

Thesis, FRANZEN Rachelle

Auteur : Henrard, Amélie

Promoteur(s) : Pequeux, Christel

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2025-2026

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/25985>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Université de Liège - Faculté de Médecine

GIGA Institute

Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement

Estrogen-sensitive tissues and cancer unit

Régulation de l'expression
du récepteur des
œstrogènes par l'œstradiol
pulsé : impact sur la
sensibilité aux
hormonothérapies du
cancer du sein.

Amélie HENRARD

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de
Master en Sciences Biomédicales

Promotrice : Pr. Christel Péqueux

Année académique 2025-2026

REMERCIEMENTS

Me voilà enfin en train de tenter de rédiger des remerciements à la hauteur de toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Tout d'abord, je souhaiterais remercier la Pr. Christel Péqueux de m'avoir accordé sa confiance pour la réalisation de ce mémoire au sein de son équipe. Merci pour tous vos précieux conseils et votre bienveillance.

Je tiens également à remercier Manon Zielonka et Camille Flas. Merci pour votre patience et votre disponibilité. Merci d'avoir répondu à mes questions, même celles de dernière minute. Merci pour votre soutien et merci de m'avoir transmis un petit bout de votre savoir.

Merci à tous les membres du LBTD qui font de cet endroit un véritable laboratoire où il est agréable de venir travailler. Merci à tous pour votre aide et vos encouragements. Merci pour cette ambiance chaleureuse à laquelle vous contribuez tant.

Un merci tout particulier à Luca Russo et Inès Elmoualij ! Luca, partager ce bureau avec toi a constitué une réelle bouffée d'oxygène pendant ce mémoire. Merci d'avoir été à l'écoute lorsque j'ai douté, merci pour tous ces M&M's partagés, merci pour ces moments de rire et de joie. L'expérience n'aurait jamais été la même sans toi. Inès, en véritable star du LBTD, tu as répandu ton énergie (et ton parfum) dans tout le labo. Avec ton sourire et ta personnalité, tu as égayé mon année. Quelle belle (re)rencontre !

Pour terminer, merci à tous mes proches, amis et famille, qui ne m'ont jamais laissé tomber. Je n'ai pas de mot à la hauteur pour exprimer toute ma gratitude. Merci pour votre patience, merci pour votre soutien, merci d'avoir tenté de comprendre lorsque je parlais de mon mémoire, ... À mes parents, merci de m'avoir permis de réaliser ces études, qui me rendront, j'en suis certaine, très heureuse.

Amélie

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc : ADN complémentaire

AF-1 : *Activation Fonction 1* (Fonction d'activation 1)

AF-2 : *Activation Fonction 2* (Fonction d'activation 2)

AI : *Aromatase Inhibitor* (Inhibiteur de l'aromatase)

ATCC : *American Type Culture Collection*

BSA : *Bovine Serum Albumin* (Albumine sérique bovine)

CDK4/6 : *Cyclin-Dependent Kinases 4 and 6* (Kinases dépendantes des cyclines 4 et 6)

CHX : Cycloheximide

DBD : *DNA Binding Domain* (Domaine de liaison à l'ADN)

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

E1 : Œstrone

E2 : 17β-œstradiol

E3 : Œstriol

E4 : Œstétrol

EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor* (Récepteur de facteur de croissance épidermique)

ER : *Estrogen Receptor* (Récepteur des œstrogènes)

ERα : *Estrogen Receptor α* (Récepteur des œstrogènes α)

ERβ : *Estrogen Receptor β* (Récepteur des œstrogènes β)

ERE : *Estrogen Response Elements* (Élément de Réponse des Œstrogènes)

ESR1 : Gène codant pour ERα

FBS : *Fœtal Bovine Serum* (Sérum fœtal bovin)

GAPDH : *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (déshydrogénase de la glycéraldéhyde-3-phosphate)

GPER : *G-Protein coupled Estrogen Receptor* (Récepteur des œstrogènes couplés aux protéines G)

GREB1 : *Growth Regulated by Estrogen in Breast Cancer 1* (Protéine 1 de la régulation de la croissance par les œstrogènes dans le cancer du sein)

HER2 : *Human Epidermal growth factor Receptor 2* (Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain)

HT : Hormonothérapie

IRES : *Internal Ribosome Entry Site* (Site d'Entrée Interne du Ribosome)

HRP : *Horseradish Peroxydase* (Péroxydase de raifort)

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

LH : *Luteinizing Hormone* (Hormone lutéinisante)

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase* (Protéine kinase activées par les agents mitogènes)

MISS : *Membrane-Initiated Steroid Signaling* (Signalisation membranaires initiées par les stéroïdes)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : *Phosphate-Buffered Saline* (Tampon phosphate salin)

PCR : *Polymerase Chain Reaction* (Réaction de polymérisation en chaîne)

PGR : *Progesterone Gene Receptor* (Gène du récepteur de la progestérone)

PR : *Progesterone Receptor* (Récepteur de la progestérone)

Rb : Protéine de rétinoblastome

SERM : *Selective Estrogen Receptor Modulator* (Modulateur sélectif du récepteur des œstrogènes)

SERD : *Selective Estrogen Receptor Degrador* (Dégradeur sélectif du récepteur des œstrogènes)

SHBG : *Sex Hormone-Binding Globulin* (Globuline liant les hormones sexuelles)

En 2024, le cancer du sein restait le plus fréquemment diagnostiqué mondialement et la première cause de mortalité par cancer chez les femmes. Les formes luminales exprimant le récepteur des œstrogènes (ER) et de la progestérone (PR) représentent environ 70 % des cas et sont principalement traitées par hormonothérapie. Cependant, environ 40 % de ces tumeurs développent des résistances thérapeutiques, notamment en raison de mutations, de modifications épigénétiques et d'une dérégulation de la signalisation en aval.

S'appuyant sur des résultats préliminaires montrant qu'une administration pulsée d'œstradiol (E2), par rapport à une exposition continue, augmente l'expression du récepteur œstrogénique alpha (ER α), ce projet visait à évaluer si l'E2 pulsé peut améliorer la sensibilité à l'hormonothérapie dans des lignées cellulaires de cancer du sein ER+ (CAMA-1, T47D, MCF-7). En effet, notre hypothèse postule qu'un niveau élevé de récepteurs multiplie les cibles thérapeutiques et optimise l'efficacité des traitements.

Ce travail s'est articulé en deux parties. La première partie a permis de caractériser, par Western blot, l'impact d'un traitement d'E2 pulsé, comparé à un traitement continu, dans des lignées cellulaires de cancer du sein. Les résultats ont révélé qu'une exposition continue à l'E2 pendant 72 h entraînait une diminution de l'expression du récepteur ER α , tandis que le traitement pulsé induisait, au contraire, une augmentation de son expression.

Dans un second temps, l'exploration des mécanismes sous-jacents a exclu l'implication d'une régulation transcriptionnelle *de novo*. En revanche, l'utilisation de cycloheximide supporte l'hypothèse d'un contrôle traductionnel, cet inhibiteur abolissant sélectivement la hausse d'ER α induite par les pulses d'E2. Enfin, le blocage du protéasome 26S par le MG132 n'a montré aucune inversion du profil d'expression différentiel entre les deux cinétiques.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent qu'une exposition pulsée d'E2 permet d'augmenter l'expression d'ER α via des mécanismes traductionnels, offrant ainsi un levier pour améliorer la sensibilité des cellules cancéreuses aux hormonothérapies.

In 2024, breast cancer remained the most frequently diagnosed malignancy worldwide and the leading cause of cancer-related mortality in women. Luminal subtypes characterized by estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) expression account for approximately 70% of cases and are primarily managed with endocrine therapy. However, nearly 40% of these tumors eventually develop resistance to endocrine treatments, often driven by mechanisms involving mutations, epigenetic alterations, and dysregulation of downstream signaling pathways.

Based on preliminary findings showing that pulsed estradiol (E2) administration, compared with continuous exposure, increases estrogen receptor alpha (ER α) expression, this project aimed to evaluate whether a pulsed regimen could enhance sensitivity to endocrine therapy in three ER-positive breast cancer cell lines (CAMA-1, T-47D, MCF-7). Our hypothesis posits that maintaining higher receptor levels provides more therapeutic targets, thereby improving treatment efficacy.

This work was divided into two main parts. The first part aimed to characterize, by Western blot analysis, the effects of pulsed E2 treatment compared with continuous exposure in breast cancer cell lines. The results demonstrated that continuous exposure to E2 for 72 hours led to a decrease in ER α expression, whereas pulsed treatment induced, conversely, an increase in receptor expression.

Subsequently, an investigation of the underlying mechanisms ruled out the involvement of *de novo* transcriptional regulation. In contrast, the use of cycloheximide supported the hypothesis of translational control, as this inhibitor selectively abolished the E2-induced increase in ER α . Finally, inhibition of the 26S proteasome by MG132 showed no reversal of the differential expression profile between the two kinetics.

Overall, these findings suggest that pulsed E2 exposure increases ER α expression via translational mechanisms, thereby offering a promising pathway for improving the sensitivity of cancer cells to hormone therapies.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
1. LE CANCER DU SEIN	1
1.1. Données épidémiologiques sur le cancer du sein	1
1.2. Les facteurs de risque associés au cancer du sein	2
1.3. Classification des cancers du sein	3
1.4. Traitements du cancer du sein	5
1.5. Résistance à l'hormonothérapie	7
2. LES ŒSTROGÈNES ET LEUR RÉCEPTEUR	9
2.1. La nature des œstrogènes	9
2.2. Les récepteurs des œstrogènes	11
2.3. Régulation de l'expression d'ER α	13
2.4. Les voies de signalisation	15
HYPOTHÈSES, OBJECTIFS & STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE	18
MATÉRIEL & MÉTHODE	20
1. CULTURE CELLULAIRE	20
1.1. Traitements cellulaires	20
2. EXTRACTION PROTÉIQUE ET WESTERN BLOT	22
2.1. Extraction protéique	22
2.2. Quantification protéique	23
2.3. Western Blot – préparation des échantillons	23
2.4. Western Blot – électrophorèse SDS-PAGE et transfert sur membrane de PVDF	24
2.5. Immunodétection	25
3. EXTRACTION DE L'ARN TOTAL ET RT-QPCR	26
3.1. Extraction de l'ARN total	26
3.2. Quantification de l'ARN	26
3.3. Transcription inverse	27
3.4. PCR quantitative	27
4. ANALYSE STATISTIQUE	28
RÉSULTATS	30
A. ÉTUDE DES EFFETS DE L'E2 CONTINU VERSUS PULSÉ SUR DES CELLULES DE CANCER DU SEIN ER⁺	30
1. L'ESTRADIOL PULSÉ AUGMENTE L'EXPRESSION D'ER α DANS LES CELLULES CAMA-1 ET MCF-7	30
2. MAINTIEN DE L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE D'ER α SOUS STIMULATIONS ŒSTROGÉNIQUES	31
2.1. Données complémentaires dans d'autres lignées ER ⁺	31
B. LES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES RÉGULANT LA MODULATION DE L'EXPRESSION D'ERα	32
1. INVALIDATION DE L'HYPOTHÈSE D'UNE RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE <i>DE NOVO</i>	32

2. IMPLICATION DE LA TRADUCTION ACTIVE DANS LA HAUSSE D'ER α INDUITE PAR LE TRAITEMENT PULSÉ	34
3. HYPOTHÈSE DE LA DÉGRADATION : LE RÔLE DU PROTÉASOME DANS LA MODULATION DE L'EXPRESSION D'ER α	35
DISCUSSION	37
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	44
BIBLIOGRAPHIE	46

1. Le cancer du sein

1.1. Données épidémiologiques sur le cancer du sein

En 2022, près de 20 millions de nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués et cette maladie aurait été la cause de plus de 9 millions de décès (Ferlay *et al.* 2024). Les prédictions pour 2050 indiquent une hausse de 77 % de nouveaux cas de cancer par rapport à ces données. Cette progression rapide s'explique notamment par le vieillissement et la croissance de la population, mais également par des évolutions dans l'exposition aux facteurs de risque, comme le tabagisme, la consommation d'alcool et l'obésité (OMS 2026).

Le cancer du sein demeure un enjeu majeur de santé publique. En 2022, il représentait 11,6 % de l'ensemble des cancers diagnostiqués cette année-là, ce qui en faisait le deuxième cancer le plus fréquent, tous sexes confondus. Chez la femme, il occupait la première place tant en termes d'incidence qu'en termes de mortalité (Figure 1) (Bray *et al.* 2024 ; Wilkinson *et al.* 2022).

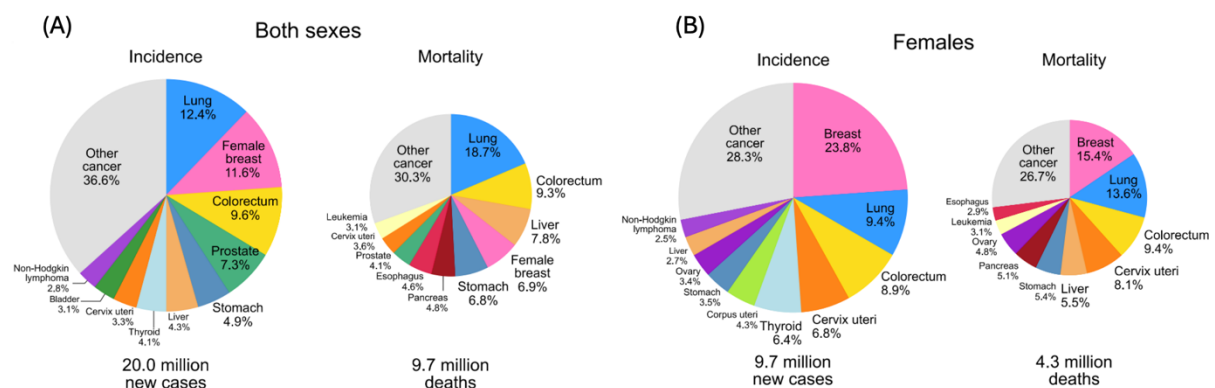


Figure 1. Répartition de l'incidence et de la mortalité par cancer en 2022 (A) chez les deux sexes, (B) chez la femme.

Les deux sexes confondus, le cancer du sein est le second en termes d'incidence, alors que chez la femme, il est le premier, tant en termes d'incidence qu'en termes de mortalité. (Bray *et al.* 2024).

Malgré cette incidence élevée, le taux de mortalité ne cesse de diminuer, grâce à l'amélioration du dépistage et à l'optimisation de l'offre thérapeutique (Mubarak *et al.* 2024).

1.2. Les facteurs de risque associés au cancer du sein

Les progrès technologiques et cliniques ne bénéficient pas de la même manière à toutes les populations, révélant d'importantes disparités géographiques. À l'échelle mondiale, les pays dits « à hauts revenus » (incluant la Belgique) affichent les incidences de cancer du sein les plus élevées. En Amérique du Nord, en Europe, en Australie et en Nouvelle-Zélande, cette incidence est environ 4 fois supérieure à celle observée en Asie ou en Afrique centrale. Inversement, la mortalité est plus importante dans les pays « à faibles ou moyens revenus ». Cette disparité majeure s'explique par deux facteurs principaux. Premièrement, les pays « à hauts revenus » disposent de programmes de dépistage permettant un diagnostic et une prise en charge précoce des cancers. Deuxièmement, le mode de vie occidental expose davantage les populations à un ensemble de déterminants délétères (Wilkinson et Gathani 2022 ; Bray et al. 2024).

En 2022, la Belgique comptait un peu plus de 11 000 nouveaux cas de cancer du sein chez les femmes (Ferlay et al. 2024). Globalement, l'incidence brute du cancer pour 100 000 habitants est plus élevée en Belgique que la moyenne des pays de l'UE-14 (les pays inclus dans l'Union européenne entre 1995 et 2004 et possédant des conditions socio-économiques similaires). Par rapport à la moyenne de l'UE-14, l'incidence brute pour 100 000 habitants en Belgique est supérieure de 4 % chez les femmes. Cependant, ces comparaisons internationales doivent être interprétées avec prudence compte tenu de l'hétérogénéité des méthodes de collecte de données en fonction des pays (Vers une Belgique en bonne santé 2022).

La maîtrise du cancer du sein passe également par une compréhension approfondie de son étiologie et des nombreux facteurs de risque qui influencent son développement. Parmi les causes identifiées, on retrouve des **facteurs reproductifs**, liés à l'exposition hormonale, tels qu'une ménarche précoce, une ménopause tardive, une nulliparité ou une parité faible, une grossesse tardive, ainsi que la prise de contraceptifs hormonaux ou de traitements hormonaux substitutifs lors de la ménopause. À ces éléments s'ajoutent des **facteurs non reproductifs**, liés à l'environnement et à l'hygiène de vie, lesquels incluent l'obésité, une densité mammaire élevée, une alimentation déséquilibrée, ainsi que la consommation

d'alcool et le tabagisme. Enfin, certaines mutations génétiques s'avèrent fortement prédisposantes au développement de la maladie, en particulier les mutations germinales des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (Obeagu et Obeagu 2024 ; Wilkinson et Gathani 2022 ; Wang et al. 2025).

1.3. Classification des cancers du sein

Il existe deux manières de classer les cancers du sein : la classification histologique et la classification moléculaire.

La **classification histologique** repose sur l'examen morphologique de la tumeur. Lorsqu'un cancer du sein est suspecté, une biopsie est réalisée afin de confirmer le diagnostic et de permettre une analyse anatomopathologique du tissu. L'étude histologique du prélèvement permet d'évaluer l'architecture tumorale, le degré de différenciation cellulaire, le caractère infiltrant de la tumeur ainsi que d'autres caractéristiques morphologiques importantes. Cette classification, intégrée et régulièrement actualisée dans la classification des tumeurs du sein de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), distingue les lésions *in situ* des lésions invasives. Les carcinomes invasifs sont ensuite classés en carcinomes de type non spécial et en types spéciaux, ces derniers présentant des caractéristiques morphologiques et architecturales particulières. Parmi les types spéciaux figurent notamment les carcinomes lobulaires, tubulaires, mucineux, papillaires et cribriformes (Cserni 2020 ; Rakha et al. 2023). Aujourd'hui, avec ses 44 types histologiques, le cancer du sein est considéré comme une maladie très hétérogène (Cserni 2020 ; Eliyatkin et al. 2015), et les différences phénotypiques entre les sous-types influencent le diagnostic, le traitement et, par conséquent, le pronostic des patientes. Pourtant, certains cancers appartenant au même type histologique peuvent présenter des comportements biologiques différents. Il est donc devenu essentiel d'établir une **classification moléculaire** des cancers du sein, basée sur des profils d'expression et/ou d'altérations biologiques. Le taux de prolifération tumorale, les voies de signalisation activées au sein de cette dernière et même sa composition cellulaire sont autant de caractéristiques qui peuvent être expliquées par le profil moléculaire de la tumeur (Perou et al. 2000 ; Zhang 2023).

Actuellement, la classification moléculaire repose sur l'expression de biomarqueurs clés : le récepteur α des œstrogènes (ER α), le récepteur de la progestérone (PR), le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) et le marqueur de prolifération Ki-67. Environ 70 % des cancers du sein expriment ER, la majorité d'entre eux expriment également PR. Ces tumeurs ER+/PR+ sont subdivisées en type **Luminal A** (Ki-67 < 20 % ; HER2-) ou **Luminal B** (Ki-67 > 20 % ; HER2+) selon l'expression de HER2 et le taux de prolifération. Les tumeurs **HER2-enrichies** sont négatives pour les récepteurs hormonaux, mais positives pour le récepteur HER2. Enfin le type **basal-like**, ou « triple négatif », n'exprime ni ER, ni PR, ni HER2 (Rivenbark et al. 2013 ; Orrantia-Borunda et al. 2022). Les sous-types luminal A et luminal B sont associés à de meilleurs pronostics, avec une survie à 5 ans de 94,4 % et 90,7 %, respectivement ; tandis que celle des types HER2-enrichis et basal-like est de 84,8 % et de 77,1 %, respectivement (Figure 2) (Orrantia-Borunda et al. 2022).

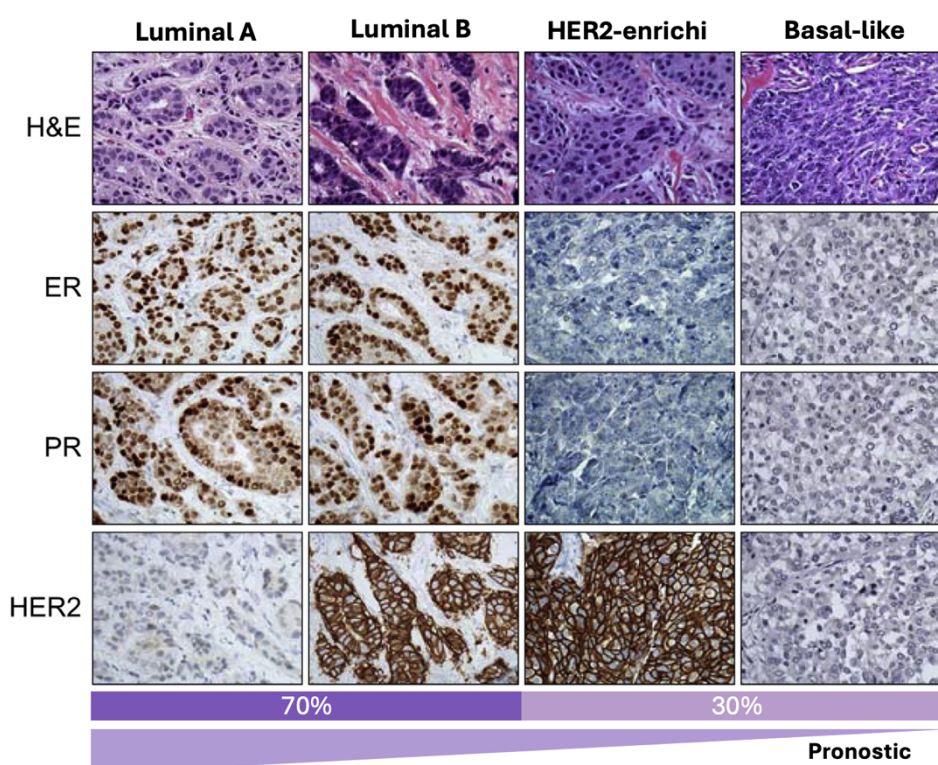


Figure 2. Classification moléculaire des cancers du sein invasifs selon l'expression d'ER, PR et HER2. L'histologie est visualisée via coloration hématoxyline-éosine ; l'expression d'ER, PR et HER2 est révélée par immunohistochimie, permettant de différencier quatre sous-types : Luminal A (ER+/PR+/HER2-, Ki-67 < 20 %), Luminal B (ER+/PR+/HER2+, Ki-67 > 20 %), HER2-enrichi (ER-/PR-/HER2+), Basal-like (ER-/PR-/HER2-). Adapté de Rivenbark et al. 2013.

En complément de la classification histologique et moléculaire, il est important de déterminer le **stade tumoral**. Pour cela, la classification TNM (*Tumor*, *Node*, *Metastasis*) évalue la taille de la tumeur (*Tumor*), l'atteinte ganglionnaire (*Nodes*) et la présence de métastases (*Metastasis*). Parallèlement, le **grade histopronostique** (de 1 à 3) est établi selon le degré de différenciation tumorale : les tumeurs de grade 1, bien différenciées, présentent un meilleur pronostic que les tumeurs de grade 3, peu différenciées.

1.4. Traitements du cancer du sein

La stratégie thérapeutique du cancer du sein est dictée par son profil moléculaire ainsi que par son stade d'évolution. Pour les tumeurs localisées, des approches focales telles que la chirurgie et la radiothérapie sont privilégiées. En cas de dissémination métastatique, il est nécessaire d'intervenir à l'échelle systémique en incluant la chimiothérapie, les thérapies ciblées, l'hormonothérapie et l'immunothérapie (Nounou et al. 2015).

Pour les tumeurs localement avancées ER+, des traitements néoadjuvants avec des inhibiteurs d'aromatase, comme le létrozole ou l'anastrozole, peuvent être utilisés pour réduire la taille des tumeurs avant une intervention chirurgicale (Ellis et al. 2011). À l'inverse, les thérapies adjuvantes sont administrées après la chirurgie ou la radiothérapie, notamment pour réduire le risque de récurrence, ou chez les patientes présentant des tumeurs inopérables (Nounou et al. 2015).

L'hormonothérapie constitue le traitement de référence pour les tumeurs mammaires ER+, visant à bloquer la signalisation œstrogénique (Figure 3). Il en existe 3 grandes classes pharmacologiques (Hartkopf et al. 2020 ; Gao et al. 2024) :

- Les Inhibiteurs de l'Aromatase (AI) : Représentés notamment par **l'Anastrozole**, ces inhibiteurs agissent en amont du récepteur en inhibant l'activité de l'aromatase, l'enzyme clé dans la biosynthèse des œstrogènes. Ils s'avèrent particulièrement efficaces chez les femmes ménopausées, chez qui ils réduisent significativement les taux d'hormones circulantes. Des essais cliniques ont d'ailleurs validé la supériorité des inhibiteurs d'aromatase par rapport au Tamoxifène chez cette population en termes de

réduction des récurrences, des métastases et de la mortalité globale ('Aromatase Inhibitors versus Tamoxifen in Early Breast Cancer' 2015 ; 'Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) Trial after Completion of 5 Years' Adjuvant Treatment for Breast Cancer' 2005).

- Les Modulateurs Sélectifs des Récepteurs aux Œstrogènes (SERM) : Le **Tamoxifène** en est l'exemple principal. En bloquant l'activation d'ER α , cette molécule constitue le standard thérapeutique préférentiel chez les femmes préménopausées. Néanmoins, son activité agoniste partielle sur l'endomètre expose à des effets secondaires notables. Des études cliniques d'envergure, telles que NSABP P-1 et STAR, ont ainsi corrélié l'usage prolongé du Tamoxifène à un risque accru d'hyperplasie et de carcinome de l'endomètre (Wolmark and Dunn 2001 ; Rangel-Méndez et al. 2019).
- Les Dégradeurs Sélectifs des Récepteurs aux Œstrogènes (SERD) : Ces composés induisent la dégradation d'ER α via la voie du protéasome. Cette déplétion abolit la signalisation intracellulaire, réprimant la prolifération et provoquant l'apoptose des cellules mammaires ER+ (Yeh et al. 2013). Parmi eux, le **Fulvestrant** est couramment indiqué chez les femmes postménopausées ou avec un cancer du sein ER+ avancé, affichant une efficacité supérieure à celles des AI, dans ces conditions (Robertson et al. 2016). Plus récemment, **l'Élcestrant** a enrichi cette classe, spécifiquement indiqué en cas de détection d'une mutation au niveau du gène *ESR1*.

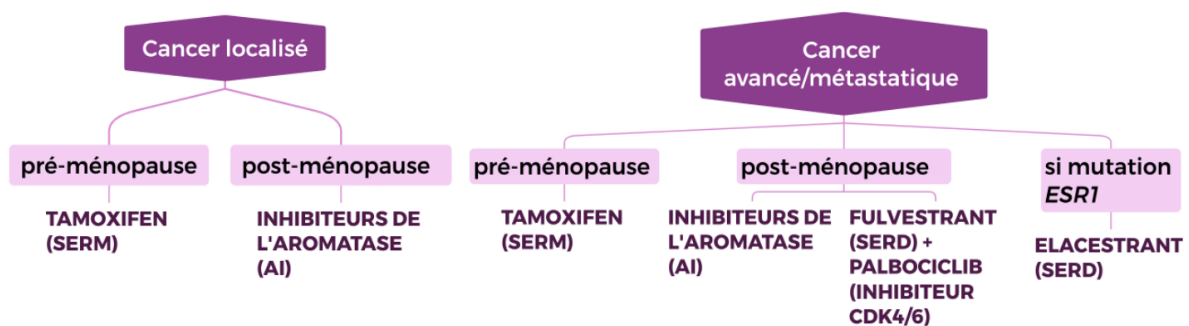


Figure 3. Les thérapies endocriniennes données aux patientes atteintes d'un cancer du sein ER+/HER2- en fonction de l'étendue du cancer et du statut hormonal de la patiente.

Malgré leur efficacité, ces approches thérapeutiques induisent l'arrêt de la signalisation œstrogénique de manière systémique, ce qui génère des effets secondaires lourds altérant la qualité de vie des patientes. Ces manifestations incluent principalement des bouffées de

chaleur, des sueurs nocturnes, un risque accru d'ostéoporose ainsi que des complications cardiovasculaires (Mortimer et al. 2008).

1.5. Résistance à l'hormonothérapie

Malgré l'efficacité initiale de l'hormonothérapie chez une proportion importante de patientes atteintes d'un cancer du sein précoce, le développement de résistance demeure un enjeu clinique majeur. Environ 50 % des patientes atteintes d'un cancer du sein avancé ou métastatique ne répondent pas à l'hormonothérapie ou développent une résistance au cours de leur traitement (Gao et al. 2024).

Les mécanismes de résistance sont classés en deux catégories : les résistances primaires et les résistances secondaires. Les résistances primaires correspondent à l'absence de réponse initiale au traitement. Elles se manifestent par une récurrence précoce survenant dans les deux ans suivant le début d'un traitement adjuvant ou, dans le contexte métastatique, par une progression tumorale observée dans les six mois suivant l'initiation du traitement. À l'inverse, les résistances secondaires, également appelées résistances acquises, apparaissent après une phase initiale de réponse thérapeutique (Hartkopf et al. 2020 ; Gao et al. 2024).

Ces résistances peuvent être causées par différents mécanismes tels que des mutations sur le gène du récepteur des œstrogènes (*ESR1*), la perte de l'expression du récepteur, l'implication de voies de signalisation alternatives qui contournent le blocage d'ER α , des dérégulations au niveau du cycle cellulaire.

→ **Les mutations du gène *ESR1*** concernent 20 à 40 % des cancers avancés et/ou métastatiques initialement traités par hormonothérapie. Majoritairement localisées au niveau de « *hot spots* » du domaine de liaison du ligand, elles induisent une activation constitutive d'ER α , indépendante de l'œstradiol. Parmi les mutations les plus fréquemment observées figurent Y537S et D538G. Afin de cibler spécifiquement ces formes mutées du récepteur et de contourner les mécanismes de résistance associés, de nouveaux SERD oraux ont été développés, parmi lesquels l'Élcestrant constitue

actuellement la seule molécule approuvée en clinique (Hartkopf et al., 2020 ; Lin et al., 2025).

→ **La surexpression ou l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase**, tels que les récepteurs de certains facteurs de croissance (comme l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR)), constituent un enjeu majeur. Ces récepteurs permettent en effet aux cellules tumorales de contourner la signalisation de l'ER α en activant des voies de signalisation intracellulaires alternatives, telles que les cascades MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) et PI3K/Akt. En plus de l'induction de l'activité transcriptionnelle d'ER α , ces voies de signalisation envoient des signaux de croissance et de survie. Elles sont également capables de réduire l'expression du récepteur à la surface des cellules, ce qui constitue un autre mécanisme de résistance tumorale (Hartkopf et al. 2020 ; Rani et al. 2019). Pour éviter cela, il est possible de combiner l'hormonothérapie à des inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR, tels que l'Inavolisib ou le Gedatolisib (Ismaili 2026).

→ **La dérégulation du cycle cellulaire** constitue également un mécanisme de résistance à l'hormonothérapie. Il a notamment été démontré que le traitement par tamoxifène peut entraîner une accumulation de la cycline D1, favorisant l'activation des CDK4/6 (*Cyclin Dependant Kinases 4 and 6*). Cette activation induit la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb), permettant ainsi la transition des cellules de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire (Hartkopf et al. 2020 ; Gao et al. 2024).

Afin de limiter ces mécanismes de résistances, des inhibiteurs de CDK4/6, tels que le Palbociclib ou le Ribociclib, sont utilisés en association avec de l'hormonothérapie. Dans les cancers du sein avancés ou métastatiques, la *Food and Drug Administration* (FDA) recommande leur association avec des inhibiteurs de l'aromatase. Plusieurs études cliniques, dont les essais PALOMA et RIBOLARIS, ont démontré l'efficacité de cette stratégie thérapeutique (Rani et al. 2019 ; Ismaili 2026).

2. Les œstrogènes et leur récepteur

2.1. La nature des œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes lipophiles dérivées du cholestérol (Tan and Muto 1986 ; Gallez et al. 2021). Brièvement, la stéroïdogénèse (Figure 4) débute par la conversion du cholestérol en progestagènes, qui subissent une série de modifications biochimiques pour donner des androgènes. Finalement, **l'aromatase**, l'enzyme ciblée par les AI (évoquée dans la partie 1.4.), convertit les androgènes en œstrogènes (Stanczyk and Archer 2023).

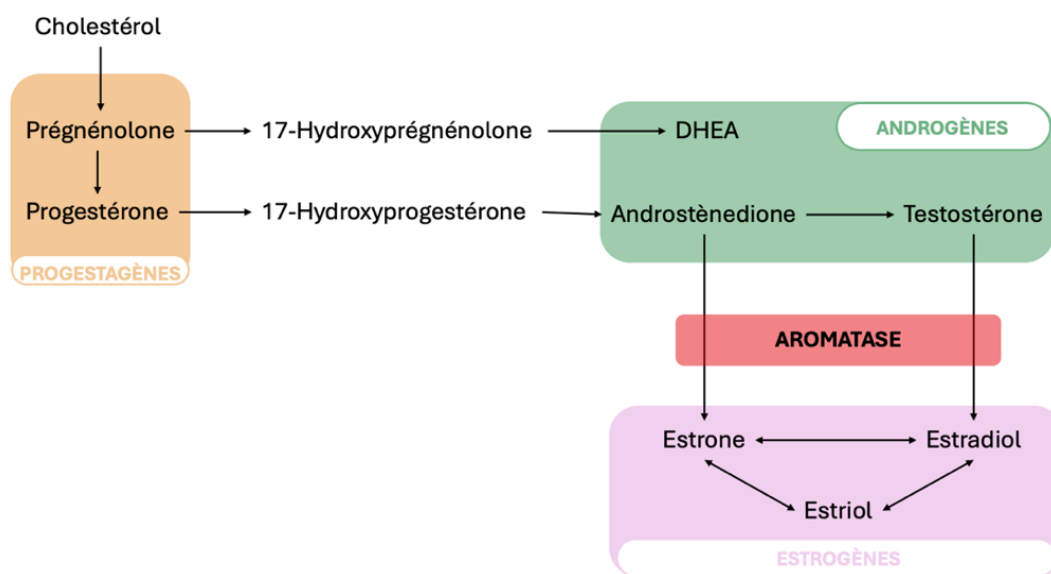


Figure 4. Voie de biosynthèse des œstrogènes adaptée de Ali and Coombes 2000. La DHEA est la déhydroépiandrosterone.

Les œstrogènes sont principalement produits durant la vie reproductive des femmes, dans les ovaires. Cette production repose sur la « **2-cell Hypothesis** » : sous l'influence de l'Hormone Lutéinisante (LH), les cellules de la thèque synthétisent les précurseurs androgéniques. Ces derniers diffusent alors vers les cellules de la granulosa qui, dépourvues de la machinerie enzymatique nécessaire à la synthèse des androgènes *de novo*, assurent leur aromatisation finale en œstrogènes (Stanczyk and Archer 2023).

Il existe également une faible production extragonadale d'œstrogènes, notamment dans le foie, le tissu adipeux, les os, le cerveau et les vaisseaux sanguins (Barakat et al. 2016). Ces œstrogènes agissent localement, de façon intracrine, voire paracrine, tandis que les

œstrogènes sécrétés par les ovaires circulent dans le sang et peuvent ainsi agir à distance de leur site de production (Simpson 2003 ; Vrtačnik et al. 2014).

En raison de leur caractère lipophile, les œstrogènes sont insolubles dans le plasma et nécessitent des protéines de transport. La **Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG)** lie les œstrogènes (et les androgènes) avec une forte affinité et une haute spécificité (Hammond 2016). **L'Albumine** est également capable de lier les œstrogènes de façon non spécifique mais possède une affinité 3 à 4 fois plus faible pour ces hormones que la SHBG (Hammond 2016). Cependant, l'albumine étant une protéine très abondante dans la circulation sanguine, malgré sa faible affinité pour l'œstradiol, elle est responsable du transport de 61 % de l'E2, contre 37 % pour la SHBG (Kuhl 2005).

Ces protéines, produites par le foie, régulent la fraction libre d'hormones dans la circulation sanguine, seule forme biologiquement active capable de diffuser à travers les membranes cellulaires, selon l'hypothèse de l'« hormone libre ». Cependant, ce modèle est partiellement incomplet en raison des différences de vascularisation et de perméabilité vasculaire selon les tissus. Certains épithélia sensibles aux hormones sexuelles sont séparés des capillaires par d'autres cellules, où ces hormones peuvent agir directement ou via des modifications métaboliques qui les rendent actives (Hammond 2016).

Chez l'humain, il existe quatre œstrogènes naturels majeurs dont la nomenclature (de E1 à E4) reflète le nombre de groupements hydroxyles (Figure 5). Ces molécules interviennent à différents stades physiologiques au cours de la vie des femmes (Stanczyk et Archer 2023 ; Gregory et al. 2025 ; Greene et al. 2025) :

→ Le **17β-œstradiol (E2)** est la forme principale produite par les ovaires durant le cycle menstruel et sa concentration sérique est fortement dépendante de la phase du cycle (Kuhl 2005) :

- 30 pg/mL en phase folliculaire précoce ;
- 150-350 pg/mL en phase pré-ovulatoire ;
- 100-210 pg/mL en phase lutéale.

À la puberté, il assure le développement des caractères sexuels et la prolifération de l'épithélium des glandes mammaires. Présentant l'affinité la plus élevée pour l'ERα et

une demi-vie courte (20-30 minutes pour la fraction circulante), il constitue la forme d'intérêt de ce travail.

- **L'œstrone (E1)**, bien que synthétisée par les ovaires, est majoritairement issue de la conversion de l'androstènedione dans les tissus périphériques. Après la ménopause, c'est la forme principalement produite par les tissus extragonadaux.
- **L'œstriol (E3)** est l'hormone clé de la grossesse. Très faiblement concentrée chez la femme lorsqu'elle n'est pas enceinte (10 pg/mL), sa concentration sérique peut atteindre les 210 ng/mL lors d'une grossesse (Kuhl 2005). Bien qu'il agisse en œstrogène faible dans la majorité des tissus, son action est complète sur l'épithélium vaginal et utérin. Cette forme interviendrait notamment dans la régulation du flux sanguin utéro-placentaire.
- **L'estétrol (E4)** est produit spécifiquement par le foie du fœtus durant la gestation. Son rôle physiologique reste encore à élucider, mais cette forme est caractérisée par une biodisponibilité orale de 90 %, comparée à 10 % pour l'E2, et une longue demi-vie de 28 à 32 h.

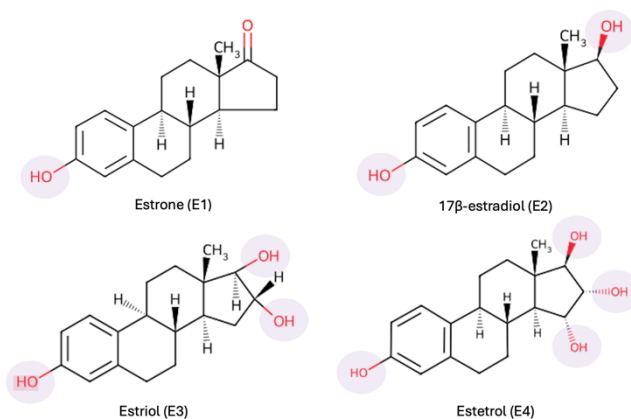


Figure 5. Structure chimique des œstrogènes naturels. Structures moléculaires obtenues via la base de données ChemSpider.

2.2. Les récepteurs des œstrogènes

Les œstrogènes exercent leurs effets biologiques par liaison à leurs récepteurs (ER), membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. En raison de la nature lipophile de leurs ligands, ces récepteurs agissent comme des facteurs de transcription (Hewitt and Korach 2018). On distingue deux isoformes principales : le récepteur des œstrogènes α

(ER α) et le récepteur des œstrogènes β (ER β) (Arnal et al. 2017). En plus de ces récepteurs nucléaires, la signalisation œstrogénique peut également être relayée par un récepteur membranaire couplé à une protéine G appelé GPER (Yu et al. 2026). Dans le cadre de ce travail, seule l'isoforme ER α sera étudiée.

L'ER α est codé par le gène *ESR1*, localisé sur le chromosome 6. Ce gène, d'une longueur de 300 kb, est constitué de huit exons. La protéine ER α comprend 595 acides aminés et présente un poids moléculaire d'environ 66 kDa (Arnal et al. 2017). Comme l'ensemble de la famille des récepteurs nucléaires, ER α est organisé en six domaines fonctionnels (Figure 6) : les domaines A/B, C, D, E et F possèdent chacun un ou plusieurs rôles importants (Habara et Shimada 2022).

Brièvement, la région N-terminale, comprenant les domaines A/B, héberge le domaine d'activation fonctionnelle AF-1, qui interagit avec divers co-régulateurs et participe à l'activation de la transcription (Hewitt et Korach 2018 ; Habara et Shimada 2022). Le domaine C correspond au domaine de liaison à l'ADN (DBD), replié en une structure de deux doigts de zinc et responsable de la reconnaissance spécifique des éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) sur le génome (Arnal et al. 2017). Enfin, le domaine E porte à la fois le domaine de liaison au ligand (LBD) et la fonction d'activation AF-2 (Habara et Shimada 2022).



Figure 6. Les 6 domaines d'ER α , orientés de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale. Les domaines responsables des fonctions clés sont illustrés dans les encadrés pointillés. AF-1 : fonction d'activation-1 ; DBD : domaine de liaison à l'ADN ; LBD : domaine de liaison du ligand ; AF-2 : fonction d'activation-2.

Bien que cette structure complète corresponde à la forme majoritaire d'ER α (66 kDa), il convient de noter que d'autres isoformes peuvent être générées par protéolyse, par épissage alternatif ou par des sites internes d'entrée des ribosomes (IRES).

- ER α 46 existe chez les mammifères. Cette forme, dépourvue des 173 premiers acides aminés à l'extrémité N-terminale, ne contient pas les domaines A/B avec la région AF-1. On la retrouve dans de nombreux types cellulaires, notamment dans les cellules cancéreuses mammaires et colorectales (Arnal et al. 2017). Certaines études ont montré que cette isoforme pouvait avoir un effet inhibiteur sur la croissance de certaines lignées cancéreuses mammaires (Penot et al. 2005) ;
- ER α 36, principalement exprimé dans les tissus de cancer du sein, est dépourvu des AF-1 et AF-2. En plus des régions DBD et LBD, il possède un domaine supplémentaire de 27 acides aminés, localisé en C-terminal (Arnal et al. 2017 ; Wang et al. 2005). Cette isoforme est surtout présente dans le cytoplasme et à la membrane plasmique, grâce à des sites de myristoylation potentiels (Wang et al. 2005).

2.3. Régulation de l'expression d'ER α

Le contrôle de l'expression d'ER α repose sur un réseau de régulation complexe dont l'imbrication exacte reste encore à élucider. Cette régulation intervient à chaque étape clé du cycle de vie du récepteur.

Dans le cadre de ce mémoire, nous explorons les hypothèses moléculaires pouvant expliquer la hausse de l'expression d'ER α observée lors de traitements pulsés d'E2. Afin de contextualiser ces travaux, cette section dresse un état de l'art des connaissances actuelles concernant les régulations transcriptionnelles, traductionnelles et protéolytiques de ce récepteur.

2.1.1. Régulation transcriptionnelle, épigénétique et post-transcriptionnelle

Le contrôle initial de l'expression d'ER α s'exerce au niveau transcriptionnel. À ce stade, la transcription du gène *ESR1* et la stabilité de ses transcripts sont influencées par une multitude de facteurs. L'expression d'*ESR1* repose notamment sur l'utilisation différentielle et tissu-spécifique de sept promoteurs, ainsi que sur des mécanismes d'épissage alternatif conduisant à une grande diversité de transcripts et aux isoformes de 66 kDa, 46 kDa et 36 kDa (Reid et al. 2002). Ces promoteurs sont également sensibles à des modulations

épigénétiques et à l'action de divers facteurs de transcription, parmi lesquels ER α lui-même peut exercer un rétrocontrôle (positif ou négatif) (Reid et al. 2002 ; Castles et al. 1997).

Parallèlement à la production des transcripts, leur survie dans le cytoplasme constitue un autre système de régulation. La stabilité des ARNm d'*ESR1* est fortement dictée par la composition nucléotidique de leur région 3'UTR (*untranslated region*). La richesse de cette région en adénines et en uraciles (séquences AU) constitue un signal classique de déstabilisation et de dégradation rapide des transcripts (Reid et al. 2002). À ce contrôle de la stabilité s'ajoute également l'action de microARN (miRNA) spécifiques, qui ciblent ces mêmes régions régulatrices non traduites et induisent le clivage de l'ARNm ou la répression de sa traduction (Lorent et al. 2019).

2.1.2. Régulation de la traduction

Une fois les ARNm d'*ESR1* exportés hors du noyau, la quantité effective de protéine ER α synthétisée dépend directement de la cinétique de la machinerie traductionnelle. Boyer et al. (2024) ont montré notamment que l'hélicase à ARN eIF4A agissait comme un régulateur critique de la traduction des transcripts d'*ESR1*.

En parallèle, ER α participe lui-même à une boucle de rétroaction complexe appelée « décalage traductionnel » (*translational offsetting*) : en modulant directement l'appareil de traduction global, il ajuste l'expression de ses propres gènes cibles indépendamment des variations transcriptionnelles (Lorent et al. 2019).

2.1.3. Régulation par la dégradation

Le cycle fonctionnel d'ER α s'achève par sa clairance protéique, un mécanisme paradoxalement indispensable à son activité transcriptionnelle.

Alors que la demi-vie basale du récepteur œstrogénique dépasse initialement 24 heures, elle chute drastiquement à seulement 3 ou 4 heures en présence d'E2. Ce renouvellement rapide dépend de sa polyubiquitination induite par le ligand, menant à sa prise en charge et à sa dégradation par le protéasome 26S (Nawaz et al. 1999 ; Reid et al. 2002). Selon le modèle décrit par Reid et al. (2002), cette élimination permanente est critique pour l'activité transcriptionnelle du récepteur. En effet, elle permet de libérer cycliquement les

promoteurs des gènes cibles, maintenant ainsi la réactivité et la sensibilité de la cellule tumorale aux stimulations hormonales ultérieures.

2.4. Les voies de signalisation

La liaison des œstrogènes à leur récepteur déclenche des cascades de signalisation complexes que l'on peut diviser en deux catégories principales selon leur cinétique et leur localisation. Alors que la **voie génomique** induit des effets transcriptionnels en quelques heures, la **voie MISS** (*Membrane-Initiated Steroid Signaling*) est responsable de réponses cellulaires rapides.

La voie génomique (Figure 7) débute par la liaison du ligand E2 au domaine LBD du récepteur. Cette interaction induit un changement conformationnel majeur, entraînant la dissociation des protéines chaperonnes (HSP) et l'homodimérisation de l'ER α . Après translocation nucléaire, le dimère régule l'expression de ses gènes cibles selon deux mécanismes distincts (Hewitt et Korach 2018 ; Vrtačnik et al. 2014 ; Adlanmerini et al. 2022) :

- **La voie génomique classique** : L'ER α interagit directement avec la chromatine au niveau de séquences promotrices spécifiques appelées « *Estrogen Responses Elements* » (ERE). Cette liaison permet le recrutement de co-régulateurs (activateurs ou répresseurs, selon le ligand) via les domaines AF-1 et AF-2, modulant l'ouverture de la chromatine et le recrutement de l'ARN polymérase II (Hewitt et Korach 2018). Parmi les gènes cibles emblématiques de cette voie figurent notamment *PGR* (codant pour le récepteur de la progestérone) et *GREB1* (*Growth Regulation by Estrogen in Breast cancer*).
- **La voie génomique indirecte** : Pour le tiers des gènes régulés par les œstrogènes dépourvus de séquences ERE, l'ER α n'interagit pas directement avec l'ADN. Il se lie via des interactions protéine-protéine à d'autres facteurs de transcription préalablement fixés sur leurs propres éléments de réponse (Vrtačnik et al. 2014), tels que Sp1 ou AP-1 (Hewitt et Korach 2018).

L'ER α peut être également activé en l'absence d'œstrogènes par la **voie indépendante du ligand**. Ce mécanisme repose sur des phosphorylations activatrices du récepteur, principalement au niveau de son domaine AF-1 (Vrtačnik et al. 2014). Ces phosphorylations

induisent la translocation nucléaire du récepteur et son interaction avec des cofacteurs, permettant ainsi une régulation transcriptionnelle même en conditions de privation hormonale (Adlanmerini et al. 2022).

Enfin, une fraction minoritaire d'ER α (notamment l'isoforme de 36 kDa (Lee et al. 2008)) est localisée à la membrane plasmique et permet l'initiation de la voie MISS (Figure 8). Cette intégration membranaire, permise par la palmitoylation des résidus cystéine ou par interaction avec des protéines d'échafaudage, ou avec le GPER déclenche des cascades de signalisation ultra-rapides. L'activation de ces récepteurs stimule des kinases partenaires (telles que c-Src ou la PI3K) et des protéines G ($G_{\alpha i}$, $G_{\beta \gamma}$), engageant ainsi des voies de transduction intracellulaires majeures, notamment les cascades des MAPK, de la phospholipase C et de la voie PI3K/Akt/mTOR (Hewitt et Korach 2018 ; Adlanmerini et al. 2022 ; Yaşar et al. 2017).

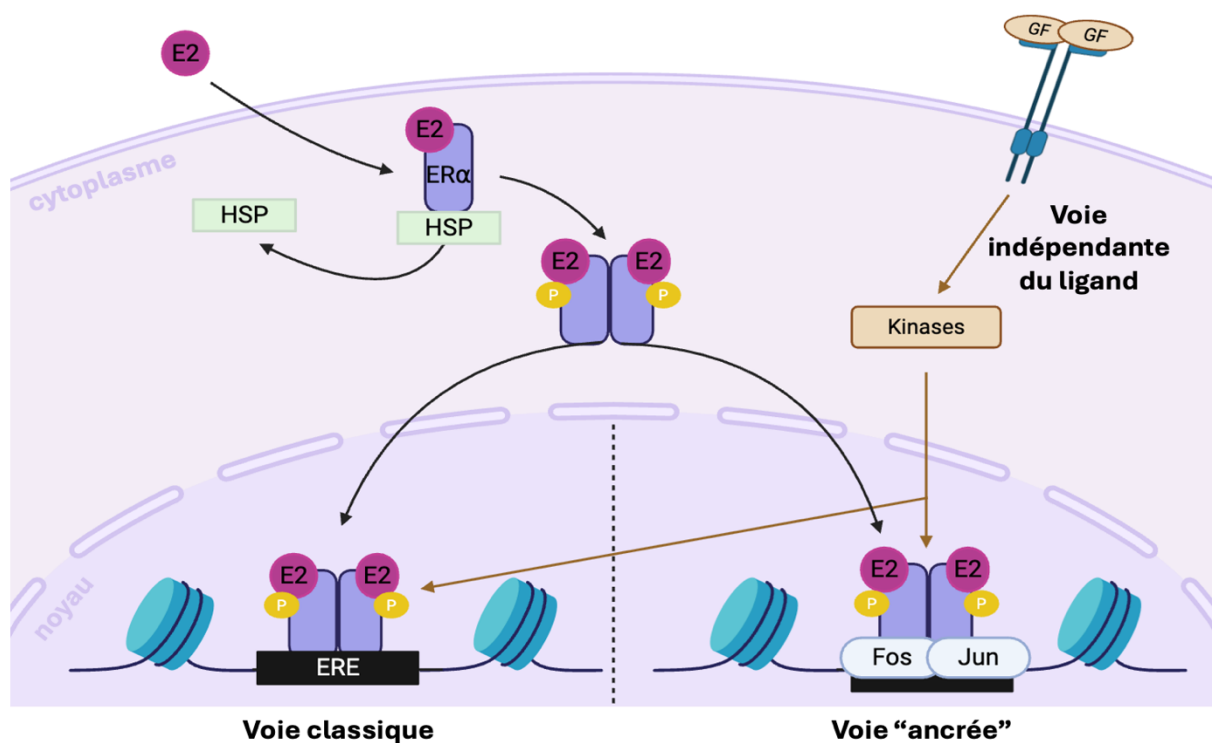


Figure 7. Les mécanismes d'activation et de régulation de la voie génomique. L'activation de la voie génomique peut être induite par le ligand (E2) ou via des signaux extracellulaires (comme des facteurs de croissance (GF)) par la voie indépendante du ligand (flèches brunes). Après dimérisation du récepteur, il peut entrer dans le noyau et réguler la transcription de ses gènes cibles. La liaison à l'ADN peut se faire de façon directe, comme dans la voie classique, ou via l'interaction avec des facteurs de transcription, c'est la voie génomique indirecte.

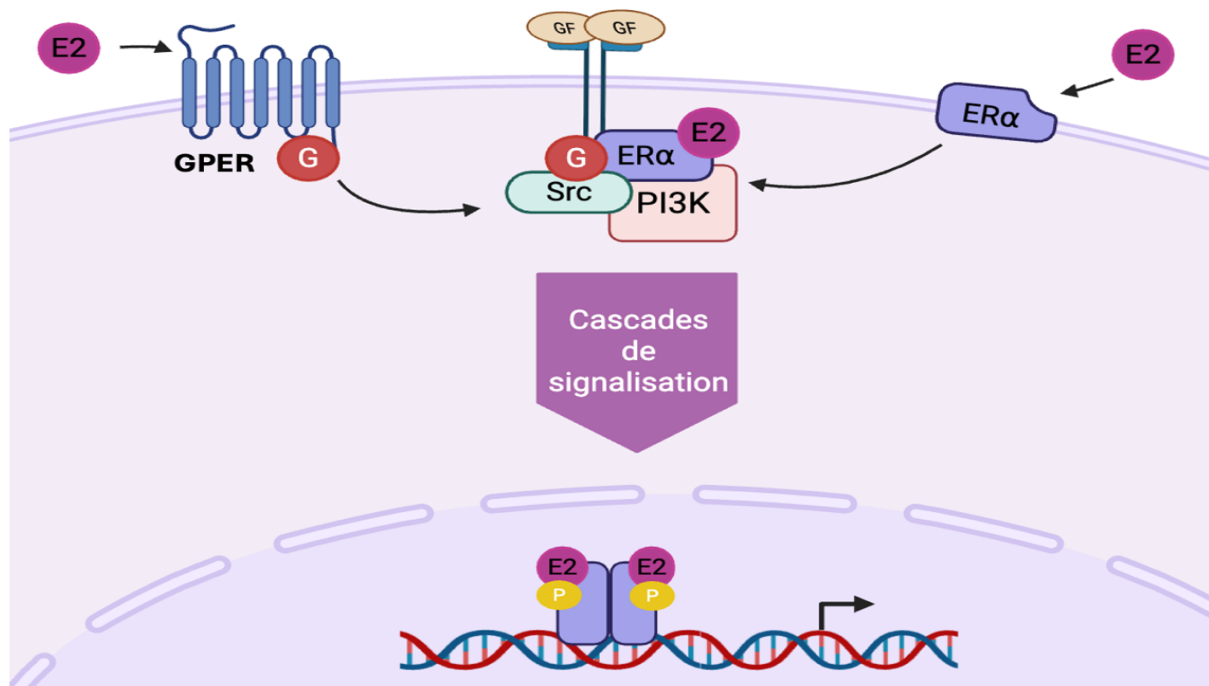


Figure 8. Illustration de la voie MISS activée par le GPER ou le ERα membranaire. La voie MISS (*Membrane-Initiated Steroid Signaling*) débute par la liaison de l'œstrogène (E2) au récepteur couplé aux protéines G (GPER) ou à une fraction membranaire de l'ERα. Cette interaction stimule la formation d'un complexe de signalisation impliquant des protéines d'échafaudage, des protéines G et des kinases, telles que Src et PI3K. Ces activations déclenchent des cascades de signalisation rapides (MAPK, Akt, PKA, PKC) qui peuvent aboutir à l'activation de l'ERα et son entrée dans le noyau.

HYPOTHÈSES, OBJECTIFS & STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE

L'hormonothérapie est le traitement de référence des cancers du sein ER+. Malgré son efficacité initiale, des résistances primaires ou acquises surviennent fréquemment au cours du traitement, favorisant la récurrence et la progression tumorale. La compréhension des mécanismes induisant ces résistances est donc devenue essentielle afin de limiter la progression du cancer et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques (Hartkopf et al. 2020, Gao et al. 2024).

Dans ce contexte, l'équipe du Pr. Christel Péqueux explore les effets d'une administration pulsée d'E2 sur l'efficacité d'hormonothérapies classiques en utilisant le Tamoxifène ou le Fulvestrant. En effet, des résultats préliminaires ont montré que l'administration d'E2 pulsée, plutôt que continue, permet d'augmenter l'expression d'ER α dans des xénogreffes de cancer du sein ER+ (Figure 9).

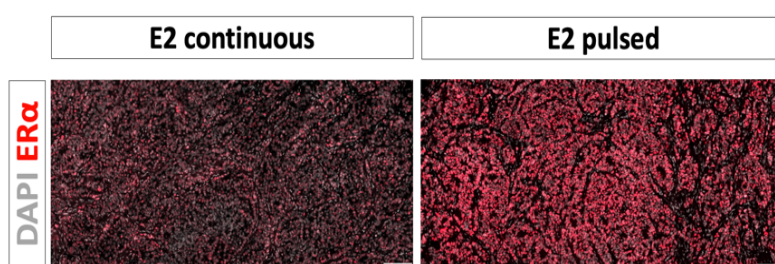


Figure 9. Figure 3. Immunofluorescence d'ER α dans des xénogreffes de cancer du sein ER+ implantées chez des souris, traitées par E2 administré en continu ou de manière pulsée. ER α est visualisé en rouge ; les noyaux sont contre-colorés au DAPI (gris). Barre d'échelle = 50 μ m. Résultat généré par Vincent Wuidar.

Étant donné que le récepteur ER α est la cible principale de l'hormonothérapie, l'hypothèse de travail est la suivante : un traitement pulsé à l'E2, en augmentant l'expression d'ER α , pourrait améliorer la sensibilité des cellules cancéreuses ER+ à ces thérapies et potentiellement restaurer celle des cellules résistantes.

L'objectif de ce travail est de **caractériser l'effet de l'administration pulsée d'E2 sur l'expression d'ER α dans différentes lignées cellulaires de cancer du sein ER+ : CAMA-1, MCF-7 et T47D.**

Dans ce but, la stratégie expérimentale s'articulait en deux grandes parties :

1. Caractérisation de l'impact d'un traitement pulsé *versus* continu d'E2 sur l'expression du récepteur des œstrogènes (ER α), ainsi que sur l'expression de ses gènes cibles (*PGR*, *GREB1*).
2. Identification des mécanismes responsables de la modulation d'ER α induite par le traitement pulsé d'E2 par l'exploration des mécanismes transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels.

1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires CAMA-1 (#HTB-21 ; ATCC), MCF-7 (#HTB-22 ; ATCC) et T-47D (#HTB-133 ; ATCC), trois lignées humaines de cancer du sein de type luminal et hormonosensibles, sont cultivées en routine selon les recommandations de la firme d'origine, l'*American Type Culture Collection* (ATCC), à 37 °C, sous atmosphère humidifiée et contenant 5 % de CO₂. Les cellules sont maintenues dans du milieu de culture standard correspondant au Dulbecco's Modified Eagle Medium 1x (DMEM) contenant du rouge phénol (#10938-025 ; Gibco, ThermoFisher Scientific), supplémenté avec 10 % de sérum bovin fœtal (FBS) (#10270, Gibco ; ThermoFisher Scientific) décomplémenté, 1 % de pénicilline-streptomycine (#15140-122 ; Gibco, ThermoFisher Scientific) et 1 % de L-glutamine (#25030-024, Gibco ; ThermoFisher Scientific).

Les cellules sont passées à l'aide de 0,05 % de trypsine-EDTA (#25300-054 ; Gibco, ThermoFisher Scientific), ensuite inactivée par le FBS contenu dans le milieu de culture, puis déposées dans des boîtes de Pétri. Les manipulations ont été réalisées sous une hotte à flux laminaire stérile (DTB120 ; Technigen).

1.1. Traitements cellulaires

Pour les traitements à l'E2 (10⁻⁹ M), les cellules CAMA-1, MCF-7 et T-47D sontensemencées à environ 200 000 cellules/puits et cultivées durant deux jours afin d'atteindre une confluence de 70 %.

Ensuite, les cellules subissent une étape de déprivation pendant une nuit. Pour cela, elles sont rincées avec 1 mL de tampon phosphate salin (PBS) et mises dans du milieu DMEM 1x sans rouge phénol (#31053-028 ; Gibco, ThermoFisher Scientific), additionné de 1 % de pénicilline-streptomycine et de 1 % de L-glutamine, contenant ou non 2 % de FBS, selon l'expérience réalisée par la suite. En effet, pour un traitement à l'E2 sur des cellules destinées à une analyse par RT-qPCR, le milieu DMEM 1x sans rouge phénol est

supplémenté avec 2 % de FBS décomplémenté et déstéroïdé. À l'inverse, les cellules destinées à une expérience de Western Blot sont cultivées dans un milieu dépourvu de FBS.

Les cellules sont ensuite traitées avec de l'E2 (#E8875 ; Sigma-Aldrich) soit en continu pendant 24 h, 48 h ou 72 h, soit selon un schéma pulsé (Figure 10).

→ Pour les **traitements continus**, les cellules sont exposées à un milieu de déprivation supplémenté en E2 durant 24 h, 48 h ou 72 h avant la fin de l'expérience.

→ Pour les **traitements pulsés**, les cellules sont exposées à un milieu de déprivation supplémenté en E2 pendant 4 h, puis replacées dans un milieu de déprivation sans E2 pendant 20 h. Ce cycle (4 h d'exposition à l'E2 suivies de 20 h de privation) est répété 1, 2 ou 3 fois selon les conditions expérimentales.

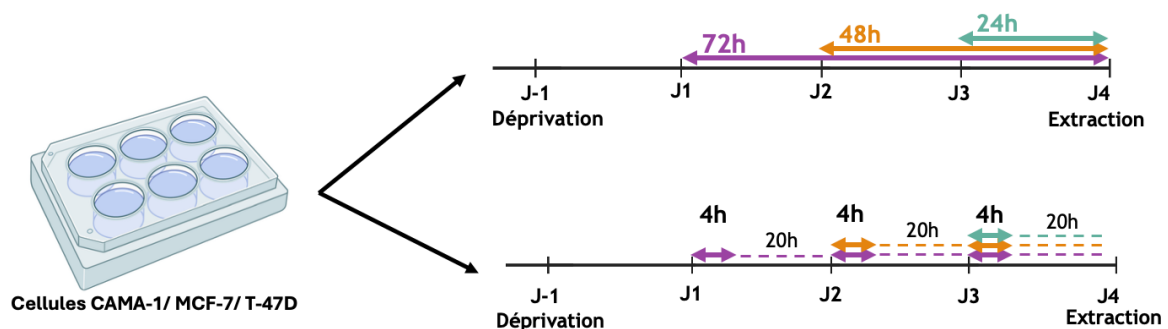


Figure 10. Design expérimental des traitements cellulaires *in vitro* des cellules CAMA-1, MCF-7 et T-47D.

La concentration d'E2 choisie (10^{-9} M) est basée sur des résultats préliminaires qui ont démontré une efficacité pour induire la signalisation d'ER α au sein des lignées cellulaires d'intérêt.

En vue de déterminer les mécanismes moléculaires expliquant la hausse d'expression d'ER α , les cellules ont été exposées à différents inhibiteurs en complément des cinétiques d'E2. À titre de contrôle négatif, du DMSO 0,1% (v/v) dilué dans le milieu de privation a été appliqué sur les cellules durant les dernières 24 h précédant la fin du traitement. L'inhibition de la transcription a été induite dans les cellules à l'aide de l'actinomycine D (10^{-8} M), tandis que le blocage de la traduction globale a été réalisé à l'aide de cycloheximide (12,5 μ g/mL). Ces deux inhibiteurs ont été également appliqués sur les cellules 24 h avant la fin du traitement. Afin de bloquer l'activité du protéasome 26S, les cellules ont été traitées au MG132 (10^{-6} M) deux heures avant la fin de la manipulation.

Au terme de ces traitements, le milieu est aspiré, les cellules sont rincées avec du PBS froid et les plaques sont conservées à -80°C lorsqu'elles ne sont pas utilisées immédiatement pour une extraction d'ARN ou de protéines.

2. Extraction protéique et Western Blot

2.1. Extraction protéique

À l'issue des traitements cellulaires, les protéines sont extraites à l'aide de 100 µL d'un tampon de lyse RIPA (Table 1), supplémenté avec 0,1 % (v/v) de « PhosSTOP » (#04906837001 ; Roche) et 0,04 % (v/v) de « cOmplete » (#04693116001 ; Roche), respectivement des inhibiteurs de phosphatases et de protéases. À l'aide de ce tampon, les cellules sont *scrappées* et les lysats incubés pendant 30 minutes sur glace. Ensuite, ils sont centrifugés pendant 10 minutes à 10 000 rpm à 4 °C. Le surnageant, contenant les protéines, est ensuite récupéré et stocké à -20 °C en vue d'analyses ultérieures par Western Blot.

Table 1. Composition du RIPA

Réactifs	Concentrations finales	Références
Tris buffer (pH 7,4)	0,05 M	#2449.2 ; Carl Roth ; ≥ 99 %
NaCl	0,15 M	#P029.2 ; Carl Roth ; ≥ 99 %
Igepal-CA630	1 % (v/v)	#I3021-100ML ; Sigma-Aldrich
Triton X-100	1 % (v/v)	#1.08603.1000 ; Merck Millipore
Déoxycholate de sodium	1 % (w/v)	#06750-100G ; Sigma-Aldrich ; 97 %
Sel de dodécylsulfate de sodium (SDS)	0,1 % (w/v)	#1.13760.1000 ; Merck Millipore

2.2. Quantification protéique

Une fois extraites, les protéines sont quantifiées afin que tous les échantillons comparés lors du Western Blot possèdent la même quantité de protéines initiale. Pour ce faire, un dosage colorimétrique à l'aide du kit « DC Protein Assay » (#5000111 ; Bio-Rad Laboratories) et d'une courbe étalon de différentes concentrations d'albumine sérique bovine (BSA) (#A2153-100G ; Sigma-Aldrich ; > 96 %), couvrant une gamme de 0,15625 mg/mL à 10 mg/mL, est réalisé. Ce kit de quantification contient 3 réactifs et son mécanisme colorimétrique repose sur deux étapes de réductions successives :

- Le Réactif A est une solution alcaline permettant l'interaction des ions Cu^{2+} , contenus dans le Réactif S, avec les liaisons peptidiques entre les acides aminés. L'interaction des ions Cu^{2+} avec les protéines va permettre leur réduction en ions Cu^+ .
- Un Réactif B, correspondant au réactif de Folin, est réduit par les acides aminés aromatiques et les ions Cu^+ , induisant une coloration bleue.

Ainsi, l'intensité de la coloration bleue dépend de la concentration en protéines totales présentes dans l'échantillon.

L'absorbance est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre (MultiSkan FC ; ThermoFisher Scientific) et la concentration de chaque échantillon est calculée à partir de la courbe étalon de BSA.

En pratique, 5 μL de chaque échantillon et de chaque point de la courbe étalon sont déposés en triplicat sur une plaque 96-puits. Sont ajoutés successivement 25 μL du mélange de Réactif A/S (préparé en raison de 20 μL de S pour 1 mL de A) et 200 μL du Réactif B. La plaque est ensuite incubée pendant 15 minutes, sous agitation, à l'abri de la lumière.

2.3. Western Blot - préparation des échantillons

Suite à la quantification, chaque échantillon est dilué dans du tampon RIPA afin d'obtenir une concentration finale de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de protéines dans un volume de 20 μL . Un cinquième de ce volume final est composé de *Loading Buffer 5X* (Annexe 1), un tampon de chargement

dénaturant. En plus de la dénaturation chimique des protéines, elles subissent également une étape de dénaturation thermique par leur incubation pendant 5 minutes à 95 °C dans un bloc chauffant, avant d'être immédiatement placées sur glace pour stabiliser l'état dénaturé.

2.4. Western Blot - électrophorèse SDS-PAGE et transfert sur membrane de PVDF

Après dénaturation, les échantillons sont chargés sur gels de polyacrylamide (Annexe 2), chacun séparé en deux parties aux propriétés physico-chimiques distinctes :

- Le **gel de compression**, faiblement concentré en acrylamide (4 %) et affichant un pH de 6,8, a pour rôle de comprimer les protéines en une bande étroite à la bordure du gel de séparation. Cette focalisation repose sur la différence de mobilité électrophorétique entre les ions glycines et chlorures à ce pH.
- Dans le **gel de séparation**, plus concentré en acrylamide et avec un pH fixé à 8,8, les ions glycines sont ionisés et migrent plus rapidement, permettant aux protéines de migrer librement. Le pourcentage d'acrylamide de ce gel dépend de la taille de la protéine à séparer (Table 2).

Table 2. Pourcentage d'acrylamide des gels de séparation

Protéines d'intérêt	Tailles	% d'acrylamide
ER α	66 kDa	10 %
PR	119 kDa	8 %
GREB1	216 kDa	

Une fois la cuve de migration installée (contenant les gels et du tampon de migration 1X (Annexe 1), 5 μ L de marqueur de poids moléculaire (PageRuler Prestained Protein Ladder ; ThermoFisher Scientific) et 20 μ L de chaque échantillon sont chargés sur le gel. Ensuite, la

migration est lancée à 50 V pendant $\pm$ 15 minutes, permettant la compression des protéines dans le gel à 4 % d'acrylamide, avant de passer à 100 V pendant environ 2 h.

Suit une étape de transfert des protéines. Dans une cuve remplie de tampon de transfert 1X (Annexe 1) et refroidie par un glaçon, les protéines sont transférées à 100 V pendant 1 h sur une membrane de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride* ; Perkin Elmer Life Science), préalablement activées en les plongeant dans 3 bains successifs de méthanol, d'eau désionisée et de tampon de transfert 1X.

2.5. Immunodétection

À la suite du transfert, les sites de liaison aspécifique sont saturés lors d'une étape de blocage, qui permet de limiter le bruit de fond lors de l'immunodétection. Pour ce faire, les membranes de PVDF sont incubées pendant 2 h, sous agitation, dans du lait (Régilait) 5 % dilué dans du tampon de lavage 1X (Annexe 1).

Les membranes sont ensuite incubées, *overnight* à 4 °C sous agitation, avec les anticorps primaires (Annexe 3) spécifiques des protéines d'intérêt. À l'issue de 3 lavages de 5 minutes dans du tampon de lavage 1X sous agitation, permettant d'éliminer les anticorps primaires non fixés, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire (Annexe 4) adéquat couplé à une *Horseradish Peroxydase* (HRP), pendant 1 h à température ambiante. Après une nouvelle série de 3 lavages, les protéines d'intérêt sont immunodétectées. Le luminol présent dans le kit « Pierce™ ECL Western Blot Substrate » (#32209 ; ThermoFisher Scientific) ou, si nécessaire, le kit « Western Lightning® Plus-ECL » (#NEL105001EA ; PerkinElmer) est oxydé par la HRP couplée aux anticorps secondaires, ce qui engendre l'émission de photons, détectés par l'appareil ImageQuant 800.

La quantification des niveaux d'expression de protéines a été réalisée en utilisant le logiciel « Quantity One ». L'expression des protéines d'intérêt est normalisée par rapport à l'expression d'une protéine de ménage, la déshydrogénase de glycéraldéhyde-3-phosphate (GAPDH), qui est exprimée de la même manière dans toutes les conditions.

3. Extraction de l'ARN total et RT-qPCR

3.1. Extraction de l'ARN total

L'extraction d'ARN à partir des cellules CAMA-1, T-47D et MCF-7 est réalisée via le kit « High Pure RNA Isolation Kit » (#11828665001 ; Roche, Indianapolis, IN, USA). Les cellules, cultivées en plaques 6-puits, sont *scrappées* et lysées dans un mélange de 100 µL/puits de PBS autoclavé et 200 µL/puits de *Lysis/Binding Buffer*, sur glace, et les lysats sont transférés sur les colonnes d'extraction fournies par le kit. Le *Lysis/Binding Buffer* contient des agents chaotropiques assurant simultanément la lyse des cellules et l'inactivation immédiate des RNAses cellulaires, ainsi que de l'éthanol, qui facilite l'adsorption des acides nucléiques sur la membrane de silice. Après centrifugation à 8000 g pendant 30 secondes, les filtrats sont éliminés et les colonnes sont incubées avec de la DNase I pendant 15 minutes à température ambiante. Plusieurs étapes de lavage se succèdent ensuite afin d'éliminer les impuretés (des sels contaminants, des protéines, des résidus d'ADN digérés, ...).

- 1) Centrifugation (30 s à 800 g) avec 500 µL de Wash Buffer I ;
- 2) Centrifugation (30 s à 800 g) avec 500 µL de Wash Buffer II ;
- 3) Centrifugation (2 min 30 s à vitesse maximale) avec 200 µL de Wash Buffer II ;

Finalement, les ARN sont élués grâce au tampon d'élution et les ARN totaux sont récupérés dans des tubes Eppendorf.

3.2. Quantification de l'ARN

La concentration et la pureté des ARN élués sont déterminées par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). La mesure de l'absorbance à différentes longueurs d'onde de chaque échantillon permet de déterminer à la fois sa concentration en ARN (pic à 260 nm) et la présence de contaminants via deux ratios d'absorbance :

→ Le **ratio A260/A280** : une valeur proche de 2 indique une bonne pureté de l'échantillon ; alors qu'une valeur inférieure à 1,8 indique une contamination protéique.

→ Le **ratio A260/A230** doit être supérieur ou égal à 2. Une valeur plus faible suggère la présence de contaminations par des agents chaotropiques ou des solvants.

3.3. Transcription inverse

En vue de l'analyse de l'expression génique dans nos cellules, l'ARN total doit être converti en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse. Pour ce faire, 1 µg d'ARN est dilué dans de l'eau *RNAse-free* pour atteindre un volume de 16 µL. Sont ensuite ajoutés 4 µL de mix enzymatique provenant du kit « FastGen Scriptase II cDNA 5x Ready » (#LS64 ; Nippon Genetics). Ce mix contient la transcriptase inverse, des dNTPs et un mélange d'amorces aléatoires en plus d'Oligo(dT)s. Le choix de ces amorces permettra donc de convertir en ADNc l'entièreté des ARN présents dans la cellule. Après homogénéisation des mélanges, les échantillons sont placés dans un thermocycleur SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) suivant ce programme :

- I. Hybridation des amorces : 25 °C pendant 10 minutes ;
- II. Synthèse de l'ADNc : 42 °C pendant 60 minutes ;
- III. Dénaturation et inactivation thermique de la transcriptase inverse : 85 °C pendant 5 minutes.

Les ADNc obtenus sont conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

3.4. PCR quantitative

L'expression des gènes d'intérêt (*ESR1*, *PGR* et *GREB1*) a été quantifiée par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR). Cette technique, aussi appelée PCR en temps réel, repose sur l'intégration d'un agent intercalant fluorescent, le SYBR Green, au sein des amplicons double-brin. Le thermocycleur QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific, USA) est utilisé pour mesurer la fluorescence, proportionnelle à la quantité d'amplicons.

Les ADNc, dilués 10x dans de l'eau *RNAse-free*, sont analysés en triplicat sur plaques 96-puits. Chaque puits contenait 2 µL d'ADNc et 10 µL de mix réactionnel PCR (Annexe 5). Le programme d'amplification (Figure 11) comprend 45 cycles de trois phases : dénaturation à 95°C, hybridation des amorces à 50 °C et extension à 72 °C.

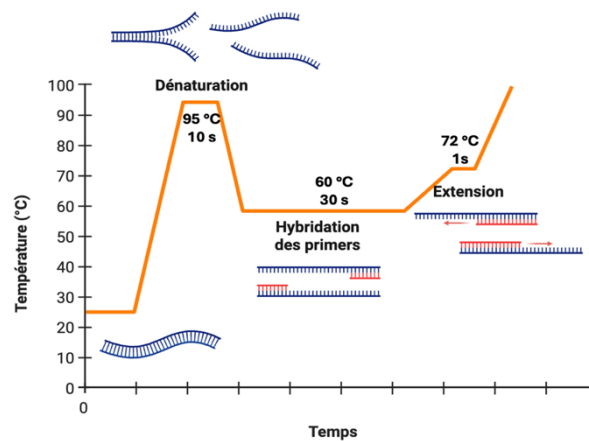


Figure 11. Programme d'un cycle de qPCR. Dénaturation à 95 °C pendant 10 secondes ; Hybridation des amorces à 60 °C pendant 30 secondes ; Extension des amorces à 72 °C pendant 1 seconde. Créé avec BioRender.

Pour garantir la fiabilité des résultats, deux contrôles de spécificité ont été appliqués :

- Les amorces sont conçues pour chevaucher une jonction exon-exon, empêchant l'amplification d'ADN génomique contaminant.
- La réalisation d'une courbe de fusion post-PCR est un contrôle de la spécificité permettant de déterminer le pic de fusion des amplicons. Comme tous les amplicons sont supposés posséder la même composition en bases, ils doivent tous avoir la même température de fusion.

Finalement, les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à la moyenne géométrique de deux gènes de ménage : GAPDH et TBP. En plus, une gamme étalon (50 à 2 ng/ μ L) d'extraits de placenta humain a été utilisée pour assurer la quantification.

4. Analyse statistique

Les données des expériences ayant pu être répliquées au moins trois fois indépendamment ont été soumises à des analyses statistiques, réalisées avec la version 8 de *GraphPad Prism*. La normalité des distributions a été systématiquement explorée à l'aide des tests de Shapiro-Wilk, d'Anderson-Darling, d'Agostino et Pearson et de Kolmogorov-Smirnov.

Lorsque la condition de normalité était respectée, les données ont été représentées sous forme d'histogrammes de moyennes $\pm$ SEM et soumises à une ANOVA à un facteur suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey. Dans le cas contraire, les données ont été

exprimées sous forme d'histogrammes de médianes avec l'écart interquartile et le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn a été appliqué. Pour l'ensemble des analyses, le seuil de significativité statistique a été fixé à 0,05.

A. Étude des effets de l'E2 continu versus pulsé sur des cellules de cancer du sein ER+

1. L'estradiol pulsé augmente l'expression d'ER α dans les cellules CAMA-1 et MCF-7

Des travaux antérieurs de l'équipe ont démontré qu'un traitement pulsé d'E2 permettait d'augmenter l'expression d'ER α *in vivo* (Figure 9). L'objectif de ce point A.1. est de transposer cette observation *in vitro*.

Pour ce faire, les cellules CAMA-1 ont été soumises à deux protocoles distincts de traitement à l'E2 (10^{-9} M) sur une cinétique de 24 h, 48 h et 72 h : le premier correspondant à une exposition continue et le second à une exposition pulsée à raison de 1, 2 ou 3 pulses successifs (chaque pulse durant 4 h, espacés toutes les 20 h (Figure 10)). L'expression protéique d'ER α a été analysée par Western Blot.

Dans les cellules CAMA-1, les résultats indiquent une tendance à maintenir, voire à légèrement augmenter, l'expression d'ER α lors de traitements à l'E2 (Figure 12).

Afin de vérifier si ce profil d'expression est conservé dans une autre lignée cellulaire, une analyse préliminaire a été menée sur la lignée MCF-7 (Figure 13). L'analyse du Western Blot montre un profil d'expression similaire à celui observé dans les cellules CAMA-1, c'est-à-dire un maintien de l'expression d'ER α lors de traitements à l'E2. Cependant, dans les cellules MCF-7, il semblerait que l'expression protéique d'ER α soit augmentée lors de traitements pulsés d'E2, par rapport au traitement continu de 72 h.

Ces résultats suggèrent donc que l'expression d'ER α est maintenue, voire augmentée, lors de traitements continus à l'E2 et que, dépendamment de la lignée cellulaire, l'administration pulsée d'E2 peut augmenter l'expression d'ER α .

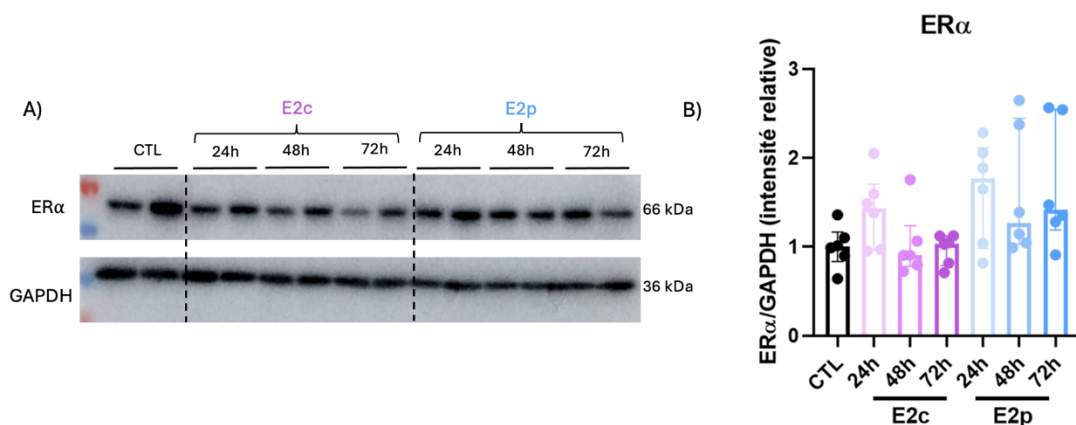


Figure 12. Expression de la protéine ER α après traitement continu ou pulsé à l'E2 dans les cellules CAMA-1. A) Blots représentatifs d'un Western Blot. B) Quantification de l'expression protéique. Les résultats ont été normalisés par rapport au contrôle de charge (GAPDH). La quantification a été réalisée à l'aide du logiciel Quantity One et l'analyse statistique sur *GraphPad Prism (version 8)*. Un test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($p = 0,0523$), suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn, a été réalisé. Le seuil de significativité est fixé à 0,05. Les résultats sont exprimés en médiane [écarts interquartiles]. $N = 6$ réplicats issus de 3 expériences indépendantes.

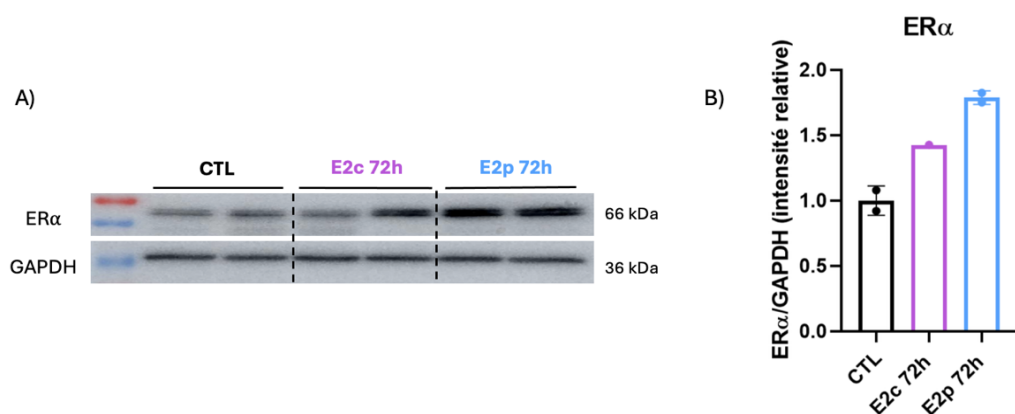


Figure 13. Expression de la protéine ER α après traitement continu ou pulsé à l'E2 dans les cellules MCF-7. A) Blots représentatifs du Western Blot. B) Quantification de l'expression protéique. Les résultats ont été normalisés par rapport au contrôle de charge (GAPDH). La quantification a été réalisée à l'aide du logiciel Quantity One et la mise en forme à l'aide de *GraphPad Prism (version 8)*. Ces données sont issues d'une seule expérience, $n = 2$ réplicats techniques. Par conséquent, aucun test statistique n'a pu être réalisé. Le premier duplicat technique de la condition E2c 72 h a été exclu lors de la quantification en raison d'une viabilité cellulaire insuffisante.

2. Maintien de l'activité transcriptionnelle d'ER α sous stimulations œstrogéniques

Afin de caractériser l'impact fonctionnel d'un traitement pulsé par rapport à une exposition continue à l'E2, nous avons évalué l'activité transcriptionnelle du récepteur à travers l'analyse de l'induction de ses principaux gènes cibles, *PGR* et *GREB1*.

Pour ce faire, l'expression des gènes *PGR* et *GREB1* a d'abord été quantifiée à l'échelle transcriptionnelle par RT-qPCR, avant d'être validée au niveau protéique par analyse de l'expression protéique de PR et GREB1 par Western Blot.

Dans les cellules CAMA-1 (Figure 14), l'expression des ARNm de *PGR* augmente significativement lors de traitements continus à l'E2 ; alors que le niveau d'ARNm reste stable et comparable à celui du contrôle tout au long de la cinétique pulsée. Le gène cible *GREB1*, quant à lui, semble répondre aux deux modalités d'exposition. Cependant, la hausse des ARNm n'est significative qu'en réponse aux traitements continus d'E2.

L'analyse de l'expression protéique de PR et GREB1 dans les cellules CAMA-1 (Figure 15) concorde avec les niveaux d'ARNm observés ci-dessus. L'expression protéique de PR est significativement augmentée lorsque les cellules sont traitées à l'E2 en continu, alors qu'elle reste stable lors des traitements pulsés. L'expression protéique de GREB1 affiche plutôt une tendance à être globalement augmentée en réponse aux traitements d'E2, sans distinction d'une cinétique d'exposition.

Globalement, ces résultats montrent un maintien de l'activité transcriptionnelle d'ER α sous traitement continu et pulsé d'E2 dans la lignée CAMA-1.

2.1. Données complémentaires dans d'autres lignées ER+

Les protocoles d'analyse de l'activité transcriptionnelle d'ER α appliqués dans la lignée CAMA-1 ont été étendus à d'autres lignées cellulaires de cancer du sein ER+, à savoir les cellules MCF-7 et T-47D, lors d'une seule expérience.

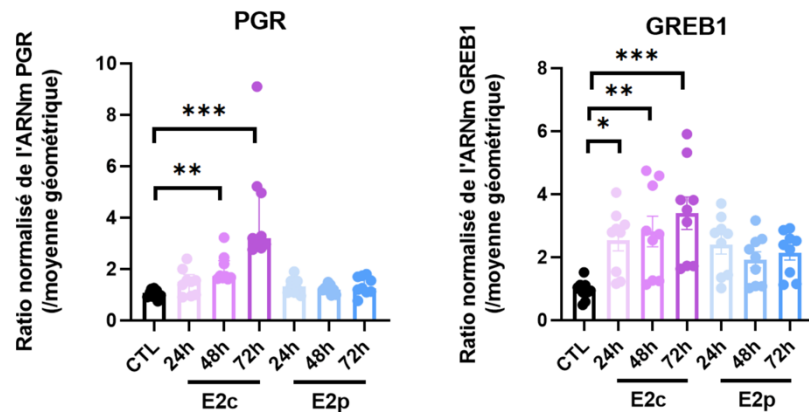


Figure 14. Niveau d'ARN messagers des gènes *PGR* et *GREB1* après traitement continu ou pulsé à l'E2 des cellules CAMA-1. L'expression de *PGR* et *GREB1* a été analysée par RT-qPCR. Les résultats sont normalisés par rapport à la moyenne géométrique de deux contrôles internes (*GAPDH* et *TBP*) et par rapport à la moyenne des conditions contrôles. L'analyse statistique a été réalisée sur *GraphPad Prism* (version 8). Pour le gène *PGR*, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($p < 0,001$), suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn, a été réalisé. Pour le gène *GREB1*, une ANOVA à un facteur ($p = 0,0004$), suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey, a été effectuée. Le seuil de significativité est fixé à 0,05 (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$). Les résultats sont exprimés en médiane [écarts interquartiles] (*PGR*) ou en moyenne $\pm$ SEM (*GREB1*). N = 9 réplicats, issus de 3 expériences indépendantes.

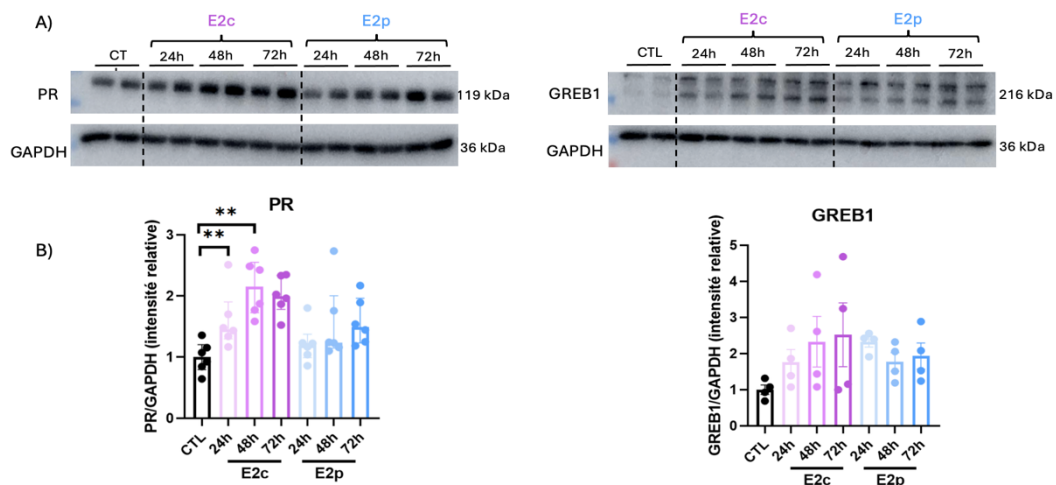


Figure 15. Expression protéique de PR et GREB1 après traitement continu ou pulsé à l'E2 des cellules CAMA-1. A) Blots représentatifs d'un Western Blot. B) Quantification de l'expression protéique. Les résultats ont été normalisés par rapport au contrôle de charge (*GAPDH*). La quantification a été réalisée à l'aide du logiciel *Quantity One* et l'analyse statistique sur *GraphPad Prism* (version 8). Pour la protéine PR, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($p = 0,0008$), suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn, a été réalisé. Pour la protéine GREB1, une ANOVA à un facteur ($p = ns$), suivie du test de comparaisons multiples de Tukey, a été effectuée. Le seuil de significativité est fixé à 0,05 (** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$). Les résultats sont exprimés en médiane [écarts interquartiles] (PR) ou en moyenne $\pm$ SEM (GREB1). N = 6 réplicats issus de 3 expériences indépendantes pour PR, et n = 4 réplicats issus de 2 expériences indépendantes pour GREB1.

Les analyses par RT-qPCR (Figure 16) révèlent que le profil d'expression des gènes *PGR* et *GREB1* dans les cellules T-47D et MCF-7 a tendance à augmenter en réponse à l'exposition à l'E2 et ce, indépendamment de la cinétique de traitement. Cette observation s'oppose à celle réalisée pour les cellules CAMA-1, où le niveau d'ARNm de *PGR* semble chuter et où celui de *GREB1* semble être maintenu à un niveau basal en réponse à une exposition pulsée d'E2.

Bien que ces données revêtent un caractère préliminaire, les profils d'expression obtenus ici révèlent une hétérogénéité de réponse selon le modèle cellulaire étudié (voir Discussion).

L'analyse par Western Blot de l'expression protéique de PR et GREB1 dans les cellules MCF-7 (Figure 17) montre une induction importante de l'expression de ces deux protéines suite à l'exposition à l'E2, indépendamment de la modalité d'administration. De manière intéressante, l'expression de PR est soutenue à la fois par le traitement continu et pulsé, s'écartant ainsi des profils d'expression observés dans la lignée CAMA-1 (Figure 15). De plus, l'expression de GREB1 est également augmentée en réponse aux traitements hormonaux.

Ces données à caractère préliminaire confirment donc la capacité d'ER α à exercer son activité transcriptionnelle sous exposition continue ou pulsée d'E2.

B. Les mécanismes moléculaires régulant la modulation de l'expression d'ER α

1. Invalidation de l'hypothèse d'une régulation transcriptionnelle de novo

La deuxième partie de ce travail a pour objectif d'explorer les hypothèses possibles pour expliquer cette hausse de l'expression d'ER α (plus ou moins importante selon la lignée cellulaire considérée) lors de traitements pulsés d'E2.

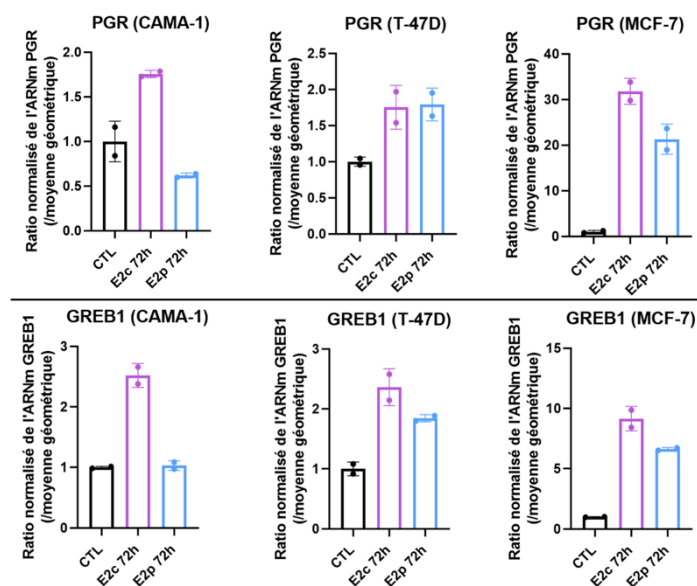


Figure 16. Niveau d'ARN messagers de PGR et GREB1 après traitement continu ou pulsé à l'E2 dans plusieurs lignées de cancer du sein ER+ (CAMA-1, T-47D et MCF-7). Les résultats sont normalisés par rapport à la moyenne géométrique de deux contrôles internes (GAPDH et TBP) et par rapport à la moyenne des conditions contrôles. Ces données sont issues d'une seule expérience, n = 2 réplicats techniques. Par conséquent, aucun test statistique n'a pu être réalisé.

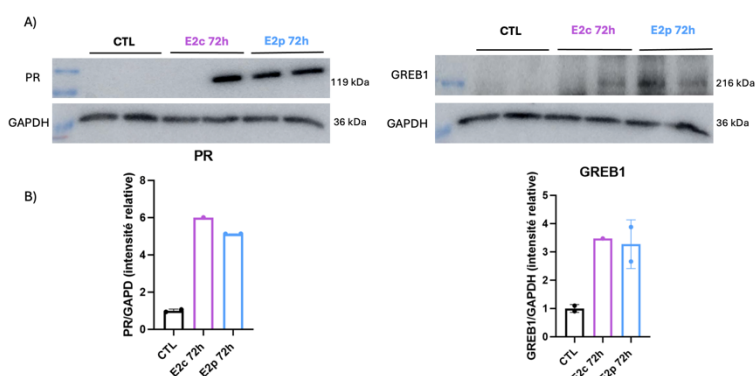


Figure 17. Expression des protéines PR et GREB1 après traitement continu ou pulsé à l'E2 dans les cellules MCF-7. A) Blots représentatifs du Western Blot. B) Quantification de l'expression protéique. Les résultats ont été normalisés par rapport au contrôle de charge (GAPDH). La quantification a été réalisée à l'aide du logiciel Quantity One et la mise en forme à l'aide de GraphPad Prism (version 8). Ces données sont issues d'une seule expérience, n = 2 réplicats techniques. Par conséquent, aucun test statistique n'a pu être réalisé. Le premier duplicat technique de la condition E2c 72h a été exclu lors de la quantification en raison d'une viabilité cellulaire insuffisante.

Afin de déterminer si cette augmentation d'expression découle d'une modulation transcriptionnelle en amont, nous avons évalué l'impact de la cinétique d'administration de l'E2 sur la synthèse de ses propres transcripts. L'hypothèse sous-jacente était qu'un traitement pulsé induirait une augmentation de la transcription du gène *ESR1*, par rapport à un traitement continu.

Pour ce faire, une analyse par RT-qPCR a été menée sur les cellules CAMA-1 afin de quantifier les niveaux d'ARNm du gène *ESR1* après 24 h, 48 h ou 72 h de traitement continu ou pulsé à l'E2 (Figure 18).

Les résultats suggèrent qu'indépendamment de la cinétique d'administration, l'exposition à l'E2 induit une diminution hautement significative des niveaux d'ARNm d'*ESR1* par rapport au contrôle non traité. De façon importante, aucune différence n'est observée entre le profil d'expression des transcripts sous traitement continu et sous traitement pulsé.

L'absence de variation des niveaux d'ARNm d'*ESR1* entre les deux modes d'administration démontre que l'augmentation de l'expression d'ER α en conditions pulsées n'est probablement pas due à une modulation transcriptionnelle.

Afin de valider la portée de ces observations, une seule expérience complémentaire de RT-qPCR à 72 h a été réalisée sur d'autres lignées cellulaires de cancer du sein ER+ (MCF-7 et T-47D) (Figure 19).

Les résultats ont révélé des profils semblables entre les CAMA-1 et les MCF-7, caractérisés par une diminution des niveaux de transcripts d'*ESR1* sous E2, indépendamment de la modalité d'exposition.

A contrario, la lignée T-47D s'est distinguée comme la seule à présenter une augmentation apparente de l'expression des transcripts d'*ESR1* spécifiquement lors du traitement pulsé.

Afin d'apporter une démonstration fonctionnelle au niveau protéique, l'expression d'ER α a été analysée par Western Blot sous blocage transcriptionnel. Cette étude a été menée sur la lignée cellulaire T-47D en mesurant l'impact de l'actinomycine D, un inhibiteur global de la transcription, après 72 heures de traitement pulsé ou continu (Figure 20).

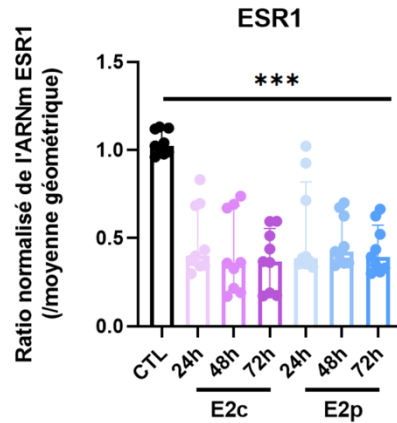


Figure 18. Niveau d'ARN messager du gène *ESR1* après traitement continu ou pulsé à l'E2 dans les cellules CAMA-1.

L'expression d'*ESR1* a été analysée par RT-qPCR. Les résultats sont normalisés par rapport à la moyenne géométrique de deux contrôles internes (*GAPDH* et *TPB*) et par rapport à la moyenne des conditions contrôles. L'analyse statistique a été réalisée sur *GraphPad Prism* (version 8). Un test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($p = 0,0004$), suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn, a été réalisé. Le seuil de significativité est fixé à 0,05. Les résultats sont exprimés en médiane [écarts interquartiles]. $N = 9$ réplicats issus de 3 expériences indépendantes.

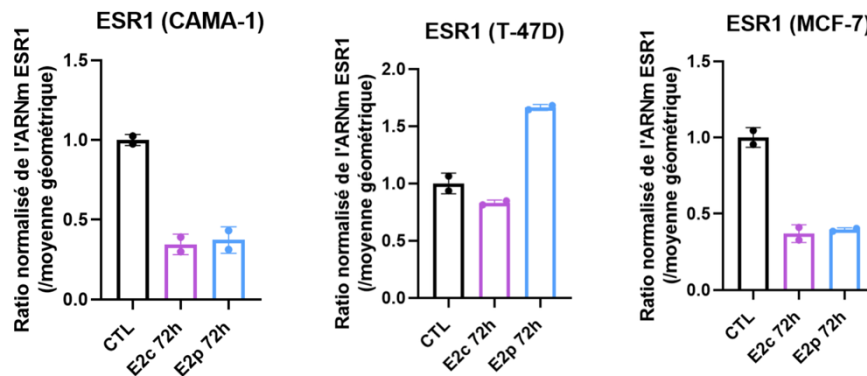


Figure 19. Comparaison des niveaux d'ARN messagers du gène *ESR1* après traitement continu ou pulsé à l'E2 dans plusieurs lignées de cancer du sein ER+ (CAMA-1, T-47D, MCF-7).

L'expression d'*ESR1* a été analysée par RT-qPCR après 72 h de traitement continu ou pulsé à l'E2. Les résultats sont normalisés par rapport à la moyenne géométrique de deux contrôles internes (*GAPDH* et *TBP*). Ces données sont issues d'une seule expérience, $n = 2$ réplicats techniques. Par conséquent, aucun test statistique n'a été effectué.

En condition contrôle (DMSO 0,1 %), le profil d'expression protéique chez les T-47D confirme la cinétique attendue : le traitement continu (E2c 72h) induit une baisse du niveau d'ER α par rapport au contrôle non traité, tandis que le traitement pulsé (E2p 72h) préserve efficacement le niveau de récepteurs. Le blocage de la transcription induit par l'actinomycine D ne lève pas cette différence.

Ce résultat démontre donc que même chez les cellules T-47D, la persistance d'ER α sous l'effet d'une exposition pulsée n'est pas due à une hausse de la transcription du gène *ESR1*.

L'ensemble de nos modèles cellulaires converge vers l'interprétation suivante : la hausse d'expression d'ER α par les traitements pulsés ne dépend pas d'une régulation transcriptionnelle *de novo*. Dans les parties suivantes, nous allons donc analyser les hypothèses d'une hausse de la traduction des transcrits d'*ESR1* (B.2.) ou d'une diminution de la dégradation d'ER α (B.3.) sous traitement pulsé.

2. Implication de la traduction active dans la hausse d'ER α induite par le traitement pulsé

Nos observations précédentes ayant exclu l'implication d'une régulation transcriptionnelle *de novo* dans l'induction d'ER α par des traitements pulsés, nous avons testé l'hypothèse d'une hausse de la traduction des transcrits d'*ESR1* déjà disponibles dans la cellule, en réponse à une administration pulsée d'E2.

Pour explorer cette piste, les cellules T-47D ont été soumises aux protocoles classiques d'exposition à l'E2 pendant 72 h, avec ceci de différent que, 24 h précédant la fin du traitement, les cellules ont soit été traitées avec du DMSO (0,1 %), soit avec du cycloheximide.

En condition contrôle (DMSO 0,1 %), l'analyse par Western Blot (Figure 21) confirme les cinétiques attendues : le traitement continu (E2c 72h) induit une diminution hautement significative de l'expression protéique d'ER α par rapport au témoin non traité, tandis que le traitement pulsé (E2p 72h) augmente significativement les niveaux de récepteurs.

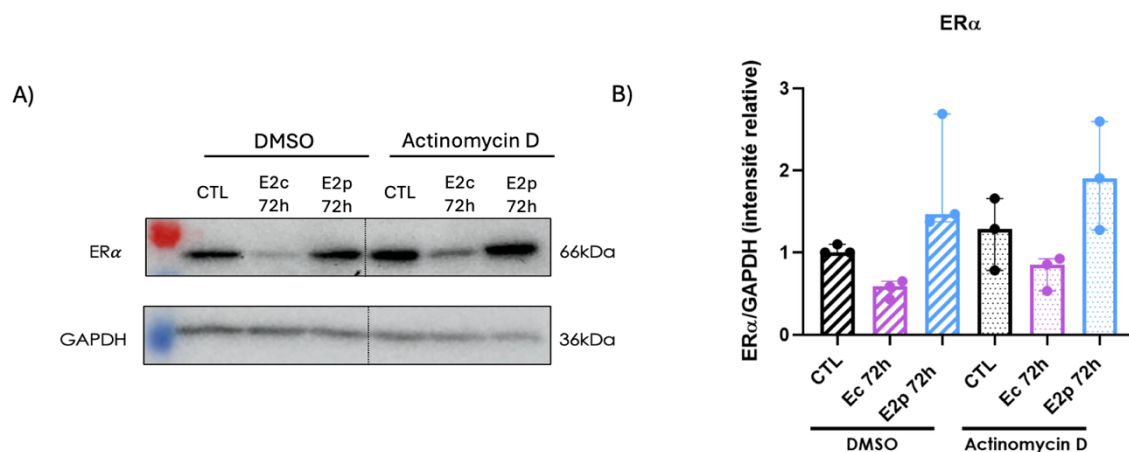


Figure 20. Expression de la protéine ER α après traitement continu ou pulsé à l'E2, en présence ou en l'absence d'actinomycine D dans les cellules T-47D. A) Blots représentatifs d'un Western Blot. B) Quantification de l'expression protéique. Les résultats ont été normalisés par rapport au contrôle de charge (GAPDH). La quantification a été réalisée à l'aide du logiciel Quantity One et l'analyse sur *GraphPad Prism* (version 8). Un test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($p = 0,0215$), suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn, a été réalisé. Le seuil de significativité est fixé à 0,05. Les résultats sont exprimés en médiane [écarts interquartiles]. N = 3 réplicats issus de 3 expériences indépendantes.

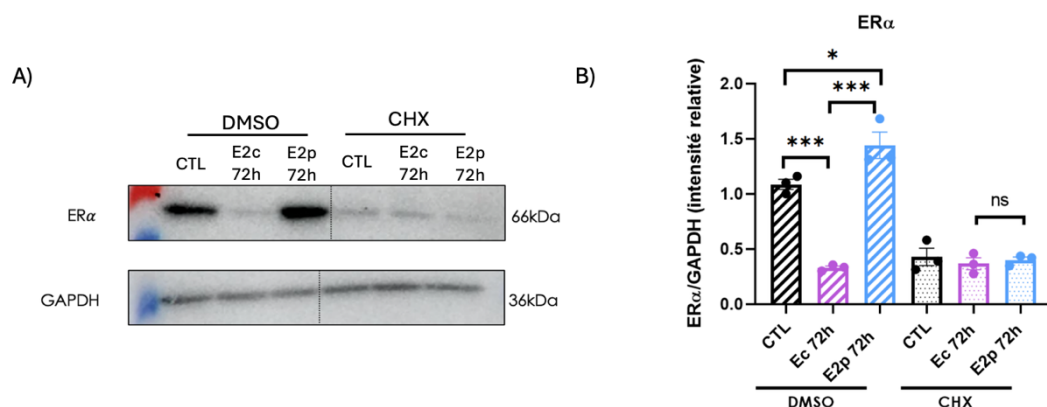


Figure 21. Expression de la protéine ER α après traitement continu ou pulsé à l'E2 en présence ou en l'absence de cycloheximide dans les cellules T-47D. A) Blots représentatifs d'un Western Blot. B) Quantification de l'expression protéique. Les résultats ont été normalisés par rapport au contrôle de charge (GAPDH). La quantification a été réalisée à l'aide du logiciel Quantity One et l'analyse statistique sur *GraphPad Prism* (version 8). Une ANOVA à un facteur ($p < 0,001$), suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey, a été réalisée. Le seuil de significativité est fixé à 0,05 (* : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$; ns : non significatif). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. N = 3 réplicats issus de 3 expériences indépendantes.

Or, le traitement au cycloheximide abolit complètement ce profil d'expression. Les tests de comparaisons multiples de Tukey démontrent qu'en l'absence de traduction active, le niveau d'ER α en conditions pulsées s'effondre et devient équivalent à celui observé sous traitement continu, aucune différence significative n'étant détectée entre ces deux conditions (ns). De plus, le niveau global d'ER α sous cycloheximide reste bas dans toutes les conditions expérimentales par rapport au témoin DMSO initial.

Ainsi, par l'inhibition de la traduction, ces résultats démontrent que, dans la lignée T-47D, la persistance et l'accumulation d'ER α induites par l'administration pulsée d'E2 proviennent très probablement d'une hausse de la traduction des transcrits d'*ESR1*. Il reste cependant à étendre cette observation à nos autres modèles cellulaires.

3. Hypothèse de la dégradation : le rôle du protéasome dans la modulation de l'expression d'ER α

Afin de considérer l'ensemble des mécanismes régulateurs post-traductionnels potentiels, nous avons exploré une troisième hypothèse : celle d'une diminution de la dégradation de la protéine ER α sous l'effet de la cinétique pulsée. En effet, l'E2 est classiquement connue pour induire la clairance de son propre récepteur via la voie ubiquitine-protéasome. Nous avons donc cherché à déterminer si le profil d'accumulation observé sous traitement pulsé résultait d'un blocage ou d'un ralentissement de cette machinerie de dégradation.

Pour tester cette possibilité, les cellules T-47D ont été soumises aux protocoles d'exposition continus ou pulsés à l'E2 pendant 72 h et traitées au cours des deux dernières heures avec du MG132, un inhibiteur du protéasome 26S, ou avec du DMSO (contrôle).

L'analyse par Western Blot (Figure 22) montre qu'en conditions contrôles (DMSO 0,1 %), le profil d'expression d'ER α reste conforme à nos observations antérieures. Le traitement au MG132, quant à lui, semble préserver la diminution de l'expression d'ER α lorsque les cellules sont traitées avec de l'E2 en continu ; alors qu'il entraîne plutôt une augmentation de l'expression du récepteur en condition pulsée. De plus, il semblerait que cette augmentation sous MG132 soit encore plus importante que celle observée sous DMSO.

Bien que ces résultats requièrent des répliquats supplémentaires pour faire l'objet d'une validation statistique, la dualité apparente des profils obtenus sous MG132 apporte des arguments en faveur d'un double niveau de régulation. D'une part, l'accumulation accrue d'ER α sous traitement pulsé indique que le protéasome reste fonctionnel dans cette condition et que le pool de récepteurs continue de subir un *turn-over* basal actif. D'autre part, la persistance de la diminution d'ER α sous exposition continue, même en présence de MG132, suggère qu'une accélération de la dégradation n'est pas le mécanisme responsable de cette régulation négative.

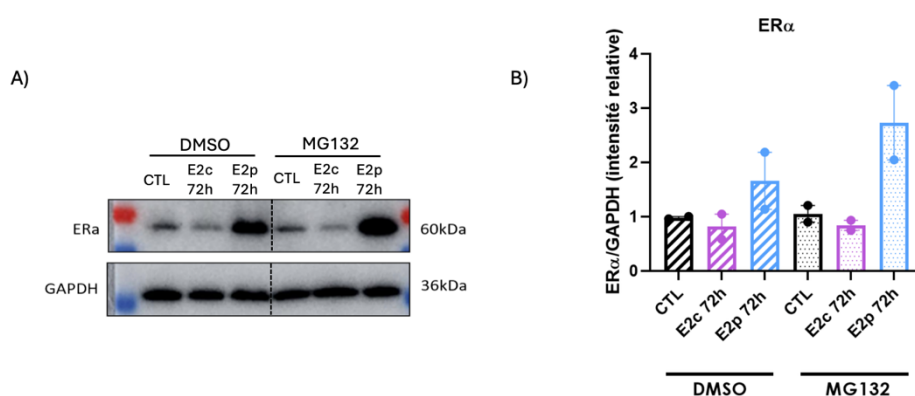


Figure 22. Expression de la protéine ER α après traitement continu ou pulsé à l'E2 en présence ou en l'absence d'un inhibiteur du protéasome (MG132) dans les cellules T-47D. A) Blots représentatifs d'un Western Blot. B) Quantification de l'expression protéique. Les résultats ont été normalisés par rapport au contrôle de charge (GAPDH). La quantification a été réalisée à l'aide du logiciel Quantity One et l'analyse statistique à l'aide de *GraphPad Prism (version 8)*. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM. N = 2 répliquats issus de 2 expériences indépendantes.

L'objectif principal de ce travail était de caractériser l'impact de la cinétique d'exposition à l'œstradiol (continue *versus* pulsée) sur la régulation d'ER α au sein de modèles cellulaires de cancers du sein hormono-dépendants. Et ceci, dans le but ultime d'évaluer si une administration pulsée d'E2 peut constituer un moyen d'augmenter l'efficacité de l'hormonothérapie, voire de pallier l'apparition de résistances à ces traitements.

L'analyse globale de nos données révèle des profils d'expression distincts entre les différentes cinétiques de traitement. Selon la lignée cellulaire, une diminution des niveaux d'expression d'ER α , conforme au rétrocontrôle négatif classiquement décrit, peut être observée sous traitement continu (Figures 20, 21 et 22). Cependant, nos résultats mettent en évidence des exceptions notables où l'expression d'ER α est maintenue à un niveau basal (Figure 12), voire légèrement augmentée (Figure 13). L'administration pulsée, quant à elle, induit une accumulation, plus ou moins marquée, d'ER α . Et c'est cette augmentation de l'expression d'ER α qui nous intéresse ici.

Afin de déterminer les processus impliqués dans cette diversité de réponses, nous avons exploré trois niveaux de régulations potentiels :

- Une hausse de la transcription du gène *ESR1* codant pour ER α ;
- Une augmentation de la traduction des transcrits de ce gène ;
- Une diminution de la dégradation d'ER α .

L'hypothèse transcriptionnelle : Une hausse de la transcription du gène *ESR1* ?

Afin de déterminer si l'accumulation d'ER α observée en condition pulsée découle d'une augmentation de la synthèse de ses propres transcrits, nous avons exploré une potentielle modulation de la transcription du gène *ESR1* par deux approches complémentaires. Dans un premier temps, les niveaux d'ARNm d'*ESR1* ont été quantifiés par RT-qPCR suite à une exposition continue ou pulsée d'E2. Dans un second temps, une approche fonctionnelle a été menée en bloquant la transcription *de novo* par traitement à l'actinomycine D.

L'analyse par RT-qPCR a été menée en parallèle sur plusieurs lignées cellulaires ER+. Dans la lignée CAMA-1 (Figures 18 et 19), où l'étude s'appuie sur trois expérimentations

indépendantes (Figure 18), l'exposition à l'E2 induit une diminution robuste des niveaux d'ARNm. De manière remarquable, cette répression est identique quelle que soit la cinétique d'administration. Une tendance similaire a été observée dans la lignée MCF-7 (Figure 19), bien que ces résultats ne soient issus que d'une seule expérience préliminaire et doivent donc être interprétés avec prudence. À ce stade, l'absence de divergence entre les deux cinétiques d'administration indique néanmoins que la hausse d'expression d'ER α ne semble pas découler d'un rebond de la transcription ou d'une stabilisation des ARNm.

Cependant, la lignée T-47D (Figure 19) s'est distinguée des CAMA-1 et MCF-7. L'analyse quantitative de ses transcripts a en effet révélé une augmentation apparente de l'expression des ARNm d'*ESR1* lors des traitements pulsés d'E2. Si ce résultat pouvait initialement laisser penser à une augmentation transcriptionnelle propre à cette lignée, plusieurs éléments invitent à la nuance. D'une part, à l'instar des observations menées chez les MCF-7, ces données sont issues d'une seule expérience indépendante et nécessitent d'être répliquées. D'autre part, une simple augmentation du pool d'ARNm ne garantit pas à elle seule une augmentation proportionnelle de l'expression du récepteur au niveau protéique. L'utilisation d'un inhibiteur fonctionnel de l'ARN polymérase II a donc permis de trancher définitivement.

Ainsi, les effets de la cinétique d'administration de l'E2 sous inhibition transcriptionnelle par l'actinomycine D ont été évalués dans les cellules T-47D (Figure 20). Les résultats ont montré que le blocage de l'ARN polymérase II n'a pas altéré le profil d'expression caractéristique du récepteur. Ce maintien de l'accumulation protéique d'ER α en conditions pulsées, en dépit de l'arrêt total de la néotranscription, démontre que ce phénomène s'affranchit de mécanismes transcriptionnels.

Bien qu'il soit nécessaire de répliquer cette validation fonctionnelle au sein des autres lignées de cancer du sein ER+, l'ensemble de ces résultats converge pour indiquer que la hausse d'ER α , induite par une exposition pulsée à l'E2, ne découle pas d'une augmentation de la transcription du gène *ESR1*.

La régulation négative des transcripts d'*ESR1* par l'E2 est assez bien documentée dans la littérature scientifique. D'une part, les articles de Stoica *et al.* (2000, 2003) ont démontré

que l'E2 active de façon ultra-rapide la voie PI3K/Akt. Par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et de mutations inactivatrices, ces auteurs ont établi que la kinase Akt contribue à la répression de la transcription du gène *ESR1*, ainsi qu'à la déstabilisation de la forme protéique d'ER α , suite à une exposition à l'E2 (10^{-9} M) pendant 6 h. De plus, les travaux d'Ellison-Zelski *et al.* (2009) suggèrent que le complexe E2-ER α , par sa fixation sur une région spécifique d'un promoteur d'*ESR1*, est capable de réprimer sa transcription dès 4 h de traitement à l'E2 (10^{-8} M). Ce mécanisme direct recrute un complexe répresseur contenant notamment la protéine Sin3A, capable d'induire des modifications post-traductionnelles sur les histones. Il en résulte alors une condensation de la chromatine fermant l'accès au promoteur, expliquant la chute drastique des niveaux d'ARNm.

En écartant définitivement l'hypothèse d'une régulation transcriptionnelle *de novo* pour expliquer la persistance d'ER α spécifique à la cinétique pulsée, l'investigation des mécanismes sous-jacents doit désormais se concentrer sur les voies traductionnelles ou sur les processus de dégradation protéique.

L'hypothèse traductionnelle : Une hausse de la traduction des transcripts ESR1 ?

Ayant exclu la contribution transcriptionnelle *de novo*, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de l'expression d'ER α sous traitement pulsé reposerait sur une hausse de la traduction des ARNm d'*ESR1*.

L'évaluation fonctionnelle de ce mécanisme par le cycloheximide, un inhibiteur de l'élongation traductionnelle (Figure 21), a apporté un argument statistiquement robuste en faveur de cette hypothèse. En effet, l'abolition complète du profil d'accumulation d'ER α en présence de cycloheximide démontre que le maintien du stock de récepteurs sous l'effet des pulses d'E2 requiert une synthèse protéique active. En l'absence de traduction, la cinétique pulsée perd son effet protecteur, et les niveaux de récepteurs s'effondrent pour atteindre un plateau bas, équivalent à celui induit par un traitement continu.

Comme mTORC1 est un régulateur majeur de la synthèse protéique (Zhang *et al.* 2014) et qu'il peut être induit par la signalisation œstrogénique via la voie PI3K/Akt, il serait très instructif d'évaluer les effets de l'inhibition de ce complexe par la rapamycine, sous traitement à l'E2 continu ou pulsé. En effet, il est aujourd'hui bien établi que l'E2 peut

déclencher une signalisation rapide non génomique capable de stimuler la voie PI3K/Akt/mTORC1 (Hewitt et Korach 2018). Les travaux d'Alayev *et al.* (2016) ont notamment démontré que l'activation de cette cascade engendre une interaction physique entre le complexe mTORC1 (via la protéine Raptor) et ER α , menant à la phosphorylation du récepteur sur sa sérine 167. Cette modification post-traductionnelle permettrait à la fois de stabiliser le récepteur et d'augmenter son activité transcriptionnelle. Ainsi cette cascade moléculaire orchestrerait un double mécanisme régulateur : d'une part, elle préserverait le pool d'ER α préexistant en le protégeant de la dégradation et, d'autre part, elle stimulerait l'efficacité de la traduction des transcripts d'*ESR1* via l'activation de la protéine ribosomale S6.

Une diminution de la dégradation d'ER α par le protéasome ?

Bien que nos analyses précédentes indiquent que l'augmentation de l'expression d'ER α sous traitement pulsé d'E2 requiert une activation de la traduction, cela n'exclut pas la contribution d'une diminution de la dégradation protéique.

Afin d'explorer cette piste, l'expression d'ER α a été analysée par Western blot après une exposition continue ou pulsée à l'E2, combinée ou non à un traitement au MG132, un inhibiteur du protéasome 26S (Figure 22).

Les profils d'expression obtenus révèlent deux réponses distinctes selon la cinétique d'administration.

D'une part, sous traitement continu à l'E2, l'ajout de MG132 ne lève pas la régulation négative d'ER α observée en condition contrôle (DMSO). Ce résultat suggère donc que le protéasome n'est pas le principal responsable de cette modulation de l'expression du récepteur. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'en condition continue prolongée, la cellule maintient l'extinction de l'expression d'ER α non pas en dégradant activement la protéine via la machinerie protéasomale, mais plutôt via d'autres mécanismes tels qu'un blocage de la transcription (Ellison-Zelski *et al.* 2009) ou de la traduction (Alayev *et al.* 2016).

En revanche, en condition pulsée, l'inhibition du protéasome induit une accumulation d'ER α encore plus marquée qu'en présence de DMSO. Cela soutient l'existence d'un *turn-over*

basal actif et suggère qu'une modulation (au moins partielle) de la dégradation protéasomale participe à la dynamique du récepteur sous cette cinétique d'exposition.

Il convient toutefois de souligner que ces données sont issues d'un nombre restreint de manipulations indépendantes ($n = 2$) et devront faire l'objet de réplicats biologiques supplémentaires pour consolider statistiquement cette tendance.

L'implication du protéasome 26S dans la clairance d'ER α induite par l'E2 est un mécanisme largement documenté dans la littérature. Il est établi que la liaison de l'E2 diminue drastiquement la demi-vie du récepteur, la réduisant à seulement 3 à 4 heures ; tandis que des ligands antagonistes comme le Tamoxifène exercent un effet stabilisateur (Wijayarathne et McDonnell 2001). Ce renouvellement rapide dépend d'une polyubiquitination de la protéine directement induite par l'E2 (Nirmala et Thampan 1995 ; Nawaz et al. 1999). Et, les travaux pionniers de Nawaz et al. (1999) ont notamment démontré qu'un blocage du protéasome par le MG132 (10^{-6} M) abolissait complètement la diminution d'ER α induite par 24 heures de traitement à l'E2 (10^{-9} M).

Cependant, nos observations à long terme (72h) sous traitement continu s'opposent à ces conclusions historiques ; une divergence qui pourrait s'expliquer par des différences méthodologiques. D'une part, alors que notre étude s'appuie sur des lignées cellulaires de cancer du sein exprimant nativement ER α , Nawaz et al. ont utilisé des cellules HeLa transfectées de manière transitoire afin qu'elles surexpriment ER α . Ce système artificiel déconnecte le gène *ESR1* de ses séquences régulatrices endogènes (situées parfois loin en amont ou en aval du gène). D'autre part, la temporalité des protocoles diffère : nos analyses s'étendent sur 72 h contre 24 h dans l'étude de 1999. Enfin, pour pallier la forte cytotoxicité du MG132, celui-ci n'a été appliqué que durant les deux dernières heures de notre protocole, là où Nawaz et al. l'ont maintenu pendant l'intégralité des 24 h d'exposition.

Les effets de l'E2 continu versus pulsé sur l'activité transcriptionnelle d'ER α

Ainsi, après avoir mis en évidence l'accumulation d'ER α sous l'effet des traitements pulsés et caractérisé les mécanismes traductionnels et de dégradation sous-jacents, il convient désormais d'évaluer l'impact de cette dynamique sur l'activité transcriptionnelle du récepteur.

Pour ce faire, nous avons étudié l'induction de deux gènes cibles d'ER α : *PGR* et *GREB1*, tant au niveau de leurs ARNm que de leurs expressions protéiques.

Les résultats de RT-qPCR obtenus dans les cellules CAMA-1 (Figure 14), issus de trois expériences indépendantes, suggèrent une hausse globale mais non significative des niveaux de transcripts de *GREB1*, et ce, en réponse aux deux cinétiques d'exposition. En revanche, l'induction de *PGR* ne semble s'opérer qu'en condition de traitement continu. Ces profils transcriptionnels s'accordent avec les analyses d'expression protéique réalisées en parallèle par Western Blot (Figure 15). Malgré l'absence d'induction de la transcription de *PGR*, l'induction de la transcription de *GREB1* sous cinétique pulsée nous permet de conclure quant à l'efficacité de l'activité transcriptionnelle dans les cellules CAMA-1.

Cette étude a également été menée de manière préliminaire ($n = 1$) au sein de deux autres lignées cellulaires ER+, les MCF-7 et les T-47D. Dans ces deux lignées, le traitement à l'E2 stimule l'expression des ARNm de *PGR* et *GREB1*, indépendamment du mode d'administration (Figure 16). Toutefois, l'ampleur de cette induction transcriptionnelle s'avère très hétérogène d'une lignée à l'autre. Par exemple, *GREB1* et *PGR* semblent induits de façon beaucoup plus importante dans la lignée MCF-7 que dans les deux autres lignées.

Ces disparités peuvent résulter de variations inter-lignées concernant les taux d'expression basaux de ces gènes. En effet, les profils quantifiés (Figure 23) permettent d'expliquer la très forte induction observée chez les MCF-7 puisque ces gènes y sont initialement très faiblement exprimés à l'état basal. À l'opposé, les niveaux de *PGR* et *GREB1* dans les cellules T-47D sont beaucoup plus importants.

Cette absence de divergence transcriptionnelle entre les profils continus et pulsés au sein des lignées MCF-7 et T-47D s'accorde avec les conclusions de Cavaillès *et al.* (2002). Ces auteurs ont démontré que les effets génomiques de l'E2 étaient équivalents sous exposition pulsée ou continue, dès lors que l'exposition hormonale totale (concentration x temps) restait constante. Cependant, ce choix expérimental introduit une différence méthodologique majeure avec notre protocole. Dans leurs travaux, les cellules MCF-7 étaient soit exposées en continu à de l'E2 peu concentré (0,29 nM), soit soumises à un pulse d'une heure à une concentration beaucoup plus élevée (7 nM). À l'inverse, dans notre

approche, la concentration d'E2 (1 nM) est strictement identique entre les conditions pulsées et les conditions continues.

En somme, l'évaluation de l'activité génomique d'ER α révèle que la capacité du récepteur à stimuler ses gènes cibles est conservée sous l'effet des traitements pulsés d'E2. Bien que l'amplitude et le profil d'induction varient selon la lignée cellulaire et le gène considéré, comme l'illustre la réponse contrastée de PGR et GREB1 dans la lignée CAMA-1.

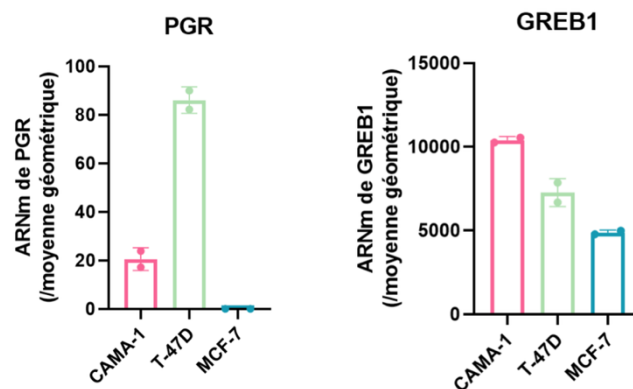


Figure 23. Comparaison des niveaux basaux d'ARN messagers de *PGR* et *GREB1* dans les différentes lignées de cancer du sein ER+ : CAMA-1, T-47D et MCF-7. Les résultats sont normalisés par rapport à la moyenne géométrique de deux contrôles internes (*GAPDH* et *TBP*). Ces données sont issues d'une seule expérience, n = 2 répliquats techniques. Par conséquent, aucun test statistique n'a pu être réalisé.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

En conclusion, nos travaux démontrent qu'une cinétique d'exposition pulsée d'œstradiol permet d'induire une hausse de l'expression d'ER α . L'exploration des mécanismes moléculaires responsables de cette modulation du récepteur nous a conduits à la conclusion d'une double régulation post-transcriptionnelle. D'une part, l'augmentation de l'expression d'ER α proviendrait d'une hausse de la traduction des transcripts d'*ESR1*, comme le révèle l'abolition de ce profil en présence de cycloheximide. D'autre part, la dégradation protéasomale semble également jouer un rôle dans la modulation des niveaux protéiques d'ER α sous exposition pulsée d'E2.

Sur le plan fonctionnel, les pools d'ER α accumulés en réponse à une cinétique d'exposition pulsée conservent pleinement leur activité transcriptionnelle. L'induction des gènes cibles *PGR* et *GREB1* s'opère de manière équivalente entre les deux cinétiques d'administration, bien que l'amplitude de la réponse soit dépendante des niveaux basaux propres à chaque lignée cellulaire.

Ces résultats ouvrent plusieurs axes de recherche complémentaires, structurés selon trois échelons de validation :

- **Consolidation des résultats :** Bien que certaines tendances intéressantes se dégagent, certaines manipulations n'ont pu être réalisées en trois réplicats indépendants (notamment celle avec le MG132). Ainsi, la réalisation de réplicats biologiques supplémentaires est indispensable pour consolider statistiquement le rôle du protéasome. Par ailleurs, l'exploration des mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de l'expression d'ER α par les inhibiteurs n'a été réalisée que dans les cellules T-47D. Il serait donc utile d'étendre ces protocoles aux autres lignées de cancer du sein ER+ afin de vérifier si les mécanismes de traduction et de dégradation identifiés y sont conservés.
- **Élargissement du modèle expérimental :** Afin de généraliser nos observations à d'autres profils tumoraux, l'étude pourrait être étendue à d'autres lignées mammaires ER+, telles que les cellules ZR-75-1. Sur le plan pharmacologique, le recours à des molécules plus spécifiques que le MG132, comme la lactacystine,

permettrait d'affiner l'analyse de la clairance d'ER α . Enfin, l'évaluation des effets d'autres types d'œstrogènes (estrone, œstriol) permettrait de déterminer si cette dynamique d'accumulation est propre à l'œstradiol (E2).

- **Ouvertures mécanistiques et alternatives méthodologiques :** Pour caractériser précisément la signalisation impliquée, l'usage de la rapamycine permettrait de tester si l'activation traductionnelle dépend de la voie non génomique PI3K/Akt/mTORC1. En parallèle, l'emploi de chloroquine servirait à explorer la contribution éventuelle d'autres voies cataboliques comme l'autophagie ou la dégradation lysosomale. Enfin, transposer l'utilisation d'œstrogènes exogènes à l'échelle de l'organisme humain se heurte à des limites majeures en raison des risques systémiques cardiovasculaires et oncologiques bien documentés chez les patientes (Zhang et al. 2021). Une alternative méthodologique à leur utilisation consisterait à s'affranchir de toute stimulation hormonale en ayant recours à des stratégies de transfection pour induire l'expression d'ER α . À terme, l'application de ces cinétiques d'exposition pulsées sur des modèles cellulaires ER+ résistants aux traitements endocriniens constitueraient également une étape clé pour évaluer leur potentiel de resensibilisation aux hormonothérapies.

- Adlanmerini, Marine, Coralie Fontaine, Pierre Gourdy, Jean-François Arnal, et Françoise Lenfant. 2022. « Segregation of Nuclear and Membrane-Initiated Actions of Estrogen Receptor Using Genetically Modified Animals and Pharmacological Tools ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 539 (janvier): 111467. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111467>.
- Alayev, A., R. S. Salamon, S. M. Berger, et al. 2016. « mTORC1 Directly Phosphorylates and Activates ER α upon Estrogen Stimulation ». *Oncogene* 35 (27): 3535-43. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.414>.
- Ali, Simak, et R. Charles Coombes. 2000. *Estrogen Receptor Alpha in Human Breast Cancer: Occurrence and Significance*.
- Arnal, Jean-François, Françoise Lenfant, Raphaël Metivier, et al. 2017. « Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications ». *Physiological Reviews* 97 (3): 1045-87. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2016>.
- « Aromatase Inhibitors versus Tamoxifen in Early Breast Cancer: Patient-Level Meta-Analysis of the Randomised Trials ». 2015. *The Lancet* 386 (10001): 1341-52. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61074-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61074-1).
- Barakat, Radwa, Oliver Oakley, Heehyen Kim, Jooyoung Jin, et CheMyong Jay Ko. 2016. « Extra-Gonadal Sites of Estrogen Biosynthesis and Function ». *BMB Reports* 49 (9): 488-96. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.9.141>.
- Boyer, Jacob A., Malvika Sharma, Madeline A. Dorso, et al. 2024. « eIF4A Controls Translation of Estrogen Receptor Alpha and Is a Therapeutic Target in Advanced Breast Cancer ». Prépublication, Cancer Biology, mai 11. <https://doi.org/10.1101/2024.05.08.593195>.
- Bray, Freddie, Mathieu Laversanne, Hyuna Sung, et al. 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): 229-63. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.
- Castles, C. G., S. Oesterreich, R. Hansen, et S. A. W. Fuqua. 1997. « Auto-Regulation of the Estrogen Receptor Promoter ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 62 (2-3): 155-63. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(97\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(97)00023-X).
- Cavailles, V., A. Gompel, Mc Portois, S. Thenot, N. Mabon, et F. Vignon. 2002. « Comparative Activity of Pulsed or Continuous Estradiol Exposure on Gene Expression and Proliferation of Normal and Tumoral Human Breast Cells ». *Journal of Molecular Endocrinology* 28 (3): 165-75. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0280165>.
- Cserni, Gabor. 2020. « Histological Type and Typing of Breast Carcinomas and the WHO Classification Changes over Time ». *Pathologica* 112 (01): 25-41. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-1-20>.
- Eliyatkin, Nuket, Evrim Yalcin, Baha Zengel, Safiye Aktaş, et Enver Vardar. 2015. « Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way ». *Journal of Breast Health* 11 (2): 59-66. <https://doi.org/10.5152/tjbh.2015.1669>.
- Ellis, Matthew J., Vera J. Suman, Jeremy Hoog, et al. 2011. « Randomized Phase II Neoadjuvant Comparison Between Letrozole, Anastrozole, and Exemestane for Postmenopausal Women With Estrogen Receptor-Rich Stage 2 to 3 Breast Cancer: Clinical and Biomarker Outcomes and Predictive Value of the Baseline PAM50-Based Intrinsic Subtype–ACOSOG Z1031 ». *Journal of Clinical Oncology* 29 (17): 2342-49. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.6950>.
- Ellison-Zelski, Stephanie J., Natalia M. Solodin, et Elaine T. Alarid. 2009. « Repression of *ESR1* through Actions of Estrogen Receptor Alpha and Sin3A at the Proximal Promoter ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (18): 4949-58. <https://doi.org/10.1128/MCB.00383-09>.

- Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al. 2024. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. (Lyon, France). <https://gco.iarc.who.int/today/en>.
- Filardo, Edward J., Jeffrey A. Quinn, Kirby I. Bland, et A. Raymond Frackelton. 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*. 14 (10).
- Gallez, Anne, Isabelle Dias Da Silva, Vincent Wuidar, Jean-Michel Foidart, et Christel Péqueux. 2021. « Estetrol and Mammary Gland: Friends or Foes? » *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 26 (3): 297-308. <https://doi.org/10.1007/s10911-021-09497-0>.
- Gao, Yuan, Yang Yu, Mingqing Zhang, Wenjun Yu, et Lihua Kang. 2024. « Mechanisms of Endocrine Resistance in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer ». *Frontiers in Oncology* 14 (octobre): 1448687. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1448687>.
- Greene, Dina N., Ahmed, Sofia B, Daccarett, Sarah, et Kling, Juliana M. 2025. « A Comprehensive Review of Estradiol, Progesterone, Luteinizing Hormone, and Follicle-Stimulating Hormone in the Context of Laboratory Medicine to Support Women's Health ». *Clinical Chemistry* 78 (8): 842-57.
- Gregory, Sarah, Katie Bridgeman, Hannah Darwin, et al. 2025. « Associations of Estrogen with Modifiable and Non-modifiable Risk Factors for Dementia: A Narrative Review ». *Alzheimer's & Dementia* 21 (11): e70873. <https://doi.org/10.1002/alz.70873>.
- Habara, Makoto, et Midori Shimada. 2022. « Estrogen Receptor α Revised: Expression, Structure, Function, and Stability ». *BioEssays* 44 (12): 2200148. <https://doi.org/10.1002/bies.202200148>.
- Hah, Nasun, Shino Murakami, Anusha Nagari, Charles G. Danko, et W. Lee Kraus. 2013. « Enhancer Transcripts Mark Active Estrogen Receptor Binding Sites ». *Genome Research* 23 (8): 1210-23. <https://doi.org/10.1101/gr.152306.112>.
- Hamilton, Katherine J., Sylvia C. Hewitt, Yukitomo Arao, et Kenneth S. Korach. 2017. « Estrogen Hormone Biology ». In *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 125. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.12.005>.
- Hammond, Geoffrey L. 2016. « Plasma Steroid-Binding Proteins: Primary Gatekeepers of Steroid Hormone Action ». *Journal of Endocrinology* 230 (1): R13-25. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0070>.
- Hartkopf, Andreas D., Eva-Maria Grischke, et Sara Y. Brucker. 2020. « Endocrine-Resistant Breast Cancer: Mechanisms and Treatment ». *Breast Care* 15 (4): 347-54. <https://doi.org/10.1159/000508675>.
- Hewitt, Sylvia C., et Kenneth S. Korach. 2018. « Estrogen Receptors: New Directions in the New Millennium ». *Endocrine Reviews* 39 (5): 664-75. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00087>.
- Ismaili, Nabil. 2026. « A Systematic Review of Major Advances in Breast Cancer Therapeutics in 2025: Synthesis of Conference and Published Evidence ». *International Journal of Molecular Sciences* 27 (4): 1971. <https://doi.org/10.3390/ijms27041971>.
- Kuhl, H. 2005. « Pharmacology of Estrogens and Progestogens: Influence of Different Routes of Administration ». *Climacteric* 8 (sup1): 3-63. <https://doi.org/10.1080/13697130500148875>.
- Lee, Lisa M. J., Jiang Cao, Hao Deng, Ping Chen, Zoran Gatalica, et Yi Wang. 2008. *ER-A36, a Novel Variant of ER- α , Is Expressed in ER-Positive and -Negative Human Breast Carcinomas*.
- Lin, Chang-Ching A., María Rosario Chica-Parrado, Nisha Unni, et al. 2025. « ESR1 Y537S and D538G Mutations Drive Resistance to CDK4/6 Inhibitors in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer ». *Clinical Cancer Research* 31 (9): 1667-75. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-24-2307>.
- Lorent, Julie, Eric P. Kusnadi, Vincent Van Hoef, et al. 2019. « Translational Offsetting as a Mode of Estrogen Receptor A-dependent Regulation of Gene Expression ». *The EMBO Journal* 38 (23): EMBJ2018101323. <https://doi.org/10.15252/emboj.2018101323>.

- Mortimer, Joanne E., Shirley W. Flatt, Barbara A. Parker, et al. 2008. « Tamoxifen, Hot Flashes and Recurrence in Breast Cancer ». *Breast Cancer Research and Treatment* 108 (3): 421-26. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9612-x>.
- Mubarak, Fatima, Gabrielle Kowkabany, Reed Popp, et al. 2024. « Early Stage Breast Cancer: Does Histologic Subtype (Ductal vs. Lobular) Impact 5 Year Overall Survival? » *Cancers* 16 (8): 1509. <https://doi.org/10.3390/cancers16081509>.
- Nawaz, Zafar, David M. Lonard, Andrew P. Dennis, Carolyn L. Smith, et Bert W. O'Malley. 1999a. « Proteasome-Dependent Degradation of the Human Estrogen Receptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (5): 1858-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.1858>.
- Nawaz, Zafar, David M. Lonard, Andrew P. Dennis, Carolyn L. Smith, et Bert W. O'Malley. 1999b. « Proteasome-Dependent Degradation of the Human Estrogen Receptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (5): 1858-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.1858>.
- Nirmala, P. B., et R. V. Thampan. 1995. « Ubiquitination of the Rat Uterine Estrogen Receptor: Dependence on Estradiol ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 213 (1): 24-31. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2093>.
- Nounou, Mohamed I., Fatema ElAmrawy, Nada Ahmed, Kamilia Abdelraouf, Satyanarayana Goda, et Hussaini Syed-Sha-Qhattal. 2015. « Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies ». *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* 9s2 (janvier): BCBCR.S29420. <https://doi.org/10.4137/BCBCR.S29420>.
- Obeagu, Emmanuel Ifeanyi, et Getrude Uzoma Obeagu. 2024. « Breast Cancer: A Review of Risk Factors and Diagnosis ». *Medicine* 103 (3): e36905. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000036905>.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2026). *Cancer du sein : Principaux repères*. Genève : OMS. Disponible sur : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- Orrantia-Borunda, Erasmo, Patricia Anchondo-Nuñez, Lucero Evelia Acuña-Aguilar, Francisco Octavio Gómez-Valles, et Claudia Adriana Ramírez-Valdespino. 2022. « Subtypes of Breast Cancer ». In *Breast Cancer*, édité par Department of Medical Education, Dr. Kiran C. Patel College of Allopathic Medicine, Nova Southeastern University, FL, USA et Harvey N. Mayrovitz. Exon Publications. <https://doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer-subtypes>.
- Penot, Graziella, Christine Le Péron, Yohann Mérot, et al. 2005. « The Human Estrogen Receptor- α Isoform hER α 46 Antagonizes the Proliferative Influence of hER α 66 in MCF7 Breast Cancer Cells ». *Endocrinology* 146 (12): 5474-84. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0866>.
- Perou, Charles M., Therese Sørli, Michael B. Eisen, et al. 2000. « Molecular Portraits of Human Breast Tumours ». *Nature* 406 (6797): 747-52. <https://doi.org/10.1038/35021093>.
- Prossnitz, Eric R., et Matthias Barton. 2023. « The G Protein-Coupled Oestrogen Receptor GPER in Health and Disease: An Update ». *Nature Reviews Endocrinology* 19 (7): 407-24. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00822-7>.
- Rakha, Emad A., Gary M. Tse, et Cecily M. Quinn. 2023. « An Update on the Pathological Classification of Breast Cancer ». *Histopathology* 82 (1): 5-16. <https://doi.org/10.1111/his.14786>.
- Rangel-Méndez, Jorge-Aarón, Rodrigo Rubi-Castellanos, Juan-Francisco Sánchez-Cruz, et Rosa Esther Moo-Puc. 2019. « Tamoxifen Side Effects: Pharmacogenetic and Clinical Approach in Mexican Mestizos ». *Translational Cancer Research* 8 (1): 23-34. <https://doi.org/10.21037/tcr.2018.12.27>.
- Rani, Aradhana, Justin Stebbing, Georgios Giamas, et John Murphy. 2019. « Endocrine Resistance in Hormone Receptor Positive Breast Cancer-From Mechanism to Therapy ». *Frontiers in Endocrinology* 10 (mai): 245. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00245>.
- Reid, G, S. Denger, M. Kos, et F. Gannon. 2002. *Human Estrogen Receptor- α : Regulation by Synthesis, Modification and Degradation*.

- Reid, George, Michael R. Hübner, Raphaël Métivier, et al. 2003. « Cyclic, Proteasome-Mediated Turnover of Unliganded and Liganded ER α on Responsive Promoters Is an Integral Feature of Estrogen Signaling ». *Molecular Cell* 11 (3): 695-707. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00090-X).
- « Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) Trial after Completion of 5 Years' Adjuvant Treatment for Breast Cancer ». 2005. *The Lancet* 365 (9453): 60-62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17666-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17666-6).
- Rivenbark, Ashley G., Siobhan M. O'Connor, et William B. Coleman. 2013. « Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer ». *The American Journal of Pathology* 183 (4): 1113-24. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.08.002>.
- Robertson, John F. R., Igor M. Bondarenko, Ekaterina Trishkina, et al. 2016. « Fulvestrant 500 Mg versus Anastrozole 1 Mg for Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer (FALCON): An International, Randomised, Double-Blind, Phase 3 Trial ». *The Lancet* 388 (10063): 2997-3005.
- Shiau, Andrew K., Danielle Barstad, Paula M. Loria, et al. 1998. « The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen ». *Cell* 95 (7): 927-37. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81717-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81717-1).
- Simpson, E. R. 2003. « Sources of Estrogen and Their Importance ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 86 (3-5): 225-30. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00360-1](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00360-1).
- Stanczyk, Frank Z., et David F. Archer. 2023. « Biosynthesis of Estetrol in Human Pregnancy: Potential Pathways ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 232 (septembre): 106359. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2023.106359>.
- Stoica, A., M. Saceda, V. L. Doraiswamy, C. Coleman, et M. B. Martin. 2000. « Regulation of Estrogen Receptor- Gene Expression by Epidermal Growth Factor ». *Journal of Endocrinology*.
- Stoica, Gerald E., Thomas F. Franke, Maria Moroni, et al. 2003. « Effect of Estradiol on Estrogen Receptor- α Gene Expression and Activity Can Be Modulated by the ErbB2/PI 3-K/Akt Pathway ». *Oncogene* 22 (39): 7998-8011. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206769>.
- Tan, Liat, et Norio Muto. 1986. « Purification and Reconstitution Properties of Human Placental Aromatase. A Cytochrome P-450-Type Monooxygenase ». *European Journal of Biochemistry* 156 (2): 243-50. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09574.x>.
- « Type and Timing of Menopausal Hormone Therapy and Breast Cancer Risk: Individual Participant Meta-Analysis of the Worldwide Epidemiological Evidence ». 2019. *The Lancet* 394 (10204): 1159-68. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31709-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31709-X).
- Vers une Belgique en bonne santé. (2022). *Maladies Non Transmissibles : Cancer*. Sciensano. Disponible sur : <https://www.belgiqueenbonnesante.be/fr/etat-de-sante/maladies-non-transmissibles/cancer>
- Vrtačnik, Peter, Barbara Ostanek, Simona Mencej-Bedrač, et Janja Marc. 2014. « The Many Faces of Estrogen Signaling ». *Biochemia Medica* 24 (3): 329-42. <https://doi.org/10.11613/BM.2014.035>.
- Wang, ZhaoYi, XinTian Zhang, Peng Shen, Brian W. Loggie, YunChao Chang, et Thomas F. Deuel. 2005. « Identification, Cloning, and Expression of Human Estrogen Receptor-A36, a Novel Variant of Human Estrogen Receptor-A66 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336 (4): 1023-27. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.226>.
- Wang, Zhuo, Lei Feng, Yuqing Xia, Zheming Zhu, Lina Wu, et Song Gao. 2025. « Risk Factors for Breast Cancer: An Umbrella Review of Observational Cohort Studies and Causal Relationship Analysis ». *Frontiers in Oncology* 15 (mai): 1541233. <https://doi.org/10.3389/fonc.2025.1541233>.

- Wijayaratne, Ashini L., et Donald P. McDonnell. 2001. « The Human Estrogen Receptor- α Is a Ubiquitinated Protein Whose Stability Is Affected Differentially by Agonists, Antagonists, and Selective Estrogen Receptor Modulators ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (38): 35684-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101097200>.
- Wilkinson, Louise, et Toral Gathani. 2022. « Understanding Breast Cancer as a Global Health Concern ». *The British Journal of Radiology* 95 (1130): 20211033. <https://doi.org/10.1259/bjr.20211033>.
- Wolmark, Norman, et Barbara K. Dunn. 2001. « The Role of Tamoxifen in Breast Cancer Prevention: Issues Sparked by the NSABP Breast Cancer Prevention Trial (P-1) ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 949 (1): 99-108. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb04007.x>.
- Won Jeong, Kwang, Rajas Chodankar, Daniel J. Purcell, Danielle Bittencourt, et Michael R. Stallcup. 2012. « Gene-Specific Patterns of Coregulator Requirements by Estrogen Receptor- α in Breast Cancer Cells ». *Molecular Endocrinology* 26 (6): 955-66. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1066>.
- Yaşar, Pelin, Gamze Ayaz, Sırma Damla User, Gizem Güpür, et Mesut Muyan. 2017. « Molecular Mechanism of Estrogen-Estrogen Receptor Signaling ». *Reproductive Medicine and Biology* 16 (1): 4-20. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12006>.
- Yeh, Wei-Lan, Keiko Shioda, Kathryn R. Coser, Danielle Rivizzigno, Kristen R. McSweeney, et Toshi Shioda. 2013. « Fulvestrant-Induced Cell Death and Proteasomal Degradation of Estrogen Receptor α Protein in MCF-7 Cells Require the CSK c-Src Tyrosine Kinase ». *PLoS ONE* 8 (4): e60889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060889>.
- Yu, Tenghua, Chongwu He, Hui Zhang, et al. 2026. « Endocrine Therapy Resistance of Breast Cancer: Important Role of G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) and New Therapeutic Strategies ». *Genes & Diseases* 13 (1): 101716. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2025.101716>.
- Zhang, Guo-Qiang, Jin-Liang Chen, Ying Luo, et al. 2021. « Menopausal Hormone Therapy and Women's Health: An Umbrella Review ». *PLOS Medicine* 18 (8): e1003731. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003731>.
- Zhang, Xinmin. 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>.
- Zhang, Yanan, Justin Nicholatos, John R. Dreier, et al. 2014. « Coordinated Regulation of Protein Synthesis and Degradation by mTORC1 ». *Nature* 513 (7518): 440-43. <https://doi.org/10.1038/nature13492>.

Des outils d'intelligence artificielle ont été mobilisés de manière ponctuelle durant la phase de rédaction de ce manuscrit. Leur utilisation s'est strictement limitée à la correction de la syntaxe, de l'orthographe et à l'aide à la reformulation de certaines phrases, afin de garantir la clarté du texte tout en préservant l'intégralité du contenu scientifique original.

Annexe 1. Composition des solutions utiles à la réalisation d'un Western Blot

Solution	Composition	Référence
Tampon Tris 1,5 M pH 8,8 (250 mL)	45,43g de Tris	#2449.2 ; Carl Roth ; $\geq 99\%$
Tampon Tris 0,5 M pH 6,8 (250mL)	15,14g de Tris	#2449.2 ; Carl Roth ; $\geq 99\%$
SDS 10% (50 mL)	5g de SDS	#1.13760.1000 ; Merck Millipore
Loading Buffer 5X (10 mL)	6,25 mL de Tris 0,5 M pH 6,8	/
	1g de SDS	#1.13760.1000 ; Merck Millipore
	12,5 mg de Bleu de Bromophénol	#15375 ; Serva
	2,5 mL de Glycérol	#7530.1 ; Carl Roth ; $\geq 98\%$
	1,25 mL de β -mercaptoéthanol	#M3148-100ML ; Sigma ; 99%
Tampon de migration 10X (1L)	30g de Tris	#2449.2 ; Carl Roth ; $\geq 99\%$
	144g de Glycine	#HN07.3 ; Carl Roth ; $\geq 99\%$
	10g de SDS	#1.13760.1000 ; Merck Millipore
Tampon de transfert 5X (1L)	15g de Tris	#2449.2 ; Carl Roth ; $\geq 99\%$
	72g de Glycine	#HN07.3 ; Carl Roth ; $\geq 99\%$
Tampon de lavage 10X (1L)	30g de Tris	#2449.2 ; Carl Roth ; $\geq 99\%$
	87,7g de NaCl	#P029.2 ; Carl Roth ; $\geq 99\%$
	10 mL de Tween-20	#8.22184.0500 ; Sigma-Aldrich

Annexe 2. Composition des gels de polyacrylamide en fonction de leur concentration en acrylamide

	4% d'acrylamide	8% d'acrylamide	10% d'acrylamide
H2O désionisée	6,4 mL	7,9 mL	7,14 mL
Tris 1,5 M pH 8,8	/	3,75 mL	3,75 mL
Tris 0,5M pH 6,8	2,5 mL	/	/
Acryl 40% 37.5 : 1 #10681.01 ; Serva	1,04 mL	3,1 mL	3,9 mL
SDS 10%	100 µL	150 µL	150 µL
APS 100 mg/mL. #A3678 ; Sigma	100 µL	75 µL	75 µL
N, N, N', N'- Tétraméthyléthylènediamine (TEMED) #420581000 ; ThermoScientific ; 99%	10 µL	5 µL	5 µL

Annexe 3. Anticorps primaires utilisés

Cible	Dilution	Espèce	Référence
ERα	1/1000, lait 5%	Lapin anti-humain	Cell Signaling #8644
PR b	1/1000, BSA 5%	Lapin anti-humain	Cell Signaling #3157
GREB1	1/1000, lait 5%	Lapin anti-humain	Millipore MABS62
GAPDH	1/10 000, lait 5%	Souris anti-humain	Chemicon MAB474

Annexe 4. Anticorps secondaires utilisés

Cible	Dilution	Espèce	Référence
Anti-souris couplé à la HRP	1/2000, lait 5%	Cheval anti-souris	Cell Signaling #7076
Anti-lapin couplé à la HRP	1/2000, lait 5%	Chèvre anti-lapin	Cell Signaling #7074

Annexe 5. Composition du mix PCR, pour un puit (10 µL)

Réactifs	Volume	Concentration finale
H ₂ O RNase free	2,8 µL	/
Primer sens (20 µM)	0,6 µL	1,2 µM
Primer anti-sens (20 µM)	0,6 µL	1,2 µM
FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (#4913914001, Roche Allemagne)	6 µL	1x

Annexe 6. Amorces spécifiques

Gène	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (3'-5')
ESR1	GCT-TAC-TGA-CCA-ACC-TGG-CAG	GGA-TCT-CTA-GCC-AGG-CAC-ATT-C
PGR	GGC-ATG-GTC-CTT-GGA-GGT	CCA-CTG-GCT-GTG-GGA-GAG
GREB1	TTG-TTC-CAG-TTC-CCT-CTT-CC	GGG-GTG-ATC-AGA-AGG-TGG-T
GAPDH	ACC-CAC-TCC-TCC-ACC-TTT-GAC	ACC-CTG-TTG-CTG-TAG-CCA-AAT-T
TBP	GAC-TCC-CAT-GAC-CCC-CAT	CAA-CCA-AGA-TTC-ACT-GTG-GAT-AC