisation des BMP peuvent donc conduire au développement de diverses maladies comme des cancers (**Fig. 19**). Les effets

polyvalents des ligands BMP ont même conduit à la suggestion de changer leur nom en « Body Morphogenetic Proteins» (Wagner et al., 2010).



**Figure 19. Représentation non exhaustive des rôles des BMP dans l'organisme.**

*Chaque membre peut avoir des rôles particuliers et réguler le maintien de différents organes ou tissus.*

*D'après (Wagner et al., 2010)*

## B. Interaction ligand récepteur

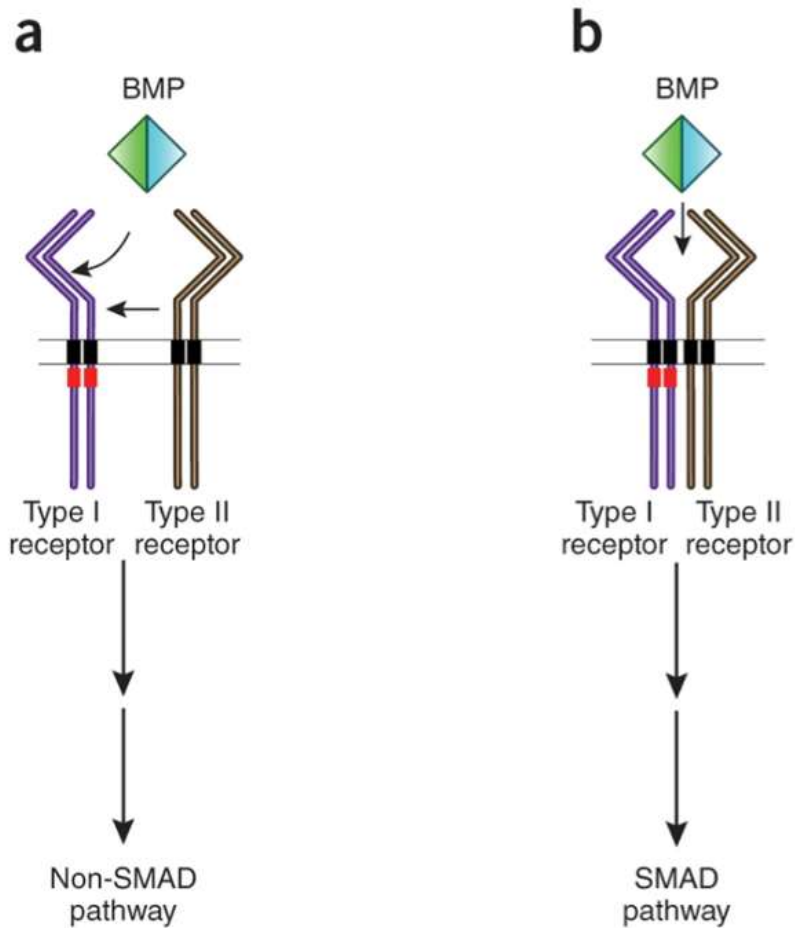


Le point commun entre tous les membres de la superfamille du TGF- $\beta$  est la génération d'un ligand sous la forme de précurseur ayant une conformation très particulière. Les ligands sont synthétisés sous forme de pré-proprotéines comprenant un peptide signal, un grand prodomaine et un domaine mature. Ces protéines vont se dimériser pour donner des dimères de proprotéines inactives. Elles possèdent une caractéristique structurale particulière se traduisant par la présence d'un motif « cystine knot » comprenant 6 cystines reliés par 3 ponts disulfures et formant 3 boucles. Cette structure confère aux ligands une très forte stabilité thermique et chimique. Il a été décrit que la longueur importante du prodomaine par rapport à la forme définitive mature pourrait aider à la bonne conformation de sa forme active et/ou à son bon transport dans la cellule. Le clivage des prodomaines par des protéines telles que les furines, entraîne la libération d'un dimère de ligands matures et actifs pouvant se fixer à leurs récepteurs (Yadin et al., 2016).

Comme évoqué plus haut, les ligands du sous-groupe BMP/GDF peuvent être classés en sous-divisions plus petites comprenant : BMP2/4, BMP5/6/7/8, GDF1/3, GDF2/BMP10, GDF5/6/7, GDF8/11, GDF9/BMP15 et GDF10/BMP3. La dimérisation de ces ligands est capable de se faire sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimères. Cette hétérodimérisation peut avoir lieu au sein d'une même sous-division mais aussi entre 2 sous-divisions différentes. Par exemple, la sous-division BMP2/4 peut s'hétérodimériser avec des composants de la sous-division BMP5-8. Ces hétérodimères peuvent conférer des avantages en terme d'efficacité et activer des voies de signalisation distinctes des ligands homodimériques (Zheng et al., 2010) (Valera et al., 2010). Enfin, un même type de BMP peut présenter une affinité différentielle pour les chaînes de récepteurs de type I ou II même sous forme homodimérique. Par exemple, les homodimères de BMP2 présentent une affinité plus élevée pour les récepteurs de type I, à l'inverse des homodimères de BMP6 (Kirsch et al., 2000) (Saremba et al., 2008). En revanche, le BMP2/6 hétérodimérique présente une forte affinité pour les récepteurs de type I et de type II. Cette variété de combinaisons possibles traduit la complexité de cette voie et les multiples possibilités de signalisations en fonction du type cellulaire, des ligands et des récepteurs exprimés.

Pour les récepteurs, il existe deux groupes : les récepteurs de type I et de type II. La différence entre ces deux groupes réside dans la présence d'une région riche en sérine-glycine (GS) uniquement dans les récepteurs de type I. Les récepteurs des BMP sont transmembranaires, ils sont donc composés d'un domaine extracellulaire de liaison du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire qui présente une activité sérine-thréonine

kinase. Le ligand va induire une signalisation via un assemblage hétéro-tétramérique composé de deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II. Il a été décrit, en particulier dans le cadre des BMP, deux mécanismes de liaison du ligand permettant d'activer des signalisations différentes. Soit le ligand se fixe directement sur un complexe hétéro-tétramérique préformé à la membrane. On appelle ce mécanisme PFC (Preformed complexe), qui va activer une signalisation intracellulaire via les protéines SMAD. Soit un assemblage séquentiel des récepteurs est induit par le ligand, appelé BISC (BMP-induced signaling complexe). Pour cela, le ligand se fixe sur un homodimère de récepteur de haute affinité et cette fixation va recruter un autre homodimère de récepteur de plus faible affinité afin de constituer un hétéro-complexe final de récepteurs BMP. Ce mécanisme va déclencher des cascades de signalisation des voies non canoniques des BMP indépendantes des SMAD, comme la voie MAPK (**Fig. 20**) (Yadin et al., 2016) (Hassel et al., 2003).



**Figure 20. Mécanismes de signalisation possibles induits par le ligand BMP.**

Sur la figure (a), le ligand dimérique par exemple BMP2 se lie d'abord à ses récepteurs de type I à haute affinité (violet) puis recrute ses récepteurs de type II à faible affinité (marron) dans le complexe. Cela conduit à la transphosphorylation et à l'activation des voies non-SMAD (mécanisme BISC). Sur la figure (b), le BMP se lie à un complexe de récepteurs hétérotétramérique de type I et II préformés mais inactifs en termes de signalisation. Cela entraîne leur activation et déclenche la voie SMAD (mécanisme PCF). Figure modifié d'après (Mueller, 2015).

## C. Voies de signalisation

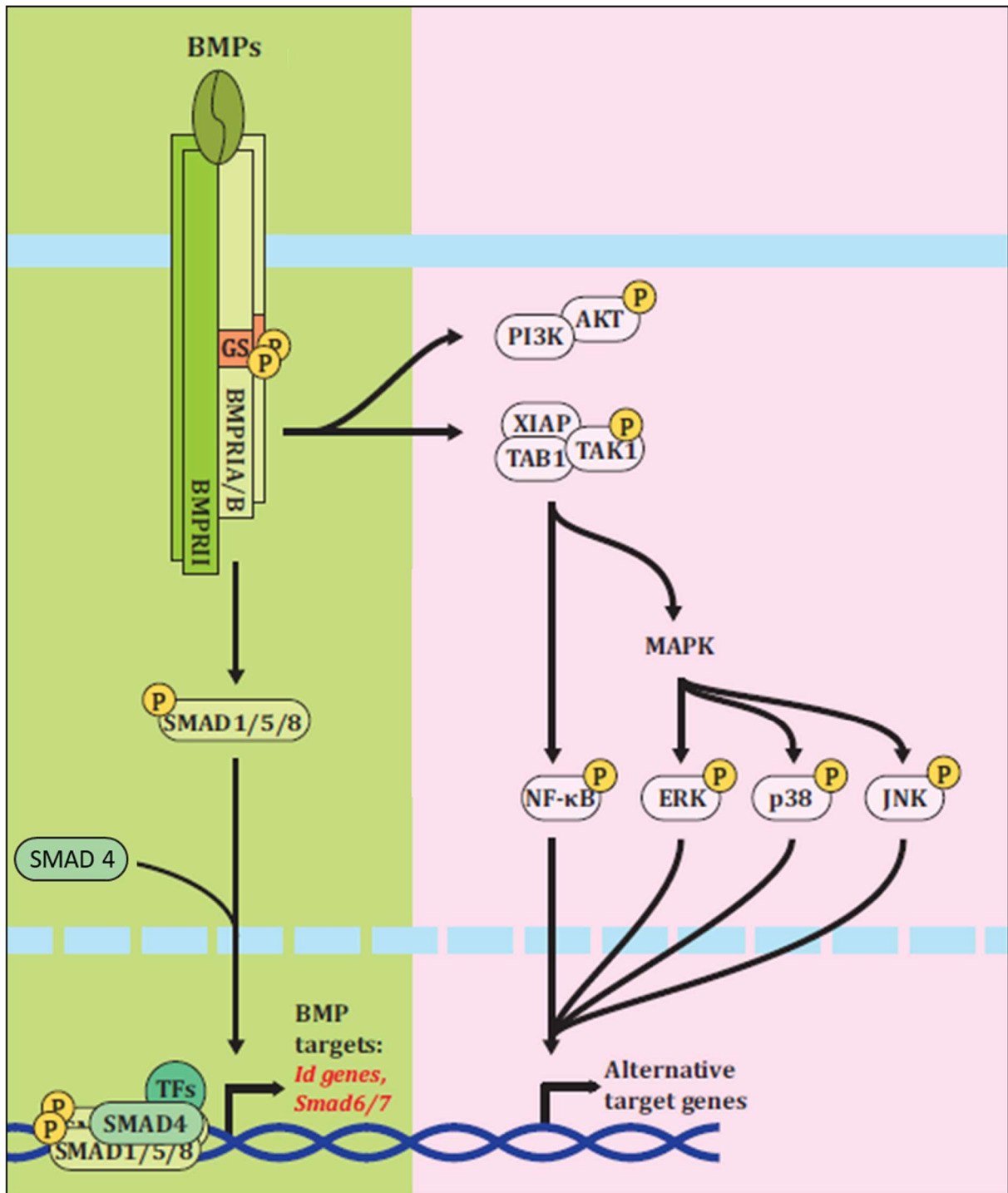
### 1. La voie canonique

La liaison du ligand BMP sur un complexe de récepteurs préformé entraîne la transphosphorylation, par les récepteurs de type II, du domaine intracellulaire GS spécifique aux récepteurs de type I. Une fois activé, les récepteurs de type I vont pouvoir recruter et

phosphoryler à leur tour les R-SMAD 1/5/8 (SMAD régulés par les récepteurs). Ces R-SMAD phosphorylées vont former un complexe hétéromérique avec la CO-SMAD 4 (common partner SMAD) et se transloquer dans le noyau. Par la suite, ce complexe va se lier aux éléments régulateurs de gènes cibles afin de jouer un rôle de facteur de transcription (Katagiri & Watabe, 2016). Parmi les gènes cibles connus pour être activés par la voie canonique des BMP, on peut citer les protéines inhibitrices de la différenciation (protéines ID, inhibiteurs compétitifs des facteurs de transcription de type bHLH) comme ID1, ID2, ID3 et ID4, mais aussi des inhibiteurs des SMAD comme SMAD 6 et SMAD 7. SMAD 6 est connu pour réguler négativement spécifiquement la voie des BMP alors que SMAD 7 régule à la fois la voie des BMP et celle du TGF- $\beta$  (Chi et al., 2019) (**Fig. 21**).

## 2. La voie non canonique

Lorsque la liaison du ligand BMP se fait selon un mécanisme BISC avec un assemblage séquentiel de récepteurs, alors la signalisation induite par ce complexe ne va pas recruter les SMAD mais d'autres protéines : on parle de voies de signalisation non canoniques des BMP. Dans ce contexte, une protéine adaptatrice, comme la protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X (XIAP) va permettre de faire le lien entre les récepteurs BMP et le complexe protéique TAK1 (kinase activée par le TGF $\beta$ ) et TAB1 (protéine de liaison à TAK1). TAK1 est un membre de la famille des protéines kinases MAPKKK, qui intervient dans les voies de signalisation p38-MAPK, ERK1/ 2-MAPK, JNK-MAPK et NF- $\kappa$ B (Shim et al., 2005). Les MAPK activées pourront ensuite transloquer dans le noyau pour phosphoryler un certain nombre de facteurs de transcription, régulant ainsi l'expression de gènes cibles (Bordukalo-Nikšić et al., 2022). Certains BMP, comme le BMP2, pourraient également activer la signalisation PI3K-AKT (Fong et al., 2008) (**Fig. 21**).



**Figure 21. Représentation des voies de signalisation induite par les BMP.**

En vert à gauche, la voie canonique des BMP est médiée via l'activation des SMAD qui vont pouvoir agir comme des facteurs de transcription dans le noyau. En rose à droite, la voie non canonique des BMP appelée aussi voie indépendante des SMAD, peut induire les signalisations NF- $\kappa$ B, MAPK et PI3K/AKT afin de réguler l'expression d'autres gènes cibles. Figure modifiée d'après (Chi et al., 2019a).

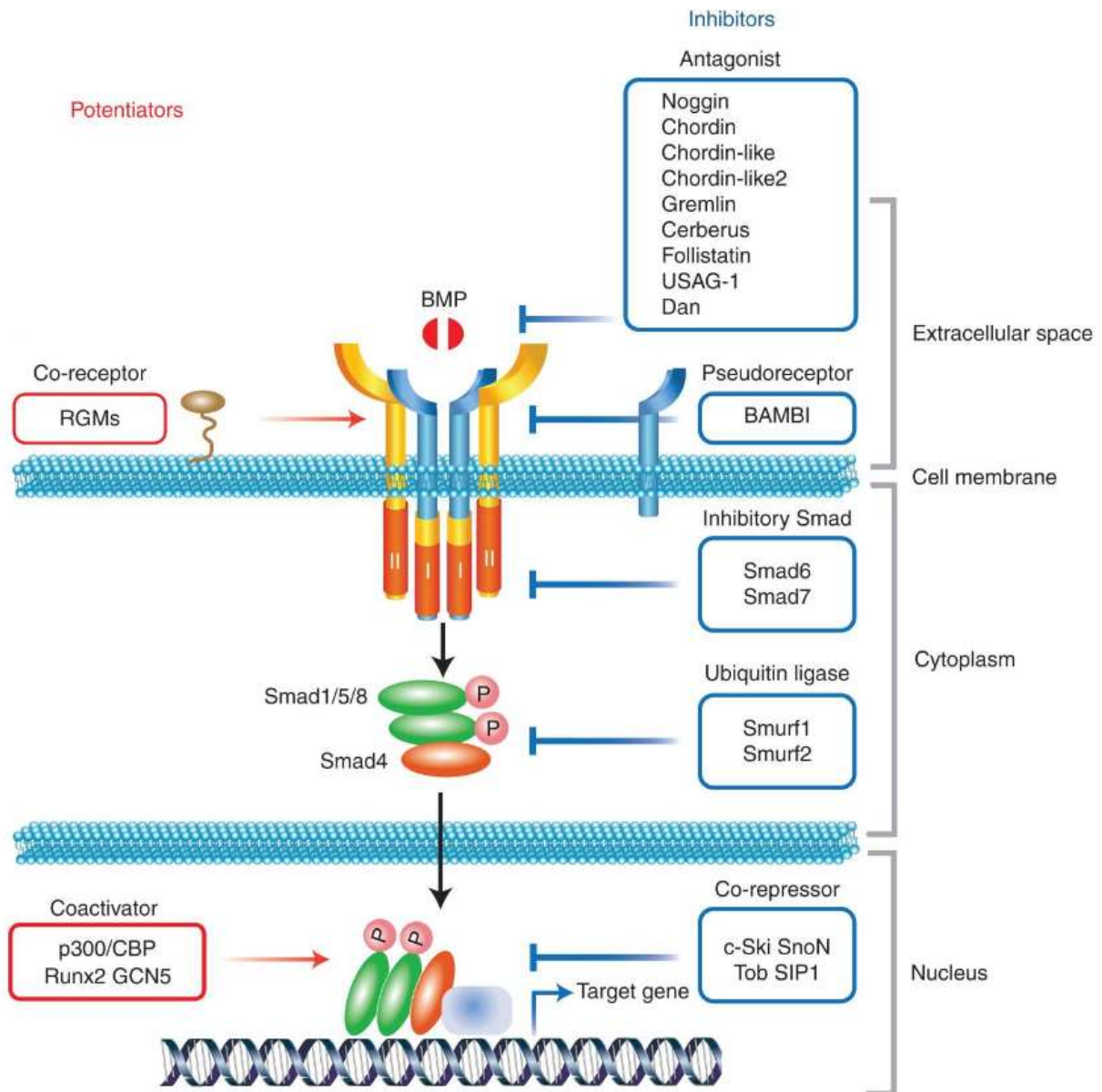
#### D. Les régulateurs des BMP

La signalisation des BMP étant très importante pour le maintien de l'homéostasie de nombreux tissus, il existe divers mécanismes de régulation à différents niveaux dans la cellule. Au niveau extracellulaire des antagonistes des BMP comme la protéine Gremlin 1 (Grem1) ou Noggin, peuvent être sécrétées par des cellules et se lier directement au dimère de ligand BMP pour empêcher leur interaction avec des récepteurs.

Au niveau membranaire, il existe des pseudorécepteurs comme BAMBI (inhibiteur lié à la membrane des BMP et l'activine) dont l'expression peut être induite par le BMP lui-même afin d'agir comme une boucle de rétroaction négative. Cette protéine transmembranaire ne possède pas de domaine kinase intracellulaire et va pouvoir se lier au récepteur BMP afin d'empêcher la formation du complexe tétramérique et donc bloquer la signalisation (Onichtchouk et al., 1999). A l'inverse, il existe des co-récepteurs appelés molécules de guidage répulsif (RGM), qui vont pouvoir réguler positivement la signalisation des BMP. En effet, ce sont des protéines membranaires ancrées au glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui vont pouvoir s'associer aux récepteurs des BMP de type I et vont améliorer l'induction de la signalisation. Par exemple, DRAGON (RGMb) est capable d'améliorer spécifiquement la signalisation du BMP2 et BMP4 afin d'augmenter l'expression du gène ID1 (Babitt et al., 2005).

Au niveau cytoplasmique, la signalisation des BMP est régulée grâce à une boucle de rétroaction médiée par les inhibiteurs de SMAD (SMAD 6 et SMAD 7), mais aussi grâce à des ubiquitine-ligases E3 (SMURF1-2) qui régulent spécifiquement le niveau des R-SMAD dans la signalisation canonique des BMP (Fu et al., 2020).

Au niveau nucléaire, le complexe de R-SMAD et CO-SMAD va s'associer à des coactivateurs transcriptionnels (p300, CBP, Runx2 et/ou GCN5) ou des co-répresseurs (c-Ski, SnoN, Tob ou SIP1) qui vont permettre de réguler positivement ou négativement l'expression des gènes cibles (**Fig. 22**).



**Figure 22. Les différents régulateurs de la voie des BMP.**

A droite il y a les potentiateurs en rouges et à gauche les inhibiteurs en bleus. Ces facteurs agissent à différents niveaux de la voie de signalisation : au niveau extracellulaire, membranaire, cytoplasmique et nucléaire. D'après (Katagiri & Watabe, 2016).

## II. Les BMP dans la glande mammaire

### A. Rôle physiologique

Comme évoqué plus haut, les BMP sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie de nombreux tissus. Pour la glande mammaire, ce sont deux BMP particuliers, le BMP2 et BMP4 qui participent à la régulation de cet organe.

Ces deux BMP sont impliqués dans la physiologie de la glande mammaire dès l'embryogenèse. Des études ont démontré que BMP2 et BMP4 jouent un rôle dans la formation des bourgeons, la communication mésenchymateuse épithéliale, la prolifération et la formation de la lumière (Forsman et al., 2013). Dans la glande mammaire fœtale, il a été décrit que BMP2 était plutôt exprimé dans l'épithélium fœtal, tandis que BMP4 était exprimé dans le mésenchyme. Ce qui suggère que ces deux ligands pourraient avoir des rôles différents mais essentiels au bon développement embryonnaire. BMP4 serait impliqué dans la mise en place des crêtes mammaires et la formation des bourgeons en stimulant la croissance canalaire via une signalisation induite par le récepteur BMPR1a (J. R. Hens et al., 2007). De plus, BMP2 et BMP4 régulent l'expression des gènes homéobox MSX1, MSX2 et de GATA-3, qui contrôlent la prolifération, l'apoptose et la différenciation (Phippard et al., 1996). Dans la glande post-natale BMP2 et BMP4 sont également retrouvés exprimés dans le coussinet adipeux stromal. Les BMP semblent donc réguler à la fois la glande mammaire mais aussi les cellules de son microenvironnement.

Les BMP ont également été décrit comme jouant un rôle essentiel dans la régulation des cellules souches. Ils promeuvent l'auto-renouvellement et/ou la différenciation des cellules souches en fonction du contexte. Par exemple, la signalisation des BMP permet l'expression des gènes cibles ID, favorisant le maintien des cellules souches embryonnaires et bloquant la différenciation (Ying et al., 2003). Cependant, le signal BMP contribue également à la différenciation des cellules du mésoderme dans les lignages hématopoïétiques, cardiaques ou encore hépatique. Pour cela, les BMP coopèrent avec d'autres signaux, comme les signalisations TGF- $\beta$  ou Wnt, pour diriger les programmes de différenciation des cellules souches. De plus, des liens ont été décrit entre la voie des BMP et des facteurs clés de la reprogrammation cellulaire impliqués dans le maintien de la pluripotence des cellules souches : OCT4, SOX2 et NANOG (OSN) (Z. Li & Chen, 2013). Par exemple, NANOG et SMAD1 sont capables d'interagir physiquement afin de bloquer la signalisation des BMP et maintenir l'auto-renouvellement (A. Suzuki et al., 2006). Un article récent a également mis en évidence des liens entre la régulation de SOX2 et celle des BMP dans la détermination du destin des cellules souches pluripotentes humaines (Teague et al., 2024). Dans le contexte des cellules souches adultes de la glande mammaire, il a été démontré que le BMP2 agirait plutôt en faveur



d'un engagement des progéniteurs luminaux via le récepteur BMPR1b alors que BMP4 favoriserait le maintien de cellules immatures et la différenciation myoépithéliale (Chapellier et al., 2015). De façon intéressante, ces fonctions distinctes de BMP2 et BMP4 ont déjà été rapportées dans le système hématopoïétique. Dans ce contexte, BMP4 favorise l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques (CSH), alors que BMP2 ou BMP7 ne le font pas (Bhatia et al., 1999). De plus, la différenciation des CSH dans la lignée érythroïde est favorisée par BMP2, tandis que l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire est favorisé par BMP4 (Maguer-Satta et al., 2003) (Jeanpierre et al., 2008).

## B. Implication dans les cancers du sein

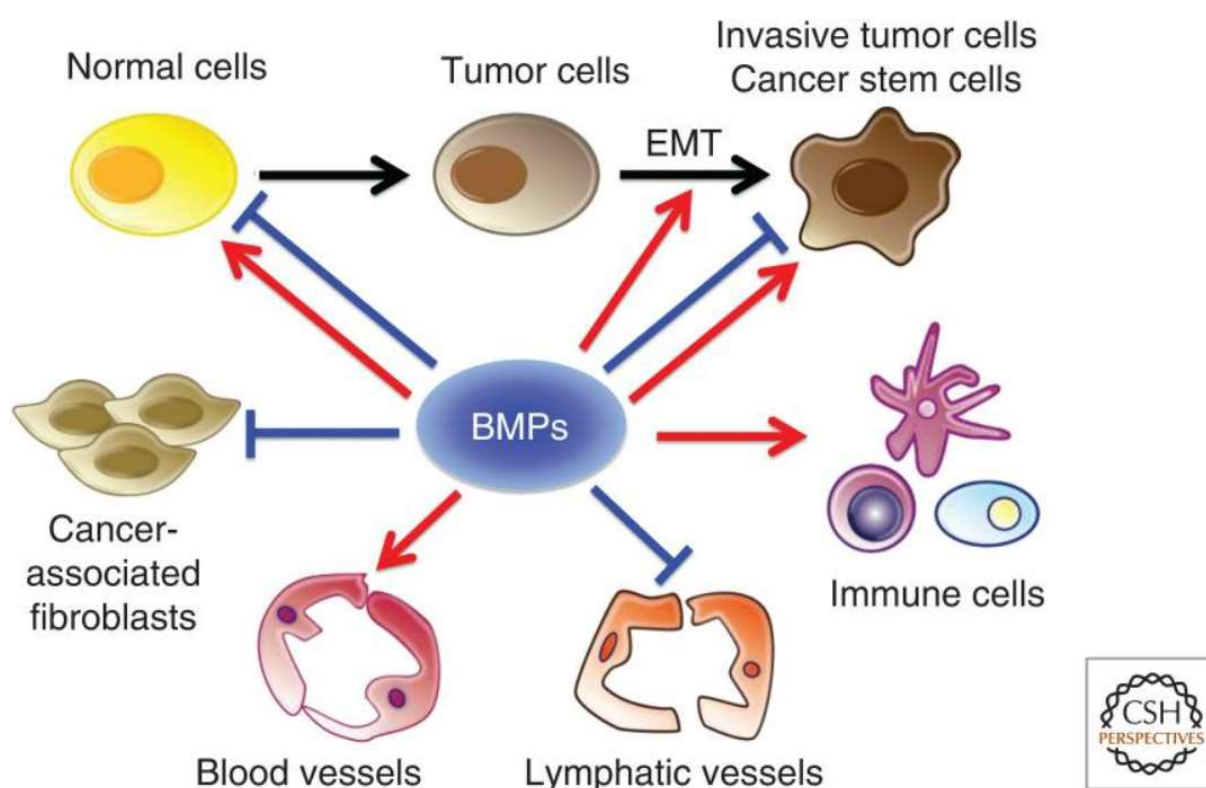
Un certain nombre de BMP sont surexprimés ou sous-exprimés dans les cancers du sein. En particulier BMP2, BMP4, BMP5 et BMP7 sont soit régulés à la hausse, soit régulés à la baisse dans les tumeurs du sein selon différentes cohortes de patients. Des preuves suggèrent que les BMP peuvent fonctionner à la fois comme des suppresseurs et des promoteurs de tumeurs selon le contexte. Leur rôle est complexe puisqu'ils agissent à la fois sur les cellules cancéreuses mais aussi sur leur microenvironnement (Chi et al., 2019).

Pour ce qui concerne le microenvironnement des cancers du sein, les BMP peuvent être impliqués dans divers processus pouvant favoriser ou inhiber la croissance tumorale comme la régulation de l'angiogenèse, de la communication avec les adipocytes ou encore le système immunitaire. Par exemple, le BMP2 et le BMP4 sont impliqués dans la promotion de l'angiogenèse qui peut être associé au développement tumoral. En effet, ils peuvent agir directement sur les cellules endothéliales pour favoriser leur prolifération ainsi que leur capacité migratoire (Ye & Jiang, 2016). Le BMP2 peut réguler à la hausse le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) via la voie p38 au sein des cellules stromales humaines (Yang et al., 2015). Le BMP4 quant à lui serait capable d'augmenter l'expression et la phosphorylation du récepteur du VEGF (VEGFR) dans les cellules endothéliales (Y. Suzuki et al., 2008). Ces exemples mettent en avant le rôle pro-tumoral des BMP sur le microenvironnement. Cependant, la glande mammaire est entourée d'un environnement riche en graisse et des données ont mis en évidence que les BMP peuvent aussi intervenir dans la régulation des adipocytes dans un contexte de cancer du sein. Par exemple, BMP9 diminue l'expression de la leptine, une cytokine sécrétée par les adipocytes. Cela entraîne la régulation

à la baisse des voies de signalisation ERK, STAT3 et PI3K/Akt, diminuant ainsi la prolifération et la migration des cellules cancéreuses de la lignée MDA-MB-231 (T. Wang et al., 2017). Enfin les BMP peuvent agir sur le système immunitaire impliqué dans le développement tumoral. BMP4 peut diminuer les capacités immunosuppressives des cellules myéloïdes. En effet, ces cellules peuvent être induites par la tumeur et suppriment l'activation et la prolifération des lymphocytes T, ce qui conduit à une augmentation de la progression métastatique (Cao et al., 2014). Cependant, une autre étude a montré que les macrophages associés aux cancers pouvaient sécréter du BMP2, favorisant l'apparition de microcalcifications du cancer du sein (S. Wang et al., 2022). Les microcalcifications sont connues comme un biomarqueur important et une caractéristique mammographique du cancer du sein, en particulier dans la détection précoce du cancer du sein non palpable. On peut donc conclure que les BMP ont un rôle ambivalent sur le microenvironnement associé aux cancers, et qu'il est difficile de les classer globalement comme pro- ou anti-tumoraux, leurs actions dépendant probablement en grande partie du ligand BMP et du type de cancer du sein considéré.

Les BMP peuvent également agir directement sur les cellules cancéreuses du sein mais là aussi leurs rôles au sein du développement tumoral restent controversés. Les BMP peuvent agir comme des suppresseurs de tumeurs notamment en induisant la différenciation des cellules souches cancéreuses. Les CSC ayant des propriétés similaires aux cellules souches normales, la signalisation des BMP est capables d'impacter leur régulation. Par exemple, il a été montré que l'hétérodimère BMP2/BMP7 réduisait la population de CSC et la formation de métastases osseuses après injection de cellules cancéreuses de sein humaines chez des souris (Buijs et al., 2012). Un autre article montre que le BMP2 pourrait inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du sein qui expriment à la fois SMAD1 et SMAD4. Cette signalisation induirait l'expression du gène CDKN1A codant l'inhibiteur de kinase dépendante des cyclines p21CIP1, conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire (Pouliot & Labrie, 2002). Cet activation de p21 semble également pouvoir être induite par BMP4 puisqu'il a été démontré que BMP4 améliorerait la sensibilité des patientes atteintes de cancers du sein ER positifs, aux traitements anti-oestrogéniques via cette activation de p21 médié par la voie canonique des BMP (Shee et al., 2019). De plus, BMP4 induit l'expression de p21 dans d'autres type de cellules cancéreuses telle que la lignée MDA-MB-231 mais en contrepartie de cet arrêt de la prolifération, le BMP4 induit un phénotype de cellules ayant des capacités migratoires ou invasives accrues (Ampuja et al., 2013). Cela souligne encore une fois l'ambivalence du rôle des BMP dans les cancers du sein.

En effet, un autre versant de la littérature a apporté de nombreuses preuves sur l'action pro-tumorale induite par ces mêmes ligands. Par exemple, des données ont démontré que l'expression de BMP2 et BMP4 étaient augmentée dans le cancer du sein invasif et induisaient une résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses via l'activation de la voie MAPK et l'expression d'ID1 (Raida et al., 2005). De plus, une autre étude a montré que le BMP2 sécrété par des cellules du microenvironnement comme les CAF induisait une EMT des cellules cancéreuses du sein via l'activation transcriptionnelle du gène RUNX2. Cela conduirait à la transformation des cellules épithéliales du cancer du sein en cellules ostéomimétiques favorisant le développement de métastases osseuses (Tan et al., 2016) (**Fig. 23**).

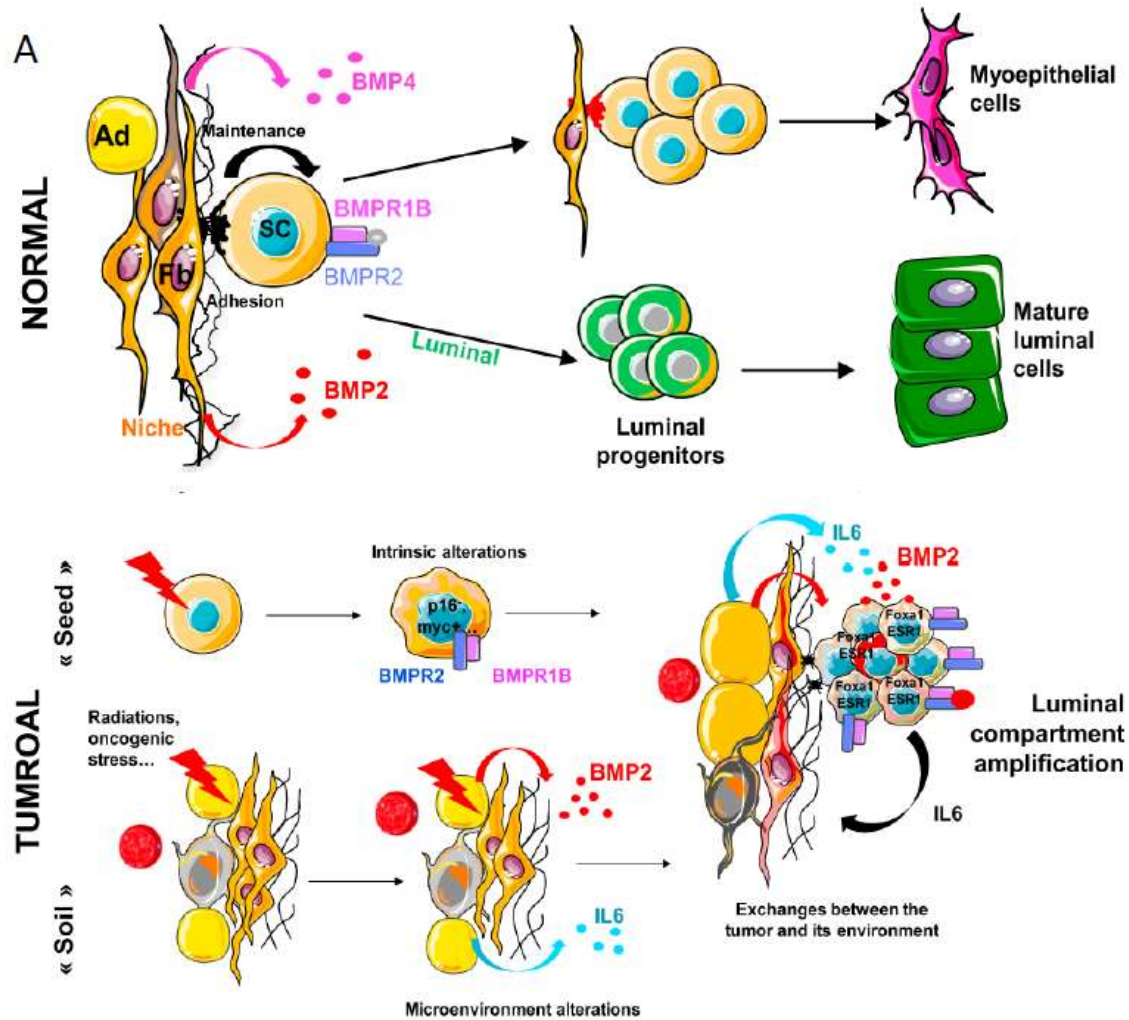


**Figure 23. Rôles des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) dans le cancer.**

Les effets pro- (rouge) et antitumorigènes (bleu) des BMP sur divers composants du microenvironnement tumoral sont présentés. Les BMP peuvent favoriser ou freiner la prolifération et la progression des cellules cancéreuses en fonction des contextes cellulaires. EMT, transition épithélio-mésenchymateuse. D'après (Katagiri & Watabe, 2016).

L'activation de la signalisation canonique des BMP a été observée non seulement dans les tissus des tumeurs mammaires primaires, mais aussi à des stades précoces de transformation

dans les lésions DCIS et dans les modèles de souris (Chapellier et al., 2015); (Balboni et al., 2013). Cela suggère que la signalisation BMP est probablement impliquée dans la tumorigenèse précoce du sein. Les BMP peuvent participer à l'initiation tumorale en perturbant la régulation des cellules souches mammaires normales et tumorales. Pour illustrer cela, une étude a montré que BMP4 favorise l'EMT à la fois dans une lignée de cellules souches mammaires normales MCF10A mais également dans la population de cellules souches cancéreuses de la lignée MDA-MB-231. Un autre article soutient que BMP2 favoriserait le maintien des capacités souches ainsi que l'EMT des bCSC via la régulation de l'expression du gène Rb et de la protéine transmembranaire CD44 (P. Huang et al., 2017). Au sein de l'équipe il a été montré qu'une exposition chronique de la lignée de cellules souches MCF10A au ligand BMP2 et à la cytokine pro-inflammatoire IL6, conduisait à la transformation des MaSC vers un phénotype tumoral de type luminal, de façon dépendante du récepteur BMPRIb. La transformation induite par BMP2/BMPRIb est médiée par une augmentation de l'expression de gènes cibles tels que les facteurs de transcription GATA-3 et FOXA1. De plus, il a été montré que BMP2 était spécifiquement augmenté dans les tumeurs du sein luminales via une sécrétion par les cellules du microenvironnement (**Fig. 24**). Une des causes qui pourraient entraîner cette sécrétion dérégulée de BMP2 par les cellules stromales est leur exposition à des polluants environnementaux comme les bisphénols. En effet, des résultats mettent en lumière que l'exposition des cellules stromales comme les fibroblastes, au BPA ou au BPS, entraînaient une sécrétion significativement accrue de BMP2 (Chapellier et al., 2015). Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, les bisphénols sont des oestrogéno-mimétiques, cela signifie qu'il existerait des liens entre la voie des BMP et celle des œstrogènes permettant aux cellules stromales de répondre aux signaux des bisphénols en sécrétant du BMP2.



**Figure 24. Implication de BMP2 et BMP4 dans la régulation des cellules souches mammaires dans un contexte normal et tumoral.**

Dans un contexte physiologique, le BMP4 tend à favoriser le maintien des cellules souches ainsi que la différenciation myoépithéliale. Tandis que le BMP2 semble engager la différenciation luminale. Dans un contexte tumoral, des stress extérieurs vont impacter à la fois les cellules souches et le microenvironnement entraînant une sécrétion de BMP2 et IL6 ainsi qu'une surexpression de BMPR1b conduisant une transformation luminale. D'après (Chapellier et al., 2015).

### C. Coopération entre les œstrogènes et les BMP

Comme nous l'avons vu tout au long de cette introduction, les BMP et les œstrogènes sont des facteurs très importants pour le maintien de la glande mammaire saine et la régulation des MaSC. Il existe également des preuves que ces deux facteurs peuvent être liés à la carcinogenèse mammaire. On peut donc supposer qu'il existerait des dialogues qui pourraient

participer à l'intégration des signaux médiés par ces deux voies de signalisation. Dans le contexte des cancers du sein, des données ont déjà mis en évidence des interactions possibles entre les œstrogènes et différents facteurs de la voie des BMP.

Au niveau des ligands BMP, les tumeurs mammaires ER-positives expriment des niveaux plus élevés de certains ligands comme BMP2, BMP6 et BMP7 par rapport aux tumeurs mammaires ER-négatives (Raida et al., 2005) (Lian et al., 2013) (Schwalbe et al., 2003). Cela peut s'expliquer par le fait que l'expression de BMP2 et BMP6 peuvent être induites par l'activité du récepteur ER $\alpha$  dans les cellules cancéreuses mammaires (Su et al., 2007) (Ong et al., 2004). Inversement, BMP2 peut induire l'expression de l'isoforme ER $\alpha$ 36 dans la lignée MDA-MB-231 qui n'exprime pas la forme classique ER $\alpha$ 66. Cette induction a pour conséquence de re-sensibiliser les cellules à l'E2 (D. Wang et al., 2012).

Au niveau des effecteurs de la voie des BMP, des interactions physiques seraient possibles entre les récepteurs aux œstrogènes et certaines protéines SMAD. Par exemple, un article a démontré que l'ajout d'E2 entraînait la formation d'un complexe ER $\alpha$ 66-SMAD1 dans des lignées de cancers du sein et conduisait à l'inhibition de la voie canonique des BMP (Yamamoto et al., 2002). De plus, la CO-SMAD appelée SMAD4 peut aussi se lier avec ER $\alpha$ 66 et agir comme un corépresseur de transcription. En effet, la formation d'un complexe avec SMAD4 lorsque ER $\alpha$ 66 se fixe à un élément sensible à l'œstrogène dans le promoteur d'un gène cible, conduirait à l'inhibition de la transcription (Wu et al., 2003). Il a été démontré que cette interaction inhiberait la croissance tumorale induite par l'E2 et induirait l'apoptose des cellules cancéreuses du sein ER $\alpha$  positives comme la lignée MCF7 (Q. Li et al., 2005).

Enfin, comme nous l'avons vu au cours de cette introduction les cellules souches mammaires semblent être des cibles intéressantes pour comprendre l'origine des cancers du sein. Cependant, ces cellules n'expriment pas les récepteurs classiques des œstrogènes comme ER $\alpha$ 66 mais elles expriment des récepteurs non canoniques comme GPER. GPER a été découvert plus tardivement et ils existent moins de données dans la littérature concernant ce récepteur et ses potentielles interactions avec la voie des BMP. Cependant, d'après les résultats de Chapelier & al. (2015), il semblerait que les cellules souches mammaires soient capables de répondre aux signaux œstrogéno-mimétiques et cela conduit à une sensibilisation accrue de ces cellules aux ligands BMP, avec une augmentation de l'expression du récepteur BMPRIb. Cela suppose qu'il existerait des liens entre la voie du GPER et la voie des BMP.

Certains articles font références à ces liens mais dans d'autres types cellulaires que les cellules mammaires. Par exemple, le gène cible de la voie des BMP, Runx2 serait capable de réguler positivement l'expression de GPER afin de contrôler la croissance des progéniteurs ostéoblastiques (Teplyuk et al., 2008). Un autre exemple montre que GPER, via la fixation de l'E2, est capable de réguler la signalisation TGFBR3/Smad2/3 dans l'endomètre (Fang et al., 2024). Enfin, il a été montré que l'activation de GPER était nécessaire pour réguler la migration des cellules mésangiales en réponse au TGF- $\beta$ 1 (Y.-C. Li et al., 2014).

## Contexte scientifique – Objectifs de la thèse

L'incidence des cancers est en perpétuelle augmentation et on estime que près de la moitié des cancers détectés chaque année pourrait être évités. Les cancers du sein sont une importante préoccupation de santé publique puisqu'ils sont le type de cancer le plus fréquent chez la femme dans le monde (Bray et al., 2024). Ils se caractérisent par une diversité phénotypique et génétique importante, due à des origines multiples encore mal comprises. Il est donc nécessaire de mieux identifier les facteurs de risques afin d'informer les instances de santé et de mettre en place des politiques de santé efficaces pour protéger la population. Parmi ces facteurs, les risques liés aux expositions environnementales sont particulièrement préoccupants. En effet, nous savons que les causes d'initiation des cancers du sein sont souvent multiples et que l'exposition prolongée à de nombreux polluants environnementaux peut favoriser ces mécanismes d'initiation. Parmi les polluants identifiés comme problématiques, les bisphénols, composés largement utilisés pour la fabrication de nombreux objets plastiques de notre quotidien, ont été l'objet d'études de leur impact sur la santé humaine. Le bisphénol A (BPA) majoritairement utilisé par l'industrie du plastique, a été identifié comme perturbateur endocrinien par l'Anses en 2017 à cause de ces effets œstrogéno-mimétiques. Des études ont démontré le lien entre l'exposition au BPA et le développement de cancers et notamment de cancers du sein (D. Wang et al., 2014). Par prévention au regard de ses effets multiples en tant que perturbateur endocrinien, son utilisation est limitée notamment dans la fabrication de contenants alimentaires en France. Cependant, ces réglementations ont contribué à l'arrivée de nouveaux bisphénols comme le BPS, choix basé sur le fait que ce dernier possède une affinité plus faible pour le récepteur aux œstrogènes canonique ER $\alpha$ 66 (Rouhimoghadam et al., 2020).

Toutefois, des études récentes suggèrent que le BPS pourrait également avoir des effets favorisant la carcinogenèse mammaire malgré son affinité plus faible à ER $\alpha$ 66 (Zhao et al., 2021). Cependant, ces études s'intéressent principalement aux effets du BPS sur des lignées de cellules mammaires déjà transformées. Nous manquons encore cruellement d'informations sur les mécanismes d'initiation précoces des cancers du sein et sur l'identification d'un potentiel effet favorisant des bisphénols sur la mise en place de ces mécanismes. De nombreuses études ont démontré que les cellules souches pourraient être à l'origine des cancers du sein via leurs nombreuses similarités avec les cellules souches



mammaires cancéreuses (Tomasetti & Vogelstein, 2015). Un aspect intéressant des cellules souches mammaires est qu'elles n'expriment pas ER $\alpha$ 66 mais un autre type de récepteur aux œstrogènes moins étudié appelé GPER. Cela remet donc en question la pertinence d'une évaluation des bisphénols basée sur l'affinité pour ER $\alpha$ 66, qui ne peut pas prendre en compte l'impact sur les cellules souches. De plus, nous avons également démontré au laboratoire dans des données déjà publiées, que l'exposition au BPA ou au BPS entraîne une augmentation de la sécrétion de BMP2 par les cellules de la niche mammaire. Cette dérégulation induit des perturbations au sein des cellules souches mammaires qui expriment un type de récepteur particulier des BMP (BMPR1b) et qui peut conduire à une transformation luminale en présence de facteurs de l'inflammation comme l'IL6 (Chapelier et al., 2015).

Mon projet possède donc deux grands axes, le premier consiste à mieux comprendre le fonctionnement des cellules souches mammaires normales, notamment comprendre **les liens entre la signalisation des œstrogènes et des BMP**, qui ne sont pas encore bien décrits aujourd'hui. Le deuxième axe, quant à lui, vise à **évaluer l'impact d'une exposition au BPS par rapport au BPA sur l'induction d'une transformation des cellules souches mammaires** induite par la perturbation de la voie des BMP. L'intérêt global de mon projet est donc d'apporter des données supplémentaires sur les risques liés à l'utilisation des bisphénols en utilisant un modèle plus complexe que de simples tests d'affinité pour les récepteurs aux œstrogènes, en prenant en compte d'autres voies de signalisation clés pour la glande mammaire. De plus, j'étudie ces effets sur un modèle de cellules souches normales afin d'apporter plus de lumière sur les premières étapes de tumorigenèse mammaires qui sont encore mal comprises, contrairement aux nombreux papiers étudiant les effets des bisphénols sur des cellules déjà transformées. Les principaux résultats de mon projet sont présentés dans la partie suivante sous forme de manuscrit que je prévois de soumettre pour publication d'ici la fin de l'année.

# Scientific paper

# Impact of BPS and BPA on the interplay between BMP and GPER pathways in mammary stem cells.

Laura BILLON<sup>1,2,3,4</sup>, Irene BARGUILLA<sup>1,2,3,4</sup>, Véronique MAGUER-SATTA<sup>1,2,3,4</sup> and Boris GUYOT<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France. <sup>2</sup>Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France. <sup>3</sup>Department of Cancer Initiation and Tumor cell Identity, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France. <sup>4</sup>Université Claude Bernard Lyon 1, CRCL, Lyon, France.

**Corresponding Authors:** Véronique Maguer-Satta, CRCL, CNRS UMR5286-INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 28 rue Laennec, Lyon 69008, France. E-mail: [veronique.maguer-satta@lyon.unicancer.fr](mailto:veronique.maguer-satta@lyon.unicancer.fr); and Boris Guyot, [boris.guyot@lyon.unicancer.fr](mailto:boris.guyot@lyon.unicancer.fr)

## Summary

Cancer stem cells have been identified in several types of cancer and their similarity with normal stem cells unveils the importance of their study regarding tumor initiation, particularly in the context of breast cancer which initial stages of transformation remain poorly understood. The increasing presence in the environment of man-made pollutants like bisphenols is an increasing concern in public health. We previously showed that exposure to bisphenols, including BPA but also BPS that is considered a safer alternative, induces similar alterations of the BMP pathway in the mammary microenvironment. This work aimed to compare the impacts of BPA and BPS with those of estradiol on the BMP pathway in mammary stem cells. We used a non-transformed mammary stem cell line model where we identified a physical and functional interaction between BMPRIb and the GPER estrogens receptor. By combining functional tests and large-scale analysis of the transcriptome and kinome, we show that BPA and BPS induce different and specific alterations that could provide a favourable context for mammary cells transformation. In addition to providing new fundamental knowledge concerning the integration of the BMP and estrogens signaling, this work could provide new scientific basis for future regulatory and preventive actions related to bisphenols, with the goal of reducing breast cancer incidence.

## Introduction

Breast cancers have the highest incidence and is the main cause of cancer mortality in women. In 2022, breast cancer was the second most frequently diagnosed type of cancer worldwide and its incidence continues to rise, making it a major public health issue (Bray et al., 2024).

However, the mechanisms of transformation are not always fully understood albeit this is essential for a better prevention and more effective treatments of the disease.

Evidences suggests that mammary stem cells (MaSCs) are likely targets of transformation. Their long lifespan makes them more likely to accumulate mutations than short-lived differentiated cells. In addition, the discovery of cancer cells with characteristics very similar to stem cells suggests that they could be at the origin of tumours (Tomasetti & Vogelstein, 2015).

Multiple risk factors have been identified in breast cancer. However, the role of environmental factors is rapidly emerging, and there is increasing evidences of the impact of our daily exposure to environmental pollutants. Among these pollutants, bisphenol A (BPA), which has been widely used by the chemical industry since the 1930s, was banned from many commonly used plastic objects following evidence of health risks due to its estrogen-mimetic properties (Abraham & Chakraborty, 2020). As a result, BPA has been replaced by other bisphenols such as BPS. However, the safety of these new compounds is mostly determined by biochemical affinity tests for the classical estrogen receptor ER $\alpha$ 66, by relatively simple assays on cell lines expressing ER $\alpha$ 66 or by animal studies where subtle and long-term effects may be difficult to detect. Furthermore, focusing on ER $\alpha$ 66, these studies neglect other cell types, like mammary stem cells, that do not express ER $\alpha$ 66 (Taurin & Alkhalifa, 2020). However, mammary stem cells are sensitive to estrogens (Asselin-Labat et al., 2010). Interestingly, other receptor such as the G protein-coupled estrogen receptor (GPER) could also be involved in the sensitivity of MaSCs to estrogens (Chan et al., 2020). GPER is a membrane receptor belonging to the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily. Initially named GPR30 for G protein-coupled orphan receptor 30 (GPR30), it was first identified in 1997 as a gene sharing strong homology with those of the GPCR family and being associated with estrogen receptor expression in breast cancers (Carmeci et al., 1997). Interestingly, GPER-induced signalling has been shown to be essential for the survival and maintenance of breast cancer stem cell characteristics (Chan et al., 2020).

It has been shown that both BPA and BPS can bind to GPER receptors and induce tumorigenesis promoting effects in TNBC cells that do not express the ER $\alpha$  receptor (Dong et al., 2011) (Deng et al., 2018). In addition, the difference in affinity between BPA and BPS for GPER is much smaller than for ER $\alpha$ 66, calling into question the safety of using BPS as an alternative to BPA on this particular cell type (Rouhimoghadam et al., 2020). Previous results published by our

team showed that BPA and BPS could affect cells of the mammary microenvironment. Exposure to bisphenols caused deregulated secretion of BMP2 by stromal cells, which in cooperation with IL6 lead to transformation of a model of untransformed human mammary stem cells (Chapellier et al., 2015). BMP proteins are soluble members of the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily that regulate stem cells in embryonic development, haematopoietic, neural and epithelial systems, including the mammary gland (Alarmo et al., 2013; Forsman et al., 2013; Jeanpierre et al., 2008; Rendl et al., 2008). Deregulation of BMP signalling has been reported during transformation (Katagiri & Watabe, 2016). These results have therefore highlighted a link between BMPs and the estrogenic signaling that can be activated by bisphenols. We therefore seek to assess the impact of BPA and BPS exposure compared to estradiol (E2) in the MCF10A mammary stem cell model in cooperation with the BMP signalling.

We first showed that short-term treatments with BPS could induce specific functional effects compared with BPA or E2, in cooperation with BMP2. We then demonstrated that these effects were dependent on GPER activation and that MCF10A cells did not express ER $\alpha$  receptors. Proximity ligation assay and co-immunoprecipitation experiments revealed that BMPR1b and GPER receptors could physically interact within cells. In order to be more relevant to the chronic exposure to bisphenols encountered in real-life, we then carried out continual exposures for 20 weeks. We confirm that BPA and BPS induce different perturbations in transcriptomic expression profiles or in the activation of signalling pathways using omics approaches. However, these specific effects were only observed in combination with BMP2 or BMP2/IL6, which reinforces the idea of a dialogue between the estrogen and BMP pathways. This project calls into question the widespread use of bisphenol S as a replacement for bisphenol A. It proposes a more complex model for assessing bisphenols, considering alternative estrogens receptors and taking into account the impact of interactions with other key signalling pathways such as the BMP pathway. Over and above this fundamental knowledge, our results could contribute to a better assessment of the dangers associated with bisphenols and to guide preventive action to reduce the incidence of breast cancer.

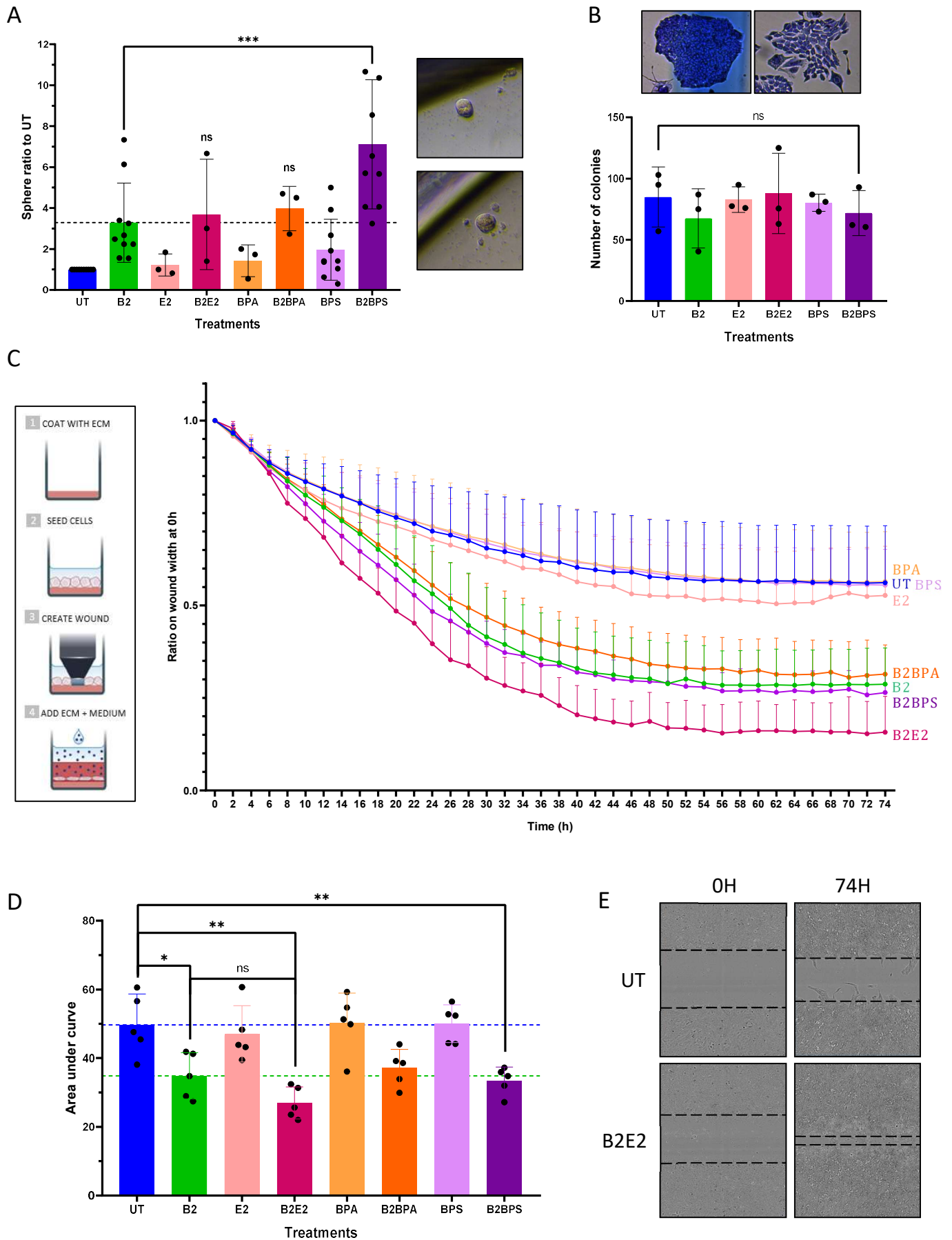
## Results

**BPS specifically synergizes with BMP2 to increase the frequency of sphere-forming cells in the MCF10A model.**

MCF10A is a heterogeneous cell line containing both stem-cell like and progenitor cells that can be assessed by mammosphere or Epithelial-Colony Forming Cell (E-CFC) assays, respectively. As mentioned in the introduction, we have shown in previous data from the lab that exposure of stromal cells to BPA or BPS leads to significantly increased secretion of BMP2. We thus questioned if endogenous estrogens or bisphenols, alone or in combination with BMP2, could impact mammary stem cells homeostasis. To answer this question, MCF10A cells were treated with either BMP2, estradiol, bisphenols, alone or in combination for three days and different functional assays were performed.

First, treatments induce no significant differences on cell viability and proliferation rate (**Supplementary Figures 1A and 1B**). Regarding the mammosphere assay, as shown in **Figure 1A**, treatments by BPA, BPS, or E2 alone didn't induce significant changes in the frequency of mammosphere forming cells compared to untreated cells. However, BMP2 treatment induced a close to three-fold increase in the frequency of mammosphere-forming cells. In addition, BPS shows a synergistic effect with BMP2, inducing a two-fold increase in mammosphere-forming cells compared to BMP2 alone. This effect is specific of BPS since neither BPA or E2 in combination with BMP2 induced an increase in sphere-forming cells compared with BMP2 alone. Results of E-CFC assays in **Figure 1B**, showed that none of the tested treatments induced significant changes in the frequency of colony-forming cells. Taken together, these results show that BPS, but not BPA, potentializes an increase in stem-cells induced by BMP2 while having no effect on its own. We also explored if these short-term treatments can have an impact on migration and invasion capacity. No impact was observed in migration capacity (**Supplementary Figure 1C**). However, concerning the ability to invade an extracellular matrix, if BPA, BPS, or E2 alone had no effect, BMP2 significantly increases it compared to the untreated condition. A non-significant trend to increased invasion by E2 in presence of BMP2 is not seen for BPA or BPS (**Figure 1C-E**). Collectively, these results suggest that crosstalk between the BMP and estrogens pathways could have functional effects not observable when the pathways are stimulated separately. In addition, these results show that different endogenous estrogens or estrogeno-mimetic chemicals can have specific effects since only BPS, but not BPA or E2, synergize with BMP2 to increase stem-cell frequency in MCF10A cells.

**Figure 1**



**Figure 1. BPS specifically synergizes with BMP2 to increase the frequency of spheres-forming cells in the MCF10A model.**

Cells were seeded in 6-well plates and treated for 3 days with 10 ng/mL BMP2 (B2) and/or 50 nM bisphenol A (BPA), bisphenol S (BPS), or estradiol (E2). The cells were then harvested and used for mammosphere, E-CFC tests or invasion assay, in which the treatments are preserved. (A) Ratio of the number of spheres obtained after 5 days in the treated condition compared to the untreated condition (UT). Each point represents the average of the 12 technical replicates with 100 cells per well in each experiment, n=3 to 9. Next to the graph there are microscopic images of mammospheres. (B) Total number of colonies obtained after 5 days, per 250 seeded cells. n=3 (there are 2 technical replicates per point that are averaged to give each single value). Next to the graph there are microscopic images of different colonies. (C) Curve obtained after invasion tests, representing ratio on wound width at 0h versus time. (D) Quantification of area under curve of invasion assay. The blue dotted line represents the average of the area under the curve of the UT condition. The green dotted line represents the average of the area under the curve of the B2 condition. (n=5) (E) Images of cells and the wound width taken by the Incucyte device at 0h and 74h. Data are represented as mean +/- S.D. Statistic using Mann-Whitney tests: ns = non-significant, \* significant ( $p \leq 0.05$ ), \*\* significant ( $p \leq 0.01$ ), \*\*\* significant ( $p \leq 0.001$ ).

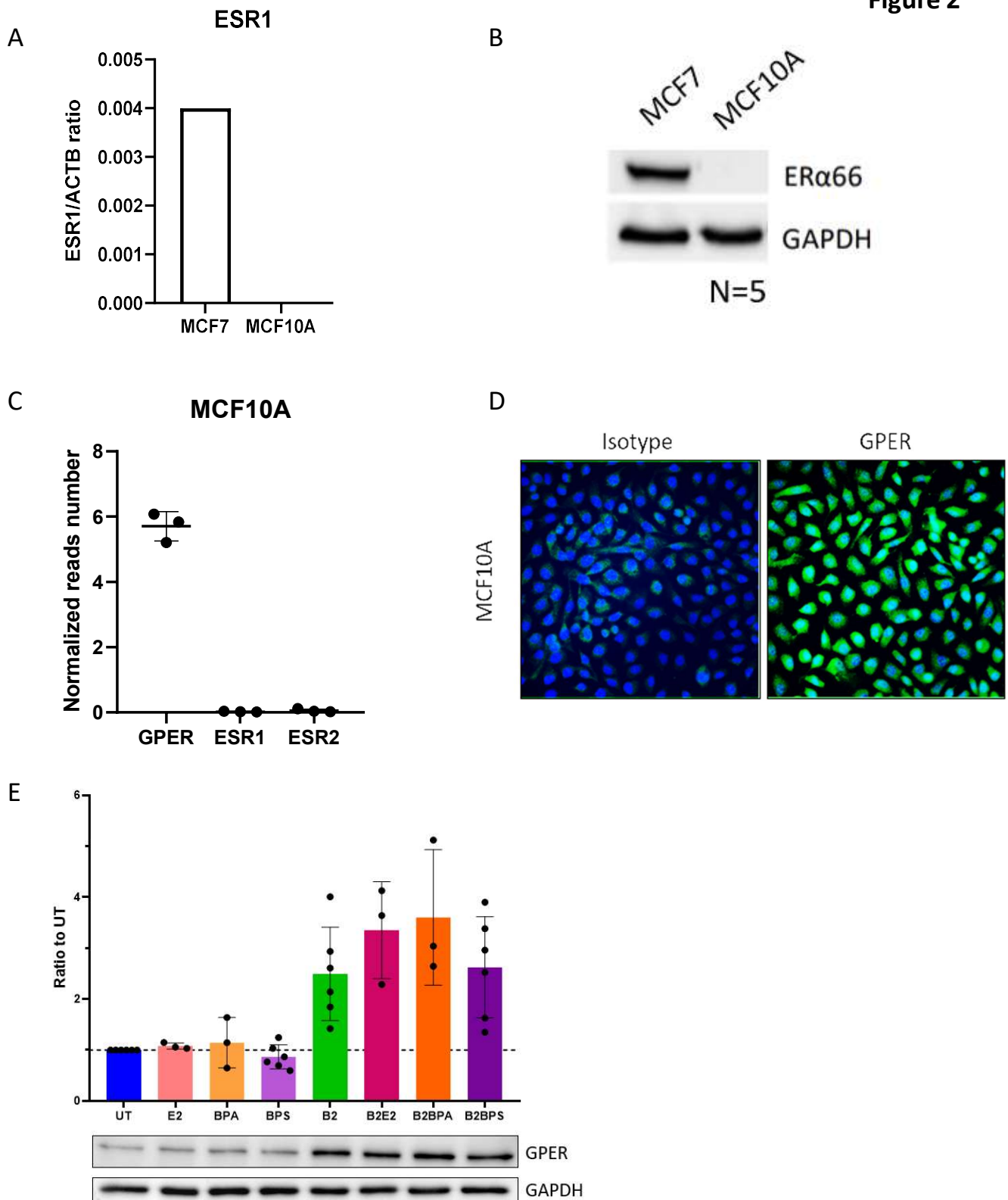
**MCF10A cells express GPER but not ER $\alpha$  and ER $\beta$**

We know that bisphenols are estrogeno-mimetics and that they can compete with endogenous estrogens for estrogen binding. Thus, we wanted to investigate which estrogen receptor(s) could be involved in the previously observed functional effects. According to the literature, normal mammary stem cells don't express the classical estrogen receptor ER $\alpha$ 66, one of the isoforms coded by the ESR1 gene. To evaluate whether the MCF10A cell line mimics the normal mammary stem cell in this regard, we performed a RT-qPCR assay with primers detecting the common part to all ESR1-encoded isoforms. Although ESR1 transcripts are easily detected in the MCF7 cell line, known for ER $\alpha$  expression, these mRNA are undetectable in MCF10A cells (**Figure 2A**). Furthermore, at the protein level, ER $\alpha$ 66 is also undetectable in MCF10A by western-blot analysis (**Figure 2B**). In addition to ER $\alpha$ , we analysed the expression of other estrogens receptors by RNA-seq. As shown in **Figure 2C**, this analysis confirms that ESR1 mRNA is not detectable in MCF10A and that the ESR2 gene coding for ER $\beta$  is not expressed as well. However, the GPER gene, coding a non-canonical estrogens receptor, is expressed at the transcript level in these MCF10A cells. Immunofluorescence and western blot results confirmed GPER expression at the protein level (**Figure 2D and E**). Taken together, these results suggest that MCF10A cell line is a good model for mammary stem cells in term of estrogen receptor expression pattern since mammary stem cells have been described as ER $\alpha$  negative and GPER positive cells (Taurin & Alkhalifa, 2020). was found to be expressed in breast stem cells. To evaluate whether BMP2 and/or estrogen or bisphenol treatments have an



impact on GPER expression, we performed western blot experiments on MCF10A cells treated for 3 days (**Figure 2E**). The results show that BMP2, in combination or not with E2 or bisphenols, can increase GPER protein expression. These data suggests that even if MCF10A cells do not express the classical estrogens receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ , bisphenols actions could be mediated by binding GPER whose expression can be regulated by BMP2.

Figure 2



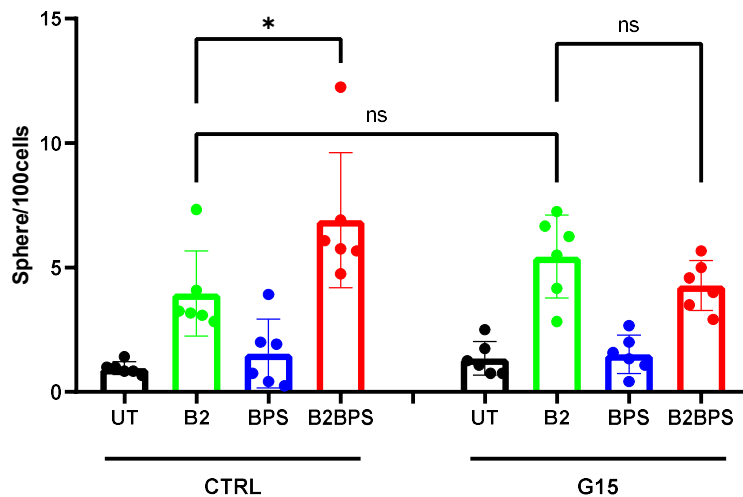
**Figure 2. MCF10A cells express GPER but not ER $\alpha$  and ER $\beta$**

(A) Analyse of ER $\alpha$  transcript expression by RT-qPCR in MCF10A and MCF7 cell lines. MCF7 is used as a positive control. (n=1) (B) Western blot previously obtained in the team, showing the expression of estrogen receptor ER $\alpha$ 66 in MCF10A and MCF7 cell lines (positive control) (n=5). (C) RNA-seq analysis of transcription level of GPER, ESR1, and ESR2 genes. (n=3) (D) Immunofluorescence detection of the GPER protein in MCF10A cell line (n=1). (E) Quantification of GPER protein level in MCF10A cells after 3 days of treatments by Western Blot (n=3 to 6). Data are represented as mean  $\pm$  S.D. Statistic using Mann-Whitney tests: ns = non-significant, \* significant ( $p \leq 0.05$ ), \*\* significant ( $p \leq 0.01$ ), \*\*\* significant ( $p \leq 0.001$ ).

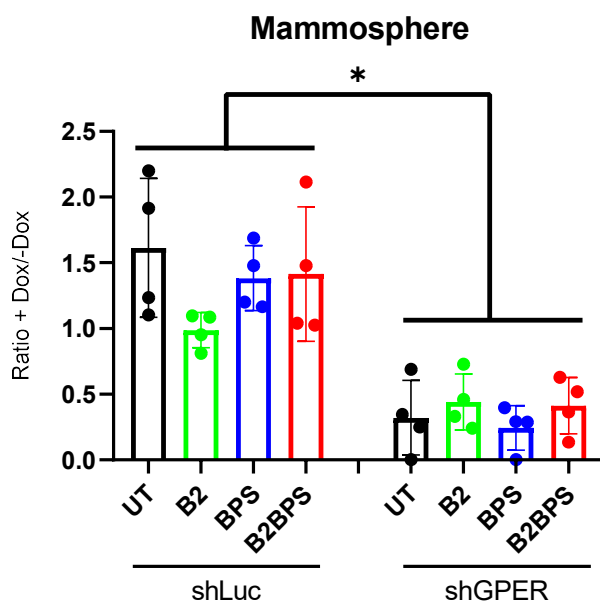
### **Functional effects induced by BMP2 and BPS in MCF10A cells are GPER - dependent**

Knowing that MCF10A cells only express the GPER estrogens receptor, we tested if the activity of this receptor was required for the synergistic effect of BPS with BMP2 on mammosphere-forming cells frequency. For that, we used the G-15 specific antagonist of GPER. We performed mammosphere experiments as before, with or without G-15 during the 3 days pre-treatment and during the mammosphere assay. G-15 induced the loss of the synergistic effect of BMP2 and BPS on the number of spheres compared to BMP2 alone (**Figure 3A**). To further confirm GPER involvement, we used a doxycycline-inducible shRNA against GPER. The efficiency of the GPER knock-down was validated at the level of transcripts and proteins (**Supplementary Figure 1D**). Despite a 40% reduction in GPER protein, the induction of the shRNA against GPER induced a significant decrease in the frequency of mammosphere-forming cells under all treatment conditions compare to the shLuc control targeting the luciferase mRNA (**Figure 3B**) but with no specific effect on the BMP2+BPS condition. This result differs from those obtained with the G-15 GPER antagonist. This could suggest that the ability of MCF10A cells to form mammosphere is very sensitive to the level of the GPER protein expression but that the level achieved in these knock-down experiments was sufficient to mediate a BPS response. Taken together, these results suggest that GPER is important for stem cell activity in MCF10A cells and that its activation is required for the synergistic effect of BPS in combination with BMP2.

A



B



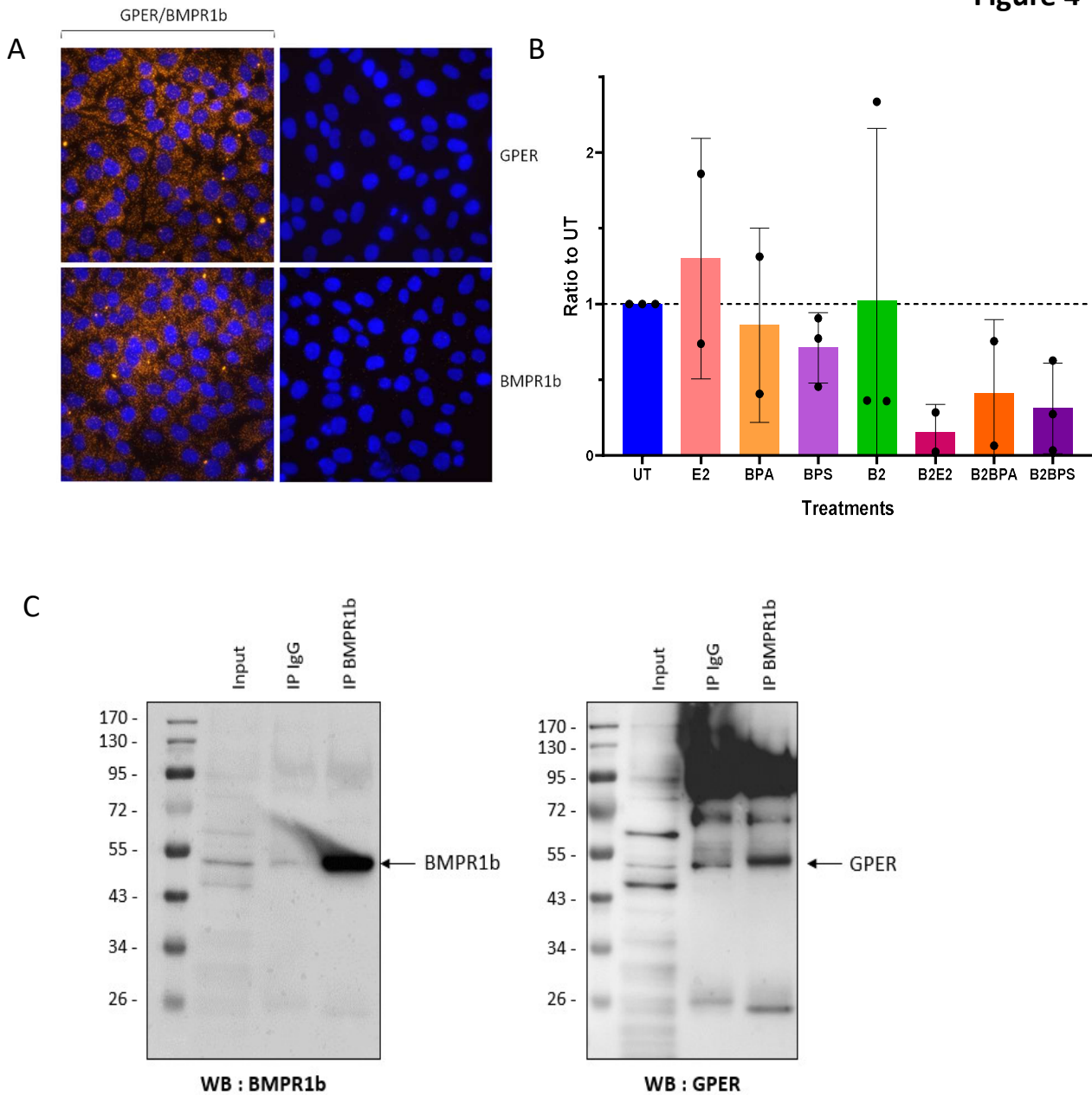
**Figure 3. Functional effects induced by B2BPS are GPER - dependent**

Two sets of cells were seeded in 6-well plates and treated for 3 days with 10 ng/mL BMP2 (B2) and/or 50 nM bisphenol S (BPS). The first set served as a control treated with G-15 solvent alone and the second was treated with 1 $\mu$ M G-15. Cells were then harvested and used mammosphere assays with the same treatments, including G-15 or its control, for 5 days. (A) Number of spheres obtained after 5 days per 100 cells seeded per well in each condition. Each point represents the average of the 12 technical replicates in each experiment (n=6). (B) Mammospheres assay on MCF10A lines transfected with a control shRNA (shLuc) or with a GPER-specific shRNA (shGPER) inducible with doxycycline. This graph represents the ratio of the number of spheres obtained with 100 cells per well to which doxycycline has been added to those without the addition of doxycycline. Each point represents the average of the 12 technical replicates in each experiment (n=4). Data are represented as mean  $\pm$  S.D. Statistic using Mann-Whitney tests: ns = non-significant, \* significant ( $p \leq 0.05$ ).

## **GPER and BMPR1b physically interact in MCF10A cells**

Given that BPS and BMP2 functionally interact in a GPER-dependent manner to increase the frequency of mammosphere-forming cells and given the implication of the BMPR1b receptor in mediating BMP2 signaling in MCF10A cells, we wanted to test a possible physical interaction between GPER and BMPR1b in MCF10A cells. For that, we performed a proximity ligation assay that detects the interaction between two close proteins (under 40 nm apart). As shown in **Figure 4A**, we detect a specific PLA signal not seen by omitting one of the primary PLA antibodies in MCF10A cells, suggesting a close proximity between GPER and BMPR1b. To evaluate whether the ligands have an impact on this interaction, MCF10A cells were treated during 3 days with E2, BPA or BPS in combination or not with BMP2. All the combinations showed a trend towards a decrease in the number of PLA signals per cells compared to other conditions (**Figure 4B**). The binding of the two ligands could therefore lead to the dissociation of the complex. However, further investigations are needed to strengthen the significance of these results. To test the existence of a physical interaction between GPER and BMPR1b receptors we also performed a co-immunoprecipitation assay on endogenous proteins in MCF10A cells. A strong immunoprecipitation of BMPR1b was achieved (**Fig 4C, left panel**). Subsequent immuno-blotting using a GPER antibody detection shows a specific band in the BMPR1b immunoprecipitation but not in the IgG control immunoprecipitation, showing that endogenous GPER and BMPR1b physically interact in MCF10A cells (**Figure 4.C, right panel**). Taken together, these results suggest that BMPR1b and GPER can interact together to form a complex in MCF10A cells and that binding of the two ligands appears to lead to dissociation of this complex.

**Figure 4**



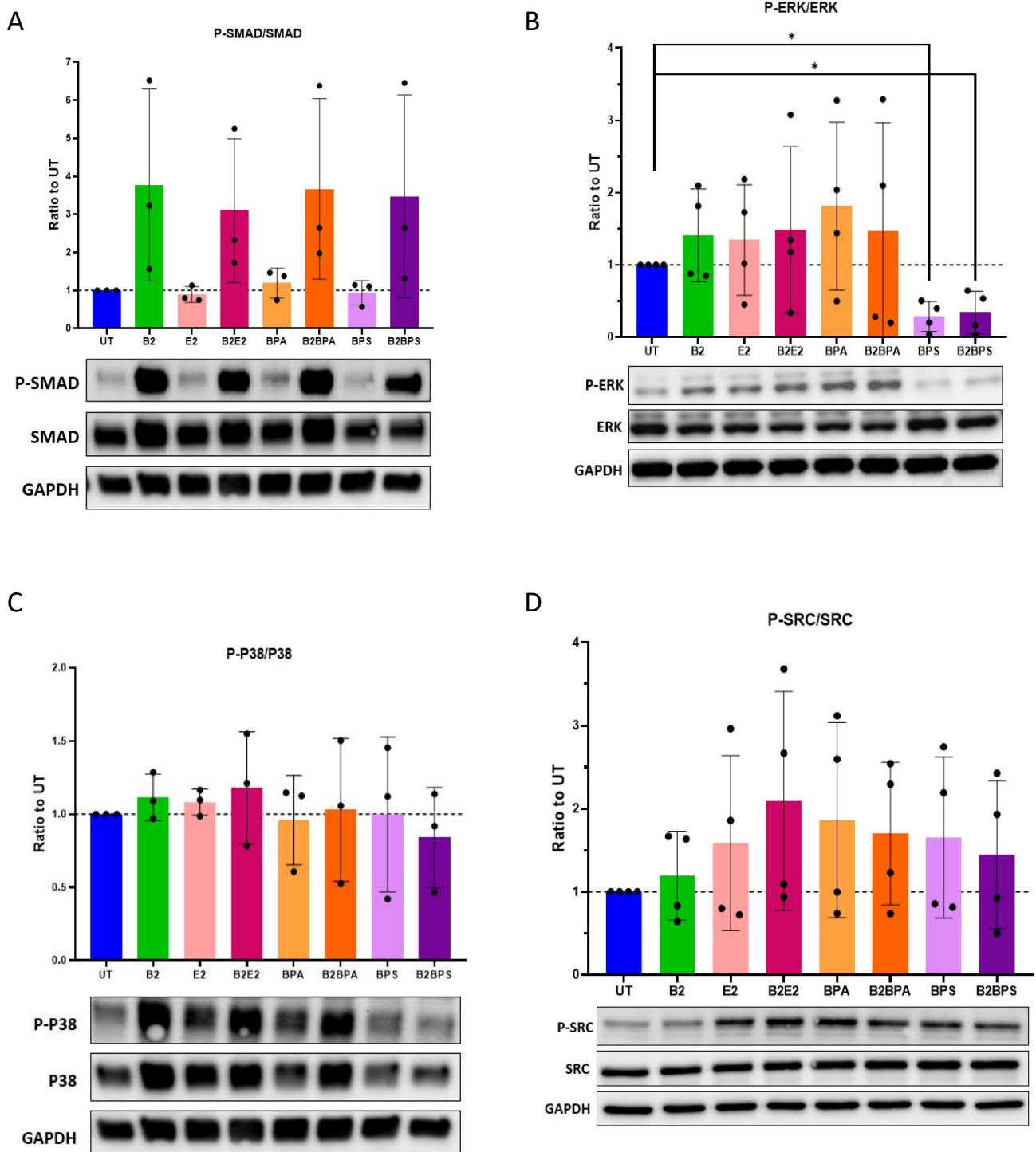
**Figure 4. GPER and BMPR1b can interact in MCF10A cell line**

Cells were seeded on glass coverslips in 12-well plates and treated for 3 days with 10 ng/mL BMP2 (B2) and/or 50 nM bisphenol A (BPA), bisphenol S (BPS), or estradiol (E2). (A) Representative images of BMPR1b/GPER interaction. Orange dots correspond to dimers detection and nuclei were counterstained with DAPI (blue). Objective x60. (B) Quantification of number of Dots per cells using a macro in ImageJ software (n=2 to 3). Data are represented as mean +/- S.D. (C) Representative images of western blots obtained after immunoprecipitation of endogenous BMPR1b in MCF10A cells. On the right we see confirmation of immunoprecipitation of BMPR1b and on the left we see co-immunoprecipitation of GPER interacting with BMPR1b (n=4).

## **Combination of BMP and estrogens do not alter canonical downstream signalling pathways**

Our data have shown that BMP2 and BPS can have a specific functional effect on MCF10A cells by increasing stemness through the activation of GPER that also interact with BMPR1b, reflecting a crosstalk between the two pathways. To elucidate the impact of this crosstalk on downstream signalling pathway, we performed RT-qPCR on MCF10A cells treated during 3 days. RT-qPCR results show that the combination BMP2-BPS have no synergistic effect on the regulation of target genes of the canonical SMAD1/5/8 mediated BMP pathway (**Supplementary Figure 2A**).

A time course of BMP2 treatment performed on MCF10A cells showed that the canonical SMAD pathway was effectively activated after 15 minutes (**Supplementary Figure 2B**). We thus performed western-blot experiments on cells treated for 15 minutes with different combinations of E2, bisphenols and BMP2. As shown in **Figure 5A**, BMP2 increases the phosphorylation of SMADs as expected but the combination with E2, BPA or BPS have no further impact. To assess the the non-canonical BMP signalling pathways, we quantified the phosphorylation of ERK and p38. The treatments did not modify p38 phosphorylation. BPS, alone or in combination with BMP2 significantly reduced ERK phosphorylation (**Figure 5B-C**). Downstream pathway activated by GPER are poorly characterized, however the SRC pathway has been described as activated by GPER in mammary cells and breast tumors. Here we did not detect any significant changes in SRC phosphorylation although a trend is seen in all treatments combinations where E2, BPA or BPS are present (**Figure 5D**).



**Figure 5. Combination of BMP and estrogens do not alter canonical downstream signalling pathways**

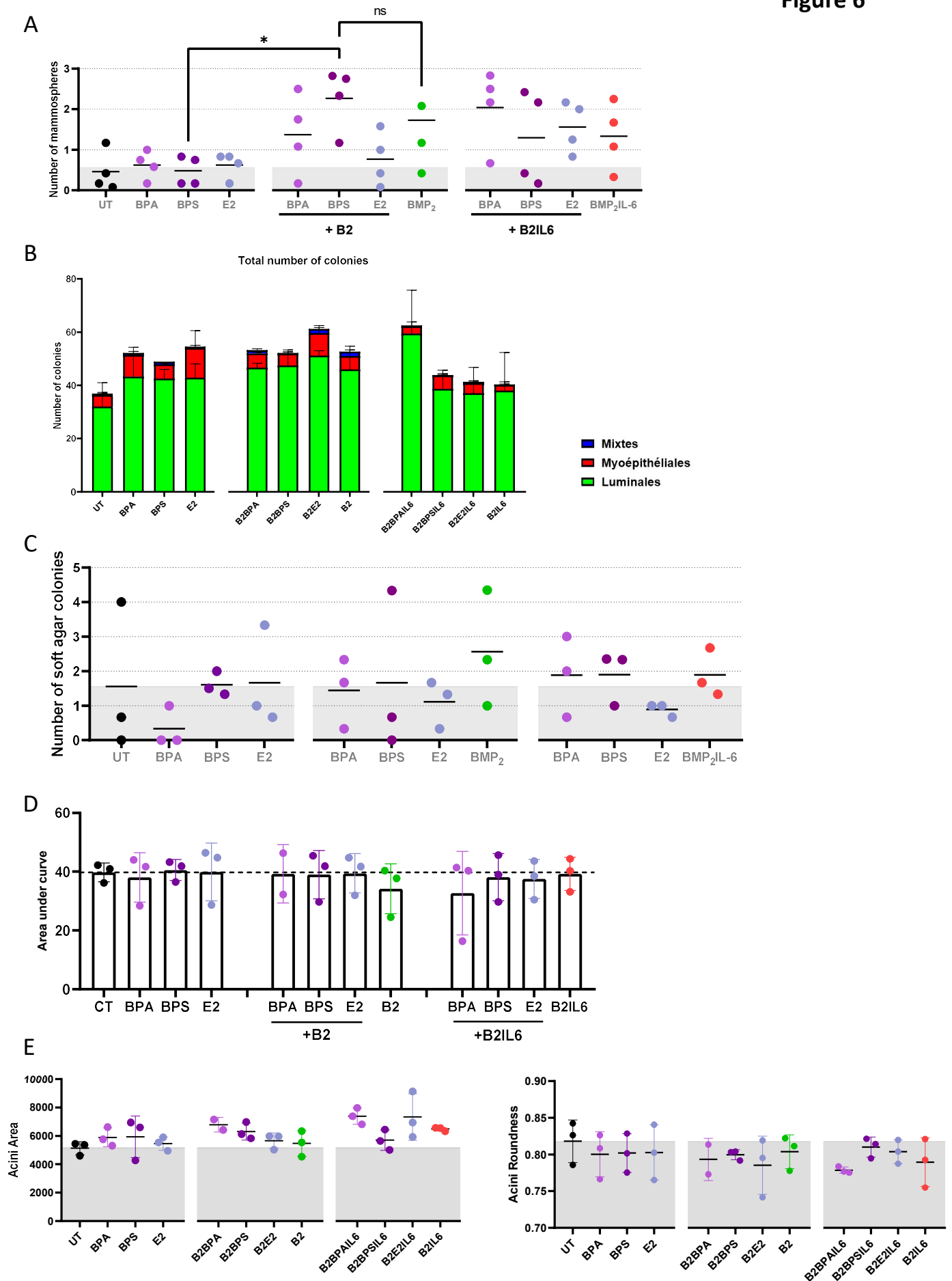
Cells were treated for 15 minutes with 10 ng/mL BMP2 (B2) and/or 50 nM bisphenol A (BPA), bisphenol S (BPS), or estradiol (E2). (A) Western-blot and quantifications showing the protein levels of total SMAD and phosphorylated SMAD under the different treatment conditions (n=3). (B) Western-blot and quantifications showing the protein levels of total ERK and phosphorylated ERK under the different treatment conditions (n=4). (C) Western-blot and quantifications showing the protein levels of total P38 and phosphorylated P38 under the different treatment conditions (n=3). (D) Western-blot and quantifications showing the protein levels of total SRC and phosphorylated SRC under the different treatment conditions (n=4). Data are represented as mean  $\pm$  S.D. Statistic using Mann-Whitney tests: \* significant ( $p \leq 0.05$ ).



## Functional effects of long-term treatments

We then performed chronic exposure during 20 weeks with different combination of treatments with BPA, BPS or E2 in combination or not with BMP2, or with BMP2 and IL6. We added IL6 in our experiments since previous data published from the lab have shown that long term exposure to BMP2 and IL6 can promote luminal transformation in MCF10A. So, we wanted to know if bisphenols can promote effects induced by BMP2 and IL6. With these long-term exposed cell lines, we carried out several functional tests as we did with the short-term exposures. Mammosphere assay show again that the combination of BMP2 and BPS is the one in which the most spheres are formed. However, the same significant difference was not found compared to the BMP2 alone condition. Conditions with BMP2 and IL6 seem to increase the number of spheres compared with E2 or bisphenols alone, but there is no difference between them (**Figure 6A**). Like with short-term treatments, no significant difference was observed in term of progenitor frequency measured by E-CFC assay (**Figure 6B**). To detect any transformation events, we performed soft agar assay but no significant difference between treatments was observed (**Figure 6C**). In addition, we performed two other functional tests to see whether the treatments could induce alterations frequently associated with transformation, such as invasion or disruption of 3D morphogenesis. No significant changes were observed in the invasion assays (**Figure 6D**). Similarly, the acini formation assay detected no significant differences between conditions (**Figure 6E and Supplementary Figure 3**). Taken together, these results suggest that after 20 weeks of exposition bisphenols, alone or in combination with BMP2 or BMP2/IL6, do not induce transformation of MCF10A cells.

Figure 6



## Figure 6. Functional effects of long-term treatments

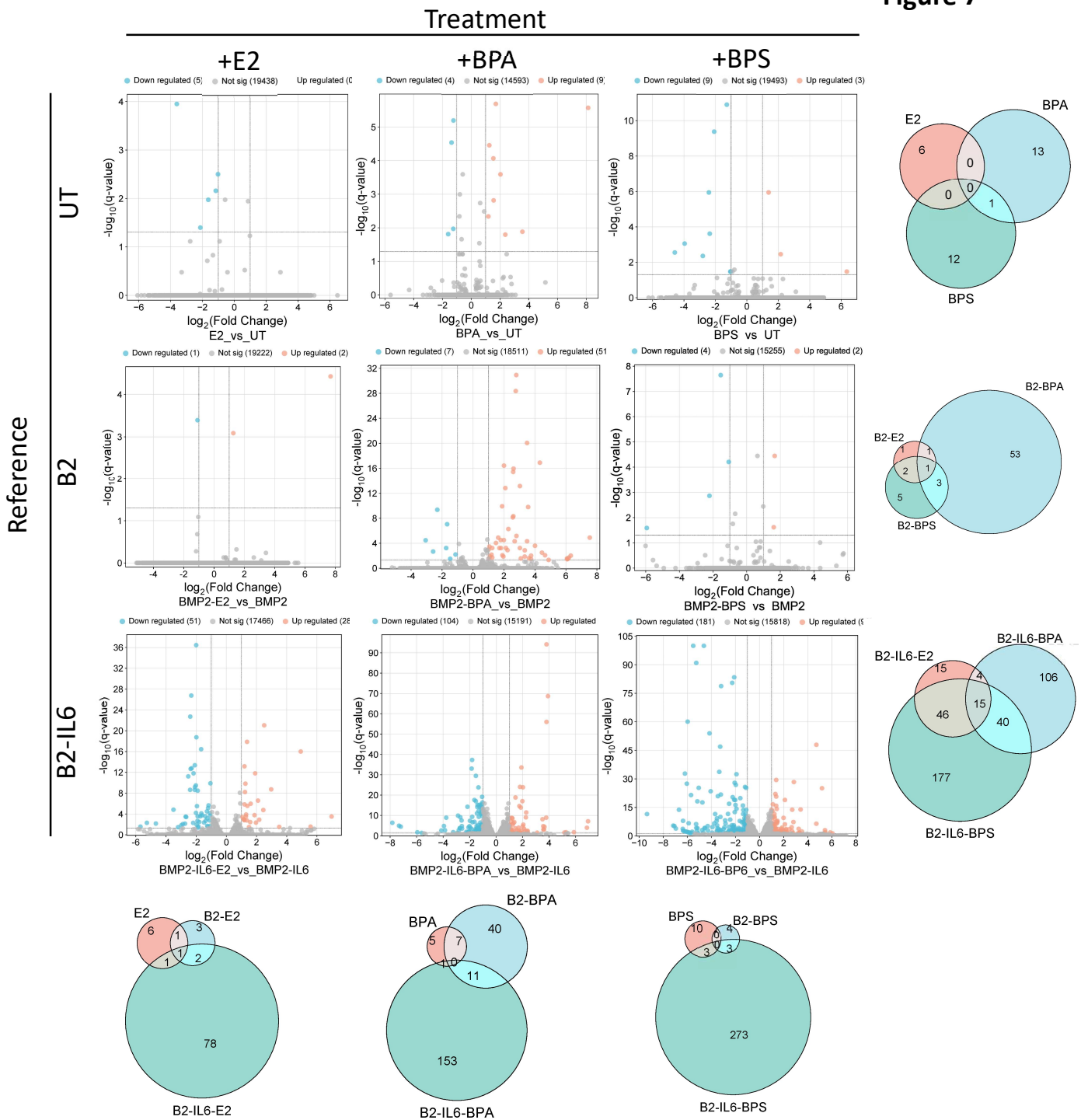
Cells were chronically exposed for 20 weeks with 5 ng/mL BMP2 (B2) and/or 50 nM bisphenol A (BPA), bisphenol S (BPS), or estradiol (E2) and/or 10 ng/mL IL6. Treatments are not maintained during functional tests. (A) Number of spheres/100 cells obtained after 5 days. Each point represents the average of the 12 technical replicates with 100 cells per well in each experiment, n=4. (B) Number of colonies obtained after 5 days, per 250 seeded cells. The bars are subdivided into 3 groups: luminal colonies (green), myoepithelial colonies (red) and mixed colonies (bleu). There are 2 technical replicates per point that are averaged to give each single value, n=3. (C) Number of soft agar colonies obtained after 4 weeks. Each point represents the average of the 3 technical replicates with 30 000 cells/well, n=3. (D) Quantification of area under curve of invasion assay. The dotted line represents the average of the area under the curve of the UT condition. (E) Quantification of acini area (left) and acini roundness (right) obtained with ImageJ software. The formation of acini takes 15 days with 3500 cells/well.

## E2 and bisphenols cooperates with BMP2/IL6 to induce specific changes in MCF10A transcriptome and kinome

We then aimed to identify changes induced by the long-term treatments in the transcriptome and kinome of MCF10A cells. Changes in transcriptome were evaluated by bulk RNAseq. We show that compared to untreated cells, E2, BPA or BPS alone surprisingly induce very little transcriptomic modifications with almost no overlap between differentially expressed genes (DEG) under each condition (**Figure 7, top row**). In combination with BMP2 alone, E2 and BPS again induce a small number of DEG although BPA start to deregulate close to 60 genes in this condition (**Figure 7, middle row**). Strikingly, in presence of BMP2/IL6, E2, BPA and BPS lead to a major increase in the number of DEG (**Figure 7, bottom row**). Interestingly, in the presence of BMP2/IL6, BPS seems to mimic E2 more faithfully than BPA does. Indeed, BPS deregulates approximately 75% and BPA only 25% of the genes deregulated by E2 (**Figure 7**). However, BPA and BPS specifically deregulate a large number of genes which are not affected by E2 and which are mainly distinct between BPA and BPS (less than 20% of genes specifically deregulated by BPS compared to E2 are also deregulated by BPA). This is also seen in a Principal Component Analysis where only the presence of BMP2 and IL6 clearly distinguish the effects induced by BPS, BPA or E2 (**Supplementary Figure 4**). A GSEA analysis using the hallmarks gene sets from MSigDB shows that DEG induced by BPS in presence of BMP2/IL6 are enriched in genes belonging to the “E2F targets” set, such as the MELK gene,

and others enriched in the “G2M checkpoint” set, such as SMC2 (**Figures 8A-B**). Albeit modest, the increase in these gene expression is strictly specific to the BPS+BMP2/IL6 condition. We also performed a Gene Ontology (GO) analysis. This showed that DEG induced by BMP2/IL6 are enriched in genes coding for plasma membranes and secreted proteins. This enrichment is conserved in presence of E2, BPA or BPS albeit to a less significant extend. Interestingly, BPS and to a lower extend BPA, induce DEG involved in inflammation and production of inflammatory cytokines. Another GO term enriched in DEG induced by both BPA and BPS is “hyaluronan biosynthetic process. Interestingly hyaluronan synthesis is elevated in breast tumors, is a factor of poor prognosis and is involved in metastasis, angiogenesis and tumor growth. Compared to the BMP2/IL6 treatment, addition of E2, BPA or BPS induced a loss in the enrichment of genes involved in cell adhesion and especially in homophilic adhesion (**Figure 8C and supplementary Figure 5B**). This was confirmed by a GSEA analysis showing a deregulation of some protocadherins especially marked when comparing the BMP2/IL6 and BPS+BMP2/IL6 conditions (**Supplementary Figure 5A**) On closer inspection of the DEG belonging to the GO terms, we identified 3 protocadherins with a similar response pattern to the treatments. PCDHA4, PCDHB4 and PCDHGB5 are all strongly activated by BMP2/IL6 compared to untreated cells. The addition of E2 tend to blunt this activation without going back to untreated levels. This is not the case for BPA that maintains the activation of all three genes by BMP2/IL6. Strikingly, BPS completely suppress the activation of the three genes by BMP2/IL6 (**Figure 8D**). This repression is specific for these protocadherins and is not the results of the silencing of the whole protocadherins genes clusters (**Supplementary Figure 5C**). We also identified Cadherin 11 (CDH11) that shows an opposite response pattern to the treatments. Indeed, compared to untreated cells, BMP2/IL6 induces a strong repression of CDH11, this repression is suppressed by the presence of E2 but not BPA. The addition of BPS, on the other hand, led to an increase of CDH11 expression to a higher level than untreated cells even in presence of BMP2/IL6 (**Figure 8D**). Collectively, this is an example where BPS, contrarily to BPA, behaves like an E2 mimetic but displays an even stronger effect than E2.

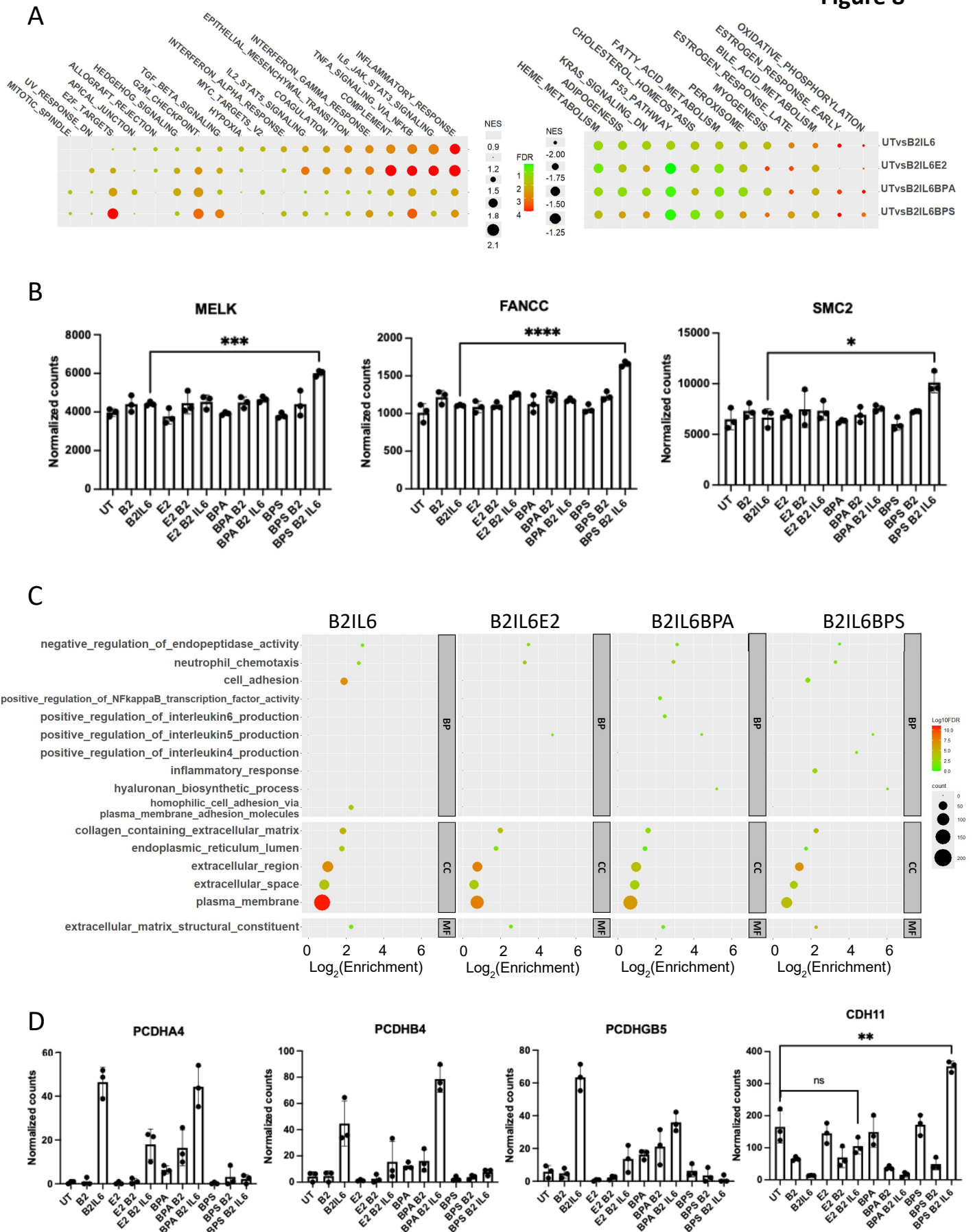
Figure 7



**Figure 7. E2 and bisphenols cooperates with BMP2/IL6 to induce specific changes in MCF10A transcriptome**

The volcano plots show differentially expressed genes (DEGs) in MCF10A cells ( $\log_2(\text{Fold Change}) > 1$  or  $< -1$  and  $-\log_{10}(\text{q-value}) > 1.3$  when E2, BPA or BPS (in columns) are added to solvent (UT), BMP2 (B2) or BM2+IL6 (B2-IL6) (in rows) during a 20 weeks culture. Venn diagrams on the right and bottom show the overlap between DEGs induced by the indicated 20 weeks treatments.

Figure 8



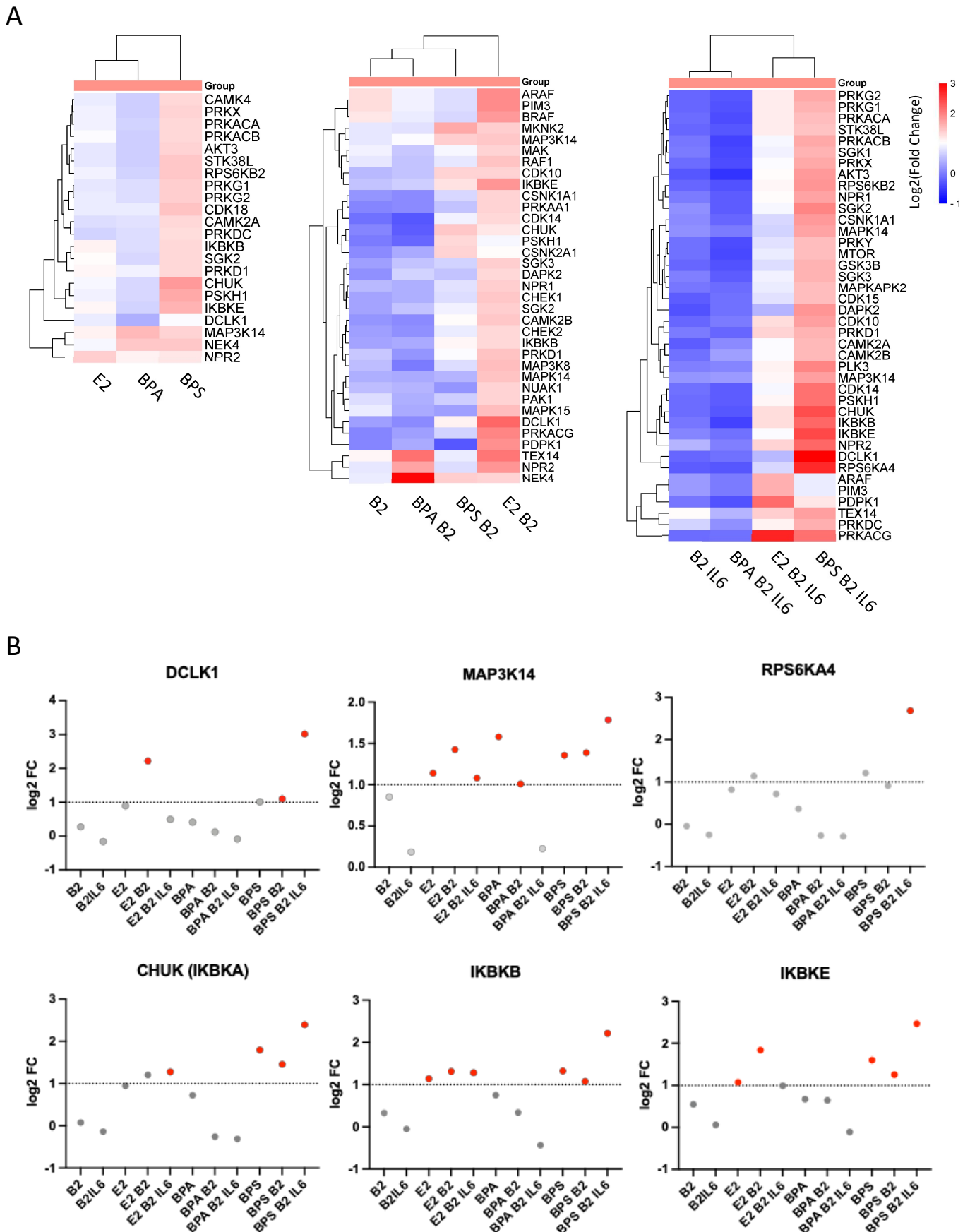
### Figure 8. E2 and bisphenols cooperates with BMP2/IL6 to induce specific changes in MCF10A transcriptome

(A) GSEA analysis of comparing the transcriptomes of MCF10A cells subjected for 20 weeks to the indicated treatment to solvent treated cells (UT) using the hallmarks MsigDB genesets. The left panel shows genesets significantly overexpressed (FDR of the Normalized Enrichment Score <0.05) in the treated condition when compared to UT. The right panel shows genesets significantly under expressed (FDR of the Normalized Enrichment Score <0.05) in the treated condition when compared to UT. The value of the NES is represented by the size of the circles and the  $-\log_{10}$  of the FDR by their color. (B) RNA-seq expression profile of genes belonging to the « E2F targets » and « G2/M checkpoint » genesets shown in A. (C) Gene Ontology analysis of DEGs upregulated in the indicated 20 weeks treatments compared to solvent treated cells. Shown are the Biological Process (BP), Cellular Compartment (CC) and Molecular Function (MF) GO terms significantly enriched (FDR<0,05) in at least one condition. The enrichment is represented on the x-axis, the number of DEGs belonging to the GO term by the circle size on the  $-\log_{10}$  of the FDR by its color. (D) RNA-seq expression profile of examples of DEGs in the BMP2-IL6 condition belonging to the « homophilic cell adhesion mediated by plasma membrane adhesion molecules» GO term shown in C.

We then quantified changes in serine/threonine or tyrosine kinase activity. No significant changes were observed for tyrosine kinase and only results for serine/threonine kinases are subsequently shown. We observed a progressive increase in the number of differently activated kinases (DAK) and the extent of their activation when E2, BPA or BPS are used alone, in combination with BMP2 or in combination with BMP2/IL6 (**Figure 9A**). When present alone, E2, BPA or BPS induce modest changes in kinase activity with the strongest effect observed for BPS (**Figure 9A, left panel**). In presence of BMP2, E2 has the strongest effect in term of kinase activation (**Figure 9A, middle panel**). In presence of BMP2/IL6, kinases activity is mostly repressed compared to untreated cells and the presence of BPA do not change this repression. The addition of E2 brings back most kinases to an activity close to those observed in untreated cells. Strikingly, the addition of BPS has a strong inducing effect on kinase activity (**Figure 9A, right panel**). This is reminiscent of the exacerbated E2-mimetic effect of BPS seen for the regulation of protocadherin and Cadherin 11 genes (**Figure 8D**). Among the 10 kinases the most activated by the of BPS + BMP2/ IL6 combination, 6 kinases are involved in the NF-kB pathway. CHUK (IKBKA), IKBKB and IKBKE are kinases able to phosphorylate NF-kB inhibitors, leading to the activation of transcription factors of the NF-kB family. MAP3K14 (NIK) is a kinase that can activate CHUK and is a central component of the non-canonical NF-kB pathway (Razani et al., 2011). RPS6KA4 (MSK2) can phosphorylate NF-kB p65 and increase its transcriptional activity (Jacks & Koch, 2010). Finally, DCLK1 induces the phosphorylation of IKK $\beta$  leading to NF-kB activation (Luo et al., 2023). The changes in the activity of these kinases induced by the treatments show a similar pattern, with the activity

measured in the BPS+BMP2/IL6 treatments systematically higher than the activity measured in the BMP2/IL6, E2+BMP2/IL6 and BPA+BMP2/IL6 conditions (**Figure 9B**).

**Figure 9**





**Figure 9. E2 and bisphenols cooperates with BMP2/IL6 to induce specific changes in MCF10A kinome.**

(A) Heatmaps with hierarchical clustering showing the fold change in serine-threonine kinases activity (in rows) in MCF10A cells subjected for 20 weeks to the indicated treatments (in columns) when compared to untreated cells. Only kinases showing a significant fold change ( $p$ -value $<0.05$  and  $\log_2$  (Fold Change) $>1.5$  in at least one treatment) are shown. The color scale is the same for each panel and the activity fold change of a given kinase can be directly compared between each panel. (B) Fold change activity of indicated kinases in MCF10A cells induced by 20 weeks indicated treatments when compared to untreated cells. Significant fold changes ( $>2$  with a  $p$ -value  $>0.05$ ) are shown in red.

**Discussion**

The physiological regulation of mammary stem cells is essential to the function of the mammary gland and their alteration can lead to cancer. Estrogens are important signals involved in both the normal and cancer biology of mammary cells. Endocrine disruptors with estrogeno-mimetic properties like bisphenols are a growing concern in term of human health, especially for hormone-dependent tissues like the mammary gland. Most in vitro studies on these bisphenols focused on their agonist action on the canonical ER $\alpha$ 66 estrogens receptor in transformed differentiated epithelial mammary cell lines. But mammary stem cells do not express the ER $\alpha$ 66 receptor although being responsive to estrogens, suggesting the involvement of other estrogens receptors. In addition, estrogens signaling can be integrated with other signaling pathway modulating the functional output. Interactions of bisphenols interactions with other signaling pathway is rarely taken into account in the literature. We explored here the functional and molecular impacts of BPA and BPS exposure compared to endogenous estradiol in a model of non-transformed human mammary stem cells in the context of BMP2 or BMP2/IL6 signaling that we previously shown involved in breast luminal transformation.

We showed that BPS, but not BPA or E2, was able to specifically potentiate the action of BMP2 by increasing the frequency of sphere-forming cells, which are considered to be very immature, stem cell-like cells. However, no impact on colonies formation in the E-CFC assay detecting more mature progenitor cells was observed for any treatment combination. This suggests that BMP2 and BPS cooperate to promote an immature phenotype in MCF10A cells without impacting their differentiation potential. It is difficult to extrapolate chronic exposure effect on the pool of breast stem cells in women. It would be necessary to distinguish an improvement in the self-renewal capacities of stem cells from an increased mobilization which

could, on the contrary, lead to their more rapid exhaustion. Serial mammosphere tests would make it possible to determine whether the sphere formation capacity is maintained or even increases over time or, on the contrary, decreases. A possible caveat in the interpretation of specific effect of BPS compared to E2 and BPA is that we did not perform dose response experiments to confirm a qualitative difference in BPS action. We show that BMP2 is capable of increasing the extracellular matrix invasion capacity, with no additional effects of bisphenols. A previous study carried out in the team showed that deregulated exposure of MCF10A cells to BMP2 and IL6 could lead to cell transformation. This seems fairly consistent with the fact that BMP2 can induce a more invasive phenotype in cells that may be associated with transformed cell characteristics. The strongest effect was found when BMP2 was combined with E2, which is also known to promote breast carcinogenesis (Henderson & Feigelson, 2000). Overall, these results support the hypothesis of a crosstalk between BMPs and estrogens pathways, with specific effects of E2 or BPS depending on the functional assay used.

In order to better understand the molecular basis underlying this crosstalk, we showed that MCF10A cells, like normal stem cells, do not express ER $\alpha$  or ER $\beta$ , but express GPER. Mammosphere assays conducted either in the presence of the GPER antagonist (G-15), or in MCF10A cells expressing an inducible shRNA targeting GPER, confirmed the requirement of GPER activity for the BMP2/BPS synergy. Interestingly, GPER knockouts have already been performed in mice as well as in breast cancer cell lines such as MDA-MB-231, where it has been shown that GPER inhibition leads to reduced cell growth and self-renewal through serial mammosphere assays (Cirillo et al., 2023). In addition, we show here that BMP2 induces GPER protein expression in MCF10A cells. Moreover, we demonstrate for the first time a molecular interaction between endogenous BMPR1b and GPER proteins. Collectively, these results support the hypothesis that the crosstalk observed between BMP and estrogens pathways are mediated at least in part by GPER. These results do not rule out the possibility that other estrogens receptor could be involved in addition to GPER. Indeed, MCF10A cells express also the ERR $\alpha$  (but not ERR $\beta$  and ERR $\gamma$ ) receptor (data not shown). ERR $\alpha$  is a nuclear orphan receptor closely related to the ER $\alpha$  receptor. Although the identity of its ligands are still the subject of debate in the literature, BPA has been shown to enhance ERR $\alpha$  expression in T-lymphocytes. Further studies will be needed to test ERR $\alpha$  involvement.

Having found no clear effect on MCF10A transformation in long-term 20 weeks exposure for any of the tested combinations of treatment, we decided to analyze their effects on the transcriptome and kinome of the cells to try and identified alterations at the molecular level.

Global transcriptomic analysis showed a surprisingly modest number of DEG induced by long-term E2 or bisphenols treatments, alone or in combination with BMP2, with the exception of the BMP2+BPA combination. In addition, there is little overlap between the DEG induced by each combination. On the other hand, in presence of BMP2/IL6, the number of DE induced by the addition of E2, BPA or BPS strongly increases, as well as the overlap between DEG induced by each combination. In these conditions, a majority (75%) of E2-induced DEG are also deregulated by BPS but only 25% of E2-induced DEG are deregulated by BPA as well. This suggest that the estrogens pathway transcriptional activity needs a concomitant activation of the BMP and IL6 pathway in this model of mammary stem cells. It also shows that the ability to mimic E2 is different between BPA and BPS and depend on other signaling pathways in the cells. In addition, the majority of DEG induced by BPA and BPS are specific of each bisphenol and not shared by E2. This suggest that the effects of bisphenols cannot be solely attributed to a strict E2-mimetic activity. In presence of BMP2/IL6, BPS specifically induce a strong repression of protocadherin coding genes that could suggest an increase in cell motility by reducing their adhesion. In addition, BPS strongly increases cadherin 11 expression, known to be highly expressed in osteoblasts. In addition, cadherin 11 has been found overexpressed in several breast cancer lines and is involved in the maintenance of the phenotype of bcSCs and the metastatic potential of cancer cells (J.-H. Chen et al., 2019). An interesting hypothesis could be that repression of some protocadherins and overexpression of cadherin 11 by mammary cells could promote the “homing” of mammary cancer cells during metastatic dissemination in the bone marrow, knowing that the bone marrow is the most frequent metastatic site for breast cancers (Clements & Johnson, 2019).

Analysis of serine/threonine kinase activity showed that, similarly to transcriptomic effects, E2, BPA and BPS induces increasingly marked deregulations when in presence of BMP2/IL6 and BMP2 to a lesser extent. In presence of BMP2/IL6, BPS has a strong positive effect on several kinases involved in the NF- $\kappa$ B pathway activation. In breast cancer, the NF- $\kappa$ B pathway has been shown to promote proliferation, survival, epithelial to mesenchymal transition and resistance to therapies. Interestingly, it has been shown that non-canonical BMP

pathways can induce NF- $\kappa$ B signaling, and that GPER can also act on this pathway in breast cancer cell line (Chi et al., 2019) (Chen et al., 2016).

In conclusion, we show here that in presence of BMP2/IL6, BPS, considered a safer alternative to BPA on the basis of its lower affinity for ER $\alpha$ , has actually stronger effects than BPA on a model of mammary stem cell where estrogens signaling is mediated through the GPER receptor. In this context, BPS could specifically activates signaling pathways and genetic programs that could increase growth, survival, resistance and dissemination of cancer cells following a transformation event not necessarily related to BPS exposure. This strongly suggests that successfully assessing the hazards associated with bisphenols will require to not neglect pertinent target cell types of chronic exposure, like stem cells, as well as to take into account the interactions of the estrogens signaling with other signal transduction pathways.

## **Materials and Methods**

### **Cell lines**

MCF10A is an immortalized but non-transformed human immature mammary epithelial cell line from the mammary gland of a female with fibrocystic breasts. MCF10A was purchased on ATCC (ATCC Batch #7635052). This cell line was cultured according to recommendations, in phenol-red free Dulbecco's Modified Eagles Medium with F-12 Nutrient Mixture (DMEM-F12, Gibco), supplemented with 5% horse serum (HS, Gibco) delipidated with charcoal, 10 000U/mL - penicillin and 10 000 $\mu$ g/ml - streptomycin (Gibco) (P/S), 10 $\mu$ g/mL insulin (NovoRapid CLB pharmacy), 0,5 $\mu$ g/ml hydrocortisone (Sigma), 100ng/mL cholera toxin (Sigma), 20ng/ml epithelial growth factor (Sigma). Twice a week, the cells were passaged so as to not exceed maximum confluence depending on the surface area of the culture dish used. To do this, the cell supernatant was removed and the cells were washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) (Life Technologies). Trypsin (Life Technologies) was then added for 10 minutes at 37°C in the incubator to detach the cells from the bottom of the dish. The cell suspension was then transferred to 20% foetal bovine serum-PBS and centrifuged for 5 minutes at 1200 rpm at room temperature. Finally, after counting, the cells were reseeded in a new dish with fresh medium. Plated cells were incubated at 37°C, 5% atmospheric CO<sub>2</sub>. NIH3T3 is an embryonic fibroblast cell line established from a NIH Swiss mouse embryo. These cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium with 10% foetal bovine serum. For short-term treatments, MCF10A

cells were seeded in 6-well plates with different treatments and grown for 3 days in complete MCF10A medium with 5% HS (described previously). Treatments were performed on these cells as follows: untreated (UT), BMP2 (B2), bisphenol A (BPA), BMP2 combined with BPA (B2BPA), bisphenol S (BPS), BMP2 combined with BPS (B2BPS), estradiol (E2), estradiol combined with BMP2 (B2E2). BPS, BPA and E2 were added at 50 nM and BMP2 at 10 ng/mL to the culture medium of MCF10A cells from day 1. Treatments were maintained during functional testing. The chronic exposure cell model was obtained by growing MCF10A cells in the complete medium described above, but with only 2% HS and with continuous treatments of 5 ng/mL BMP2, 50nM E2, BPA or BPS, and/or 10ng/mL IL6. Media and treatments were changed twice weekly, and treatments were maintained continuously for up to 20 weeks. The various functional tests were carried out without treatment to evaluate whether they induced lasting changes in the cells. MCF10A shGPER was obtained by transfecting a shGPER plasmid (sequence below) into MCF10A cells by electroporation and selection with 0,5 µg/mL of puromycine. This shRNA is inducible with 800 ng/mL of doxycycline.

shGPER Sequence
TGCTGTTGACAGTGAGCGAAGGCTGTACATTGAGCAGAAATAGTGAAGCCACAGATGTATTTCTGCT CAATGTACAGCCTCTGCCTACTGCCTCGGA

### **Mammosphere formation assay**

The sphere-forming abilities of MCF10A cells were evaluated by plating them after 3 days of 2D culture, at very low concentration (100 cells/100 µL) in 96 well flat bottom ultralow attachment plate (BD Corning). The media used was serum-free and phenol red-free mammary epithelial cell basal medium (MEBM) (Promocell), supplemented with 1X B27 (Life Technologies), 20ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF2) (Life Technologies), 20 ng/mL epithelial growth factor (EGF) (Sigma), 4mg/mL heparin sodium (Panpharma), and 100X of GlutaMAX (Life Technologies). Mammospheres were observed under the microscope as regular round spheres with a refringent pseudo-membrane and counted after 5 days.

### **Epithelial Colony Forming Cell (E-CFC) assay**

To analyse the differentiation capacity of MCF10A cells, E-CFC assays can be performed. A layer of 32,000 cells/well of irradiated (30 Gy) NIH3T3 fibroblasts was seeded in a 12-well plate. Then, 150 cells/well of MCF10A were seeded over the fibroblast layer with their conventional

medium and the cells were left in the incubator for 5 days. After 5 days, the medium was removed, washed twice with PBS and the colonies were fixed with ice-cold 100% methanol for 15 minutes. Wright's solution (RAL diagnostics 320400-0125) was then added for 2 minutes to stain the colonies. Finally, the plates were washed several times with water, dried and the colonies counted under the microscope.

### **Migration assay**

The cells were seeded at high confluence, 50,000 cells/100 $\mu$ L of medium, per well in a 96-well Incucyte<sup>®</sup>Imagelock plate (Sartorius) left overnight. The following day, after PBS washing, the cells are treated with Mitomycin C from *Streptomyces caespitosus* (Merck Sigma, #M0503) at a final concentration of 5 $\mu$ g/mL for 2h at 37°C to prevent cellular division. After PBS washing, a wound was performed using Incucyte<sup>®</sup> 96-Well Woundmaker Tool (Sartorius). Detached cells were washed cells with PBS and 100 $\mu$ L of complete medium was added to the wounded wells. Finally, the plate is left in the Incucyte<sup>®</sup> Live-Cell Analysis System (Sartorius) at 37°C with photos being taken every 2 hours for 3 days. We use the Incucyte<sup>®</sup> Scratch Wound analysis software module to obtain the wound width on each image and plotted the wound width versus time curve for each condition.

### **Invasion assay**

For this assay, a 96-well Incucyte<sup>®</sup>Imagelock plate (Sartorius) was coated with 50  $\mu$ L/well of phenol red-free Matrigel (Corning, #356231) at 100 $\mu$ g/mL (dilution in complete medium). The cells were then seeded at high confluence, 50,000 cells/100 $\mu$ L of medium, per well overnight. The following day, after PBS washing, the cells are treated with Mitomycin C from *Streptomyces caespitosus* (Merck Sigma, #M0503) at a final concentration of 5 $\mu$ g/mL for 2h at 37°C to prevent cellular division. After PBS washing, a wound was performed using Incucyte<sup>®</sup> 96-Well Woundmaker Tool (Sartorius). Detached cells were washed cells with PBS and 50 $\mu$ L of Matrigel at 1/30 dilution with complete medium was added to the wounded wells and incubated at 37°C for one hour. Subsequently, 50 $\mu$ L of liquid complete medium was added on top of the matrigel. Finally, the plate is left in the Incucyte<sup>®</sup> Live-Cell Analysis System (Sartorius) at 37°C with photos being taken every 2 hours for 3 days. We use the Incucyte<sup>®</sup> Scratch Wound analysis software module to obtain the wound width on each image and plotted the wound width versus time curve for each condition.

### **Clone formation in Soft-agar**

To analyse the transformation of MCF10A cells, a mixture of 1.5% low melting temperature agarose (Lonza) and 2X complete medium was added to the bottom of a 12-well plate. After polymerisation at room temperature, a top layer containing 0.9% agarose mixed with 2X complete medium and with 30 000 cells was added. To prevent the agar from drying, PBS was added between the wells. Cells were counted manually after 4 weeks.

### **Acini assay**

For the acini assay, we started by coating a specific 8-wells plate (IBIDI  $\mu$ -slide 8 Well Glass Bottom 80827) with 150 $\mu$ L of pure Matrigel (Corning #356231). While the Matrigel solidified, the cells were seeded on top of the pure matrigel, at low concentration (3500 cells/well) in a mixture of complete medium with 4% Matrigel. The formation of acini takes approximately 15 days during which the medium is changed every 3-4 days. After washing with cold PBS, fixation is carried out for 20 min in 4% paraformaldehyde at room temperature (RT). After this step, Triton 100X 0.5% is used for permeabilization for 30 minutes. Then, 3 PBS-Glycine washes were performed and PBS 3% BSA added for saturation for 1h at RT. For staining, acini were incubated for 1h at RT with 1:100 Rhodamine phalloidin (Invitrogen R415) and 1:10 000 Sytox Deep Red 647 (Invitrogen S11380). Final washes with PBS were carried out and then acini were preserved in PBS at 4°C before taking images using the confocal microscope. 7 Z-STACK images were taken in different fields from the well with the 20X objective. Acini area and roundness were calculated using the ImageJ software.

### **Reverse Transcription- quantitative Polymerase Chain Reaction (RTqPCR)**

MCF10A cells were seeded in 6-well plates to reach 80% confluency after 3 days of treatments. After treatment, the supernatant was removed and 500  $\mu$ L of Tri Reagent was added directly to the wells. The Direct-Zol RNA Microprep, OZYME extraction kit was used for RNA extraction and purification. Subsequently, the RNA concentration was measured with a Nanodrop spectrophotometer using the 260nm absorbance and RNA purity was measured using the A260/A280 and A260/A230 ratios. cDNA synthesis was performed using the PrimeScript™ RT Reagent Kit (TAKARA) following manufacturer's instructions. A control tube without the Reverse Transcriptase enzyme was made to check for DNA contamination. Real-time PCR were performed using specific primer pairs with the TB Green® Premix Ex Taq™ kit (TAKARA) on a LC480 thermocycler (Roche).

Summary table of primers used for quantitative Polymerase Chain Reaction (RTqPCR):

Gene name	Primers sequences
ER $\alpha$	TTACTGACCAACCTGGCAGA ATCATGGAGGGTCAAATCCA
GP $\alpha$	GCTTGTCCCTGAAGGTCTCC TCCCTGCAAGCAGTCTTTCC
SMAD6	CTGCAACCCCTACCACTTCA AGAATTCACCCGGAGCAGT
ID1	GGTGCCTGTCTGTCTGAG TGTCGTAGAGCAGCACGTTT
ID2	TATTGTCAGCCTGCATCACC AATTCAGAAGCCTGCAAGGA
ID3	AAATCCTACAGCGCGTCATC AAGCTCCTTTTGTGTTGGA

### Immunoblotting

MCF10A cells were harvested from 6-wells plates and centrifugated to make dry pellets which can be stored at -20°C. After that, the cells are lysed by incubation with lysis buffer (0.5M NaF, 200mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 200mM  $\beta$ -glycerophosphate, protease inhibitor cocktail and RIPA Buffer) with shaking for 20 minutes. Then the pellets are centrifuged for 15 minutes at 12,000 rpm at 4°C to remove cellular debris and to recover the supernatant containing the proteins. Cell lysates can be measured by preparing a standard range with known concentrations of BSA in Coomassie Blue. After this step, the samples are prepared for loading by adding 15  $\mu$ g of protein lysate with Laemmli buffer (0.05M Tris pH 6.8, 5% Glycerol, 2% SDS, 2.5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 1mg/mL Bromophenol Blue) and heating for 5 minutes at 95°C, with exception for GP $\alpha$  detection samples that were heated 30 minutes at 37°C. Proteins from lysed cells were separated by migration on a 10% SDS polyacrylamide gel in running buffer (25mM Tris, 192mM Glycine, 0,5% SDS). The proteins were then transferred to a PVDF membrane in Transfer Buffer (Trans-Blot Turbo™ Biorad kit) with a semi-liquid transfer device. After one hour of blocking in TBST (10mM Tris, pH8, 150mM NaCl, 0.1% tween 20) with 5% BSA or milk, the membranes were incubated at 4°C overnight with a primary antibody. The membranes were then washed five times with TBST for 5 minutes and incubated with a peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit antibody for 1 hour at room



temperature. After antibody incubation, the membranes were re-washed with TBST six times for 5 minutes. ECL reagent (BioRad) was used for signal detection and quantification was performed in a BioRad Chemidoc.

Antibodies used for Western Blot:

Targeted protein	Host species	Dilution	Reference	Manufacturer
GPER	Rabbit	1:500 in 5% BSA	NLS4290	Novus Biological
BMPR1b	Mouse	1:300 in 5% BSA	AB78417	Abcam
P-SMAD 1/5	Rabbit	1:500 in 5% BSA	#13820	Cell Signaling
SMAD 1/5/8	Rabbit	1:500 in 5% BSA	sc-6031-r	Santa Cruz
P-ERK 1/2	Rabbit	1:1000 in 5% BSA	4370S	Cell Signaling
ERK	Rabbit	1:1000 in 5% Lait	4695S	Cell Signaling
P-P38	Mouse	1:1000 in 5% BSA	612288	BD Biosciences
P38	Mouse	1:1000 in 5% Lait	612168	BD Biosciences
SRC	Rabbit	1:1000 in 5% BSA	#2109	Cell Signaling
GAPDH	Mouse	1:50 000 in 5% BSA	600004-1	Proteintech

**Co-immunoprecipitation**

Cells seeded in a 10cm dish for 3 days and then washed twice with cold PBS. To lyse the cells, 500µL of specific lysis buffer without SDS (0.5M NaF, 200mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 200mM β-glycerophosphate, protease and phosphatase inhibitor cocktail and RIPA Buffer without SDS) was added to the cells and incubated for 20 minutes at 4°C with agitation. Cells were harvested and centrifugated for 15 minutes at 12,000 rpm at 4°C in order to remove cellular debris and to recover the supernatant containing the proteins. Cell lysates can be measured by preparing a standard range with known concentrations of BSA in Coomassie Blue. For immunoprecipitation we used 1 mg/mL of protein which were incubated overnight at 4°C with 5µg/mL of antibodies. On the following day, magnetic beads (Thermofisher #88802) were pre-washed with Tris Saline Buffer with 0,05% Tween. 12.5 µL of beads were added for 2 hours at 4°C to the protein lysates in order to extract the antibodies attached to our proteins of interest with the use of a magnet. The antibody coupled-beads were washed once again with Tris Saline Buffer before adding Leamli 1X (0.05M Tris pH 6.8, 5% Glycerol, 2% SDS, 2.5% β-mercaptoethanol, 1mg/mL Bromophenol Blue). The samples were then heated for 30 minutes

at 37°C. After obtaining the immunoprecipitation samples, classic immunoblotting is performed in order to detect the presence of the endogenous protein interacting with the protein that we have specifically immunoprecipitated (see immunoblotting protocol). The only specificity of this protocol is that we used HRP G proteins (Invitrogen P21041) as secondary antibodies in order to limit the nonspecific signals induced by the antibodies during immunoprecipitation.

### **Proximity Ligation assay**

For this assay we used Kits from Sigma (DUO92002 + DUO92004 + DUO92007). Cells were grown on coverslips in 12-well plates and then fixed in ice-cold methanol for 5 min, before being washed twice in 1X PBS. The cells were initially saturated using the blocking solution from the PLA kit, for 30 minutes at 37°C in a humid room, then pairs of primary antibodies (GPER 1:300 and BMPR1b 1:200) were added and incubated for 1 hour at 37°C. After a first rapid wash and a second of 5 min with agitation with buffer A, from the PLA kit, the PLA minus and plus probes containing the secondary antibodies conjugated to complementary oligonucleotides were added and incubated for 1 h at 37°C. After a quick wash and a second 5-minute shaking with buffer A, a ligation cocktail was added for 30 minutes at 37°C and washed twice as described above. Then, a rolling circle amplification (RCA) reaction was carried out for 1h40 at 37°C. The amplification solution contained fluorescently labeled oligonucleotides, which hybridized to the RCA product. After hybridization, samples were washed twice for 10 min with buffer B, then mounted with Duolink II mounting medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and visualized with a fluorescence microscope.

### **Kinome analysis**

MCF10A cells were seeded in 6-wells plate, so as to have two wells per condition at 50% of confluency after 3 days. Then cells were washed with cold PBS and lysed directly in the wells with 100µL of specific lysis Buffer (M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent #78503 + Phosphatase Inhibitor Cocktail 100X #78420 + Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free 100X #87785 from Thermofisher). The bottoms of the wells were scraped to remove the cells and centrifuge them for 20 minutes at 12,000 rpm at 4°C. The supernatant containing proteins was recovered and frozen at -80°C. For the kinome assay, the samples were prepared thanks to PamGene kit (PTK Reagent Kit 32112.5 and STK Reagent Kit 32201.3) and run on a PAMSTATION apparatus. Results were processed

## RNA-seq

RNA from long-term exposed cells were extracted following the RNeasy Kit protocol (Qiagen) and then used to construct the mRNA library. RNA-seq sequencing analysis was performed according to the Illumina NovaSeq 6000 sequencing platform. The results were filtered and trimmed by quality, mapped to the reference genome (GRCh38/hg38) through the Rsubread library, and finally, gene expression was quantified. The differential expression (DEGs) analysis was applied for comparison between samples and to evaluate the effect of the variable(s) of interest.

## References

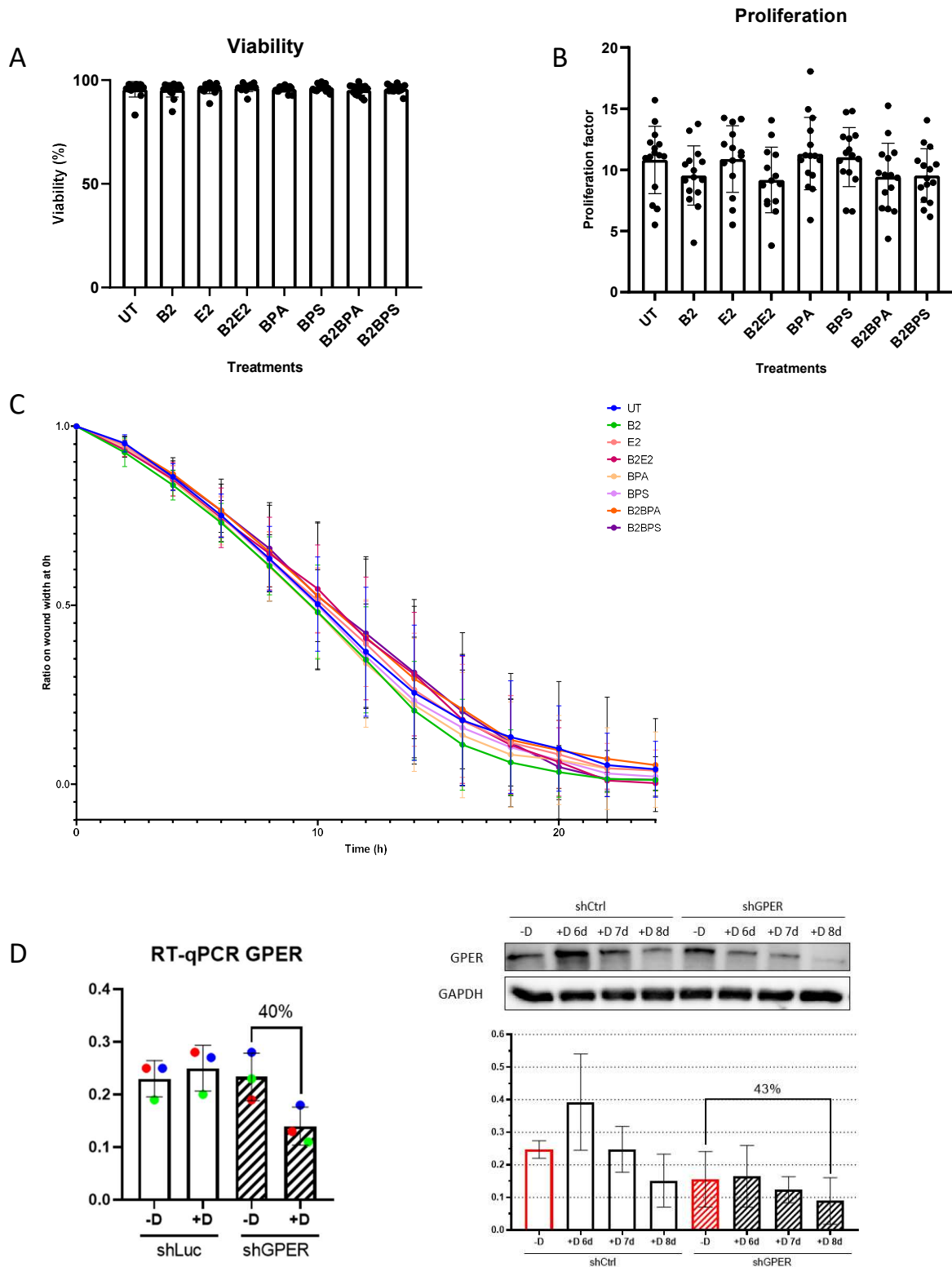
- Abraham, A., & Chakraborty, P. (2020). A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Reviews on Environmental Health*, 35(2), 201-210. <https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0034>
- Alarmo, E.-L., Huhtala, H., Korhonen, T., Pylkkänen, L., Holli, K., Kuukasjärvi, T., Parkkila, S., & Kallioniemi, A. (2013). Bone morphogenetic protein 4 expression in multiple normal and tumor tissues reveals its importance beyond development. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 26(1), 10-21. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.128>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229-263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Carmeci, C., Thompson, D. A., Ring, H. Z., Francke, U., & 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(3), 607-617. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4972>
- Chan, Y.-T., Lai, A. C.-Y., Lin, R.-J., Wang, Y.-H., Wang, Y.-T., Chang, W.-W., Wu, H.-Y., Lin, Y.-J., Chang, W.-Y., Wu, J.-C., Yu, J.-C., Chen, Y.-J., & Yu, A. L. (2020). GPER-induced signaling is essential for the survival of breast cancer stem cells. *International Journal of Cancer*, 146(6), 1674-1685. <https://doi.org/10.1002/ijc.32588>
- Chapellier, M., Bachelard-Cascales, E., Schmidt, X., Clément, F., Treilleux, I., Delay, E., Jammot, A., Ménétrier-Caux, C., Pochon, G., Besançon, R., Voeltzel, T., Caron de Fromentel, C., Caux, C.,

- Blay, J.-Y., Iggo, R., & Maguer-Satta, V. (2015). Disequilibrium of BMP2 Levels in the Breast Stem Cell Niche Launches Epithelial Transformation by Overamplifying BMPR1B Cell Response. *Stem Cell Reports*, 4(2), 239-254. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.12.007>
- Deng, Q., Jiang, G., Wu, Y., Li, J., Liang, W., Chen, L., Su, Q., Li, W., Du, J., Wong, C. K. C., Chen, Z., & Wang, H. (2018). GPER/Hippo-YAP signal is involved in Bisphenol S induced migration of triple negative breast cancer (TNBC) cells. *Journal of Hazardous Materials*, 355, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.05.013>
- Dong, S., Terasaka, S., & Kiyama, R. (2011). Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 159(1), 212-218. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.004>
- Forsman, C. L., Ng, B. C., Heinze, R. K., Kuo, C., Sergi, C., Gopalakrishnan, R., Yee, D., Graf, D., Schwertfeger, K. L., & Petryk, A. (2013). BMP-binding protein twisted gastrulation is required in mammary gland epithelium for normal ductal elongation and myoepithelial compartmentalization. *Developmental Biology*, 373(1), 95-106. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.10.007>
- Jacks, K. A., & Koch, C. A. (2010). Differential regulation of mitogen- and stress-activated protein kinase-1 and -2 (MSK1 and MSK2) by CK2 following UV radiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(3), 1661-1670. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.083808>
- Jeanpierre, S., Nicolini, F. E., Kaniewski, B., Dumontet, C., Rimokh, R., Puisieux, A., & Maguer-Satta, V. (2008). BMP4 regulation of human megakaryocytic differentiation is involved in thrombopoietin signaling. *Blood*, 112(8), 3154-3163. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-145326>
- Katagiri, T., & Watabe, T. (2016). Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(6), a021899. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021899>
- Luo, W., Jin, Y., Jiang, Y., Yang, L., Xu, H., Wu, D., Zhang, Y., Yin, L., Khan, Z. A., Liang, G., & Wang, Y. (2023). Doublecortin-like kinase 1 activates NF- $\kappa$ B to induce inflammatory responses by binding directly to IKK $\beta$ . *Cell Death and Differentiation*, 30(5), 1184-1197. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01147-8>
- Razani, B., Reichardt, A. D., & Cheng, G. (2011). Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling activation and regulation: Principles and perspectives. *Immunological Reviews*, 244(1), 44-54. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01059.x>
- Rendl, M., Polak, L., & Fuchs, E. (2008). BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties. *Genes & Development*, 22(4), 543-557. <https://doi.org/10.1101/gad.1614408>
- Rouhimoghadam, M., Lu, A. S., Salem, A. K., & Filardo, E. J. (2020). Therapeutic Perspectives on the Modulation of G-Protein Coupled Estrogen Receptor, GPER, Function. *Frontiers in*

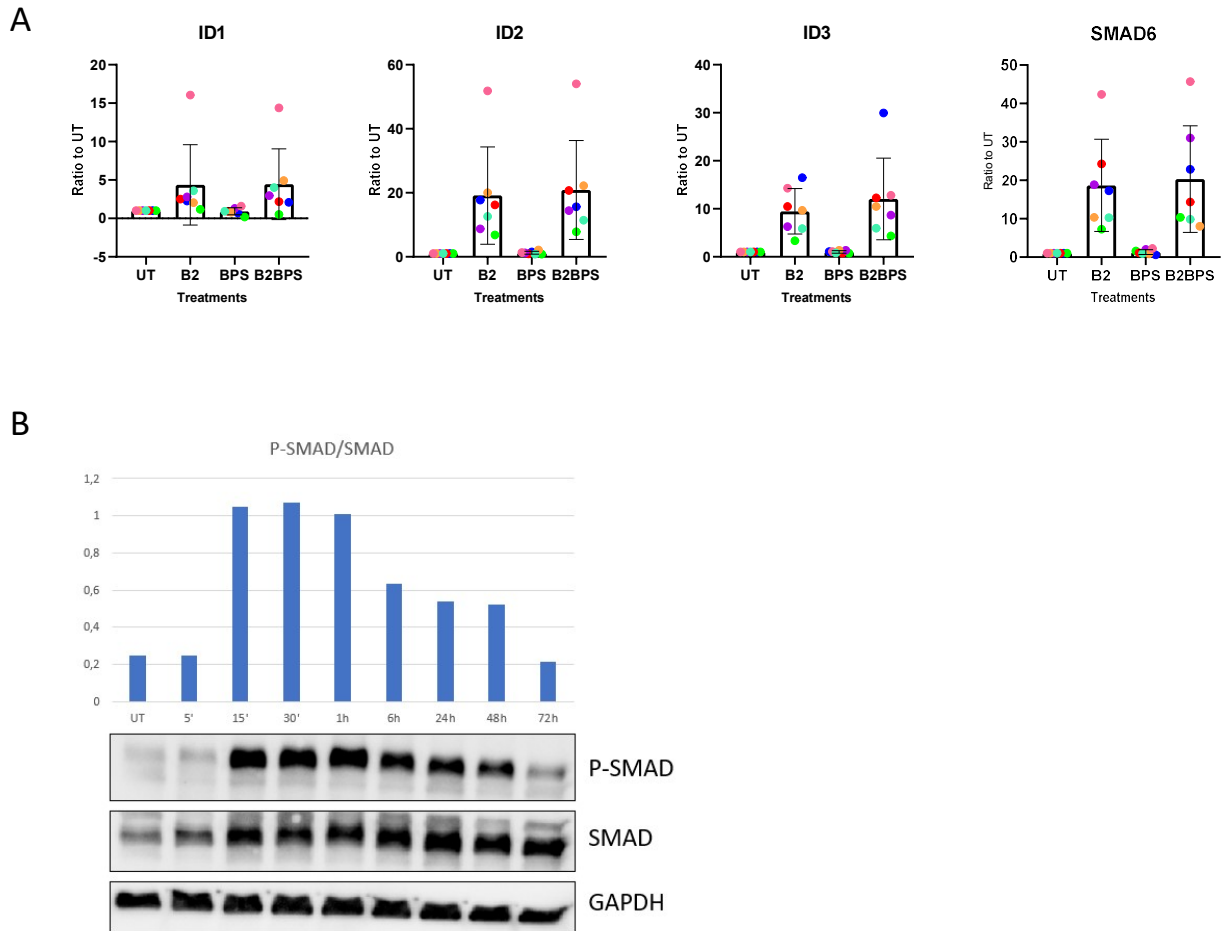
*Endocrinology*, 11, 591217. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.591217>

Taurin, S., & Alkhalifa, H. (2020). Breast cancers, mammary stem cells, and cancer stem cells, characteristics, and hypotheses. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 22(12), 663-678. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.09.009>

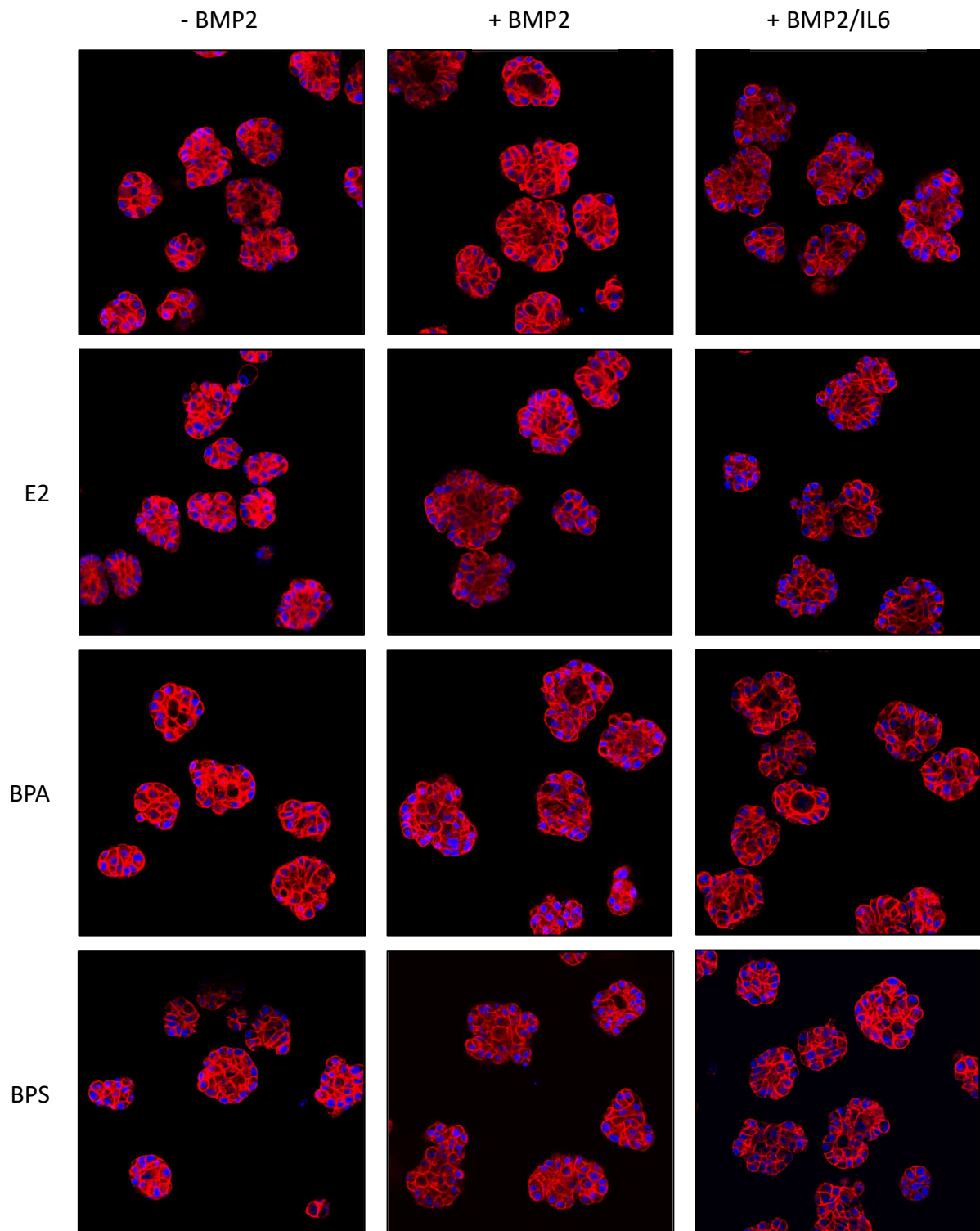
Tomasetti, C., & Vogelstein, B. (2015). Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6217), 78-81. <https://doi.org/10.1126/science.1260825>



**Supplementary Figure 1.** Cells were seeded in 6-well plates and treated for 3 days with 10 ng/mL BMP2 (B2) and/or 50 nM bisphenol A (BPA), bisphenol S (BPS), or estradiol (E2). (A) Percentage of viability of the MCF10A cell line under each condition. This percentage is calculated automatically by the cell counter from the ratio of the number of live cells to the number of total cells. Data are represented as mean  $\pm$  S.D, n=14. (B) Proliferation factor of the MCF10A line under each condition. Data are represented as mean  $\pm$  S.D, n=15. (C) Curve obtained after migration tests, representing ratio on wound width at 0h versus time, n=10. (D) Validation of shGPER with RT-qPCR and western blot quantification (n=3).



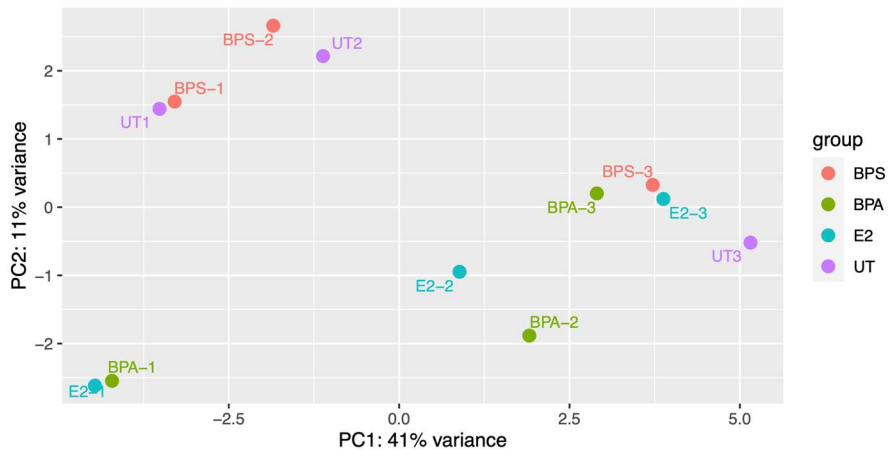
**Supplementary Figure 2.** (A) RT-qPCR quantification of target genes of BMP pathway, n=7. (B) Western Blot quantification of SMAD phosphorylation on MCF10A cells with increasing incubation time of BMP2 treatment. BMP2 concentration 10 ng/mL.



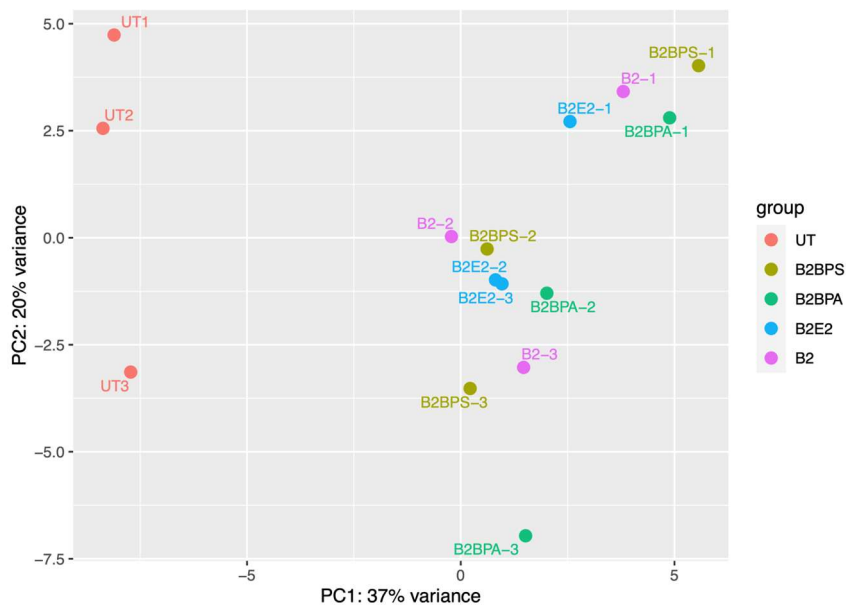
**Supplementary Figure 3.** Representative confocal microscopy images of acini of chronically exposed MCF10A cells. In red actin stained with phalloidin rhodamine and in blue nuclei stained with Sytox deep red.



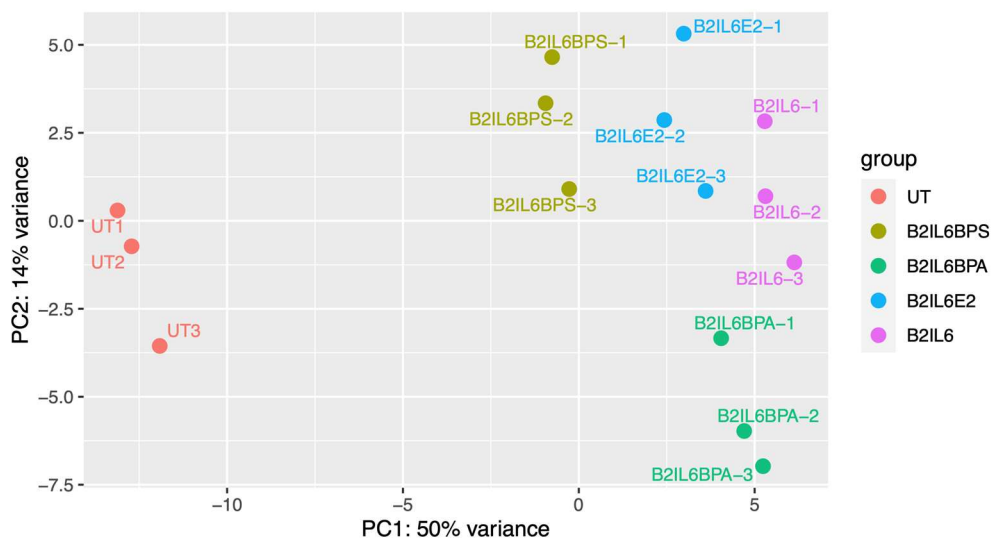
A



B

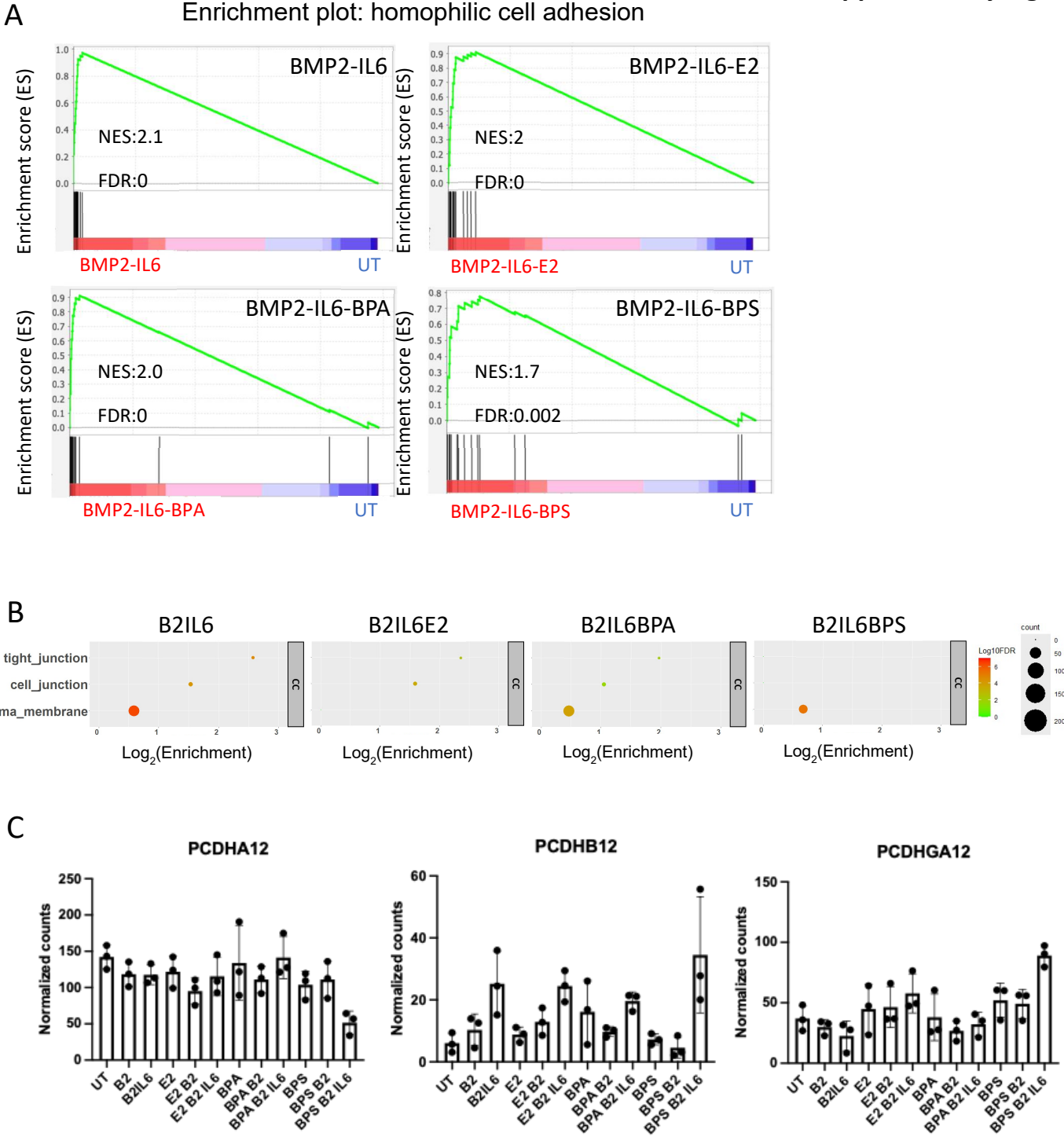


C



**Supplementary Figure 4.** Principal Component Analysis (PCA) plots of the transcriptome of MCF10A cells kept

In culture with the indicated treatments for 20 weeks. UT: untreated, B2: BMP2.



**Supplementary Figure 5.** (A) GSEA analysis of the transcriptome of MCF10A cells treated for 20 weeks by the indicated combinations compared to untreated cells (UT). The geneset used represents genes overexpressed in the BMP2-IL6 condition compared to UT (untreated) belonging to the « homophilic cell adhesion mediated by plasma membrane adhesion molecules » GO term identified in Fig. XC. (B) Gene Ontology analysis of DEGs downregulated in the indicated 20 weeks treatments compared to untreated cells. Shown are the Cellular Compartment (CC) GO terms significantly enriched (FDR<0,05) in at least one condition, no GO terms belonging to the MF and BP categories were found. The enrichment is represented on the x-axis, the number of DEGs belonging to the GO term by the circle size and the  $-\log_{10}$  of the FDR by its color. (C) RNA-seq expression profile of other protocadherin genes showing a different regulation pattern by the indicated treatments than the protocadherin genes identified in Figure XD.

## Acknowledgments

We thank P. Battiston-Montagne and C. Vanbelle, CRCL-PIC cytometry and imaging platform. This study was funded by La Ligue Nationale Contre le Cancer Ain, Rhône and Saône-et-Loire (V. Maguer-Satta); Fondation ARC (V. Maguer-Satta, SFI20111203500, PJA20171206331); Association RUBAN ROSE Prix Avenir 2021 (V. Maguer-Satta, L. Billon).

# Discussion

Cette partie est une discussion plus exhaustive des résultats de mon projet et de ses perspectives que celle développée dans le manuscrit pour publication.

Les études *in vitro* sur les bisphénols sont généralement focalisées sur leur éventuel effet aggravant sur le phénotype de lignées déjà transformées, dans ce contexte il m'a semblé intéressant d'étudier les premières étapes de dérégulations pouvant survenir dans un modèle de cellules non transformées. Comme je l'ai évoqué dans l'introduction, les cellules souches semblent être des cibles clés de l'initiation tumorale et leurs caractéristiques particulières renforcent l'intérêt d'étudier l'impact de perturbateurs endocrinien tels que les bisphénols sur ces cellules. En particulier, mon travail montre que l'évaluation des risques associés aux bisphénols nécessite la prise en compte des coopérations possibles avec d'autres voies de signalisation. En effet, j'ai mis en évidence des effets démultipliés et différents de l'E2, du BPA et du BPS en présence de BMP2 ou de BMP2 et d'IL-6. J'ai également mis en lumière un nouveau mode de dialogue entre les signalisations des BMP et des œstrogènes dans les cellules souches mammaires médié par les récepteurs BMPR1b et GPER. Ces données éclairent d'un jour nouveau l'intégration de la signalisation œstrogénique et d'autres voies de signalisation importantes pour les cellules souches mammaires ainsi que les impacts complexes de xénobiotiques œstrogéno-mimétiques sur ces mécanismes cellulaires.

Les bisphénols ont été décrits comme des perturbateurs endocriniens agissant en tant qu'œstrogéno-mimétiques. Malgré de nombreux articles suggérant l'implication des bisphénols dans la tumorigenèse, ils ne sont pas classifiés comme des substances cancérigènes par les instances de santé telles que le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) ou encore l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). Pourtant, la question de la réelle innocuité des bisphénols reste ouverte, en particulier dans le contexte de cancers hormono-dépendants tels que certains cancers du sein dans lesquelles les œstrogènes participent au développement tumoral. En effet, l'ANSES reconnaît certains effets cancérigènes dits avérés chez l'animal au niveau de la glande mammaire mais ces effets sont indiqués comme ne pouvant être extrapolés à l'Homme en raison des différences physiologiques entre les espèces (Anses, 2011). De plus, aucune étude épidémiologique réalisée chez l'Homme ne permet d'établir un lien clair entre

l'exposition au BPA et le développement de cancers du sein (G. Liu et al., 2021) (Fauconnier et al., 2023). L'interdiction du BPA dans certains produits de consommation a conduit à son remplacement par des bisphénols alternatifs tels que le BPS pour lesquelles les données objectives de dangerosité sont encore plus limitées que pour le BPA. Dans ce contexte, il semble nécessaire d'approfondir nos connaissances sur l'impact des bisphénols sur des modèles aussi proches que possible des cellules les plus à risques lors d'une exposition chronique aux bisphénols et en tentant d'approcher la complexité des signalisations mises en jeu.

J'ai utilisé le modèle de la lignée MCF10A pour étudier l'impact des expositions aux bisphénols sur des cellules humaines non transformées ayant un phénotype de cellules souches et de progéniteurs immatures. Comme évoqué dans l'introduction, les cellules à longue durée de vie pourraient être des cibles importantes d'éventuels mécanismes de transformations médiés par les œstrogéno-mimétiques. Nous savons que les cellules souches adultes n'expriment pas le récepteur classique ER $\alpha$  (Taurin & Alkhalifa, 2020c). Cependant il a été démontré qu'elles étaient sensibles aux signaux œstrogéniques et que le récepteur GPER était essentiel à la survie des cellules souches mammaires cancéreuses (Henderson & Feigelson, 2000); (Chan et al., 2020). J'ai démontré que la lignée MCF10A avait un profil d'expression des récepteurs aux œstrogènes similaire à ce qui est décrit pour les cellules souches mammaires adultes. En effet, elles n'expriment ni ER $\alpha$  ni ER $\beta$  mais elles expriment bien GPER. De plus, il a déjà été décrit que les bisphénols peuvent induire des signalisations via GPER (Khan et al., 2021) (Deng et al., 2018). En démontrant l'expression protéique de GPER dans la lignée MCF10A, j'ai également mis en lumière l'action du BMP2 qui est capable d'augmenter cette expression. Des régulations croisées entre les récepteurs aux œstrogènes et les BMP ont déjà été décrites dans la littérature. Par exemple, l'activité de ER $\alpha$  induit l'expression de BMP2 (Su et al., 2007). Inversement, BMP2 promeut l'expression de certaines isoformes d'ER $\alpha$  comme ER $\alpha$ 36 dans des lignées de cancers du sein (D. Wang et al., 2012). Cependant, ici il s'agit de la première description que BMP2 est capable de favoriser l'expression de GPER dans des cellules mammaires. Toutefois, les bisphénols ne modulent pas cette expression.

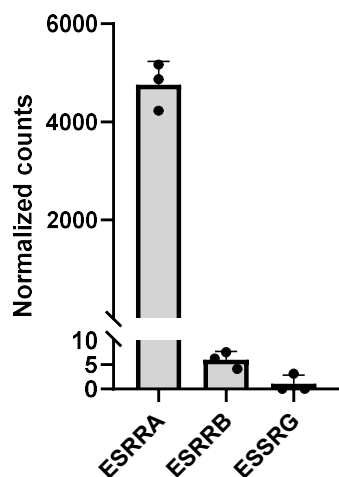
En termes d'impacts au niveau fonctionnel de l'exposition aux bisphénols, j'ai démontré que le BPS, mais pas le BPA ou l'E2, était capable d'augmenter le nombre de cellules formant des mammosphères lorsqu'il était combiné avec le BMP2. Cela suggère que la combinaison BPS/BMP2 augmente le nombre de cellules souches capable de proliférer ou

favorise leur survie ou maintient dans cet état. Il est à ce stade difficile d'extrapoler l'effet à long-terme sur le pool de cellules souches mammaires chez la femme. Il faudrait pour cela distinguer une amélioration des capacités d'auto-renouvellement des cellules souches d'une mobilisation augmentée qui pourrait au contraire conduire à leur épuisement plus rapide. Pour cela des tests de mammosphères en série permettraient de déterminer si la capacité de formation des sphères se maintient voire augmente dans le temps ou au contraire décroît. Quoiqu'il en soit, ce résultat met en exergue le fait que le BPS peut avoir des effets différents du BPA et de l'E2 malgré des similarités structurelles importantes et l'implication probable du même récepteur aux œstrogènes. Il met également en évidence que certains effets induits par les bisphénols peuvent être observés uniquement en conjonction avec d'autres voies de signalisation cellulaire pouvant induire des effets uniques via des coopérations, comme ici avec le BMP2. En revanche, le BPS n'impacte pas le nombre de progéniteurs capables de former des colonies épithéliales mammaires, qu'il soit combiné au BMP2 ou non. Ceci suggère que BMP2 et BPS coopèrent pour promouvoir un phénotype immature dans les cellules MCF10A sans affecter leur différenciation. Parmi les tests fonctionnels effectués j'ai également évalué l'effet de l'exposition des cellules sur leurs capacités de migration et d'invasion. Ces résultats ont montré que le BMP2 augmentait la capacité invasive des cellules. Une précédente étude réalisée en laboratoire a montré qu'une exposition chronique à BMP2 des cellules MCF10A conduisait à une transformation cellulaire en présence d'IL6. Cela semble assez cohérent avec le fait que BMP2 puisse induire un phénotype plus invasif dans les cellules, souvent associé à des caractéristiques de cellules transformées. Enfin, l'effet le plus puissant a été observé lorsque BMP2 était combinée à E2, également connu pour favoriser la carcinogenèse du sein (Henderson et Feigelson, 2000). Ce résultat souligne encore un effet coopératif spécifique entre les œstrogènes et le BMP2. J'ai ensuite voulu déterminer par quel récepteur les bisphénols et l'E2 pouvaient transmettre leur signal dans les cellules MCF10A.

Sachant que les cellules MCF10A expriment GPER, j'ai émis l'hypothèse que l'augmentation du nombre de cellules formant des mammosphères dans la condition BMP2/BPS dépendait de l'activation de GPER par le BPS. J'ai mis en œuvre différentes approches expérimentales pour tester cette hypothèse. L'utilisation de l'antagoniste sélectif de GPER G-15 a suggéré que l'effet synergique du BPS avec le BMP2 nécessitait l'activation de GPER. Pour s'affranchir d'éventuels effets aspécifiques du G-15, j'ai essayé d'utiliser dans un premier temps des siRNA ciblant GPER. Cependant, toutes les méthodes de transfection testées empêchaient

la formation correcte de sphères, indépendamment de la spécificité du siRNA transfecté. Dans un second temps, j'ai donc développé un shRNA dirigé contre GPER inductible par la doxycycline. Toutefois, je ne suis parvenu à atteindre qu'une répression de l'expression de la protéine GPER de 40% maximum après de nombreuses adaptations ce qui n'est resté modeste. J'ai tout de même constaté une diminution significative du nombre de sphères par rapport au shRNA contrôle. Cette diminution a eu lieu dans toutes les conditions de traitement contrairement aux résultats obtenus avec G-15. Cela suggère que le niveau de protéine GPER est limitant pour le maintien des cellules formant des mammosphères dans les MCF10A mais que le niveau de réduction atteint de lors de cette approche par shRNA reste suffisant pour transmettre le signal du BPS. Dans tous les cas, ce résultat va dans le sens que l'effet observé en test de mammosphères est dépendant de GPER. Pour trancher sur la nécessité de l'expression de GPER pour la synergie BPS/BMP2, un knock-out complet de GPER avec la technique CRISPR/CAS9 est en cours d'élaboration. Dans ce contexte, il est important de mentionner ici l'existence potentielle d'autres récepteurs moins connus qui sont les « estrogens-related receptors ». Ces récepteurs sont considérés comme des récepteurs orphelins mais il a été décrit que le BPA et le BPS pouvait se lier à ERR $\alpha$ . Par exemple, il a été montré que le BPA pouvait améliorer les capacités souches des cellules souches neurales via les signalisations de ERR $\alpha$  et TGF- $\beta$  (P. Dong et al., 2022). Cela est intéressant car on peut supposer que ERR $\alpha$  pourrait aussi participer aux effets observés sur l'augmentation de la fréquence des cellules capables de former des mammosphères avec les cellules MCF10A. Dans un autre article, il est mentionné que l'activation de ERR $\alpha$  via le BPS peut favoriser la migration et l'invasion de cellules cancéreuses de tumeur médullosurrénale (Jia et al., 2018). Il a donc été démontré, que ERR $\alpha$  activé par les bisphénols pourrait aussi jouer un rôle dans le développement tumoral. Cependant, concernant les cellules mammaires je n'ai trouvé aucun article faisant référence à un impact induit par les bisphénols sur ERR $\alpha$  bien qu'il pourrait être impliqué dans le maintien des bCSC (Muduli et al., 2023). A partir de nos données de RNA-seq, seul le récepteur ERR $\alpha$  semble être exprimé dans les MCF10A, il sera donc important de déterminer si ERR $\alpha$  pourrait participer avec GPER à la signalisation des bisphénols dans mon modèle (**Figure 25**).





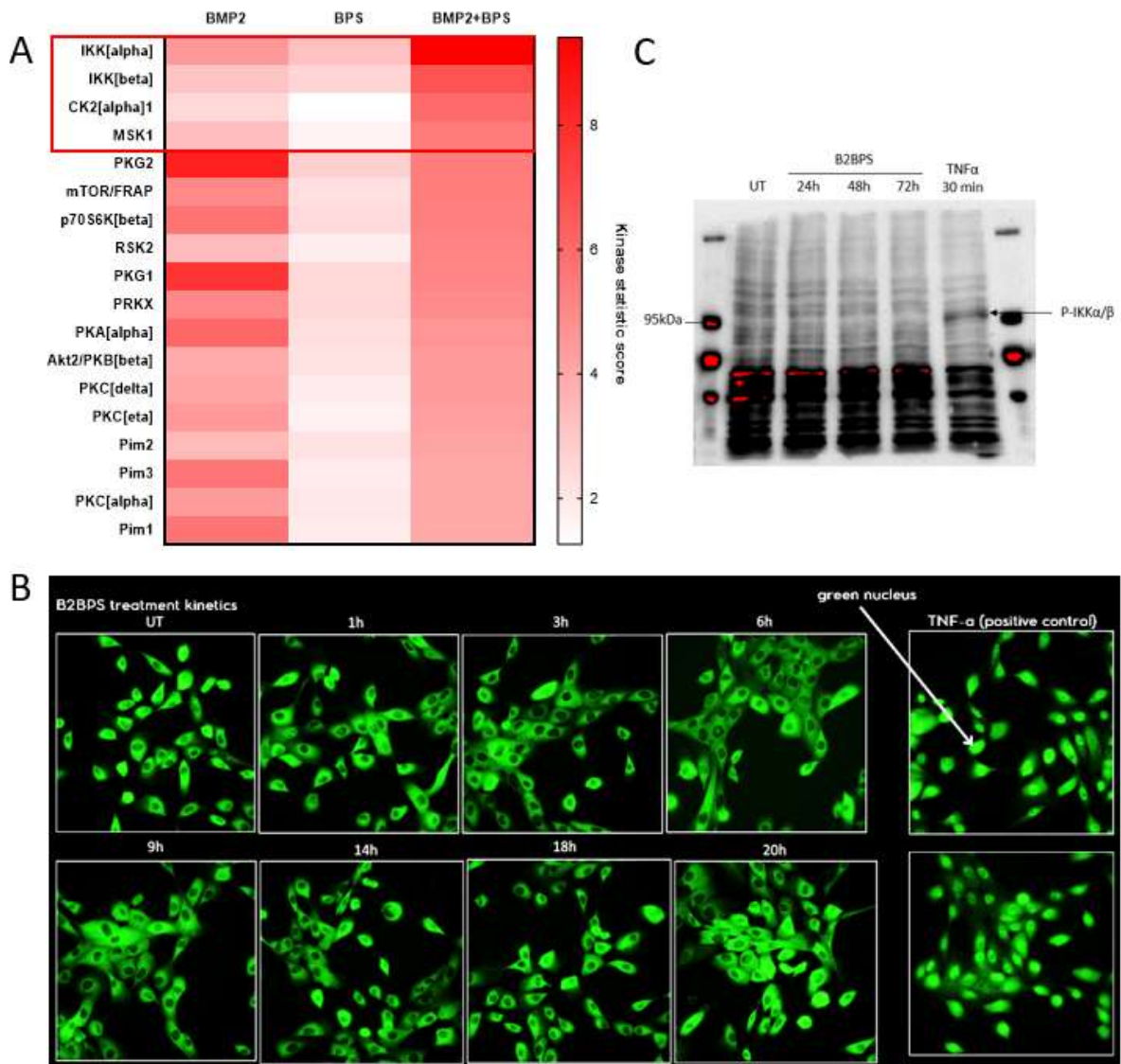
**Figure 25. Résultats de RNA-seq montrant le profil d'expression transcriptomique des gènes ESRRRA, ESRRB et ESSRG dans la lignée MCF10A.**

*Ces gènes codent respectivement pour les récepteurs ERR $\alpha$ , ERR $\beta$  et ERR $\gamma$  (n=3).*

Ces tests fonctionnels m'ont permis de constater que les effets les plus importants étaient observés dans des conditions de combinaison de traitements entre le BMP2 et les œstrogènes ou œstrogéno-mimétiques. Pour tenter d'expliquer ces mécanismes au niveau moléculaire, j'ai montré que GPER pourrait être impliqué dans ces effets. Pour le BMP2, l'article de Chapelier et al. suggère que c'est le récepteur BMPR1b qui médie l'effet de BMP2. Cela était compatible avec une interaction physique entre GPER et BMPR1b. Par la technique de PLA j'ai pu constater que les deux protéines sont étroitement co-localisées (<40nm). Cela est supporté par des approches de co-immunoprécipitation des protéines endogènes qui ont mis en évidence la présence de GPER dans les complexes protéiques associés à BMPR1b. Cependant, il n'a pas été possible de valider l'approche inverse, à savoir la co-immunoprécipitation de BMPR1b avec GPER. Cela constitue une limite de mon étude qui nécessite davantage d'optimisations au niveau de l'immunoprécipitation de GPER, l'anticorps dont je disposais semblant peu efficace. Cependant, ces résultats révèlent pour la première fois que GPER pourrait interagir physiquement avec BMPR1b au sein des cellules MCF10A. Dans la littérature, il a déjà été démontré que des interactions physiques entre des membres de la voie des BMP et celle des œstrogènes pouvaient exister. Par exemple, il a été montré que ER $\alpha$ 66 et SMAD1 ou SMAD4 pouvaient interagir dans des lignées de cancers du sein induisant des régulations spécifiques de ces voies (Yamamoto et al., 2002) (Wu et al., 2003). Nous pouvons donc suggérer que la formation d'un complexe BMPR1b et GPER permettrait d'induire une

signalisation spécifique uniquement lorsque les deux récepteurs sont activés par leur ligand respectif. Ce signal se traduirait alors par des effets fonctionnels tels que l'augmentation de la fréquence des cellules formant des mammosphères.

L'analyse de l'activation de voies de signalisations classiques en aval des récepteurs BMPR1b et GPER ont permis de comprendre que cette coopération ne semblait pas impacter les voies de signalisation les plus connues. Il est difficile d'effectuer une mesure exhaustive de l'activité des voies en aval de ces récepteurs avec des approches expérimentales classiques comme des Western Blot ou des RT-qPCR. C'est pour cela que par la suite, j'ai choisi de mettre en œuvre des approches à grande échelle permettant d'analyser un nombre beaucoup plus important de cibles en même temps. Nous avons choisi de réaliser un kinome permettant d'analyser l'activation ou l'inhibition de kinases et donc de chercher quelles voies de signalisation seraient spécifiquement perturbées par les expositions aux bisphénols, en combinaison ou non avec BMP2. Ce kinome a d'abord été réalisé sur des cellules MCF10A traitées à court terme comme lors des expériences précédentes. Ces résultats ont permis de montrer que plusieurs facteurs de la voie NF- $\kappa$ B, comme les protéines IKK $\alpha/\beta$ , CK2 et MSK1 semblaient être spécifiquement suractivées par la combinaison de traitements BMP2+BPS (**Figure 26A**). Pour confirmer ces résultats par une approche indépendante, j'ai tenté de mettre en évidence par immunofluorescence la translocation nucléaire du complexe RelA/p50 et donc l'activation de la voie canonique NF- $\kappa$ B. Cependant, les résultats obtenus ont été négatifs malgré un contrôle positif (exposition au TNF $\alpha$ ) donnant le résultats attendu (**Figure 26B**). Sachant qu'il existe des voies non canoniques qui n'impliquent pas la translocation nucléaire de ce complexe RelA/p50 et qui peuvent aussi être activé par IKK $\alpha$ , j'ai voulu mettre en évidence par western-blot la phosphorylation des protéines IKK après traitement au BMP2 et au BPS (**Figure 26C**) (S.-C. Sun, 2011). Cependant, dans ce cas également je n'ai pas pu confirmer les résultats obtenus avec le kinome malgré l'effet attendu du TNF $\alpha$ . Il reste envisageable que l'activation des kinases IKK passe par la phosphorylation de résidus différents de ceux détectés par les anticorps que j'ai utilisés et que les conséquences en aval de cette activation soient différentes de celles classiquement décrites lors de l'activation des kinases IKK par d'autres signaux que la combinaison BPS/BMP2.



**Figure 26. Résultats concernant l'activation de la voie NF-κB par l'exposition au BMP2/BPS.**

(A) Heatmap montrant le score statistique (équivalent au  $\log_2$  du « fold change ») des kinases indiquées (en ligne) dans les cellules MCF10A soumises pendant 3 jours aux traitements indiqués (en colonnes) par rapport aux cellules non traitées. (B) Détection de la localisation intra-cellulaire de RelA/p50 par immunofluorescence après traitement par BMP2+BPS de cellules MCF10A pendant les temps indiqués. (C) Résultat du Western-blot montrant les niveaux protéiques de IKK $\alpha/\beta$  phosphorylé sous le traitement cinétique avec BMP2+BPS. Le TNF- $\alpha$  est utilisé comme contrôle positif pour l'activation de la voie NF- $\kappa$ B ou pour la phosphorylation des kinases IKK, il est ajouté pendant 30 min à 100  $\mu$ g/mL.

Les résultats discutés jusqu'ici ont été obtenus après des expositions à court-terme de quelques jours. L'identification d'interactions physiques et fonctionnelles entre GPER et BMPR1b médiant des effets différentiels entre BPA, BPS et E2 en conjonction avec BMP2 m'a poussé à réaliser des traitements chroniques. J'ai donc exposé pendant 20 semaines les

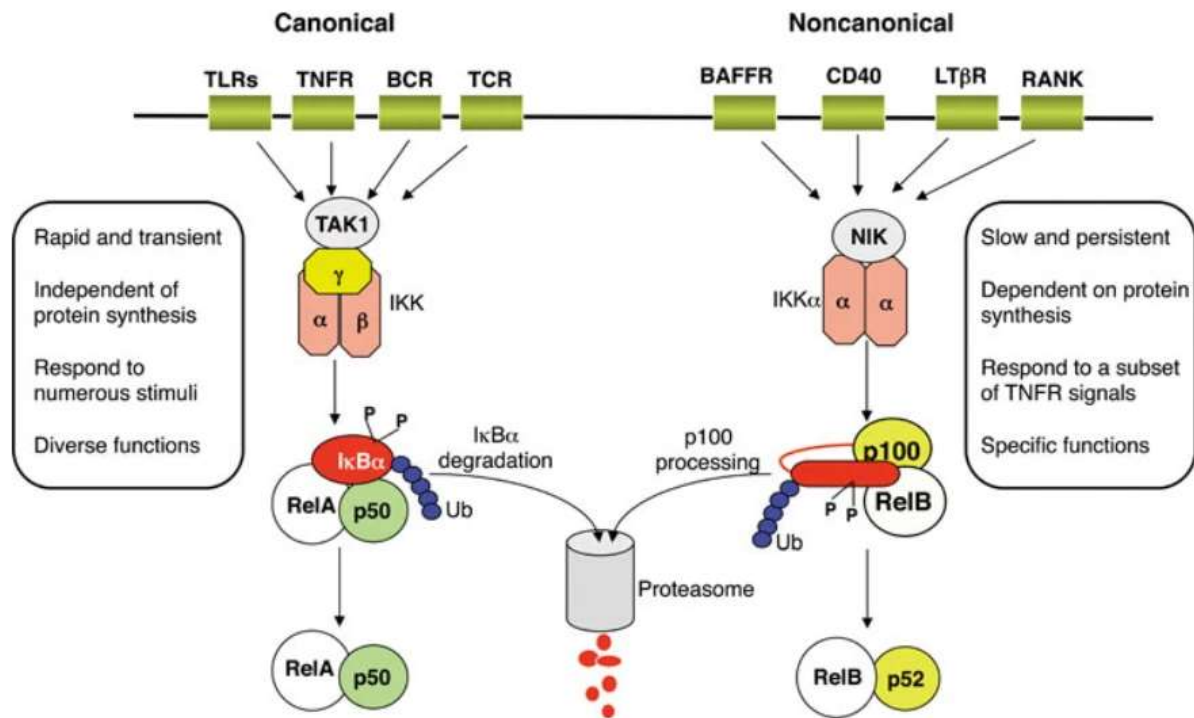
cellules MCF10A avec les combinaisons précédentes afin de déterminer si les effets identifiés se maintenaient dans le temps et si d'autres pouvaient apparaître avec ces expositions longues. Nous savons que les dérégulations liées aux expositions aux bisphénols résultent d'une exposition chronique puisque nous sommes quotidiennement en contact avec ces perturbateurs endocrinien. Les résultats obtenus après expositions chroniques pendant 20 semaines semblent maintenir l'augmentation de la fréquence des cellules formant des mammosphères dans la condition BMP2/BPS. Cependant, cet effet est observé plus faiblement qu'à court terme et on ne retrouve pas de synergie dans les expériences d'invasions. Une hypothèse serait que les effets induits par les traitements ne seraient pas forcément stables même après 20 semaines d'exposition, qui reste malgré tout un temps court sachant que nous sommes exposés toute notre vie. En effet, pendant les essais à long termes j'ai retiré les traitements afin d'analyser s'il y avait des perturbations acquises durablement par les cellules exposées chroniquement. Alors que pendant les tests à court termes les traitements étaient maintenus pendant les essais.

Pour les expositions à long terme, j'ai également décidé d'ajouter des conditions associant des expositions avec l'IL6 puisque les modèles de transformations précoces des MCF10A publiés par l'équipe ont été obtenus après exposition au BMP2 et à l'IL6 (Guyot et al., 2023). Ces conditions avaient pour but d'observer si les bisphénols pouvaient également favoriser l'émergence d'une transformation précoce par rapport à une exposition au BMP2 et à l'IL6 sans bisphénols. Néanmoins, j'ai eu des difficultés à obtenir des preuves d'initiation de transformation même dans la condition BMP2/IL6. En effet, j'ai obtenu assez peu de colonies en agar mou par rapport à la conditions non traitée. Si on se réfère à l'article évoqué précédemment, il était également difficile d'observer une transformation significative des cellules avec seulement des tests de colonies en agar mou mais l'initiation de transformation avait pu être observé via des xénogreffes dans des souris. Il est donc envisagé de réaliser des xénogreffes comme avec les MCF10A exposées chroniquement. De plus, dans nos lignées chroniques nous avons également apportés une modification par rapport aux lignées générées précédemment dans l'étude, en les cultivant avec du sérum délipidé. Cela permet de limiter les biais liés aux hormones lipophiles présentes naturellement dans le sérum. Toutefois ce processus retire également des facteurs de croissance, certaines vitamines et certains métabolites. Il est donc probable que je ne puisse pas strictement comparer les résultats obtenus ici avec ceux obtenus précédemment par l'équipe. Parmi les tests fonctionnels, j'ai également mis en place au laboratoire un test de formation d'acini en matrigel. Cette

expérience permet d'observer si les expositions perturbent la capacité des cellules à s'organiser en 3D afin de former des sphéroïdes possédant une lumière bien définie. En effet, un article avait déjà démontré que l'exposition au BPA ou au BPS pouvaient perturber la formation des acini en augmentant leur taille et induisant un envahissement de la lumière par les cellules (Atlas & Dimitrova, 2019). Une expérience identique a donc été réalisée mais je n'ai pas mis en évidence de différences significatives dans la formation des acini. Cependant, l'étude mentionnée a été réalisée sur la lignée MCF12A qui exprime ER $\alpha$  et qui répond donc peut-être de manière plus forte aux signaux oestrogéniques.

J'ai à nouveau réalisé une analyse du kinome et du transcriptome par RNA-seq des cellules exposées à long-terme. Les résultats de kinome ont encore une fois montré une suractivation de kinases impliquées dans la voie NF- $\kappa$ B avec l'activation de IKK $\alpha/\beta$ , IKK $\epsilon$ , MAP3K14 (NIK) et RPS6KA4 (MSK2). Cette fois-ci, l'activation des kinases était la plus forte dans la condition BPS+BMP2/IL6. L'activation spécifique observée à 3 jours dans la condition BMP2 et BPS semblait être perdue avec le temps par rapport à la condition BPS seul. Une hypothèse, serait que la présence d'un contexte inflammatoire induit par l'IL6 favoriserait le maintien sur la durée des effets spécifiquement induits par la coopération BMP2 et BPS. Dans la littérature, la voie NF- $\kappa$ B a souvent été décrite comme pouvant être suractivée dans les cancers du sein. Il est notamment décrit que l'inflammation via l'IL6 peut induire une boucle de rétroaction positive IL6/STAT3/NF- $\kappa$ B pouvant conduire à la transformation des cellules MCF10A (Iliopoulos et al., 2009). Nous savons que la majorité du microenvironnement mammaire est constitué d'adipocytes qui régulent de façon paracrine les cellules mammaires en sécrétant des facteurs comme l'IL6. Il a été démontré que l'IL6 sécrété par les adipocytes avait une activité pro-EMT, et pouvait promouvoir l'auto-renouvellement et la signalisation des cellules souches cancéreuses (Wolfson et al., 2015). Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, les adipocytes mammaires sont également un lieu important de stockage des bisphénols et donc ils pourraient représenter à la fois une source d'exposition aux bisphénols et à l'IL6 pour les cellules souches mammaires (M. F. Fernandez et al., 2007). De plus, la voie NF- $\kappa$ B serait aussi impliquée dans le maintien des cellules souches cancéreuses et dans la résistance aux thérapies (Khongthong et al., 2019). Un autre article montre que la suractivation de la voie NF- $\kappa$ B est capable d'induire l'EMT des cellules MCF10A en supprimant l'expression des gènes spécifiques épithéliaux comme l'E-cadhérine et la desmoplakine et en induisant l'expression de gènes mésenchymateux comme la vimentine (Chua et al., 2007).

Il est intéressant de constater que plusieurs de ces kinases les plus suractivées dans la condition BPS+BMP2/IL6 ne sont pas des kinases canoniques de la voie NF- $\kappa$ B, comme IKK $\epsilon$  et MAP3K14 (appelée aussi NIK). Par exemple, IKK $\epsilon$  est décrit comme un membre atypique de la famille des IKK, il jouerait un rôle dans l'activation de NF- $\kappa$ B et dans l'immunité en réponse à une infection virale ou à une stimulation cellulaire. Fait intéressant, IKK $\epsilon$  a été décrit comme un oncogène dans les cancers du sein et est retrouvé fréquemment surexprimé dans les tumeurs mammaires (Boehm et al., 2007). Il est capable de favoriser la prolifération des cellules cancéreuses et est impliqué dans la résistance au tamoxifène (Shen & Hahn, 2011). Pour ce qui est de la kinase MAP3K14, elle est directement impliquée dans la voie non canonique de NF- $\kappa$ B. Elle phosphoryle IKK $\alpha$ , entraînant la liaison de la sous-unité p52 avec RelB puis sa translocation nucléaire (**Figure 27**). Certaines études ont rapporté que l'activité dérégulée de NIK pouvait favoriser la croissance tumorale. Par exemple, un article démontre que l'accumulation aberrante de NIK conduit au recrutement de fibroblastes associés au cancer et à l'activation de mécanismes anti-apoptotiques (Hayashi et al., 2023). Un autre article montre que NIK est surexprimé dans les bCSC et qu'il permet la maintien et amplifie la tumorigénicité des bCSC via les signalisations ERK1/2 et NF- $\kappa$ B. Cette étude montre entre autres, que l'inhibition spécifique de NIK via l'utilisation d'un shRNA diminue le nombre de mammosphères formées dans la lignée MCF7 (Vazquez-Santillan et al., 2016). A la date de cette rédaction, je suis en train de tester l'impact d'un inhibiteur de NIK sur la formation des sphères suite à l'exposition à la combinaison BPS+BMP2/IL6. De plus, je vais également tester la translocation nucléaire de RelB/p52, n'ayant pas pu mettre en évidence celle de RelA/p50 lors des traitements à court terme (voir figure 1 de la discussion), ce qui pourrait s'expliquer par une activation non-canonique de la voie NF- $\kappa$ B par le BPS.



**Figure 27. Voies canoniques et non canoniques de la signalisation NF-κB.**

La voie canonique est déclenchée par de nombreux signaux, y compris ceux médiés par les récepteurs immunitaires innés et adaptatifs. Elle implique l'activation du complexe IKK par Tak1, la phosphorylation de l'IκBα médiée par l'IKK et sa dégradation ultérieure, entraîne une translocation nucléaire rapide et transitoire de l'hétérodimère prototypique NF-κB RelA/p50. La voie NF-κB non canonique repose sur la transformation de la p100 induite par la phosphorylation. Cette voie dépend de NIK et d'IKKα, mais pas du complexe trimérique IKK, et assure la médiation de l'activation persistante du complexe RelB/p52. D'après (S.-C. Sun, 2011).

En plus de ces kinases impliquées dans la voie NF-κB, la suractivation la plus importante spécifiquement induite par la combinaison BPS+BMP2/IL6 est celle de la kinase DCLK1. Les connaissances concernant cette kinase sont encore assez limitées, mais des articles récents ont permis d'identifier DCLK1 comme un nouveau biomarqueur des cellules souches cancéreuses dans divers cancers comme les cancers du côlon, du pancréas, du rein, du foie, de l'estomac, de l'œsophage mais aussi dans les cancers du sein (Lu et al., 2022). En effets, plusieurs études ont montré que DCLK1 pouvaient impacter la prolifération et la motilité des cellules cancéreuses mammaires en régulant par exemple la voie Wnt/β-caténine, certains miRNA ou encore la voie ERK/MAPK (Y.-L. Wang et al., 2019) ; (J. Wang et al., 2018) et (H. Liu et al., 2019). Une publication récente relie également DCLK1 à l'activation de la voie NF-κB via celle de la kinase IKKβ, suggérant à nouveau un rôle central de cette voie dans les effets du BPS en présence de BMP2/IL6 (Luo et al., 2023).

Concernant l'analyse transcriptomique, le RNA-seq a révélé que l'exposition à long-terme aux bisphénols ou à l'E2 seuls avait un impact modeste en termes de nombre de gènes différentiellement exprimés. En combinaison avec le BMP2, le BPA induit une dérégulation d'un plus grand nombre de gènes que le BPS ou l'E2. Les effets transcriptomiques les plus forts sont toutefois retrouvés dans les combinaisons des bisphénols ou de l'E2 avec BMP2/IL6. Il est intéressant de noter que sur ces critères transcriptomiques, en présence de BMP2/IL6, le BPS semble mimer plus fidèlement l'E2 que ne le fait le BPA. En effet, le BPS dérégule environ 75% et le BPA seulement environ 25% des gènes dérégulés par l'E2 (voir Figure X du manuscrit). Toutefois, le BPA et le BPS dérégulent spécifiquement un grand nombre de gènes qui ne sont pas affectés par l'E2 et qui sont majoritairement distincts entre le BPA et le BPS (moins de 20% des gènes dérégulés spécifiquement par le BPS par rapport à l'E2 sont également dérégulés par le BPA). Une analyse GSEA a permis de révéler que les gènes spécifiquement surexprimés dans la condition BMP2, BPS et IL6 étaient enrichis en cibles du facteur E2F ainsi qu'en régulateurs de la transition G2/M, donc principalement dans la régulation du cycle cellulaire. Bien que nous n'ayons pas observé de réelle différence en termes de prolifération dans nos différentes conditions, la dérégulation du cycle cellulaire est un facteur courant dans l'initiation tumorale. Nous pourrions transfecter nos cellules exposées chroniquement avec le système FUCCI que nous possédons au laboratoire, et observer s'il y a des perturbations des phases du cycle cellulaire. Dans ces groupes nous avons trouvés 3 kinases significativement surexprimées uniquement dans la condition BMP2, BPS et IL6. MELK (Maternal embryonic leucine zipper kinase) est une kinase impliquée dans divers processus cellulaires tels que la régulation du cycle cellulaire, l'auto-renouvellement des cellules souches, l'apoptose et la régulation de l'épissage et c'est également une cible du facteur de transcription E2F. Un article a démontré que la protéine MELK est surexprimée dans les cellules progénitrices mammaires et qu'elle participe à la tumorigenèse *in vivo* dans des modèles de souris (Hebbard et al., 2010). De plus, le gène SMC2 code pour une protéine impliquée dans la composition du complexe de condensine qui est un complexe nécessaire à la condensation de la chromatine lors de la mitose. Un article de 2024, a démontré que la surexpression de protéines de la famille des SMC telle que SMC2 pouvait servir de marqueur de mauvais pronostic dans les cancers du sein. De plus SMC2 est impliqué dans la croissance et la migration des cellules MCF7. (Pei et al., 2024). L'analyse par Gene Ontology des résultats de RNA-seq met en évidence la régulation différentielle de gènes impliqués dans les adhésions homotypiques (adhésion entre elles des cellules exprimant les mêmes molécules). En particulier on retrouve la cadhérine 11



spécifiquement surexprimée et trois protocadhérines spécifiquement sous-exprimées par l'effet du BPS en combinaison avec le BMP2 et l'IL6, si on compare aux données obtenues avec les combinaisons BMP2/IL6 seul ou avec E2 ou BPA. La perte d'expression de ces protocadhérines peut suggérer une augmentation de la motilité cellulaire en réduisant leur adhésion. Cependant, la cadhérine 11 est une cadhérine particulière puisqu'elle est aussi appelée OB-cadhérine, c'est-à-dire que c'est une cadhérine exprimée dans les ostéoblastes. De plus, elle a été retrouvée surexprimée dans plusieurs lignées de cancers du sein. Elle serait impliquée dans le maintien du phénotype des bCSC et le potentiel métastatique des cellules cancéreuses (J.-H. Chen et al., 2019). On pourrait suggérer que la surexpression de cette cadhérine des ostéoblastes par les cellules mammaires pourrait favoriser le « homing » des cellules mammaires cancéreuses lors des disséminations métastatiques dans la moelle osseuse, sachant que la moelle osseuse est le site métastatique le plus fréquent pour les cancers du sein (Clements & Johnson, 2019). De plus en plus de preuves suggèrent que les processus de disséminations auraient lieu assez tôt dans les étapes de développement tumoral et un article a démontré que les cellules cancéreuses pouvaient produire des vésicules extracellulaires riche en cadhérine 11 et en intégrine  $\alpha 5$  permettant la formation d'une niche pré-métastatique facilitant la colonisation dans l'os (X.-Q. Li et al., 2022). Après validation de la dérégulation de la cadhérine 11 et des protocadhérines identifiées au niveau protéique, nous envisageons de tester une localisation préférentielles des cellules exposées à la combinaison BPS+BMP2/IL6 au niveau des ostéoblastes dans un modèle de moelle osseuse humaine *in vitro* développé au laboratoire (Voeltzel et al., 2022). Dans le même ordre d'idée, en présence de BMP2/IL6, le BPA et le BPS semble spécifiquement activer, par rapport à l'E2, des gènes impliqués dans la synthèse de l'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique est fortement surexprimé dans de nombreuses tumeurs, incluant celles du sein, et est un marqueur de mauvais pronostic. De plus, l'acide hyaluronique provenant des cellules tumorales est souvent de bas poids moléculaire et est impliqué dans l'inflammation, la croissance tumorale, l'angiogenèse et l'invasion. Au contraire de l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire qui est considéré anti-tumoral (Karalis, 2023). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que parmi les gènes dérégulés par le BPA ou le BPS, on retrouve aussi bien une hyaluronan synthase (HAS3) que des hyaluronidases (CEMIP et HYAL1), ce qui pourrait conduire à augmenter la quantité d'acide hyaluronique de bas poids moléculaire.

## Perspectives

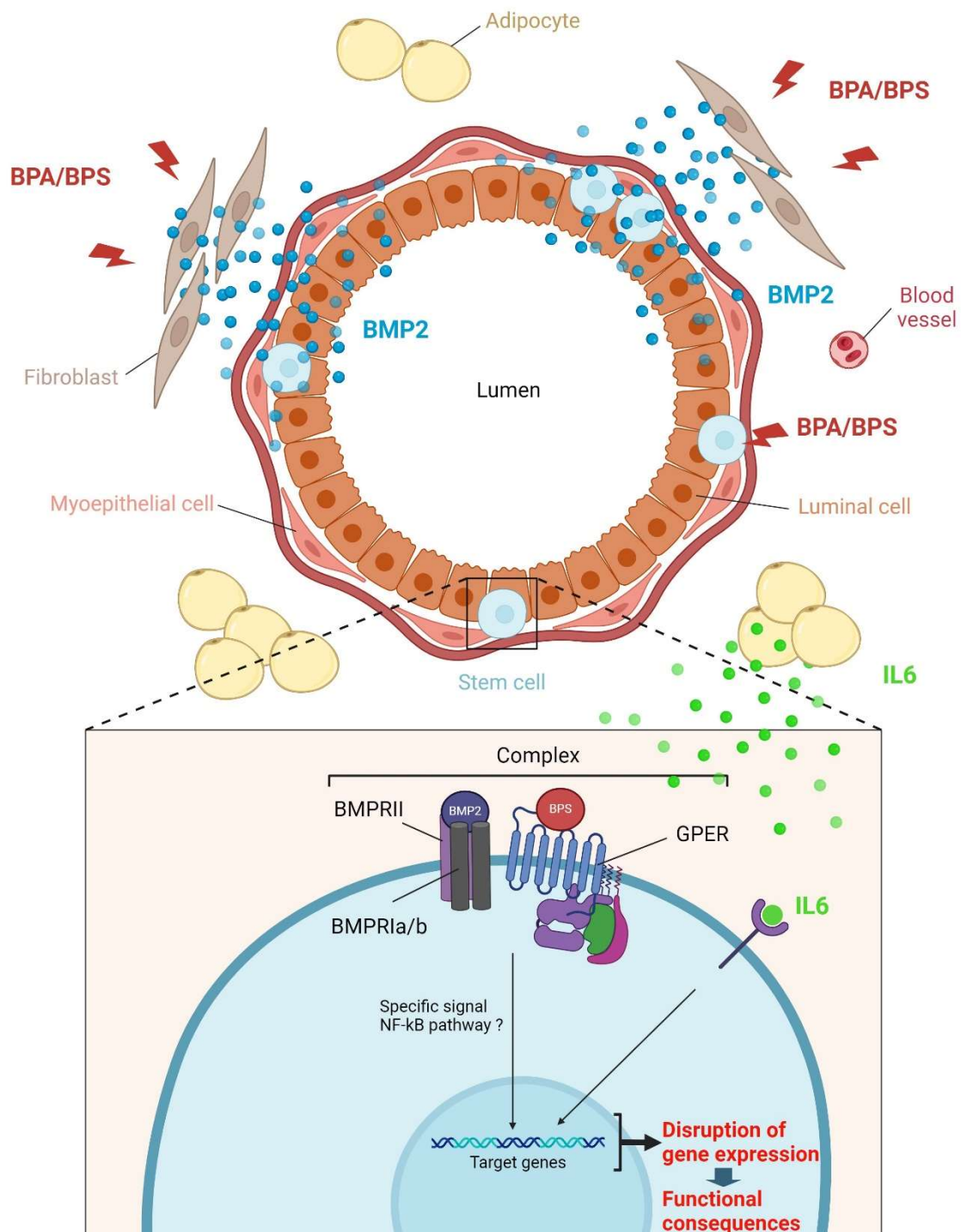
Collectivement, ces analyses suggèrent qu'en présence de BMP2/IL6, le BPS pourrait induire, et ce spécifiquement par rapport au BPA et à l'E2, des altérations largement considérées comme pro-tumorales. En effet, l'induction d'un phénotype inflammatoire est supportée par l'analyse du kinome avec l'activation de nombreuses kinases associées à la voie NF-kB. De plus, le BPS induit des modifications de l'expression de plusieurs molécules d'adhésion homotypiques, suggérant un potentiel changement des types cellulaires interagissant préférentiellement avec les cellules exposées, et pouvant modifier les tissus cibles lors d'une dissémination. Enfin, en commun avec le BPA, le BPS pourrait altérer la composition de la matrice extra-cellulaire via l'accumulation d'acide hyaluronique. Ces observations issues d'approches -omics restent descriptive et nécessiteront d'être confirmées par d'autres méthodes et validées en termes d'effets fonctionnels. Elles permettent toutefois de proposer l'hypothèse de travail que le BPS, dans un contexte de co-exposition avec BMP2/IL6, sans augmenter le processus de transformation *per se*, pourrait induire un contexte favorable à une transformation et/ou à une agressivité plus importante de cellules transformées par d'autres événements. Pour tester en partie cette hypothèse, il serait envisageable d'évaluer l'efficacité de la transformation induite par des événements oncogéniques (surexpression d'un oncogènes, agents génotoxiques...) de cellules exposées ou non à BPS+BMP2/IL6.

Concernant la problématique de l'évaluation des risques liées aux bisphénols, mon travail a permis de montrer qu'il était nécessaire de prendre en compte à la fois la complexité des types cellulaires ciblés par ces polluants et celle des voies de signalisation activées dans ces cellules, dont l'intégration avec celle des œstrogènes peut induire des conséquences moléculaires et fonctionnelles émergentes.

Ainsi, l'immense majorité des études sur les bisphénols sont focalisées sur leur action médiée par le récepteur ER $\alpha$ 66 dans des lignées cellulaires souvent transformées et exprimant ce dernier. Or chez la femme, seule une minorité de cellules mammaires, différenciées dans un phénotype luminal et dotée d'une durée de vie réduite, expriment ER $\alpha$ 66. Cette focalisation sur un seul récepteur des œstrogènes est illustrée par le remplacement du BPA par le BPS qui s'est fait sur la seule base d'une affinité réduite pour ER $\alpha$ 66. Il n'est pas question ici de remettre en cause l'intérêt d'étudier les effets des bisphénols médiés par ER $\alpha$ 66, dont

l'importance dans la biologie des cellules mammaires normales et transformées est incontestable. Je pense toutefois qu'il est indispensable de s'intéresser également aux effets des bisphénols dans d'autres types cellulaires exprimant d'autres récepteurs aux œstrogènes. Mon travail utilisant un modèle de cellules souches mammaires en est un exemple. Ce type cellulaire à longue durée de vie, le rendant particulièrement vulnérable à des expositions chroniques, n'exprime par le récepteur ER $\alpha$ 66 mais le récepteur des œstrogènes GPER (Henderson & Feigelson, 2000). Dans ce contexte, j'ai mis en évidence des effets spécifiques du BPS, probablement médiés par GPER, qui ne sont pas retrouvés avec l'E2 ou le BPA. Il restera nécessaire de réaliser des études dose/réponse pour confirmer une différence qualitative entre E2, BPA et BPS. Cela pourrait conduire à moduler la notion de composé œstrogénomimétique dans la mesure où le BPA et le BPS ont également des effets qui ne sont pas retrouvés avec l'E2. Par ailleurs, mon travail montre que dans le modèle cellulaire utilisé, les effets (en termes de transcriptomique, d'activité des kinases, de fréquence de mammosphères) les plus marqués de l'E2 et/ou des bisphénols sont retrouvés en présence d'une signalisation BMP2 ou BMP2/IL6. Cela suggère que la compréhension des effets des bisphénols dans un type cellulaire donné passe par la prise en compte de l'intégration des autres voies de signalisation qui peuvent y être activées. Dans le contexte des cellules souches mammaires et de leur transformation, les données du laboratoire montrent que la voie des BMP dans un contexte pro-inflammatoire est particulièrement pertinente (**Figure 28**).

En conclusion, la mise en évidence de la présence ou de l'absence de risques associés aux polluants environnementaux, dont les bisphénols, est une problématique de santé publique majeure. La résoudre nécessitera de prendre en compte la complexité des types cellulaires exposés, celle des interactions avec les autres voies de signalisation cellulaire et celle des conséquences fonctionnelles qui pourrait être subtiles mais toutefois favoriser la mise en place d'un environnement favorable à certaines pathologies comme le cancer.



**Figure 28. Schéma de conclusion représentant une coupe d'un canal de la glande mammaire ainsi que son microenvironnement.**

D'après les résultats précédemment obtenus au laboratoire, l'exposition au BPA ou au BPS peuvent entrainer une sécrétion dérégulée de BMP2 par les cellules stromales du microenvironnement mammaires (Chapellier et al., 2015). D'après la littérature, les adipocytes sont capables de sécréter de l'IL6 pouvant avoir une activité pro-tumorale et représentent aussi un lieu de stockage des bisphénols (Wolfson et al., 2015) (M. F. Fernandez et al., 2007). Tous ces signaux présents au niveau de la niche mammaire vont pouvoir impacter la régulation des cellules souches (en bleu). J'ai montré qu'au niveau de ces cellules, était présent des complexes impliquant les récepteurs BMPRIb et GPER. De plus, la fixation des ligands BMP2/BPS/IL6 étaient capables d'induire des régulations d'expression transcriptomiques et des voies de signalisations spécifiques non classiques comme une signalisation NF-Kb. Enfin, j'ai montré que ces dérégulations pouvaient conduire à des conséquences fonctionnelles

*sur les cellules souches, comme par exemple une augmentation de leur capacité à former des sphères lorsqu'elles sont exposées au BMP2/BPS.*

# Références

- Abouhamzeh, B., Zare, Z., Mohammadi, M., Moosazadeh, M., & Nourian, A. (2023). Bisphenol-S Influence on Oxidative Stress and Endocrine Biomarkers of Reproductive System : A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Preventive Medicine*, *14*(1), 37. [https://doi.org/10.4103/ijpvm.ijpvm\\_271\\_21](https://doi.org/10.4103/ijpvm.ijpvm_271_21)
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(7), 3983-3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- Alharbi, H. F., Algonaiman, R., Alduwayghiri, R., Aljutaily, T., Algheshairy, R. M., Almutairi, A. S., Alharbi, R. M., Alfurayh, L. A., Alshahwan, A. A., Alsadun, A. F., & Barakat, H. (2022). Exposure to Bisphenol A Substitutes, Bisphenol S and Bisphenol F, and Its Association with Developing Obesity and Diabetes Mellitus : A Narrative Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(23), 15918. <https://doi.org/10.3390/ijerph192315918>
- Ampuja, M., Jokimäki, R., Juuti-Uusitalo, K., Rodriguez-Martinez, A., Alarmo, E.-L., & Kallioniemi, A. (2013). BMP4 inhibits the proliferation of breast cancer cells and induces an MMP-dependent migratory phenotype in MDA-MB-231 cells in 3D environment. *BMC Cancer*, *13*, 429. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-429>
- 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., Prossnitz, E. R., Dun, N. J., & Jordan, V. C. (2010). The G Protein-Coupled Receptor GPR30 Inhibits Proliferation of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells. *Cancer research*, *70*(3), 1184-1194. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3068>
- 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., & Visvader, J. E. (2010). Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature*, *465*(7299), 798-802. <https://doi.org/10.1038/nature09027>
- Atashgaran, V., Wrin, J., Barry, S. C., Dasari, P., & Ingman, W. V. (2016). Dissecting the Biology of Menstrual Cycle-Associated Breast Cancer Risk. *Frontiers in Oncology*, *6*, 267. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00267>
- Atlas, E., & Dimitrova, V. (2019). Bisphenol S and Bisphenol A disrupt morphogenesis of MCF-12A human mammary epithelial cells. *Scientific Reports*, *9*, 16005. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52505-x>
- Babitt, J. L., Zhang, Y., Samad, T. A., Xia, Y., Tang, J., Campagna, J. A., Schneyer, A. L., Woolf, C. J., & Lin, H. Y. (2005). Repulsive Guidance Molecule (RGMa), a DRAGON Homologue, Is a Bone Morphogenetic Protein Co-receptor \*. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(33), 29820-29827. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503511200>
- Balakrishnan, B., Henare, K., Thorstensen, E. B., Ponnampalam, A. P., & Mitchell, M. D. (2010). Transfer of bisphenol A across the human placenta. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, *202*(4), 393.e1-393.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.01.025>
- Balboni, A. L., Hutchinson, J. A., DeCastro, A. J., Cherukuri, P., Liby, K., Sporn, M. B., Schwartz, G. N., Wells, W. A., Sempere, L. F., Yu, P. B., & DiRenzo, J. (2013).  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -mediated activation of bone morphogenetic protein signaling governs stem cell activity and plasticity in normal and malignant mammary epithelial cells. *Cancer Research*, *73*(2), 1020-1030. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2862>
- Barańska, A., Błaszczuk, A., Kanadys, W., Malm, M., Drop, K., & Polz-Dacewicz, M. (2021). Oral Contraceptive Use and Breast Cancer Risk Assessment : A Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control Studies, 2009–2020. *Cancers*, *13*(22), 5654. <https://doi.org/10.3390/cancers13225654>

- Bhatia, M., Bonnet, D., Wu, D., Murdoch, B., Wrana, J., Gallacher, L., & Dick, J. E. (1999). Bone Morphogenetic Proteins Regulate the Developmental Program of Human Hematopoietic Stem Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *189*(7), 1139-1148.
- Bisphénol A. (2017, octobre 12). Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. <https://www.anses.fr/fr/content/bisph%C3%A9nol>
- Boehm, J. S., Zhao, J. J., Yao, J., Kim, S. Y., Firestein, R., Dunn, I. F., Sjostrom, S. K., Garraway, L. A., Weremowicz, S., Richardson, A. L., Greulich, H., Stewart, C. J., Mulvey, L. A., Shen, R. R., Ambrogio, L., Hirozane-Kishikawa, T., Hill, D. E., Vidal, M., Meyerson, M., ... Hahn, W. C. (2007). Integrative Genomic Approaches Identify IKBKE as a Breast Cancer Oncogene. *Cell*, *129*(6), 1065-1079. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.052>
- Bordukalo-Nikšić, T., Kufner, V., & Vukičević, S. (2022). The Role Of BMPs in the Regulation of Osteoclasts Resorption and Bone Remodeling : From Experimental Models to Clinical Applications. *Frontiers in Immunology*, *13*, 869422. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.869422>
- Boucher, J. G., Boudreau, A., Ahmed, S., & Atlas, E. (2015). In Vitro Effects of Bisphenol A  $\beta$ -D-Glucuronide (BPA-G) on Adipogenesis in Human and Murine Preadipocytes. *Environmental Health Perspectives*, *123*(12), 1287-1293. <https://doi.org/10.1289/ehp.1409143>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *74*(3), 229-263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- 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., Hartman, L., Fernö, M., & Leeb-Lundberg, L. M. F. (2013). G protein-coupled estrogen receptor is apoptotic and correlates with increased distant disease-free survival of estrogen receptor-positive breast cancer patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *19*(7), 1681-1692. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2376>
- Buijs, J. T., van der Horst, G., van den Hoogen, C., Cheung, H., de Rooij, B., Kroon, J., Petersen, M., van Overveld, P. G. M., Pelger, R. C. M., & van der Pluijm, G. (2012). The BMP2/7 heterodimer inhibits the human breast cancer stem cell subpopulation and bone metastases formation. *Oncogene*, *31*(17), 2164-2174. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.400>
- Cao, Y., Slaney, C. Y., Bidwell, B. N., Parker, B. S., Johnstone, C. N., Rautela, J., Eckhardt, B. L., & Anderson, R. L. (2014). BMP4 Inhibits Breast Cancer Metastasis by Blocking Myeloid-Derived Suppressor Cell Activity. *Cancer Research*, *74*(18), 5091-5102. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3171>
- Carmeci, C., Thompson, D. A., Ring, H. Z., Francke, U., & 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*(3), 607-617. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4972>
- Carwile, J. L., Ye, X., Zhou, X., Calafat, A. M., & Michels, K. B. (2011). Canned Soup Consumption and Urinary Bisphenol A: A Randomized Crossover Trial. *Jama*, *306*(20), 2218-2220. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1721>
- Chan, Y., Lai, A. C. -Y., Lin, R., Wang, Y., Wang, Y., Chang, W., Wu, H., Lin, Y., Chang, W., Wu, J., Yu, J., Chen, Y., & Yu, A. L. (2020a). GPER-induced signaling is essential for the survival of breast cancer stem cells. *International Journal of Cancer*, *146*(6), 1674-1685. <https://doi.org/10.1002/ijc.32588>



- Chapellier, M., Bachelard-Cascales, E., Schmidt, X., Clément, F., Treilleux, I., Delay, E., Jammot, A., Ménétrier-Caux, C., Pochon, G., Besançon, R., Voeltzel, T., Caron de Fromentel, C., Caux, C., Blay, J.-Y., Iggo, R., & Maguer-Satta, V. (2015a). Disequilibrium of BMP2 Levels in the Breast Stem Cell Niche Launches Epithelial Transformation by Overamplifying BMPR1B Cell Response. *Stem Cell Reports*, *4*(2), 239-254. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.12.007>
- Chen, J.-H., Huang, W.-C., Bamodu, O. A., Chang, P. M.-H., Chao, T.-Y., & Huang, T.-H. (2019). Monospecific antibody targeting of CDH11 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and represses cancer stem cell-like phenotype by up-regulating miR-335 in metastatic breast cancer, in vitro and in vivo. *BMC Cancer*, *19*, 634. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5811-1>
- 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., & Wang, H.-S. (2016). Activation of GPER suppresses epithelial mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells via NF- $\kappa$ B signals. *Molecular Oncology*, *10*(6), 775-788. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.002>
- Cheng, S.-B., Graeber, C. T., Quinn, J. A., & Filardo, E. J. (2011). Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus. *Steroids*, *76*(9), 892-896. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.02.018>
- Cheung, C. P., Yu, S., Wong, K. B., Chan, L. W., Lai, F. M. M., Wang, X., Suetsugi, M., Chen, S., & Chan, F. L. (2005). Expression and functional study of estrogen receptor-related receptors in human prostatic cells and tissues. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *90*(3), 1830-1844. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1421>
- Chi, L. H., Burrows, A. D., & Anderson, R. L. (2019a). Bone morphogenetic protein signaling in breast cancer progression. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, *37*(1-2), 12-28. <https://doi.org/10.1080/08977194.2019.1626378>
- Cho, K.-W., Kim, J.-Y., Song, S.-J., Farrell, E., Eblaghie, M. C., Kim, H.-J., Tickle, C., & Jung, H.-S. (2006). Molecular interactions between Tbx3 and Bmp4 and a model for dorsoventral positioning of mammary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(45), 16788-16793. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604645103>
- Choi, S., Yu, J., Park, A., Dubon, M. J., Do, J., Kim, Y., Nam, D., Noh, J., & Park, K.-S. (2019). BMP-4 enhances epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell properties of breast cancer cells via Notch signaling. *Scientific Reports*, *9*, 11724. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48190-5>
- Chua, H. L., Bhat-Nakshatri, P., Clare, S. E., Morimiya, A., Badve, S., & Nakshatri, H. (2007). NF- $\kappa$ B represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: Potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene*, *26*(5), 711-724. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209808>
- Clements, M. E., & Johnson, R. W. (2019). Breast Cancer Dormancy in Bone. *Current osteoporosis reports*, *17*(5), 353-361. <https://doi.org/10.1007/s11914-019-00532-y>
- Dairkee, S. H., Luciani-Torres, M. G., Moore, D. H., & Goodson, W. H. (2013). Bisphenol-A-induced inactivation of the p53 axis underlying deregulation of proliferation kinetics, and cell death in non-malignant human breast epithelial cells. *Carcinogenesis*, *34*(3), 703-712. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs379>
- Daniel, C. W., De Ome, K. B., Young, J. T., Blair, P. B., & Faulkin, L. J. (1968). The in vivo life span of normal and preneoplastic mouse mammary glands : A serial transplantation study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *61*(1), 53-60.
- Davis, F. M., Lloyd-Lewis, B., Harris, O. B., Kozar, S., Winton, D. J., Muresan, L., & Watson, C. J. (2016). Single-cell lineage tracing in the mammary gland reveals stochastic clonal dispersion of

- stem/progenitor cell progeny. *Nature Communications*, 7, 13053. <https://doi.org/10.1038/ncomms13053>
- De Francesco, E. M., Sims, A. H., Maggiolini, M., Sotgia, F., Lisanti, M. P., & Clarke, R. B. (2017). GPER mediates the angiocrine actions induced by IGF1 through the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway in the breast tumor microenvironment. *Breast Cancer Research: BCR*, 19, 129. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0923-5>
- Deng, Q., Jiang, G., Wu, Y., Li, J., Liang, W., Chen, L., Su, Q., Li, W., Du, J., Wong, C. K. C., Chen, Z., & Wang, H. (2018). GPER/Hippo-YAP signal is involved in Bisphenol S induced migration of triple negative breast cancer (TNBC) cells. *Journal of Hazardous Materials*, 355, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.05.013>
- Dong, P., Ye, G., Tu, X., Luo, Y., Cui, W., Ma, Y., Wei, L., Tian, X., & Wang, Q. (2022). Roles of ERR $\alpha$  and TGF- $\beta$  signaling in stemness enhancement induced by 1  $\mu$ M bisphenol A exposure via human neural stem cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 23(2), 164. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.11087>
- Dong, S., Terasaka, S., & Kiyama, R. (2011). Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environmental Pollution*, 159(1), 212-218. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.004>
- Dravis, C., Chung, C.-Y., Lytle, N. K., Herrera-Valdez, J., Luna, G., Trejo, C. L., Reya, T., & Wahl, G. M. (2018). Epigenetic and transcriptomic profiling of mammary gland development and tumor models disclose regulators of cell state plasticity. *Cancer cell*, 34(3), 466-482.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.08.001>
- Durando, M., Kass, L., Piva, J., Sonnenschein, C., Soto, A. M., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2007). Prenatal Bisphenol A Exposure Induces Preneoplastic Lesions in the Mammary Gland in Wistar Rats. *Environmental Health Perspectives*, 115(1), 80-86. <https://doi.org/10.1289/ehp.9282>
- El Helou, R., Pinna, G., Cabaud, O., Wicinski, J., Bhajun, R., Guyon, L., Rioualen, C., Finetti, P., Gros, A., Mari, B., Barbry, P., Bertucci, F., Bidaut, G., Harel-Bellan, A., Birnbaum, D., Charafe-Jauffret, E., & Ginestier, C. (2017). miR-600 Acts as a Bimodal Switch that Regulates Breast Cancer Stem Cell Fate through WNT Signaling. *Cell Reports*, 18(9), 2256-2268. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.016>
- Fang, Z., Wang, Q., Duan, H., Sheng, X., Qi, X., Xing, K., Liu, B., Chang, D., Guo, Y., Wang, X., & Xiao, L. (2024). 17 $\beta$ -Estradiol mediates TGFBR3/Smad2/3 signaling to attenuate the fibrosis of TGF- $\beta$ 1-induced bovine endometrial epithelial cells via GPER. *Journal of Cellular Physiology*, 239(1), e31153. <https://doi.org/10.1002/jcp.31153>
- Fauconnier, M.-B., Albert, C., Tondreau, A., Maumy, L., Rouzier, R., & Bonneau, C. (2023). Bisphénol A et cancer du sein : État des lieux des connaissances et méta-analyse. *Bulletin du Cancer*, 110(2), 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2022.11.011>
- Fernandez, M. F., Arrebola, J. P., Taoufiki, J., Navalón, A., Ballesteros, O., Pulgar, R., Vilchez, J. L., & Olea, N. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 259-264. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.06.007>
- Fernandez, S. V., & Russo, J. (2010). Estrogen and Xenoestrogens in Breast Cancer. *Toxicologic pathology*, 38(1), 110-122. <https://doi.org/10.1177/0192623309354108>
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I., & Frackelton, A. R., Jr. (2000). Estrogen-Induced Activation of Erk-1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and Occurs via Trans-Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology*, 14(10), 1649-1660. <https://doi.org/10.1210/mend.14.10.0532>

- Fong, Y.-C., Li, T.-M., Wu, C.-M., Hsu, S.-F., Kao, S.-T., Chen, R.-J., Lin, C.-C., Liu, S.-C., Wu, C.-L., & Tang, C.-H. (2008). BMP-2 increases migration of human chondrosarcoma cells via PI3K/Akt pathway. *Journal of Cellular Physiology*, *217*(3), 846-855. <https://doi.org/10.1002/jcp.21568>
- Forsman, C. L., Ng, B. C., Heinze, R. K., Kuo, C., Sergi, C., Gopalakrishnan, R., Yee, D., Graf, D., Schwertfeger, K. L., & Petryk, A. (2013). BMP-binding protein Twisted gastrulation is required in mammary gland epithelium for normal ductal elongation and myoepithelial compartmentalization. *Developmental biology*, *373*(1), 95-106. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.10.007>
- Fu, L., Cui, C.-P., Zhang, X., & Zhang, L. (2020). The functions and regulation of Smurfs in cancers. *Seminars in Cancer Biology*, *67*, 102-116. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.12.023>
- Gao, F., Ma, X., Ostmann, A. B., & Das, S. K. (2011). GPR30 Activation Opposes Estrogen-Dependent Uterine Growth via Inhibition of Stromal ERK1/2 and Estrogen Receptor Alpha (ER $\alpha$ ) Phosphorylation Signals. *Endocrinology*, *152*(4), 1434-1447. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1368>
- Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J.-P., Goeyens, L., Lecomte, P., Maghuin-Rogister, G., Pironnet, A.-M., Pussemier, L., Scippo, M.-L., Van Loco, J., & Covaci, A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(10), 3725-3740. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.059>
- Geens, T., Roosens, L., Neels, H., & Covaci, A. (2009). Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere*, *76*(6), 755-760. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.05.024>
- Giguère, V., Yang, N., Segui, P., & Evans, R. M. (1988). Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature*, *331*(6151), 91-94. <https://doi.org/10.1038/331091a0>
- Girgert, R., Emons, G., & Gründker, C. (2019). Estrogen Signaling in ER $\alpha$ -Negative Breast Cancer : ER $\beta$  and GPER. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 781. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00781>
- Gramec Skledar, D., & Peterlin Mašič, L. (2016). Bisphenol A and its analogs : Do their metabolites have endocrine activity? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *47*, 182-199. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.014>
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.-M., Argos, P., & Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA : Sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, *320*(6058), 134-139. <https://doi.org/10.1038/320134a0>
- Hamilton, D. J., Minze, L. J., Kumar, T., Cao, T. N., Lyon, C. J., Geiger, P. C., Hsueh, W. A., & Gupte, A. A. (2016). Estrogen receptor alpha activation enhances mitochondrial function and systemic metabolism in high-fat-fed ovariectomized mice. *Physiological Reports*, *4*(17), e12913. <https://doi.org/10.14814/phy2.12913>
- Hannan, F. M., Elajnaf, T., Vandenberg, L. N., Kennedy, S. H., & Thakker, R. V. (2023). Hormonal regulation of mammary gland development and lactation. *Nature Reviews. Endocrinology*, *19*(1), 46-61. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00742-y>
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, *5*(1), 1-31. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Hartman, J., Ström, A., & Gustafsson, J.-Å. (2009). Estrogen receptor beta in breast cancer—Diagnostic and therapeutic implications. *Steroids*, *74*(8), 635-641. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.02.005>
- Hassel, S., Schmitt, S., Hartung, A., Roth, M., Nohe, A., Petersen, N., Ehrlich, M., Henis, Y. I., Sebald, W., & Knaus, P. (2003). Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct

- BMP-receptor complexes. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 85-A Suppl 3, 44-51. <https://doi.org/10.2106/00004623-200300003-00009>
- Hayashi, Y., Nakayama, J., Yamamoto, M., Maekawa, M., Watanabe, S., Higashiyama, S., Inoue, J., Yamamoto, Y., & Semba, K. (2023). Aberrant accumulation of NIK promotes tumor growth by dysregulating translation and post-translational modifications in breast cancer. *Cancer Cell International*, 23, 57. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-02904-y>
- Hebbard, L., Maurer, J., Miller, A., Lesperance, J., Hassell, J., Oshima, R. G., & Terskikh, A. (2010). MELK is Upregulated and Required in Mammary Tumor Initiating Cells In Vivo. *Cancer research*, 70(21), 8863-8873. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1295>
- Henderson, B. E., & Feigelson, H. S. (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(3), 427-433. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.427>
- Hens, J., Dann, P., Hiremath, M., Pan, T.-C., Chodosh, L., & 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. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 238(11), 2713-2724. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22097>
- Hens, J. R., Dann, P., Zhang, J.-P., Harris, S., Robinson, G. W., & Wysolmerski, J. (2007). BMP4 and PTHrP interact to stimulate ductal outgrowth during embryonic mammary development and to inhibit hair follicle induction. *Development*, 134(6), 1221-1230. <https://doi.org/10.1242/dev.000182>
- Hens, J. R., & Wysolmerski, J. J. (2005). Key stages of mammary gland development : Molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast Cancer Research*, 7(5), 220-224. <https://doi.org/10.1186/bcr1306>
- Hirao-Suzuki, M., Takiguchi, M., Yoshihara, S., & Takeda, S. (2023). Repeated exposure to 4-methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene (MBP) accelerates ligand-independent activation of estrogen receptors in long-term estradiol-deprived MCF-7 cells. *Toxicology Letters*, 378, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2023.02.008>
- Hiremath, M., & Wysolmerski, J. (2013). Parathyroid Hormone-Related Protein Specifies the Mammary Mesenchyme and Regulates Embryonic Mammary Development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 18(2), 171-177. <https://doi.org/10.1007/s10911-013-9283-7>
- Hong, Y.-P., Yang, Y.-J., Hong, Y.-P., & Yang, Y.-J. (2017). Low-Dose Exposure to Bisphenol A in Early Life. In *Bisphenol A Exposure and Health Risks*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68428>
- Howard, B. A., & Gusterson, B. A. (2000). Human breast development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 5(2), 119-137. <https://doi.org/10.1023/a:1026487120779>
- Hsu, L.-H., Chu, N.-M., Lin, Y.-F., & Kao, S.-H. (2019). G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 306. <https://doi.org/10.3390/ijms20020306>
- Huang, P., Chen, A., He, W., Li, Z., Zhang, G., Liu, Z., Liu, G., Liu, X., He, S., Xiao, G., Huang, F., Stenvang, J., Br nner, N., Hong, A., & Wang, J. (2017). BMP-2 induces EMT and breast cancer stemness through Rb and CD44. *Cell Death Discovery*, 3, 17039. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.39>
- Huang, W., Zhao, C., Zhong, H., Zhang, S., Xia, Y., & Cai, Z. (2019). Bisphenol S induced epigenetic and transcriptional changes in human breast cancer cell line MCF-7. *Environmental Pollution*, 246, 697-703. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.084>
- Ignatov, A., Ignatov, T., Wei enborn, C., Eggemann, H., Bischoff, J., Semczuk, A., Roessner, A., Costa, S. D., & Kalinski, T. (2011). G-protein-coupled estrogen receptor GPR30 and tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 128(2), 457-466. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1584-1>

- Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., & Struhl, K. (2009). An epigenetic switch involving NF- $\kappa$ B, Lin28, let-7 microRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell*, *139*(4), 693-706. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.014>
- Inman, J. L., Robertson, C., Mott, J. D., & Bissell, M. J. (2015). Mammary gland development : Cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development*, *142*(6), 1028-1042. <https://doi.org/10.1242/dev.087643>
- Jacenic, D., Cygankiewicz, A. I., & Krajewska, W. M. (2016). The G protein-coupled estrogen receptor as a modulator of neoplastic transformation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *429*, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.04.011>
- Javed, A., & Lteif, A. (2013). Development of the human breast. *Seminars in Plastic Surgery*, *27*(1), 5-12. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1343989>
- Jeanpierre, S., Nicolini, F. E., Kaniewski, B., Dumontet, C., Rimokh, R., Puisieux, A., & Maguer-Satta, V. (2008). BMP4 regulation of human megakaryocytic differentiation is involved in thrombopoietin signaling. *Blood*, *112*(8), 3154-3163. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-145326>
- Jenkins, S., Wang, J., Eltoum, I., Desmond, R., & 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. *Environmental Health Perspectives*, *119*(11), 1604-1609. <https://doi.org/10.1289/ehp.1103850>
- Jia, Y., Sun, R., Ding, X., Cao, C., & Yang, X. (2018). Bisphenol S Triggers the Migration and Invasion of Pheochromocytoma PC12 Cells via Estrogen-Related Receptor  $\alpha$ . *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, *66*(2), 188-196. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1148-5>
- Jung, S., Wang, M., Anderson, K., Baglietto, L., Bergkvist, L., Bernstein, L., van den Brandt, P. A., Brinton, L., Buring, J. E., Heather Eliassen, A., Falk, R., Gapstur, S. M., Giles, G. G., Goodman, G., Hoffman-Bolton, J., Horn-Ross, P. L., Inoue, M., Kolonel, L. N., Krogh, V., ... Smith-Warner, S. A. (2016). Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status : In a pooled analysis of 20 studies. *International Journal of Epidemiology*, *45*(3), 916-928. <https://doi.org/10.1093/ije/dyv156>
- Karalis, T. (2023). Targeting Hyaluronan Synthesis in Cancer : A Road Less Travelled. *Biologics*, *3*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/biologics3040022>
- Kasper, M., Jaks, V., Fiaschi, M., & Toftgård, R. (2009). Hedgehog signalling in breast cancer. *Carcinogenesis*, *30*(6), 903-911. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp048>
- Katagiri, T., & Watabe, T. (2016a). Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(6), a021899. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021899>
- Khan, N. G., Correia, J., Adiga, D., Rai, P. S., Dsouza, H. S., Chakrabarty, S., & Kabekkodu, S. P. (2021). A comprehensive review on the carcinogenic potential of bisphenol A : Clues and evidence. *Environmental Science and Pollution Research International*, *28*(16), 19643-19663. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13071-w>
- Khongthong, P., Roseweir, A. K., & Edwards, J. (2019). The NF-KB pathway and endocrine therapy resistance in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, *26*(6), R369-R380. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0087>
- Kim, J.-Y., Choi, H.-G., Lee, H.-M., Lee, G.-A., Hwang, K.-A., & Choi, K.-C. (2017). Effects of bisphenol compounds on the growth and epithelial mesenchymal transition of MCF-7 CV human breast cancer cells. *Journal of Biomedical Research*, *31*(4), 358-369. <https://doi.org/10.7555/JBR.31.20160162>

- Kirsch, T., Nickel, J., & Sebald, W. (2000). BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *The EMBO Journal*, *19*(13), 3314-3324. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3314>
- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L., & Feldman, D. (1993). Bisphenol-A : An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, *132*(6), 2279-2286. <https://doi.org/10.1210/endo.132.6.8504731>
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., & Gustafsson, J. A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(12), 5925-5930.
- Kuruto-Niwa, R., Nozawa, R., Miyakoshi, T., Shiozawa, T., & Terao, Y. (2005). Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *19*(1), 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.05.009>
- Kwon, Y. (2022). Potential Pro-Tumorigenic Effect of Bisphenol A in Breast Cancer via Altering the Tumor Microenvironment. *Cancers*, *14*(12), 3021. <https://doi.org/10.3390/cancers14123021>
- Lakhani, S. R., Chaggar, R., Davies, S., Jones, C., Collins, N., Odel, C., Stratton, M. R., & O'Hare, M. J. (1999). Genetic alterations in 'normal' luminal and myoepithelial cells of the breast. *The Journal of Pathology*, *189*(4), 496-503. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199912\)189:4<496::AID-PATH485>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199912)189:4<496::AID-PATH485>3.0.CO;2-D)
- Lehmann, B. D., Colaprico, A., Silva, T. C., Chen, J., An, H., Ban, Y., Huang, H., Wang, L., James, J. L., Balko, J. M., Gonzalez-Ericsson, P. I., Sanders, M. E., Zhang, B., Pietenpol, J. A., & Chen, X. S. (2021). Multi-omics analysis identifies therapeutic vulnerabilities in triple-negative breast cancer subtypes. *Nature Communications*, *12*(1), 6276. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26502-6>
- Li, Q., Wu, L., Oelschlager, D. K., Wan, M., Stockard, C. R., Grizzle, W. E., Wang, N., Chen, H., Sun, Y., & Cao, X. (2005). Smad4 Inhibits Tumor Growth by Inducing Apoptosis in Estrogen Receptor- $\alpha$ -positive Breast Cancer Cells \*. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(29), 27022-27028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505071200>
- Li, X.-Q., Zhang, R., Lu, H., Yue, X.-M., & Huang, Y.-F. (2022). Extracellular Vesicle-Packaged CDH11 and ITGA5 Induce the Premetastatic Niche for Bone Colonization of Breast Cancer Cells. *Cancer Research*, *82*(8), 1560-1574. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-1331>
- Li, Y.-C., Ding, X.-S., Li, H.-M., Zhang, Y., & Bao, J. (2014). Role of G protein-coupled estrogen receptor 1 in modulating transforming growth factor- $\beta$  stimulated mesangial cell extracellular matrix synthesis and migration. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *391*(1), 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.04.014>
- Li, Z., & Chen, Y.-G. (2013). Functions of BMP signaling in embryonic stem cell fate determination. *Experimental Cell Research*, *319*(2), 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.09.016>
- Lian, W.-J., Liu, G., Liu, Y.-J., Zhao, Z.-W., Yi, T., & Zhou, H.-Y. (2013). Downregulation of BMP6 enhances cell proliferation and chemoresistance via activation of the ERK signaling pathway in breast cancer. *Oncology Reports*, *30*(1), 193-200. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2462>
- Lieberherr, M., Grosse, B., Kachkache, M., & Balsan, S. (1993). Cell signaling and estrogens in female rat osteoblasts : A possible involvement of unconventional nonnuclear receptors. *Journal of Bone and Mineral Research*, *8*(11), 1365-1376. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650081111>
- 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., Feleppa, F., Huschtscha, L. I., Thorne, H. J., Fox, S. B., Yan, M., French, J. D., Brown, M. A., Smyth, G. K., Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature Medicine*, *15*(8), 907-913. <https://doi.org/10.1038/nm.2000>

- Liu, G., Cai, W., Liu, H., Jiang, H., Bi, Y., & Wang, H. (2021). The Association of Bisphenol A and Phthalates with Risk of Breast Cancer : A Meta-Analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*, 2375. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052375>
- Liu, H., Wen, T., Zhou, Y., Fan, X., Du, T., Gao, T., Li, L., Liu, J., Yang, L., Yao, J., Ge, Y., & An, G. (2019). DCLK1 Plays a Metastatic-Promoting Role in Human Breast Cancer Cells. *BioMed Research International*, *2019*, 1061979. <https://doi.org/10.1155/2019/1061979>
- Liu, S., Cong, Y., Wang, D., Sun, Y., Deng, L., Liu, Y., Martin-Trevino, R., Shang, L., McDermott, S. P., Landis, M. D., Hong, S., Adams, A., D'Angelo, R., Ginestier, C., Charafe-Jauffret, E., Clouthier, S. G., Birnbaum, D., Wong, S. T., Zhan, M., ... Wicha, M. S. (2014). Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports*, *2*(1), 78-91. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.009>
- Lu, Q., Feng, H., Chen, H., Weygant, N., Du, J., Yan, Z., & Cao, Z. (2022). Role of DCLK1 in oncogenic signaling (Review). *International Journal of Oncology*, *61*(5), 1-12. <https://doi.org/10.3892/ijo.2022.5427>
- Luo, W., Jin, Y., Jiang, Y., Yang, L., Xu, H., Wu, D., Zhang, Y., Yin, L., Khan, Z. A., Liang, G., & Wang, Y. (2023). Doublecortin-like kinase 1 activates NF- $\kappa$ B to induce inflammatory responses by binding directly to IKK $\beta$ . *Cell Death and Differentiation*, *30*(5), 1184-1197. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01147-8>
- Macias, H., & Hinck, L. (2012a). Mammary Gland Development. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, *1*(4), 533-557. <https://doi.org/10.1002/wdev.35>
- Madeo, A., & Maggiolini, M. (2010). Nuclear Alternate Estrogen Receptor GPR30 Mediates 17 $\beta$ -Estradiol-Induced Gene Expression and Migration in Breast Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Research*, *70*(14), 6036-6046. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0408>
- Maguer-Satta, V., Bartholin, L., Jeanpierre, S., Ffrench, M., Martel, S., Magaud, J.-P., & Rimokh, R. (2003). Regulation of human erythropoiesis by activin A, BMP2, and BMP4, members of the TGF $\beta$  family. *Experimental Cell Research*, *282*(2), 110-120. [https://doi.org/10.1016/s0014-4827\(02\)00013-7](https://doi.org/10.1016/s0014-4827(02)00013-7)
- Maiti, K., Paul, J. W., Read, M., Chan, E. C., Riley, S. C., Nahar, P., & Smith, R. (2011). G-1-Activated Membrane Estrogen Receptors Mediate Increased Contractility of the Human Myometrium. *Endocrinology*, *152*(6), 2448-2455. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0979>
- Marjon, N. A., Hu, C., Hathaway, H. J., & Prossnitz, E. R. (2014). G protein-coupled estrogen receptor (GPER) regulates mammary tumorigenesis and metastasis. *Molecular cancer research : MCR*, *12*(11), 1644-1654. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0128-T>
- Matthews, J. B., Twomey, K., & 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. *Chemical Research in Toxicology*, *14*(2), 149-157. <https://doi.org/10.1021/tx0001833>
- McCready, J., Arendt, L. M., Rudnick, J. A., & Kuperwasser, C. (2010). The contribution of dynamic stromal remodeling during mammary development to breast carcinogenesis. *Breast Cancer Research : BCR*, *12*(3), 205. <https://doi.org/10.1186/bcr2578>
- Menarche, menopause, and breast cancer risk : Individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. (2012a). *The Lancet. Oncology*, *13*(11), 1141-1151. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70425-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70425-4)
- Monneret, C. (2017). What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus. Biologies*, *340*(9-10), 403-405. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.004>
- Moon, H. J., Shin, H. S., Lee, S. H., Hong, E.-J., Ahn, C., Yoo, Y.-M., Jeung, E.-B., Lee, G.-S., An, B.-S., & Jung, E.-M. (s. d.). Effects of prenatal bisphenol S and bisphenol F exposure on behavior of

- offspring mice. *Animal Cells and Systems*, 27(1), 260-271. <https://doi.org/10.1080/19768354.2023.2264905>
- Muduli, K., Prusty, M., Pradhan, J., Samal, A. P., Sahu, B., Roy, D. S., Reddy, K. S., & Elangovan, S. (2023). Estrogen-Related Receptor Alpha (ERR $\alpha$ ) Promotes Cancer Stem Cell-Like Characteristics in Breast Cancer. *Stem Cell Reviews and Reports*, 19(8), 2807-2819. <https://doi.org/10.1007/s12015-023-10605-2>
- Mueller, T. D. (2015). RGM co-receptors add complexity to BMP signaling. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(6), 439-440. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3037>
- Munguia-Lopez, E. M., & Soto-Valdez, H. (2001). Effect of Heat Processing and Storage Time on Migration of Bisphenol A (BPA) and Bisphenol A-Diglycidyl Ether (BADGE) to Aqueous Food Simulant from Mexican Can Coatings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3666-3671. <https://doi.org/10.1021/jf0009044>
- Ndaw, S., Remy, A., Jargot, D., & Robert, A. (2016). Occupational exposure of cashiers to Bisphenol A via thermal paper : Urinary biomonitoring study. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 89, 935-946. <https://doi.org/10.1007/s00420-016-1132-8>
- Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., & Gustafsson, J.-Å. (2001). Mechanisms of Estrogen Action. *Physiological Reviews*, 81(4), 1535-1565. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.4.1535>
- Núñez-Ríos, J. D., Ulrich, H., Díaz-Muñoz, M., Lameu, C., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2023). Purinergic system in cancer stem cells. *Purinergic Signalling*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11302-023-09976-5>
- Obeagu, E. I., & Obeagu, G. U. (2024). Breast cancer : A review of risk factors and diagnosis. *Medicine*, 103(3), e36905. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000036905>
- Ong, D. B., Colley, S. M., Norman, M. R., Kitazawa, S., & Tobias, J. H. (2004). Transcriptional Regulation of a BMP-6 Promoter by Estrogen Receptor  $\alpha$ . *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(3), 447-454. <https://doi.org/10.1359/JBMR.0301249>
- Onichtchouk, D., Chen, Y. G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massagué, J., & Niehrs, C. (1999). Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, 401(6752), 480-485. <https://doi.org/10.1038/46794>
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G. G. J. M., Nilsson, S., Gustafsson, J.-Å., Kushner, P. J., & Scanlan, T. S. (1997). Differential Ligand Activation of Estrogen Receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 Sites. *Science*, 277(5331), 1508-1510. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1508>
- Pei, L., Li, Y., Gu, H., Wang, S., Wu, W., Fan, S., Shi, X., & Si, X. (2024). Identification of SMC2 and SMC4 as prognostic markers in breast cancer through bioinformatics analysis. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. <https://doi.org/10.1007/s12094-024-03521-5>
- Phippard, D. J., Weber-Hall, S. J., Sharpe, P. T., Naylor, M. S., Jayatalake, H., Maas, R., Woo, I., Roberts-Clark, D., Francis-West, P. H., Liu, Y.-H., Maxson, R., Hill, R. E., & Dale, T. C. (1996). Regulation of Msx-1, Msx-2, Bmp-2 and Bmp-4 during foetal and postnatal mammary gland development. *Development*, 122(9), 2729-2737. <https://doi.org/10.1242/dev.122.9.2729>
- Pottenger, L. H., Domoradzki, J. Y., Markham, D. A., Hansen, S. C., Cagen, S. Z., & Waechter, J. M., Jr. (2000). The Relative Bioavailability and Metabolism of Bisphenol A in Rats Is Dependent upon the Route of Administration. *Toxicological Sciences*, 54(1), 3-18. <https://doi.org/10.1093/toxsci/54.1.3>
- Pouliot, F., & Labrie, C. (2002). Role of Smad1 and Smad4 proteins in the induction of p21WAF1,Cip1 during bone morphogenetic protein-induced growth arrest in human breast cancer cells. *The Journal of Endocrinology*, 172(1), 187-198. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1720187>



- Presunto, M., Mariana, M., Lorigo, M., & Cairrao, E. (2023). The Effects of Bisphenol A on Human Male Infertility : A Review of Current Epidemiological Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12417. <https://doi.org/10.3390/ijms241512417>
- Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2023). The G protein-coupled oestrogen receptor GPER in health and disease : An update. *Nature Reviews. Endocrinology*, 19(7), 407-424. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00822-7>
- Pupo, M., Pisano, A., Lappano, R., Santolla, M. F., De Francesco, E. M., Abonante, S., Rosano, C., & Maggiolini, M. (2012). Bisphenol A Induces Gene Expression Changes and Proliferative Effects through GPER in Breast Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts. *Environmental Health Perspectives*, 120(8), 1177-1182. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104526>
- Raida, M., Clement, J. H., Ameri, K., Han, C., Leek, R. D., & Harris, A. L. (2005). Expression of bone morphogenetic protein 2 in breast cancer cells inhibits hypoxic cell death. *International Journal of Oncology*, 26(6), 1465-1470.
- Reproduction et environnement.* (s. d.).
- Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B., & Prossnitz, E. R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5715), 1625-1630. <https://doi.org/10.1126/science.1106943>
- Revankar, C. M., Mitchell, H. D., Field, A. S., Burai, R., Corona, C., Ramesh, C., Sklar, L. A., Arterburn, J. B., & Prossnitz, E. R. (2007). Synthetic Estrogen Derivatives Demonstrate the Functionality of Intracellular GPR30. *ACS Chemical Biology*, 2(8), 536-544. <https://doi.org/10.1021/cb700072n>
- Ricupito, A., Del Pozzo, G., Diano, N., Grano, V., Portaccio, M., Marino, M., Bolli, A., Galluzzo, P., Bontempo, P., Mita, L., Altucci, L., & Mita, D. G. (2009). Effect of bisphenol A with or without enzyme treatment on the proliferation and viability of MCF-7 cells. *Environment International*, 35(1), 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.05.011>
- Rouhimoghadam, M., Lu, A. S., Salem, A. K., & Filardo, E. J. (2020). Therapeutic Perspectives on the Modulation of G-Protein Coupled Estrogen Receptor, GPER, Function. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 591217. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.591217>
- Routledge, E. J., White, R., Parker, M. G., & Sumpter, J. P. (2000). Differential Effects of Xenoestrogens on Coactivator Recruitment by Estrogen Receptor (ER)  $\alpha$  and ER $\beta$  \*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 35986-35993. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006777200>
- Samavat, H., & Kurzer, M. S. (2015). Estrogen Metabolism and Breast Cancer. *Cancer letters*, 356(2 0 0), 231-243. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.018>
- Sanchez, R., Nguyen, D., Rocha, W., White, J. H., & Mader, S. (2002). Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. *BioEssays*, 24(3), 244-254. <https://doi.org/10.1002/bies.10066>
- Saremba, S., Nickel, J., Seher, A., Kotzsch, A., Sebald, W., & Mueller, T. D. (2008). Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand. *The FEBS Journal*, 275(1), 172-183. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06187.x>
- Schwalbe, M., Sanger, J., Eggers, R., Naumann, A., Schmidt, A., Hoffken, K., & Clement, J. H. (2003). Differential expression and regulation of bone morphogenetic protein 7 in breast cancer. *International Journal of Oncology*, 23(1), 89-95. <https://doi.org/10.3892/ijo.23.1.89>
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K. J., Stingl, J., Smyth, G. K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, 439(7072), 84-88. <https://doi.org/10.1038/nature04372>
- Shee, K., Jiang, A., Varn, F. S., Liu, S., Traphagen, N. A., Owens, P., Ma, C. X., Hoog, J., Cheng, C., Golub, T. R., Straussman, R., & Miller, T. W. (2019). Cytokine sensitivity screening highlights BMP4

- pathway signaling as a therapeutic opportunity in ER+ breast cancer. *The FASEB Journal*, 33(2), 1644-1657. <https://doi.org/10.1096/fj.201801241R>
- Shen, R. R., & Hahn, W. C. (2011). Emerging roles for the non-canonical IKKs in cancer. *Oncogene*, 30(6), 631-641. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.493>
- Shim, J.-H., Xiao, C., Paschal, A. E., Bailey, S. T., Rao, P., Hayden, M. S., Lee, K.-Y., Bussey, C., Steckel, M., Tanaka, N., Yamada, G., Akira, S., Matsumoto, K., & Ghosh, S. (2005). TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes & Development*, 19(22), 2668-2681. <https://doi.org/10.1101/gad.1360605>
- Shukla, G., Khera, H. K., Srivastava, A. K., Khare, P., Patidar, R., & Saxena, R. (2017). Therapeutic Potential, Challenges and Future Perspective of Cancer Stem Cells in Translational Oncology : A Critical Review. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 12(3), 207-224. <https://doi.org/10.2174/1574888X11666161028143224>
- Singletary, K. W., Frey, R. S., & Yan, W. (2001). Effect of ethanol on proliferation and estrogen receptor- $\alpha$  expression in human breast cancer cells. *Cancer Letters*, 165(2), 131-137. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00419-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00419-0)
- Siracusa, J. S., Yin, L., Measel, E., Liang, S., & Yu, X. (2018). Effects of Bisphenol A and its Analogs on Reproductive Health : A Mini Review. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 79, 96-123. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.005>
- Söderqvist, G., Isaksson, E., Schoultz, B. von, Carlström, K., Tani, E., & Skoog, L. (1997). Proliferation of breast epithelial cells in healthy women during the menstrual cycle. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 176(1), 123-128. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(97\)80024-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(97)80024-5)
- Song, H., Zhang, T., Yang, P., Li, M., Yang, Y., Wang, Y., Du, J., Pan, K., & Zhang, K. (2015). Low doses of bisphenol A stimulate the proliferation of breast cancer cells via ERK1/2/ERR $\gamma$  signals. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 30(1 Pt B), 521-528. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.09.009>
- Spina, E., & Cowin, P. (2021). Embryonic mammary gland development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 114, 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.12.012>
- Su, J.-L., Yang, C.-Y., Zhao, M., Kuo, M.-L., & Yen, M.-L. (2007). Forkhead proteins are critical for bone morphogenetic protein-2 regulation and anti-tumor activity of resveratrol. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(27), 19385-19398. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702452200>
- Sun, S.-C. (2011). Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Research*, 21(1), 71-85. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.177>
- Sun, Y.-S., Zhao, Z., Yang, Z.-N., Xu, F., Lu, H.-J., Zhu, Z.-Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P.-P., & Zhu, H.-P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11), 1387-1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- Suzuki, A., Raya, Á., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gage, F. H., Rodríguez-Esteban, C., & Izpisua Belmonte, J. C. (2006). Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10294-10299. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506945103>
- Suzuki, Y., Montagne, K., Nishihara, A., Watabe, T., & Miyazono, K. (2008). BMPs Promote Proliferation and Migration of Endothelial Cells via Stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and Angiopoietin-1/Tie2 Signalling. *The Journal of Biochemistry*, 143(2), 199-206. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm215>
- Tan, C.-C., Li, G.-X., Tan, L.-D., Du, X., Li, X.-Q., He, R., Wang, Q.-S., & Feng, Y.-M. (2016). Breast cancer cells obtain an osteomimetic feature via epithelial-mesenchymal transition that have undergone BMP2/RUNX2 signaling pathway induction. *Oncotarget*, 7(48), 79688-79705. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12939>

- Tang, J., Xue, P., Huang, X., Lin, C., & Liu, S. (2022). Diet and Nutrients Intakes during Infancy and Childhood in Relation to Early Puberty : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, *14*(23), 5004. <https://doi.org/10.3390/nu14235004>
- Taurin, S., & Alkhalifa, H. (2020a). Breast cancers, mammary stem cells, and cancer stem cells, characteristics, and hypotheses. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *22*(12), 663-678. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.09.009>
- Taylor, A., Brady, A. F., Frayling, I. M., Hanson, H., Tischkowitz, M., Turnbull, C., & Side, L. (2018). Consensus for genes to be included on cancer panel tests offered by UK genetics services : Guidelines of the UK Cancer Genetics Group. *Journal of Medical Genetics*, *55*(6), 1-6. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-105188>
- Teague, S., Primavera, G., Chen, B., Liu, Z.-Y., Yao, L., Freeburne, E., Khan, H., Jo, K., Johnson, C., & Heemskerk, I. (2024). Time-integrated BMP signaling determines fate in a stem cell model for early human development. *Nature Communications*, *15*, 1471. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45719-9>
- Teplyuk, N. M., Galindo, M., Teplyuk, V. I., Pratap, J., Young, D. W., Lapointe, D., Javed, A., Stein, J. L., Lian, J. B., Stein, G. S., & van Wijnen, A. J. (2008). Runx2 Regulates G Protein-coupled Signaling Pathways to Control Growth of Osteoblast Progenitors. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(41), 27585-27597. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802453200>
- Tharmapalan, P., Mahendralingam, M., Berman, H. K., & Khokha, R. (2019). Mammary stem cells and progenitors : Targeting the roots of breast cancer for prevention. *The EMBO Journal*, *38*(14), e100852. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100852>
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J., & Dong, J. (2005). Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology*, *146*(2), 624-632. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1064>
- Tica, A. A., Dun, E. C., Tica, O. S., Gao, X., Arterburn, J. B., Brailoiu, G. C., Oprea, T. I., & Brailoiu, E. (2011). G protein-coupled estrogen receptor 1-mediated effects in the rat myometrium. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *301*(5), C1262-C1269. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00501.2010>
- Tomasetti, C., & Vogelstein, B. (2015). Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science (New York, N.Y.)*, *347*(6217), 78-81. <https://doi.org/10.1126/science.1260825>
- Torres-Alamilla, P., Castillo-Sanchez, R., Cortes-Reynosa, P., Gomez, R., & Perez Salazar, E. (2023). Bisphenol A increases the size of primary mammary tumors and promotes metastasis in a murine model of breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *575*, 111998. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111998>
- travail, M. du, solidarités, de la santé et des, travail, M. du, & solidarités, de la santé et des. (s. d.). *Bisphénols*. Ministère du travail, de la santé et des solidarités. Consulté 9 août 2024, à l'adresse <https://sante.gouv.fr/sante-et-environnement/risques-microbiologiques-physiques-et-chimiques/article/bisphenols>
- Urist, M. R. (1965). Bone : Formation by autoinduction. *Science (New York, N.Y.)*, *150*(3698), 893-899. <https://doi.org/10.1126/science.150.3698.893>
- Valencia-Olvera, A., Maldonado Weng, J., Christensen, A., LaDu, M., & Pike, C. (2023). Role of estrogen in women's Alzheimer's disease risk as modified by APOE. *Journal of neuroendocrinology*, *35*(2), e13209. <https://doi.org/10.1111/jne.13209>
- Valera, E., Isaacs, M. J., Kawakami, Y., Izpisúa Belmonte, J. C., & Choe, S. (2010). BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inducer of differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS One*, *5*(6), e11167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011167>

- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals : Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*, *33*(3), 378-455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>
- Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Wadia, P. R., Sonnenschein, C., Rubin, B. S., & Soto, A. M. (2007). Exposure to Environmentally Relevant Doses of the Xenoestrogen Bisphenol-A Alters Development of the Fetal Mouse Mammary Gland. *Endocrinology*, *148*(1), 116. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0561>
- Vazquez-Santillan, K., Melendez-Zajgla, J., Jimenez-Hernandez, L. E., Gaytan-Cervantes, J., Muñoz-Galindo, L., Piña-Sanchez, P., Martinez-Ruiz, G., Torres, J., Garcia-Lopez, P., Gonzalez-Torres, C., Ruiz, V., Avila-Moreno, F., Velasco-Velazquez, M., Perez-Tapia, M., & Maldonado, V. (2016). NF-kappaB-inducing kinase regulates stem cell phenotype in breast cancer. *Scientific Reports*, *6*, 37340. <https://doi.org/10.1038/srep37340>
- Voeltzel, T., Fossard, G., Degaud, M., Geistlich, K., Gadot, N., Jeanpierre, S., Mikaelian, I., Brevet, M., Anginot, A., Le Bousse-Kerdilès, M.-C., Trichet, V., Lefort, S., & Maguer-Satta, V. (2022). A minimal standardized human bone marrow microphysiological system to assess resident cell behavior during normal and pathological processes. *Biomaterials Science*, *10*(2), 485-498. <https://doi.org/10.1039/d1bm01098k>
- Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., & Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochimica Medica*, *24*(3), 329-342. <https://doi.org/10.11613/BM.2014.035>
- Wagner, D. O., Sieber, C., Bhushan, R., Börgermann, J. H., Graf, D., & Knaus, P. (2010). BMPs : From bone to body morphogenetic proteins. *Science Signaling*, *3*(107), mr1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.3107mr1>
- Wang, D., Gao, H., Bandyopadhyay, A., Wu, A., Yeh, I.-T., Chen, Y., Zou, Y., Huang, C., Walter, C. A., Dong, Q., & Sun, L.-Z. (2014). Pubertal Bisphenol A Exposure Alters Murine Mammary Stem Cell (MaSC) Function Leading to Early Neoplasia in Regenerated Glands. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, *7*(4), 445-455. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0260>
- Wang, D., Huang, P., Zhu, B., Sun, L., Huang, Q., & Wang, J. (2012). Induction of estrogen receptor  $\alpha$ -36 expression by bone morphogenetic protein 2 in breast cancer cell lines. *Molecular Medicine Reports*, *6*(3), 591-596. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.945>
- Wang, J., Wang, S., Zhou, J., & Qian, Q. (2018). miR-424-5p regulates cell proliferation, migration and invasion by targeting doublecortin-like kinase 1 in basal-like breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *102*, 147-152. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.018>
- Wang, S., Jiang, H., Zheng, C., Gu, M., & Zheng, X. (2022). Secretion of BMP-2 by tumor-associated macrophages (TAM) promotes microcalcifications in breast cancer. *BMC Cancer*, *22*, 34. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-09150-3>
- Wang, T., Zhang, Z., Wang, K., Wang, J., Jiang, Y., Xia, J., Gou, L., Liu, M., Zhou, L., He, T., & Zhang, Y. (2017). Inhibitory effects of BMP9 on breast cancer cells by regulating their interaction with pre-adipocytes/adipocytes. *Oncotarget*, *8*(22), 35890-35901. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16271>
- Wang, Y.-L., Li, Y., Ma, Y.-G., & Wu, W.-Y. (2019). DCLK1 promotes malignant progression of breast cancer by regulating Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *23*(21), 9489-9498. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201911\\_19443](https://doi.org/10.26355/eurrev_201911_19443)
- Weiskirchen, R., Meurer, S. K., Gressner, O. A., Herrmann, J., Borkham-Kamphorst, E., & Gressner, A. M. (2009). BMP-7 as antagonist of organ fibrosis. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, *14*(13), Article 13. <https://doi.org/10.2741/3583>

- Winkler, J., Liu, P., Phong, K., Hinrichs, J. H., Ataii, N., Williams, K., Hadler-Olsen, E., Samson, S., Gartner, Z. J., Fisher, S., & Werb, Z. (2022). Bisphenol A replacement chemicals, BPF and BPS, induce protumorigenic changes in human mammary gland organoid morphology and proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *119*(11), e2115308119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2115308119>
- Wolfson, B., Eades, G., & Zhou, Q. (2015). Adipocyte activation of cancer stem cell signaling in breast cancer. *World Journal of Biological Chemistry*, *6*(2), 39-47. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i2.39>
- Wu, L., Wu, Y., Gathings, B., Wan, M., Li, X., Grizzle, W., Liu, Z., Lu, C., Mao, Z., & Cao, X. (2003). Smad4 as a Transcription Corepressor for Estrogen Receptor  $\alpha$  \*. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(17), 15192-15200. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212332200>
- Wysolmerski, J. J. (2003). The Evolutionary Origins of Maternal Calcium and Bone Metabolism During Lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*.
- Yadin, D., Knaus, P., & Mueller, T. D. (2016). Structural insights into BMP receptors : Specificity, activation and inhibition. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *27*, 13-34. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.11.005>
- Yamamoto, T., Saatcioglu, F., & Matsuda, T. (2002). Cross-Talk between Bone Morphogenic Proteins and Estrogen Receptor Signaling. *Endocrinology*, *143*(7), 2635-2642. <https://doi.org/10.1210/endo.143.7.8877>
- Yang, Y., Jin, G., Cao, X., Wang, P., Yang, X., & Wu, J. (2015). In vitro evaluation of rhBMP-2-induced expression of VEGF in human adipose-derived stromal cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *8*(1), 222-230.
- Ye, L., & Jiang, W. G. (2016). Bone morphogenetic proteins in tumour associated angiogenesis and implication in cancer therapies. *Cancer Letters*, *380*(2), 586-597. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.036>
- Yin, H., Zhu, Q., Liu, M., Tu, G., Li, Q., Yuan, J., Wen, S., & Yang, G. (2017). GPER promotes tamoxifen-resistance in ER+ breast cancer cells by reduced Bim proteins through MAPK/Erk-TRIM2 signaling axis. *International Journal of Oncology*, *51*(4), 1191-1198. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4117>
- Ying, Q.-L., Nichols, J., Chambers, I., & Smith, A. (2003). BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. *Cell*, *115*(3), 281-292. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00847-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00847-X)
- Zhang, X. (2023). Molecular Classification of Breast Cancer : Relevance and Challenges. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *147*(1), 46-51. <https://doi.org/10.5858/arpa.2022-0070-RA>
- Zhao, C., Yong, T., Zhang, Y., Xiao, Y., Jin, Y., Zheng, C., Nirasawa, T., & Cai, Z. (2021). Breast cancer proliferation and deterioration-associated metabolic heterogeneity changes induced by exposure of bisphenol S, a widespread replacement of bisphenol A. *Journal of Hazardous Materials*, *414*, 125391. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125391>
- Zheng, Y., Wu, G., Zhao, J., Wang, L., Sun, P., & Gu, Z. (2010). rhBMP2/7 heterodimer : An osteoblastogenesis inducer of not higher potency but lower effective concentration compared with rhBMP2 and rhBMP7 homodimers. *Tissue Engineering. Part A*, *16*(3), 879-887. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0312>
- Zhou, X., Wang, S., Wang, Z., Feng, X., Liu, P., Lv, X.-B., Li, F., Yu, F.-X., Sun, Y., Yuan, H., Zhu, H., Xiong, Y., Lei, Q.-Y., & Guan, K.-L. (2015). Estrogen regulates Hippo signaling via GPER in breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, *125*(5), 2123-2135. <https://doi.org/10.1172/JCI79573>