

*COLLÈGE NATIONAL
DES GYNÉCOLOGUES ET OBSTÉTRICIENS FRANÇAIS
Président : Professeur J. Lansac*

Extrait des Mises à jour en Gynécologie Médicale

—

**Volume 2008
publié le 3.12.2008**



*TRENTE-DEUXIÈMES JOURNÉES NATIONALES
Paris, 2008*

Comment étudier l'effet des œstrogènes et des progestatifs sur le sein ?

A. GOMPEL *
(Paris)

INTRODUCTION

Les effets des œstrogènes sur le tissu mammaire font l'objet d'un relatif consensus alors que ceux des progestatifs restent plus discutés. Une des raisons pour lesquelles la connaissance reste encore limitée est l'absence de modèles animaux. En effet, la glande mammaire humaine est la seule (en dehors, semble-t-il, de celle de l'éléphante !) à persister entre les grossesses. À l'époque où l'on utilise comme modèle pour comprendre la fonction des produits de gènes des souris transgéniques ou invalidées, il est en effet sans doute très important de bien connaître les limites de chaque modèle expérimental pour en extrapoler les résultats à l'espèce humaine. L'accès du sein humain étant également difficile, les études dans l'espèce humaine restent presque toujours limitées à des femmes ayant des pathologies mammaires justifiant un abord chirurgical.

* Unité de Gynécologie Endocrinienne - APHP - Hôtel-Dieu - Université Paris Descartes INSERM UMRS 893 - 1 place du Parvis Notre-Dame - 75004 Paris
E-mail : anne.gompel@htd.aphp.fr

Nous examinerons quels sont les principaux modèles précliniques pour étudier l'action des stéroïdes sexuels sur le tissu mammaire.

1. Modèles in vitro

1.1. Lignées de cancer du sein

Des lignées continues hormonodépendantes de cancer du sein, dérivées de métastases pleurales, ont été établies il y a plus de 20 ans [1]. Ces lignées sont caractérisées par leur équipement en récepteurs hormonaux, de l'œstradiol (ER) et de la progestérone (PR). Elles ont aussi des récepteurs des glucocorticoïdes et des androgènes. Il s'agit surtout des MCF-7, des T47-D, des ZR75-1 et des BT 474, ces dernières étant beaucoup moins utilisées car difficiles à cultiver. Des lignées dépourvues de récepteurs ont aussi été développées avec des caractéristiques également variables en termes par exemple de contenu en facteurs de croissance, de capacités invasives différentes, etc... Sont également aussi utilisées des cellules d'autre origine que mammaires lorsque l'on veut étudier par transfection l'effet d'une substance sur des gènes rapporteurs (Tableau I).

L'action proliférative des œstrogènes a surtout été étudiée dans les MCF-7 qui sont très riches en ER et pauvres en PR [2]. Les PR sont inducibles par les œstrogènes selon un degré variable suivant les clones [3].

L'action des progestatifs a surtout été étudiée dans les T47-D qui sont beaucoup plus riches en PR que les MCF-7 et ont des ER à un degré variable.

Une des caractéristiques de ces lignées est que leur phénotype varie d'un laboratoire à l'autre et au cours du temps de culture. Il est donc indispensable de bien caractériser le clone et les passages sur lesquels on travaille, ce qui n'est pas toujours fait. De plus, il existe des variations d'expression de certains gènes clés dans la genèse du cancer du sein comme par exemple la p53, impliquée dans le contrôle de l'ADN et de l'apoptose au cours du cycle cellulaire, et qui peut être mutée dans certains clones.

Ainsi, on a pu montrer que les effets des progestatifs pouvaient être antiprolifératifs dans la plupart des clones de T47-D et prolifératifs dans d'autres clones [4]. Ceci peut sûrement être attribué aux variations phénotypiques de ces clones, en particulier en certaines protéines clés du cycle cellulaire, de l'apoptose, de la différenciation.

Tableau 1 : Utilisation des lignées continues en culture

Nom	Origine	Propriétés	Utilisation courante	Régulations gènes hormonodépendants
MCF-7	Métastases pleurales d'adénocarcinome du sein	ER+++	Effets œstrogènes SERM	Endogènes ou transfections gènes rapporteurs
T47-D	Métastases pleurales de carcinome canalaire du sein	PR+++ ER+	Effets progestatifs	Endogènes ou transfections gènes rapporteurs
ZR 75-1	Métastase ascite de carcinome canalaire du sein	PR++ ER++	Œstrogènes et progestatifs	Endogènes ou transfections gènes rapporteurs
MDA-MB231...	Métastases pleurales de carcinome canalaire du sein	ER α - PR- ER β +	Effets ne passant pas par ER/PR ou clones transfectés (PRA/PRB..)	Récepteur + gènes rapporteur correspondant
COS	Fibroblastes de rein de singe	Aucun récepteur	Modèle pour interaction gène rapporteur et hormone	Toutes transfections
HEK	Rein embryon humain	Aucun récepteur	Modèle pour interaction gène rapporteur et hormone	Toutes transfections

Intérêts :

L'intérêt de ces lignées est de pouvoir étudier et confirmer l'hypothèse d'hormonodépendance d'un gène donné, de pouvoir en disséquer les éléments de régulation.

Ces lignées ont en effet permis de comprendre de manière très détaillée le contrôle génique par E2, et les progestatifs depuis plus de 20 ans avec les travaux du groupe de Lipmann [5] et de Chambon [6]. C'est à partir de l'étude de ces lignées que les mécanismes du contrôle prolifératif des œstrogènes a été démembré et les modes d'action des anticœstrogènes décrits.

Ces lignées sont toujours utilisées pour screener des effets de nouvelles molécules ciblant ER (SERMs). Elles peuvent être transfectées avec un gène rapporteur comportant une séquence ERE consensus et servant à évaluer l'effet transcriptionnel des produits à tester, ou bien un gène endogène connu comme ER-dépendant. Ce dernier modèle

est plus intéressant car mettant en jeu des régulations plus normales. En effet, la transfection de gènes artificiels, d'autant qu'elle a lieu dans des cellules non hormonodépendantes, ne rend pas forcément compte de ce qui a vraiment lieu dans une cellule mammaire lors de la régulation de la transcription. L'équipement en co-activateurs et en co-répresseurs qui contrôlent l'efficacité de transcription est en effet dépendant du type cellulaire et peut varier. La disponibilité relative en co-activateur et co-répresseur peut transformer un produit antagoniste en agoniste.

Elles ont permis de décrire les zones de régulation de la transcription des gènes, zones appelées « hormone responsive element » et les complexes de transcription qui s'y lient. De même, c'est dans ce matériel que les régulations par les co-facteurs (co-activateurs et co-répresseurs) ont été décrites de l'acétylation chromatinienne à l'activation de la transcription. C'est également avec ce type de matériel que viennent d'être aussi décrits des mécanismes cytoplasmiques d'interaction entre les récepteurs hormonaux et l'activation de voies comme celles des MAP kinases, de la PI3kinase ou Akt qui vont interagir avec des mécanismes classiques de transcription dans le noyau, notamment par la phosphorylation/l'activation de facteurs impliqués dans la transcription [7].

Limites :

- Cependant, ces lignées ne sont pas toujours représentatives des cancers primitifs du sein dont elles sont censées représenter le comportement. Il est cependant malgré tout vrai que la plupart des mécanismes de dérégulation décrits dans ces lignées peuvent être applicables aux traitements de cancers du sein, notamment pour les thérapies ciblées.
- Les lignées sont capables de croissance ininterrompue, ce qui n'est pas le cas pour les cellules de cancers du sein, très difficiles à maintenir en culture. Ceci suggère que l'environnement tumoral joue un rôle très important dans la croissance des cancers du sein. L'inconvénient majeur de ces cultures est l'absence d'environnement stromal, adipeux et vasculaire contrairement à ce qui se passe in vivo. De plus, l'action de l'immunité sur la progression tumorale ne peut être étudiée en culture.

1.2. Cellules mammaires humaines normales

L'extrapolation des mécanismes décrits dans les lignées de cancer du sein au tissu normal et à la physiologie mammaire, alors qu'il s'agit de cellules transformées, et aux caractéristiques probablement

caricaturales, est hautement critiquable. En effet, l'équipement en récepteurs hormonaux par exemple ainsi que d'autres caractéristiques comme celles de protéines qui sont mutées ne permettent pas d'étendre les observations faites sur les lignées continues à ce qui peut se passer en amont du cancer... C'est la raison pour laquelle nous avons développé des cultures de cellules mammaires épithéliales dérivées de fragments d'hypermasties obtenues lors de chirurgie plastique de femmes de moins de 25 ans, afin de mieux caractériser les événements précédant la transformation cellulaire. La difficulté de ces modèles est d'obtenir des cultures qui conservent leur hormonodépendance. Ceci impose d'avoir recours à du sérum humain qui ajoute un élément de variation aux cultures par un contenu possiblement aléatoire en stéroïdes en fonction de la source du sérum. Ces cultures offrent aussi une relative difficulté d'obtention, un coût élevé, une variabilité des résultats liés sans doute à la variabilité du phénotype du sein d'origine, et donc imposent de disposer d'un nombre plus élevé d'expériences pour obtenir des résultats significatifs. Elles ont aussi l'inconvénient de cellules isolées du tissu de soutien. Cependant, cette variabilité constitue en fait un avantage car reflétant sans doute mieux ce qui se passe dans les cellules épithéliales du tissu mammaire normal. De plus, des cultures de fibroblastes sont faciles à obtenir et des co-cultures peuvent être développées. Il nous semble que ce matériel peu développé en dehors de notre équipe offre des avantages par rapport aux lignées en termes d'information pour le comportement des cellules mammaires normales. Nous avons pu utiliser ce modèle pour montrer des différences de comportement des stéroïdes et antihormones sur l'apoptose et des gènes impliqués dans l'apoptose entre cellules normales et lignées [8, 9].

1.3. Conditions de traitements hormonaux

Il est surprenant de voir que l'action des stéroïdes est étudiée de manière séparée dans la littérature. Alors que chez la femme il existe toujours des dérivés œstrogéniques, soit par sécrétion ovarienne et/ou par aromatisation périphérique ou mammaire, l'action des progestatifs sur les cultures est toujours étudiée sans œstrogènes. Nous sommes sans doute les seuls à avoir ajouté des conditions d'association d'étude d'E2 + progestatifs. L'action des progestatifs obtenue sans E2 est ainsi extrapolée à ce qui se passe chez la femme, soit au cours des cycles menstruels, soit au cours des traitements substitutifs de ménopause où sont aussi associés œstrogènes et progestatifs. Il existe aussi des contraintes méthodologiques aux cultures sur plastique qui n'en permettent pas une différenciation équivalente à ce qui est obtenu *in vivo*.

D'autres modèles ont aussi été utilisés pour mieux comprendre l'effet des stéroïdes sur le tissu mammaire.

2. Modèles animaux

2.1. Modèles murins

Ce sont surtout les souris et les rates qui ont été utilisées pour évaluer l'effet des stéroïdes.

2.1.1. Tumorigénèse murine induite

Ces modèles ont été utilisés pour étudier l'influence des hormones sur la cancérogenèse induite par des carcinogènes chimiques (Dimethyl benzanthracène, DMBA et N Methyl nitrosouré NMU) [10]. Ces modèles sont encore utilisés lors du développement de nouveaux dérivés stéroïdiens. L'administration du stéroïde à étudier peut être faite selon deux modèles :

- thérapeutique s'il est administré après le carcinogène chimique et ainsi est mesurée la croissance tumorale qui s'en suit (taille, volume tumoral). Ainsi, la Tibolone, l'estetrol ont été testés dans ce modèle lors de leur développement ;
- préventif si le stéroïde est administré avant le carcinogène chimique. Ainsi il a été montré que l'E2 + progestérone administrés avant le DMBA avaient un effet protecteur de la tumorigénèse par le biais de la différenciation du tissu mammaire qui le rend impropre à la survenue de mutation [10].

2.1.2. Souris transgéniques et invalidées

Les souris transgéniques et invalidées sont des modèles très intéressants pour étudier la fonction d'un gène. Elles ont cependant des limites importantes car la physiologie mammaire murine est différente de celle de l'espèce humaine [11]. Ces modèles ont surtout été utilisés pour décrire le rôle des ER, PR et de ses isoformes (PRA et PRB). Ils ont aussi été utilisés pour étudier l'effet potentialisateur éventuel de la surexpression de ER ou de PR sur la carcinogénèse mammaire murine. On peut se questionner sur l'extrapolation à l'espèce humaine des résultats quand on sait que la glande mammaire humaine est la seule à avoir un développement lobulo-alvéolaire permanent persistant entre les grossesses, ce qui n'est pas le cas des souris qui n'ont pas non plus de phase lutéale, n'ayant de sécrétion de progestérone que pendant la grossesse. De plus, la quantité de PRA et de PRB est différente entre la souris (PRA 4 fois > PRB) et la femme (PRA = PRB)

dans le sein normal. Or, on sait que le ratio des isoformes de PR peut sans doute influencer leur action biologique et le contrôle de leur gènes cibles.

2.1.3. Xénogreffes de tissu humain chez la souris

Il est possible de réimplanter dans des souris à faible immunité des fragments de glandes mammaires humaines normales ou pathologiques. L'avantage de ces modèles et de pouvoir étudier sur l'ensemble du tissu mammaire l'effet des substances à tester. Ce sont donc les modèles précliniques sans doute les plus intéressants. Il existe cependant des limites méthodologiques. Les traitements peuvent être administrés par implants dans la plupart des articles publiés, par voie sous-cutanée ou plus rarement intrapéritonéale. Il est extrêmement étonnant de voir que dans la plupart des articles sinon dans tous, la quantité obtenue dans le plasma n'a pas été mesurée ni vérifiée. Les quantités administrées paraissent énormes comparées aux concentrations plasmatiques féminines. Cependant, les études de pharmacocinétique chez la souris manquent. Ce sont aussi des modèles très chers et consommateurs de temps également.

3. Primates

Quelques études ont utilisé les traitements hormonaux chez les macaques Rhésus. Ce sont des animaux plus difficiles à étudier pour des raisons de coût et de contraintes. Bien que la glande mammaire de primates se rapproche davantage de celle de la femme, il existe des limites d'extrapolation [12]. L'aspect histologique des glandes mammaires de primates est celui d'hyperplasie pour l'espèce humaine. La physiologie en est cependant assez mal connue [12].

4. Glande mammaire humaine

4.1. Tissu mammaire recueilli pour étude de paramètres biologiques

Ce sont sans doute les études où l'on administre in vivo chez la femme le produit à étudier qui ont la plus grande valeur. Cependant, il y en a relativement peu compte tenu de l'accès invasif de la glande mammaire. Le tissu mammaire peut en effet être obtenu lors d'interventions chirurgicales pour pathologie bénignes, malignes ou chirurgie plastique. Ceci impose donc un protocole assez lourd. Il n'est pas toujours facile d'obtenir un accord éthique des patientes car ceci

impose la prise du produit à tester en préopératoire, que ce soit chez des femmes sans pathologie ou ayant un cancer du sein.

Il existe assez peu d'études ayant étudié les effets in vivo sur la prolifération des traitements stéroïdiens. Trois études ont étudié ainsi l'effet de l'application topique de $E2 \pm P$ directement sur la région mammaire et montré un effet antiprolifératif de l'association $E2 + P$. Aucun comparateur progestatif n'avait été inclus.

Une équipe suédoise a développé les ponctions mammaires à l'aiguille fine, et plus récemment les microbiopsies chez des femmes volontaires saines traitées par différents schémas de ménopause (groupe de B. von Schoultz) [13]. En utilisant ce modèle, ce groupe a montré que la plupart des progestatifs combinés à l'œstradiol augmentaient l'indice de prolifération. Ce groupe a aussi étudié en parallèle l'effet des traitements sur la densité mammaire et corrélé l'action proliférative avec l'augmentation de densité mammographique [13]. L'obtention de 200-300 cellules par ponction offre un matériel évidemment limité et qui peut être biaisé dans la mesure où les cellules qui se détachent le mieux lors de la ponction peuvent être celles qui sont en cours de réplication, car étant moins adhérentes à la matrice. Les résultats nécessitent donc une confirmation histologique. La technique alternative par microbiopsies paraît théoriquement plus intéressante. Il existe cependant une limitation méthodologique liée à la taille des fragments obtenus. Le tissu mammaire normal est très hétérogène et la plupart du temps riche en structure conjonctive et grasseuse, mais le contenu épithélial est relativement très minoritaire. Plus la taille des fragments obtenus est faible, plus les résultats seront difficiles à interpréter. Ainsi, lors du congrès mondial de ménopause de 2008 à Madrid, G. Södverquist a présenté les résultats d'une étude randomisée entre $E2 + MPA$ et $E2 + P$. En fait, seulement une minorité de prélèvements ont été interprétables. Il est probable qu'en augmentant le nombre de cas, les résultats deviennent statistiquement plus solides. Cependant, il existe aussi une limitation d'interprétation : il est possible que les femmes qui ont des prélèvements contributifs soient différentes, ayant un tissu mammaire plus riche, moins involué, donc régulé différemment de celles qui ont un tissu mammaire ayant subi l'involution fibroadipeuse physiologique.

4.2. Densité mammographique

La signification de l'augmentation de la densité mammaire sous traitement hormonal reste sujette à discussion. Dans les études du groupe de von Schoultz, il existe une corrélation entre densité et prolifération. Cependant, la plupart des auteurs s'accordent pour penser

que l'augmentation de densité mammaire sous traitement hormonal est au moins en partie liée à une extravasation plasmatique vers le tissu de soutien. Il n'est pas actuellement admis que la densité liée aux traitements hormonaux reflète forcément un état de prolifération exacerbée.

4.3. Études épidémiologiques

Elles sont un outil très important pour comprendre l'impact des différents traitements hormonaux sur le risque de cancer du sein qui est bien sûr l'information majeure que l'on souhaite obtenir, tous les modèles précliniques ne pouvant servir que de marqueurs intermédiaires ou d'études physiopathologiques. Cependant, l'information épidémiologique doit, pour être vraisemblable, posséder une « plausibilité biologique ».

En dehors des deux essais cliniques de la Women Health Initiative, il n'existe pas d'étude randomisée mais des études cas-témoins et d'observation. Elles sont coûteuses, longues et complexes. Il est nécessaire d'inclure un grand nombre de sujets pour avoir une puissance statistique suffisante. Elles peuvent être soumises à des biais. En effet, par exemple pour l'étude E3N qui a regardé l'effet des progestatifs sur l'incidence de cancer du sein chez les femmes de 40-50 ans, les femmes qui prenaient un progestatif pendant longtemps avaient une indication médicale peut-être associée à un risque plus élevé de cancer du sein. De plus, le recueil des données dans des études d'observation peut être imprécis, incomplet, selon le dessin initial de l'étude. Dans les études cas-contrôles, l'information est soumise encore plus à des biais de mémoire.

Enfin, une étude randomisée est un essai clinique qui permet de répondre à une question mais est fonction du dessin de l'étude, de la caractéristique de la population concernée et des drogues administrées. Elle ne peut permettre d'extrapoler les résultats à d'autres populations et d'autres traitements.

CONCLUSION

Les différents modèles d'étude des stéroïdes sur le sein ont chacun des avantages et des inconvénients. Ils contribuent pour une part chacun à l'information scientifique disponible sur ce sujet. Il est essentiel de bien comprendre et bien connaître les limites de tel ou tel modèle pour en interpréter les résultats. Si les études cliniques restent le gold standard, elles sont difficiles à réaliser et coûteuses.

Résumé

L'effet des stéroïdes sur le tissu mammaire humain est essentiel à mieux comprendre, compte tenu d'une part de l'augmentation de l'incidence du cancer du sein et d'autre part du fait que le sein humain est imprégné par les stéroïdes ovariens ou les hormones exogènes pour la contraception ou les traitements de ménopause. La compréhension de leur mode d'action en est limitée par le fait qu'il n'existe pas de bons modèles animaux et que l'abord mammaire est relativement invasif. Il existe différents modèles précliniques pour étudier l'impact de stéroïdes sur les cellules mammaires : cultures de lignées continues de cancer du sein, de cellules normales, modèles murins, xénogreffes de tissu humain chez la souris, recueil de matériel mammaire sous différents traitements hormonaux et enfin études épidémiologiques ou essais cliniques. Chaque méthode a des avantages et des limites. L'information doit pouvoir tenir compte de l'ensemble des résultats obtenus afin de disposer d'une palette d'arguments pour un organe complexe à étudier.

Bibliographie

- [1] Engel LW, Young NA. Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer Res* 1978;38:4327-39.
- [2] Katzenellenbogen BS, Kendra KL, Norman MJ et al. Proliferation, hormonal responsiveness, and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cancer cells grown in the short-term and long-term absence of estrogens. *Cancer Res* 1987;47:4355-60.
- [3] Edwards DP, Adams DJ, McGuire WL. Estrogen regulation of growth and specific protein synthesis in human breast cancer cells in tissue culture. *Adv Exp Med Biol* 1981;138:133-49.
- [4] Sutherland RL, Hall RE, Pang GY et al. Effect of medroxyprogesterone acetate on proliferation and cell cycle kinetics of human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 1988;48:5084-91.
- [5] Lippman M, Bolan G, Huff K. The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res* 1976;36:4595-601.
- [6] Green S, Walter P, Kumar V et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 1986; 320:134-9.
- [7] Vicent GP, Ballare C, Zaurin R et al. Chromatin remodeling and control of cell proliferation by progestins via cross talk of progesterone receptor with the estrogen receptors and kinase signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1089:59-72.
- [8] Somaï S CM, Jacob D, Perrot J-Y, Ros-tène W, Forgez P, Gompel A. Antiestrogens are pro-apoptotic in normal human breast epithelial cell. *Int J Cancer* 2003;105:607-12.
- [9] Kandouz M, Siromachkova M, Jacob D et al. Antagonism between estradiol and progestin on Bcl-2 expression in breast-cancer cells. *Int J Cancer* 1996;68:120-5.
- [10] Medina D. Chemical carcinogenesis of rat and mouse mammary glands. *Breast Dis* 2007;28:63-8.
- [11] Shoushtari AN, Michalowska AM, Green JE. Comparing genetically engineered mouse mammary cancer models with human breast cancer by expression profiling. *Breast Dis* 2007; 28:39-51.
- [12] Tarara RP. Review of mammary gland neoplasia in nonhuman primates. *Breast Dis* 2007;28:23-7.
- [13] Soderqvist G, von Schoultz B. Lessons to be learned from clinical studies on hormones and the breast. *Maturitas* 2004;49:90-6.