

Université de Montréal

Identification de nouveaux complexes protéiques impliqués dans la régulation transcriptionnelle
par le récepteur des œstrogènes alpha dans le cancer du sein

Par

Virginy Côté-Gravel

Institut de recherche en immunologie et en oncologie, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maître

En biologie moléculaire et cellulaire, option biologie des systèmes

30 Avril 2022

© Virginy Côté-Gravel, 2022

Université de Montréal

Institut de recherche en immunologie et en oncologie, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

Identification de nouveaux complexes protéiques impliqués dans la régulation transcriptionnelle par le récepteur des œstrogènes alpha dans le cancer du sein

Présenté par

Virginie Côté-Gravel

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Alain Verreault

Président-rapporteur

Sylvie Mader

Directrice de recherche

Éric Milot

Membre du jury

Résumé

Le cancer du sein est une maladie complexe résultant de la prolifération non contrôlée des cellules mammaires. Plus de 70% des tumeurs mammaires expriment les récepteurs des œstrogènes (ER) et peuvent bénéficier d'hormonothérapies ciblées. Parmi les thérapies hormonales, on y retrouve des anti-œstrogènes tel que le Fulvestrant. Les mécanismes d'action de ER α ne sont pas encore tous connus, d'où l'importance d'étudier son interactome. Un TurboID a été effectué dans la lignée cellulaire ER α + ZR75.1. Ceci a permis d'identifier de potentiels interacteurs de ER α en réponse à différents traitements (E2 vs Fulvestrant) : GATAD2B, une sous-unité du complexe répresseur NuRD, et AIP, un interacteur connu du récepteur d'aryl hydrocarbure (AHR). Ces deux complexes sont connus comme pouvant être impliqué dans la signalisation par ER α .

Nous avons donc émis comme hypothèse que GATAD2B et AIP étaient des cofacteurs de ER α et pouvaient avoir un impact sur l'activité transcriptionnelle de ER α . Nos objectifs étaient de mieux comprendre la relation entre ces protéines et ER α . Nous avons d'abord validé la colocalisation et la proximité de ces protéines avec ER α dans les cellules ER+ ZR-75-1. Nous avons ensuite observé l'interaction de ER α avec GATAD2B et AIP. De plus, des analyses par ChIP-qPCR ont permis d'observer le recrutement de ces protéines aux EREs du promoteur de *GREB1* et que ce recrutement pouvait être modulé par les ligands de ER α . Finalement, nous avons pu observer par RNAseq que l'inhibition de GATAD2B entraînait une surexpression de groupes de gènes impliqués dans la réponse oestrogénique ER α -dépendante.

Ainsi, nos travaux suggèrent que GATAD2B et AIP sont des interacteurs de ER α dans les cellules ER+ ZR-75-1. De plus, les résultats préliminaires semblent indiquer que GATAD2B pourrait jouer un rôle dans la répression de l'activité transcriptionnelle de ER α en présence de Fulvestrant.

Mots-clés : cancer du sein, ER α , GATAD2B, AIP, interaction protéine-protéine

Abstract

Breast cancer is a complex and heterogenous disease resulting from the uncontrolled proliferation of breast cells. More than 70% of breast tumors express ER α and can benefit from targeted hormonal therapies. Among hormonal therapies, there are antiestrogens such as Fulvestrant. The mechanism of action of ER α signaling are still not all known and therefore, more studies need to be done to better understand ER α signaling pathways. With the aim to identify potential novel ER α interactors, a TurboID screening was done in ER+ cells, ZR-75-1. This screening led to the identification of GATAD2B, a sub-unit of the NuRD repressive complex, and AIP, a known interactor of AhR. Cross-signaling pathways between these two complexes and ER α are known.

We hypothesized that GATAD2B and AIP were ER α cofactors could impact ER α transcriptional activity. Therefore, we aimed to better understand the relationship between these proteins and ER α . We first validated the colocalization and proximity of these proteins with ER α in ER+ ZR-75-1 cells. We then observed the interaction of ER α with GATAD2B and AIP. In addition, ChIP-seq experiments led to the observation of the recruitment of these proteins to the EREs of *GREB1* promoter and that this recruitment could be modulated by ER α ligands. Finally, we were able to observe by RNAseq that the inhibition of GATAD2B leads to an overexpression of groups of genes involved in the ER α -dependent estrogen response.

To conclude, our work suggests that GATAD2B and AIP are ER α interactors in ER+ ZR-75-1 cells. Additionally, preliminary results suggest that GATAD2B may play a role in suppressing ER α transcriptional activity in the presence of Fulvestrant.

Keywords: Breast cancer, ER α , GATAD2B, AIP, protein-protein interaction

Table des matières

Résumé.....	5
Abstract.....	7
Table des matières.....	9
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures.....	15
Liste des sigles et abréviations.....	18
Remerciements.....	23
Introduction.....	25
Le cancer.....	25
1. Le cancer du sein.....	26
1. Incidence et facteurs de risques.....	26
2. Classifications du cancer du sein.....	27
3. Les récepteurs des œstrogènes.....	30
3.1 Famille des récepteurs des hormones stéroïdiennes.....	30
3.1.1 Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes sexuelles.....	31
3.1.1.1 Rôles biologiques des œstrogènes.....	32
3.1.1.2 Biosynthèse des œstrogènes.....	32
3.1.2 La réponse aux œstrogènes est médiée par les récepteurs des œstrogènes.....	33
3.1.2.1 La structure de ER partage des similitudes avec tous les récepteurs nucléaires.....	34
3.1.2.2 Les mécanismes d'action de la signalisation oestrogénique ligand-dépendante.....	37

3.1.3 L'activité transcriptionnelle par ER α implique une dynamique et une coopération de cofacteurs	39
3.1.3.1 FOXA1 est un facteur pionnier nécessaire pour l'activité transcriptionnelle de ER α	39
3.1.3.2 ER α peut réguler ses gènes cibles sur de longues distances, tel qu'observé pour la régulation de GREB1.....	41
3.1.3.3 ER α peut recruter une vaste gamme de cofacteurs aux éléments cis-régulateurs de gènes régulés.....	41
4. Les thérapies hormonales contre les tumeurs mammaires du cancer du sein	42
4.1 Les agents de thérapies hormonales utilisées contre le cancer du sein peuvent être classées en deux catégories selon leur mécanisme d'action.....	43
4.1.1 Modulateurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes (SERMs)	43
4.1.2 Dégradeurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes (SERDs).....	44
5. Criblage par TurboID pour l'identification de l'interactome de ER α dans la lignée cellulaire ER α + ZR-75.1	46
5.1 BioID, une méthode d'étiquetage de proximité pour étudier les protéines voisines d'une protéine d'intérêt.....	46
5.1.1 Le TurboID est une version plus rapide du BioID.....	47
5.2 Méthodologie du criblage par TurboID pour l'identification de protéines à proximité de ER α dans les ZR75.1	48
5.3 Le criblage par TurboID a permis d'identifier deux potentiels nouveaux interacteurs de ER α , GATAD2B et AIP	53
5.3.1 GATAD2B est une sous-unité du complexe NuRD	54
5.3.1.1 La structure de GATAD2B.....	56
5.3.1.2 Rôle de NuRD dans la signalisation par ER α	57
5.3.2 AIP fait partie du complexe AhR	58

5.3.2.1 Structure de AIP	60
5.3.2.2 Rôle du complexe AhR dans la signalisation par ER α	61
Hypothèses et objectifs.....	63
Matériel et méthodes	65
Culture cellulaire et traitements hormonaux	65
Analyse Western	66
Inhibition de l'expression par siARN	67
Préparation des plasmides.....	67
Transfection des cellules avec l'ADN plasmidique.....	68
Pull-down assay.....	68
Co-immunofluorescence (Co-IF)	69
Test de ligature de proximité (ou <i>Proximity Ligation Assay</i> , PLA)	70
Coimmunoprécipitation (Co-IP)	71
Immunoprécipitation de la chromatine et analyse par réaction en chaîne par polymérase	72
Extraction de l'ARN et séquençage de prochaine génération	74
Résultats	76
L'expression de GATAD2B et AIP ne semble pas dépendre de l'expression de ER α	76
GATAD2B et AIP sont en forte proximité avec la protéine de fusion TurboID-ER α	77
Discussion.....	97
5.1 Avantages et désavantages du criblage par Turbo-ID pour l'identification de nouveaux interacteurs de ER α en présence de différents ligands	98
1.2.1 Autre stratégie pour l'identification de l'interactome de ER α : RIME	99
5.2 Résumé et limitations de nos observations de l'interaction entre GATAD2B ou AIP et ER α	101

5.2.1 Colocalisation et proximité de GATAD2B ou AIP avec ER α dans les noyaux des cellules tumorales du cancer du sein	101
5.2.2 Validation de l'interaction entre GATAD2B ou AIP et ER α dans les ZR-75-1	102
5.3 Fonctions de l'interaction entre GATAD2B ou AIP et ER α – Observations préliminaires	104
5.3.1 Fonction de l'interaction ER α -GATAD2B au sein du complexe NuRD	104
5.3.2 Fonction de l'interaction ER α -AIP dans les ZR-75-1.....	106
Conclusion	108
Références bibliographiques.....	109
Tableaux supplémentaires	121
Figures supplémentaires	123

Liste des tableaux

Tableau 1. – Gènes régulés par le knockdown par siARN de GATAD2B dans les ZR-75-1.....95

Liste des tableaux supplémentaires

Tableau supplémentaire 1. –Dilution des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les WB, PLA et Co-IF121

Tableau supplémentaire 2. –Séquences des oligonucléotides utilisés pour le CHIP-qPCR.....121

Tableau supplémentaire 3. –Séquences des siRNA utilisés en prévision du RNA-seq.....121

Tableau supplémentaire 4 . –Description des plasmides utilisées pour les « *pull-down assay* » et les co- immunoprécipitation122

Tableau supplémentaire 5 . –Gènes impliqués dans la réponse précoce et tardive aux œstrogènes régulés par GATAD2B.....122

Liste des figures

Figure 1 - Caractéristiques des cellules cancéreuses selon le modèle multi-étape.**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 2 - Lien entre la classification clinique et par sous-types moléculaires.....30

Figure 3 - Structure des œstrogènes endogènes majeurs31

Figure 4 - Généralisation des voies de biosynthèses des œstrogènes32

Figure 5 - Régions et domaines fonctionnels de ER α pleine longueur et de ses isoformes plus courts.....34

Figure 6 - Structure du domaine de liaison au ligand de ER α sous sa forme active et sous sa forme inactive36

Figure 7 - Voies de signalisation ligand-dépendantes de ER.....37

Figure 8 - Structure de différentes molécules de thérapies hormonales utilisées contre les tumeurs mammaires ER α +43

Figure 9 - Approche TurboID pour le criblage de protéines à forte proximité d'une protéine d'intérêt.....48

Figure 10 - Stratégies pour la construction des vecteurs nécessaires pour le criblage par TurboID dans les ZR-75-149

Figure 11 - Contrôles pour la fiabilité du criblage par TurboID dans les lignées cellulaires ZR-75-1 et sélection des cibles52

Figure 12 - Compte peptidique obtenu par spectrométrie de masse lors du criblage par TurboID dans les ZR-75-1 pour GATAD2B et AIP.....53

Figure 13 - Complexe NuRD et ses sous-unités principales54

Figure 14 - Structure de GATAD2B56

Figure 15 - Mécanisme d'action du complexe AhR.....58

Figure 16 - Structure de AIP59

Figure 17 - Expression protéique de ER α , GATAD2B et AIP dans les lignées cellulaires de tumeurs mammaires.....75

Figure 18 - Biotinylation de GATAD2B ou AIP par TurboID-ER α dans les HEK293.....77

Figure 19 - Expression protéique de ER α , GATAD2B et AIP en fonction de différents ligands dans les lignées cellulaires de tumeurs mammaires.	79
Figure 20 - Colocalisation de GATAD2B ou AIP et ER α dans le noyau des cellules ZR-75-1.	81
Figure 21 - Proximité entre ER α et GATAD2B ou AIP dans les ZR-75-1 en réponse à différents ligands.	84
Figure 22 - Efficacité d'extraction de GATAD2B et AIP dans les ZR-75-1 et dans les HEK293	86
Figure 23 - Co-immunoprécipitation entre ER α et GATAD2B ou AIP dans les HEK-293T	87
Figure 24 - Co-immunoprécipitation entre ER α et GATAD2B ou AIP dans les ZR-75-1 en réponse à différents ligands.....	88
Figure 25 - Recrutement de ER α et GATAD2B aux EREs situés dans le promoteur de GREB1 dans les cellules ZR-75-1	90
Figure 26 - Recrutement de ER α et AIP aux EREs situés dans le promoteur de GREB1 dans les cellules ZR-75-1.	91
Figure 27 - Knockdown de GATAD2B et AIP par siARN dans les ZR-75-1 et les MCF-7	93
Figure 28 - Schéma hypothétique de la fonction de l'interaction entre ER α et GATAD2B sur l'activité transcriptionnelle de ER α dans les cellules du cancer du sein.....	106

Liste des figures supplémentaires

Figure supplémentaire 1 - Validation de la spécificité des bandes par l'inhibition de l'expression de GATAD2B par siARN dans les ZR-75-1.....	123
Figure supplémentaire 2 - Efficacité de transfection pour le « Pull-down assay » de TurboID-ER α et RID des HEK293 avec traitements. Imagerie par microscopie pour valider l'efficacité de transfection	124
Figure supplémentaire 3 - Contrôles négatifs pour la coimmunofluorescence de AIP ou GATAD2B avec ER α dans les cellules de tumeurs mammaires	125
Figure supplémentaire 4 - Proximité entre ER α et GATAD2B ou AIP dans les ZR-75-1 en réponse à différents ligands. Contrôles positifs et négatifs pour le PLA dans les ZR-75-1 et SK-BR-3.....	126
Figure supplémentaire 5 - Recrutement de ER α et GATAD2B aux EREs situés dans le promoteur de GREB1 dans les cellules ZR-75-1.....	127

Figure supplémentaire 6 - Recrutement de ER α et GATAD2B au promoteur de GREB1 ne comportant pas de ERE dans les cellules ZR-75-1.....	128
Figure supplémentaire 7 - Recrutement de ER α et AIP au promoteur de GREB1 ne comportant pas de ERE dans les cellules ZR-75-1.	128
Figure supplémentaire 8 - Autres interacteurs potentiels provenant du criblage par TurboID dans les ZR-75-1.....	129

Liste des sigles et abréviations

3MC : 3-methylcholanthrene

a.a : acide aminé

ADN: Acide Désoxyribonucléique

AE: antiœstrogènes

AF-1/2 : *Activation Function 1 ou 2*

AHR : Aryl hydrocarbon receptor

AhR : Aryl hydrocarbure receptor

AIP : AHR-interacting protein

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

Arnt: Aryl Hydrocarbon receptor nuclear translocator

BLBC: Basal-like

BRCA1/2: *Breast cancer associated gene 1 and 2*

BSA : Albumine de Sérum Bovin

CHD : *Chromodomain Helicase DNA-binding protein*

ChIP: Immunoprécipitation de la chromatine

Co-IF: coimmunofluorescence

Co-IP: coimmunoprécipitation

CR1-2: régions conservées 1 et 2

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DBD : Domaine de liaison à l'ADN

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

E1: œstrone

E2: Estradiol

E3 : œstriol

E4 : œsterol

EMT : transition épithéliale-à-mésenchymateuse

ERE : Élément de réponse aux œstrogènes

ER α : Récepteur des œstrogènes alpha

ER β : Récepteur des œstrogènes beta

EtOH : Éthanol

FBS: Sérum Bovin Fœtal

FKBP : famille des protéines liant FK506

FOXA1: Forkhead box protein A

Fulv: Fulvestrant

GATAD2A: GATA zinc finger domain containing 2A

GATAD2B: GATA zinc finger domain containing 2A

GFP: *Green fluorescent protein*

GPER : récepteur des œstrogènes couplées à une protéine G

GR: Récepteur des glucocorticoïdes

GREB1: *Gene Regulated in Breast Cancer 1*

HAH : hydrocarbures aromatiques halogénés

HAT : histone acétyl-transférase

HDAC : histone désacétylase

HER2: Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain

Hsp90 : protéines de choc 90

IA : Inhibiteur de l'aromatase

IHC : Immunohistochimie

KDa : kiloDalton

LBD : Domaine de liaison du ligand

MAPK : protéine kinase activée par un mitogène

MBD: *Methylated CpG-Binding domain Proteins*

MTA: *Metastasis Associated*

NaCl: Chlorure de sodium

NCoA: Nuclear Receptor Coactivator
NCoR: Nuclear Receptor Corepressor
NES: Signal d'exportation nucléaire
NLS : Signal de localisation nucléaire
NuRD: Complexe de remodelage des nucléosomes et de désacétylation des histones
PAGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS : Tampon phosphate salin
PCR : Réaction en chaîne par polymérase
PEI : polyéthylèneimine
PLA: *Proximity ligation assay*
PR : Récepteur des progestines
PTM : Modification post-traductionnelles
PVDF : polyfluorure de vinylidène
RE : reticulum endoplasmique
RID: domaine d'interaction aux récepteurs
SDS: Dodécylsulfate de sodium
SERD: Dégradateurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes
SERM: Modulateurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes
siARN: small *interfering* ARN
SP-1: protéine de stimulation 1
Tam: Tamoxifène
TCDD: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine
TNBC : Triple Negative
V: Véhicule
YFP: *Yellow fluorescent protein*

*À mon papa, qui combat un cancer,
À mon conjoint qui a accepté de m'épauler tout au long de cette aventure,
À ma famille et mes amis qui m'ont toujours encouragé.*

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Sylvie Mader, qui m'a accepté dans son équipe et m'a offert cette opportunité pour terminer mon parcours académique. Merci pour son soutien, sa créativité, son innovation et surtout sa confiance accordée envers moi.

J'aimerais également remercier mes collègues de l'IRIC au sein du laboratoire Mader ainsi que dans les autres laboratoires. J'aimerais remercier particulièrement Elham Dianati qui a été mon mentor tout le long de mon projet, ainsi qu'Hermine Djimoudi qui a été une amie et collègue dans mes meilleurs et moins bons moments.

Merci aux membres des plateformes génomiques, Jennifer et Raphaëlle, et d'imagerie, Christian, qui m'ont souvent accompagnés et conseillés afin de mener à terme mes expériences.

Merci aux organismes subventionnaires (FRQS), à l'Université de Montréal, à l'École des Études Supérieures et à l'IRIC pour avoir eu confiance en moi et mon projet.

Et finalement, merci à mes amis et ma famille qui m'ont supportés et encouragés. Un merci spécial à mon copain, Guillaume, sans qui je n'aurais pu me concentrer à 100% sur mes études.

Introduction

Le cancer

Malgré de grandes avancées scientifiques, les cancers restent la cause principale de décès au Canada. En effet, en 2020, il a été estimé que 225 800 cas de cancer seraient diagnostiqués et que 83 300 Canadiens en décèderont (1,2). Le cancer est une maladie très complexe, mais grâce aux progrès scientifiques et technologiques des dernières décennies, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la pathogénèse du cancer a été possible.

En 2000, Hanahan et Weinberg ont décrit six caractéristiques des cellules cancéreuses qui leur permettaient de déréguler les mécanismes cellulaires impliqués dans la prolifération et le maintien de l'homéostasie cellulaire. Cette hypothèse initiale assumait qu'une tumeur était un amas de cellules cancéreuses. Les six caractéristiques originales sont 1) le maintien du signal prolifératif, 2) l'évasion du contrôle par les signaux anti-croissance, 3) la résistance à l'apoptose, 4) l'induction de l'angiogenèse, 5) la réplication cellulaire illimitée et 6) l'activation de l'invasion et du développement métastatique (3,4). En 2011, les auteurs ont pu mettre à jour ce modèle décrivant les caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses en y ajoutant deux nouvelles caractéristiques émergentes : la dérégulation du métabolisme énergétique en faveur de la tumeur et l'évasion au système immunitaire (4). De plus, ils ont par la même occasion suggéré deux mécanismes permettant l'acquisition des caractéristiques de ce modèle multi-étape. Le premier est l'inflammation, qui va stimuler la tumorigénèse, et le second est l'instabilité génétique et les mutations menant à l'expansion clonale. Il est pertinent de mentionner qu'avec cette mise à jour, les auteurs reconnaissent maintenant l'hétérogénéité d'une tumeur et de l'importance du micro-environnement tumoral dans le développement de la maladie (4).

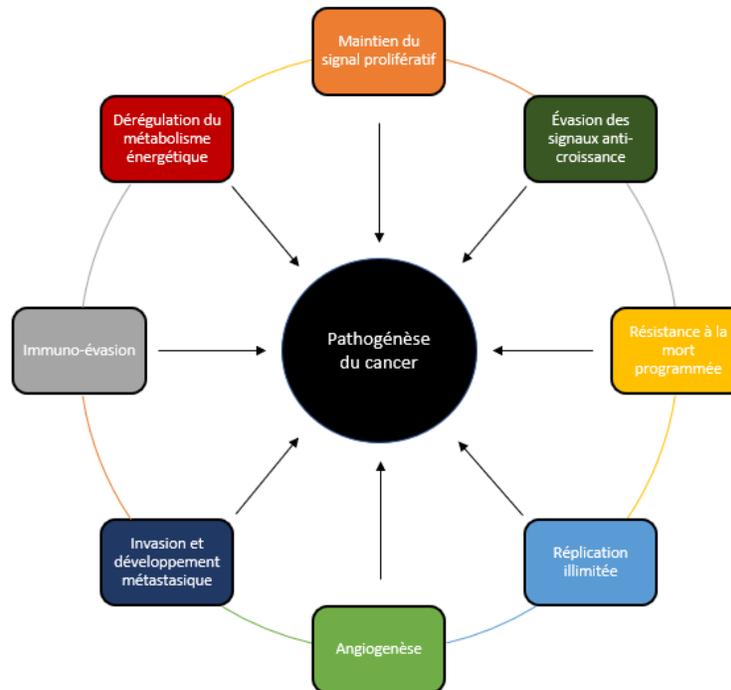


Figure 1 - Caractéristiques des cellules cancéreuses selon le modèle multi-étape. (Adaptée de Hanahan et Weinberg, 2011).

1. Le cancer du sein

1. Incidence et facteurs de risques

Au Canada en 2020, il était estimé qu'une Canadienne sur huit recevra un diagnostic de cancer du sein et qu'une sur 33 en mourra. Il s'agit du cancer le plus fréquent chez les femmes canadiennes, à l'exception des cancers de la peau autres que les mélanomes. C'est aussi le second type de cancer en termes de mortalité (1,2). Plusieurs facteurs de risque augmentant les chances de développer un cancer du sein ont été identifiés.

Premièrement, les femmes sont beaucoup plus à risque de développer un cancer que les hommes (< 1% des cancers du sein), probablement puisque les tissus mammaires féminins sont plus développés que ceux des hommes (5,6). Ceci implique une plus grande sensibilité aux hormones dans des cellules immatures et très actives du sein des femmes (5). Deuxièmement, l'âge reste un facteur important puisque 83% des cas de cancers du sein sont détectés chez les femmes âgées

de plus de 50 ans (2,7). En effet, le vieillissement physiologique contribue à l'accumulation de mutations et d'évènements oncogéniques par des altérations génétiques et épigénétiques. L'âge implique également l'accumulation de dommages génétiques causés par des facteurs environnementaux ou par l'exposition à d'autres mutagènes (8,9). Troisièmement, les chances de développer un cancer du sein augmentent avec des cas dans l'historique familial rapproché. Certaines mutations oncogéniques peuvent être héréditaires, telles que les mutations des gènes *BRCA1/2* (« *Breast cancer associated gene 1 and 2* »), des suppresseurs de tumeurs très importants dans le cancer du sein (6,10). Finalement, des facteurs reproductifs peuvent aussi avoir un impact sur le développement du cancer du sein, incluant une puberté précoce, une ménopause tardive ou encore un nombre faible ou nul de grossesses menées à terme. Ces facteurs sont souvent importants puisqu'ils impliquent une plus grande période d'exposition aux hormones telles que les œstrogènes (6).

2. Classifications du cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie très hétérogène pouvant présenter différentes caractéristiques biologiques affectant les réponses aux traitements. Différentes classifications ont été proposées pour mieux prédire le comportement d'une tumeur et choisir les traitements appropriés.

2.2.1 Classification clinique des tumeurs mammaires en fonction du statut de l'expression de récepteurs clés

L'un des systèmes de classification les plus utilisés en clinique repose sur le statut de l'expression de récepteurs clés (récepteurs des œstrogènes alpha (ER α), récepteur de la progestérone (PR) et du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain HER2 (HER2)). Ce classement permet de déterminer leur susceptibilité à des traitements spécifiques contre ER α ou HER2 (11). Le statut d'expression de chacun de ces récepteurs est mesuré par immunohistochimie (IHC), et par l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) pour HER2 (12). La majorité (>70%) des tumeurs du cancer du sein sont ER α + et les tumeurs positives pour ER α (ER α +) et PR (PR+) ont souvent un meilleur pronostic puisqu'elles répondent aux thérapies hormonales. Pour que les tumeurs soient considérées comme étant ER α + et/ou PR+, elles doivent exprimer les récepteurs à plus de 1% dans les noyaux (11-13). Certaines tumeurs n'expriment pas les récepteurs hormonaux (ER- et

PR-), mais expriment HER2 (HER2+). Ces tumeurs peuvent également bénéficier de thérapies ciblant spécifiquement HER2+ (14). Pour être considérées HER2+, les tumeurs mammaires doivent contenir plus de 10% de cellules avec un fort marquage membranaire, ou encore un ratio HER2 : CEP17 ≥ 2 (11,15). Finalement, une dernière catégorie de tumeurs n'exprime aucun de ces récepteurs clés et sont ainsi appelées triple-négatives (TNBC). Ces tumeurs ont généralement un pronostic défavorable puisqu'elles ne bénéficient pas de thérapies ciblées communes et sont généralement traitées avec des traitements conventionnels tels que la chimiothérapie (16).

2.2.2 Classification des tumeurs mammaires par sous-types moléculaires

Plus récemment, avec l'aide de nouvelles technologies en biologie moléculaire, il a été possible de mieux identifier le profil moléculaire des tumeurs du cancer du sein et de mieux saisir l'hétérogénéité de celles-ci. C'est en 2000 que la première classification de ce genre a été proposée, à partir d'expériences avec des puces à ADN («*DNA microarray*») incluant des sondes contre 8102 gènes et à partir d'échantillons provenant de 65 tumeurs mammaires (42 patients) (17). Depuis, d'autres études ont été effectuées afin d'approfondir les connaissances sur les profils transcriptionnels des tumeurs mammaires. D'ailleurs, la méthode PAM50 (de l'anglais «*Prediction Analysis of Microarray using 50 classifier genes plus 5 reference genes*») a été développée afin de standardiser la classification des tumeurs mammaires. Cette classification va de pair avec le statut des récepteurs et peut être représentée en cinq catégories : luminale A, luminale B, HER2+, de type basal («*basal-like*») (BLBC) et de type normal («*normal-like*») (18).

2.2.2.1 Tumeurs lumineuses A/B

La majorité des tumeurs mammaires sont des tumeurs de type luminal, le sous-type luminal A représentant de 40% à 50% de toutes les tumeurs. Ces tumeurs expriment ER et les tumeurs lumineuses A expriment davantage PR ($\geq 20\%$) que les lumineuses B ($< 20\%$). Aussi, les lumineuses A possèdent de moins grand niveau du biomarqueur de prolifération cellulaire Ki-67, comparativement aux lumineuses B. Finalement, les tumeurs lumineuses n'expriment généralement pas HER2, à l'exception d'une minorité de tumeurs lumineuses B (17,19). Finalement, les lumineuses A répondent mieux aux thérapies endocrines (discutées plus loin) et les lumineuses B vont souvent recevoir de la chimiothérapie en plus des thérapies hormonales. Tout ceci fait en sorte qu'en

général, les tumeurs classées comme lumineales A auront un meilleur pronostic que les lumineales B (11,12).

2.2.2.2 Tumeurs sur-exprimant HER2

Environ 15% des tumeurs mammaires sont classées comme étant des *HER2-overexpressed* (HER2-surexprimé). Elles sont caractérisées par une surexpression de HER2 et/ou des gènes associés à la signalisation de HER2. Cette catégorie de tumeurs est ER-/PR-, mais peuvent bénéficier de thérapies ciblant HER2. La découverte de HER2 comme oncogène et le développement du Trastuzumab, un anticorps monoclonal ciblant la partie extra-cellulaire du récepteur, comme agent thérapeutique ont considérablement amélioré le pronostic de ce type de tumeurs (11,20).

2.2.2.3 Tumeurs basal-like

Les tumeurs de cette catégorie (<10%) n'expriment aucun des gènes lumineux, y compris ceux des récepteurs clés. Cette appellation dérive de l'expression dans ces tumeurs de certains gènes retrouvés dans les cellules mammaires normales basales/myoépithéliales, mais leur signature transcriptionnelle est en fait comparable aux cellules mammaires normales lumineales progénitrices (21). Les tumeurs basales sont également associées à l'expression des cytokératines 5, 14 et 17, des protéines jouant un rôle important dans les filaments intermédiaires cytosquelettiques et s'apparente au phénotype des tumeurs mammaires triples négatives. Ces tumeurs ont généralement un indice prolifératif accru et sont traitées avec de la chimiothérapie, ce qui explique leur moins bon pronostic en comparaison aux tumeurs des autres catégories énoncées plus haut (11,12,17). De plus, beaucoup de tumeurs du type *basal-like* sont mutées pour *BRCA1*, une protéine clé pour la réparation des dommages à l'ADN par recombinaison homologue. Ces tumeurs peuvent maintenant bénéficier des thérapies à base d'inhibiteurs de poly ADP ribose polymérase (PARP), une enzyme importante pour la réparation des coupures simple brin de l'ADN.

2.2.2.4 Tumeurs normal-like

Cette dernière catégorie possède un profil moléculaire s'apparentant beaucoup aux cellules normales épithéliales. Cette catégorie est maintenant controversée puisqu'il s'agirait possiblement du résultat de résections contenant beaucoup de cellules non cancéreuses (11).

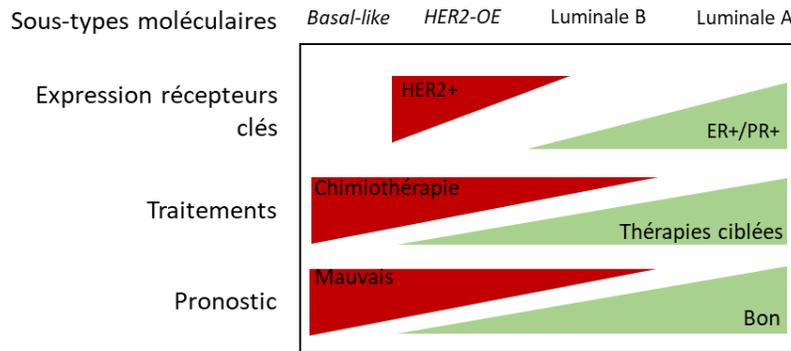


Figure 2 - Lien entre la classification clinique et par sous-types moléculaires

Puisque la grande majorité des tumeurs sont ER α +, de nombreuses équipes se sont penchées sur l'implication de ce récepteur et de son rôle dans la tumorigénèse mammaire.

3. Les récepteurs des œstrogènes

3.1 Famille des récepteurs des hormones stéroïdiennes

Les récepteurs des œstrogènes font partie de la famille des récepteurs des hormones stéroïdiennes et de la superfamille des récepteurs nucléaires. Les récepteurs des hormones stéroïdiennes peuvent être classés en cinq classes majeures en fonction de leurs ligands respectifs : les récepteurs des glucocorticoïdes (GR), des minéralocorticoïdes (MR), des androgènes (AR), des progestines (PR) et finalement, des œstrogènes (22). Ces récepteurs jouent des rôles importants dans la croissance, le développement et le maintien de l'homéostasie de divers processus physiologiques (23). Les récepteurs de cette famille sont d'homologues avec des degrés de conservation variables dans les différentes régions des récepteurs, tel qu'il sera discuté plus loin (22).

3.1.1 Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes sexuelles

La découverte des hormones stéroïdiennes, dont les œstrogènes, a précédé la découverte des récepteurs nucléaires. Les hormones stéroïdiennes sont des hormones sécrétées provenant du métabolisme du cholestérol. Après leur sécrétion par les glandes stéroïdiennes, elles sont transportées dans la circulation sanguine jusqu'à leurs tissus cibles où leurs récepteurs peuvent médier la réponse hormonale. Les hormones stéroïdiennes peuvent être classées en deux groupes : les corticostéroïdes et les hormones sexuelles (dont font partie les œstrogènes) (24).

Les récepteurs des œstrogènes sont les protéines intra-cellulaires ayant comme ligands naturels les œstrogènes. C'est en 1929 que le premier œstrogène, l'œstrone (E1), a été isolé par Adolf Butenandt et Edward Adelbert Doisy, et ce dernier a également isolé et purifié pour la première fois l'œstradiol dans les ovaires de porc en 1935 (25). En 1930, Marrian et ses collègues (26) ont découvert l'œstriol (E3) à partir d'échantillons urinaires de femmes enceintes (25). Finalement, ce n'est qu'en 1965 que l'œstérol (E4) a été mis en évidence, également à partir d'urine de femmes enceintes (27). E2 est l'œstrogène circulant le plus puissant, alors que E3 serait le moins puissant (28). Leur structure chimique est illustré dans la figure 3 et reflète leur différence, notamment au niveau du nombre de groupements hydroxyles (-OH) (29).

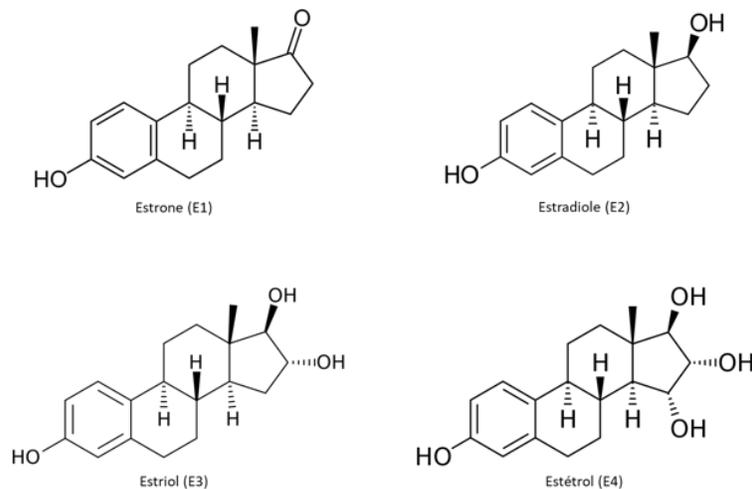


Figure 3 - Structure des œstrogènes endogènes majeurs

3.1.1.1 Rôles biologiques des œstrogènes

Ces hormones jouent plusieurs rôles biologiques importants dans la croissance, le développement et le maintien des organes reproductifs féminins et des glandes mammaires (30). Chez les femmes, les niveaux d'œstrogènes dans le sang varient en fonction du cycle menstruel, régulant l'ovulation (31). Les œstrogènes sont aussi impliqués dans d'autres systèmes physiologiques. Par exemple, ces hormones sont impliquées dans la croissance, la maturation et le maintien des os et une perte de la production d'œstrogènes est associée à l'ostéoporose (32). Un autre exemple de l'impact de ces hormones est leur effet protectif sur le système cardiovasculaire, notamment en stimulant l'angiogenèse et la vasodilatation (33). Les œstrogènes peuvent diffuser passivement dans plusieurs types de cellules et c'est l'expression des ER qui définira leur activité.

3.1.1.2 Biosynthèse des œstrogènes

Chez l'humain, les œstrogènes dérivent de la conversion du cholestérol par des enzymes de la famille des cytochromes P450 (P450) et des aromatasés. Les ovaires et le placenta sont les principaux lieux de synthèse des œstrogènes (surtout E1 et E2) (28), mais d'autres tissus sont également capables d'en produire via différents mécanismes d'action. La figure 4 illustre les étapes majeures de la biosynthèse des œstrogènes à partir du cholestérol.

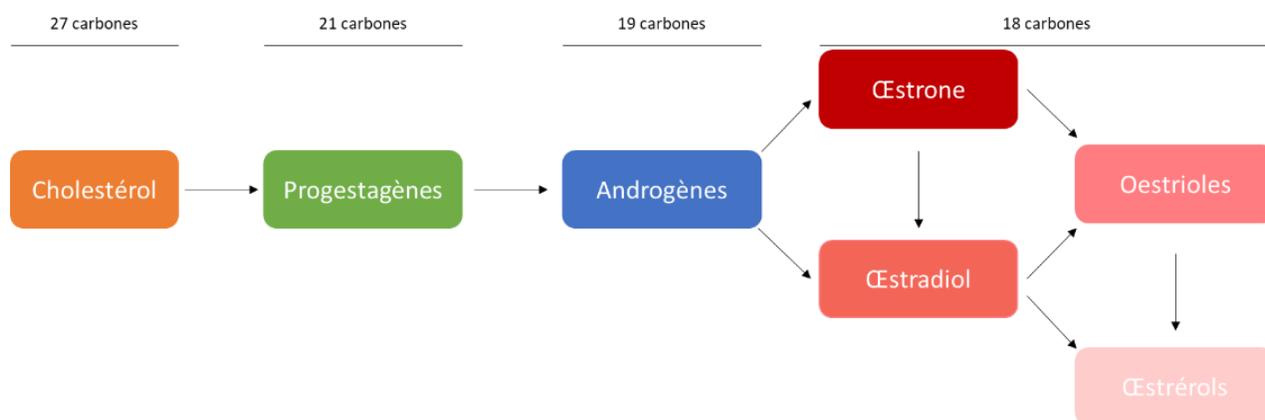


Figure 4 - Généralisation des voies de biosynthèses des œstrogènes

Dans les ovaires, le cholestérol (27 carbones) est d'abord converti par des enzymes de clivage de chaînes latérales en progestagènes (21 carbones). Ensuite, des enzymes P450 permettent la

conversion des progestagènes en androgènes (19 carbones). L'aromatase des androgènes en E1 ou E2 (18 carbones) est assurée par des aromatasas. Il est à noter que E1 peut également être converti en E2 par la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD). E3 peut être synthétisé par le foie (à de très faible niveau) ou dans le placenta de la femme enceinte à partir de E1 et E2. E4 est uniquement synthétisé par le foie fœtal durant la grossesse, à partir de E2 et E3 (28). Les œstrogènes nouvellement synthétisés peuvent rejoindre la circulation sanguine et être transporté dans divers tissus afin d'exercer leurs fonctions biologiques grâce à leurs récepteurs.

3.1.2 La réponse aux œstrogènes est médiée par les récepteurs des œstrogènes

La découverte des récepteurs hormonaux est arrivée après la découverte de leurs ligands. C'est en 1958 qu'Elwood Jensen et son équipe découvrent le premier récepteur des hormones stéroïdiennes, ER, en démontrant que l'E2 radioactif était lié par des protéines de l'utérus de rats femelles. Un peu plus tard, il a également démontré que le complexe E2 :ER pouvait être transloqué dans le noyau où il avait un effet sur la transcription de gènes prolifératifs et de croissance (34). En 1963, Peter Karlson émet l'hypothèse de la théorie « hormone-gène » stipulant que les hormones stéroïdiennes ont un rôle important dans la signalisation menant à la régulation de la transcription des gènes (35). Dans les années 1980, les nouvelles avancés dans les techniques de biologie moléculaire ont permis le clonage des récepteurs nucléaires, notamment de GR (36). En 1986, l'équipe de Pierre Chambon réussit à cloner ER (maintenant connu comme étant ER α) à partir d'ARN isolés de lignées cellulaires de tumeurs mammaires MCF-7 (37,38). Jusqu'en 1996, cet ER était considéré comme le seul récepteur pouvant médier la réponse oestrogénique. Toutefois, à partir de tissus de prostates et d'ovaires de rat, l'équipe de Jan-Ake Gustafsson met en évidence l'existence d'un second ER (maintenant ER β) ayant un grand degré de conservation avec ER α (39). ER α et ER β sont les produits des gènes *ESR1* (chromosome 6, locus 6q25.1, (40)) et *ESR2* (chromosome 14, locus 14q23–24, (41)) respectivement. Toutefois, ER β ne semble pas être une protéine oncogénique dans le cancer du sein, contrairement à ER α . Ainsi, dans le cadre de ce mémoire, seul ER α sera étudié. Finalement, en 2005, un récepteur couplé à une protéine G, GPR30, dont aucun ligand n'était connu, a finalement été renommé récepteur des œstrogènes couplées à une protéine G-1 (GPER1) puisqu'il peut se lier avec une

forte affinité à l'E2 et médie une partie de la réponse rapide des œstrogènes. Cette protéine peut se retrouver à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et à la membrane plasmique (42).

Grâce à tous ces chercheurs pionniers, la structure des membres de la famille des récepteurs des hormones stéroïdiennes a pu être déterminée, ce qui a conduit à une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'action en tant que facteurs de transcription ligand-dépendants.

3.1.2.1 La structure de ER partage des similitudes avec tous les récepteurs nucléaires

ER α possède les régions communes des membres de la famille des récepteurs des hormones stéroïdiennes (Figure 5A). Plusieurs isoformes existent, mais l'isoforme complet est composé de 595 acides aminés (a.a.) et a un poids moléculaire d'environ 67 kiloDaltons (kDa). Ces récepteurs possèdent six régions distinctes (A-F) et peut être divisés en trois domaines fonctionnels majeurs.

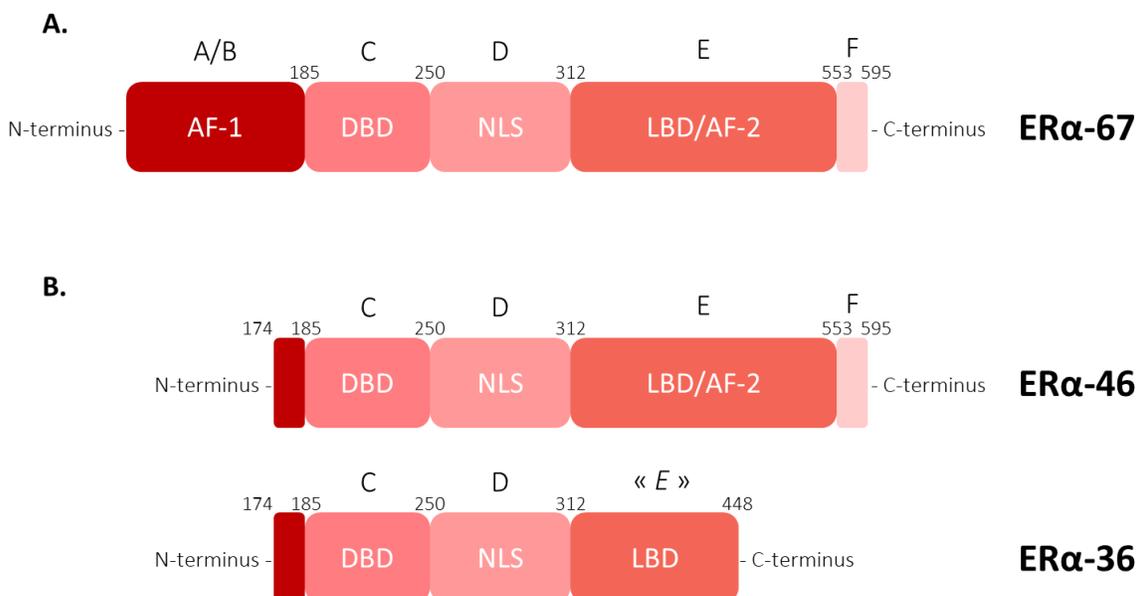


Figure 5 - Régions et domaines fonctionnels de ER α pleine longueur **(A.)** et de ses isoformes plus courts **(B.)**.

Tout d'abord, la région N-terminale A/B (Figure 5) contient les domaines A et B possédant une fonction d'activation 1 (AF1, de l'anglais « *Activation Function 1* ») qui est ligand-indépendante, bien qu'ayant une activité plutôt faible. Cette activité est régulée par la phosphorylation de résidus sérines de cette région, notamment par MAPK, GSK-3 et cycline A/cdk2 (43).

ER α possède un domaine de liaison à l'ADN (DBD, de l'anglais « *DNA binding domain* ») comprenant la région C et est le domaine le plus conservé entre les deux variants (44). Ce domaine est important pour médier l'activité transcriptionnelle des récepteurs puisqu'il permet de lier des séquences précises de l'ADN, et ainsi de cibler des gènes spécifiques pour une régulation transcriptionnelle. Le DBD comprend deux doigts de zinc à quatre cystéines (C4) et des résidus précis de cette région permettent la reconnaissance spécifique des éléments de réponse des œstrogènes (EREs) dans le sillon majeur de l'ADN qui correspondent à la séquence palindromique GGTCAnnnTGACC lorsque les récepteurs forment des homodimères. De plus, cette région est importante pour la dimérisation, qui contribue à l'affinité des récepteurs pour l'ADN (44-46).

La région D est une région charnière qui lie le DBD et le domaine de liaison au ligand (LBD, de l'anglais « *Ligand Binding Domain* ») et confère une flexibilité aux récepteurs. Cette région contient également un signal de localisation nucléaire (NLS) important pour la localisation nucléaire du récepteur actif. Un autre NLS se situe dans le LBD, mais il a été démontré que seul, il ne peut assurer la localisation nucléaire de ER α et doit plutôt coopérer avec le NLS de la région charnière (47). De plus, la région charnière est nécessaire pour assurer une synergie entre AF-1 et une deuxième fonction d'activation, AF2, située dans les régions E/F, où se trouve également le LBD. Ceci permet une transactivation plus complète de ER α (48). De plus, de nombreux résidus de la région charnière peuvent être la cible de modifications post-traductionnelles (PTM) ayant un impact sur la sensibilité de ER aux hormones, la stabilité des récepteurs et le recrutement de cofacteurs (49). Par exemple, les lysines (K) 266 et 268 peuvent être acétylées par p300, une histone acétylase, stimulant ainsi la liaison de ER α à l'ADN ainsi que de son activité ligand-dépendante (50).

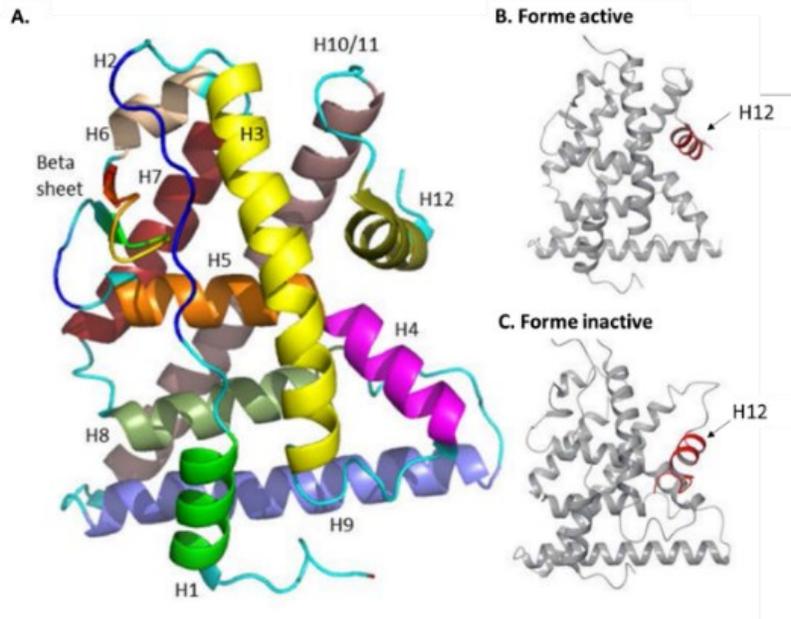


Figure 6 - Structure du domaine de liaison au ligand de ER α **A.** sous sa forme active et **B.** sous sa forme inactive. Tiré de *Ng et al. (2014)*. (51) License pour utilisation : [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Finalement, le LBD est le domaine permettant la liaison des ligands spécifiques au récepteur. Il est composé de 12 hélices- α (H1-12) formant une poche hydrophobe permettant de recruter les ligands (Figure 6A). Plus précisément, la liaison d'agonistes comme E2 va provoquer un changement de la conformation du LBD sous sa forme active (Figure 6B), où H12 va venir fermer la poche hydrophobe. Ceci entraîne la libération d'un complexe inactif composé de protéines chaperonnes (protéines de choc comme Hsp90 ou Hsp70, des immunophilines, etc.) et active AF-2, composé des hélices- α H3, H4, H5 et H12. Les motifs LXXLL retrouvés sur plusieurs coactivateurs de ER α (52,53) se fixent au niveau du sillon formé par ces hélices, expliquant les propriétés d'activation transcriptionnelle de AF2. Le recrutement d'antagonistes de ER α change la conformation de ce domaine (Figure 6C) et inhibe le recrutement des coactivateurs de ER α (53).

Deux autres isoformes de ER α ont été identifiés (Figure 5B), nommés ER α -46 et ER α -36, en fonction de leur poids moléculaires respectifs (Figure 5). Ces isoformes sont obtenus par utilisation d'un site différent d'initiation de la transcription et par épissage alternatif (54-57). La séquence de ER α -46 est identique à celle de ER α -67 sans les 173 premiers a.a. ER α -46 ne possède donc pas AF-1. ER α -36 ne possède ni AF-1, ni AF-2. Les rôles de ces isoformes ne sont pas tous

élucidées encore, mais quelques mécanismes d'action ont été révélés par différentes équipes. Par exemple, ER α -36 jouerait un rôle de l'activation de la voie de signalisation non-génomique de la protéine kinase activée par un mitogène (MAPK) (57-59). Des études ont suggéré que ER α -46 inhibait les effets prolifératifs de ER α -67, probablement en formant des homodimères ou hétérodimères moins aptes à recruter des cofacteurs transcriptionnels (60). Les isoformes de ER α gagnent à être mieux connus, mais dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons à l'isoforme pleine longueur de ER α .

3.1.2.2 Les mécanismes d'action de la signalisation oestrogénique ligand-dépendante

La signalisation par ER ligand-dépendante peut se faire de diverses manières, mais est généralement divisée en trois mécanismes généraux qui sont illustrés à la figure 7.

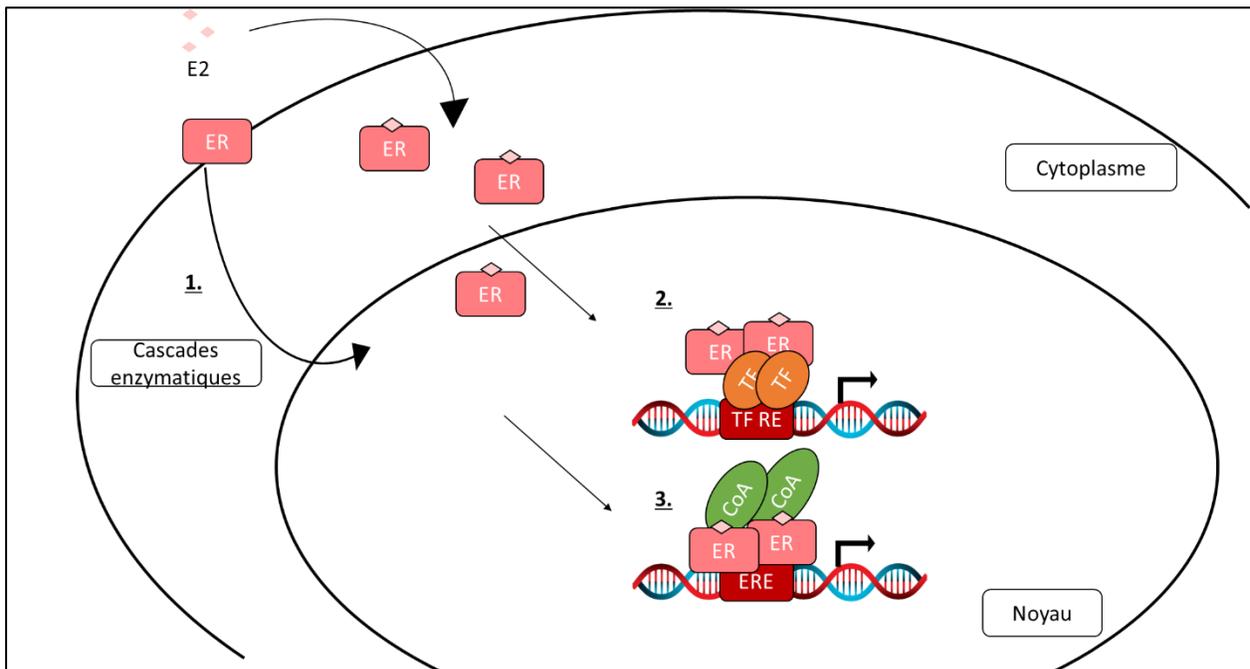


Figure 7 – Voies de signalisation ligand-dépendantes de ER Les trois voies de signalisation ligand-dépendantes sont présentées : 1. Voie non-génomique. 2. Voie génomique indirecte (ou ERE-indépendante) et 3. Voie génomique directe (ou ERE-dépendante)

Adapté de Marc et al. (2014) (61)

La signalisation non-génomique permet une réponse particulièrement rapide des cellules à l'E2, trop rapide pour pouvoir impliquer une transcription directe des gènes par ER. Par exemple, il a

été observé qu'une dose physiologique de E2 entraînait en 15 secondes une augmentation de l'AMP cyclique (AMPC) de l'utérus de rate ovariectomisées (59). Cette voie de signalisation pourrait être en partie médiée par GPER1, mais également par une sous-population de ER α et ER β se trouvant à la membrane plasmique. Ce mécanisme implique la génération de messagers secondaires et l'activation de cascades enzymatiques, notamment de kinases. Un exemple de cibles de cette voie de signalisation est la famille des STAT (de l'anglais « *Signal Transducers and Activators of Transcription* ») impliquée dans différents processus cellulaires, telle que la prolifération, la différenciation et l'apoptose (62). Un autre aspect intéressant de cette voie est l'activation des membres de la famille MAPK, qui comme mentionné précédemment, peut phosphoryler des résidus de AF-1 de ER α et engendrer une faible activité ligand-indépendante (63). Ainsi, la voie de signalisation non-génomique peut interférer avec la voie de signalisation génomique des ER.

La signalisation génomique indirecte implique le recrutement de ER α à des gènes ne comportant pas de séquences EREs. Il a été suggéré que plus de 35% des gènes régulés par ER α n'avaient pas de EREs dans leurs régions régulatrices (64). Dans ce cas, ER α est plutôt recruté à l'ADN par d'autres facteurs de transcriptions, sans liaison directe à l'ADN et agit à titre de cofacteur (64). Un exemple de facteur recruteur est la protéine de stimulation 1 (SP-1), dont le recrutement est accentué aux promoteurs de gènes riches en GC en présence de ER α stimulé par E2, tel que décrit pour les gènes du récepteur de lipoprotéines de faible densité (LDLR) ou encore pour le récepteur des progestérone B (PRB) (61,65,66). Ainsi, ER α peut agir à titre de coactivateur, mais également de corépresseur. Un exemple de ER α agissant à titre de corépresseur est avec sa liaison avec le facteur se liant à GATA 1 (GATA1), interférant avec la liaison de GATA1 à l'ADN et inhibant ainsi son activité transcriptionnelle, comme décrit dans des lignées cellulaires érythroïdes (67).

La voie classique de la signalisation par les hormones stéroïdiennes est l'activation des ER comme des facteurs de transcription ligand-dépendants. Après sa liaison à un agoniste comme E2, le récepteur change de conformation, favorisant ainsi sa translocalisation nucléaire et son recrutement sous forme de dimère (majoritairement des homodimères) sur les EREs des gènes ciblés. Une étude à l'échelle du génome humain et de souris a permis d'identifier plus de 70 000 EREs grâce aux avancées dans le domaine de la biologie computationnelle, et la liaison à plusieurs

de ces EREs a été confirmée par immunoprécipitation de la chromatine couplé à la PCR ou à des micropuces à ADN (68,69). Finalement, les dimères de ER α liés à l'ADN peuvent recruter des cofacteurs qui vont stimuler l'activité transcriptionnelle de gènes prolifératifs et de croissance cellulaire.

Ces voies de signalisation mettent en évidence la complexité de la signalisation oestrogénique et l'implication d'une multitude de cofacteurs à différentes étapes en réponse à différents contextes et signaux cellulaires.

3.1.3 L'activité transcriptionnelle par ER α implique une dynamique et une coopération de cofacteurs

Bien que plusieurs ERE ont été identifiés dans une panoplie de gènes du génome humain et de souris, tous les gènes contenant de tels éléments ne sont pas activés transcriptionnellement par ER α . Ceci suggère que ER α nécessite la coopération d'autres facteurs afin d'activer ses gènes ciblés.

3.1.3.1 FOXA1 est un facteur pionnier nécessaire pour l'activité transcriptionnelle de ER α

Lorsque la chromatine est sous sa forme la plus compacte, soit l'hétérochromatine, les gènes sont non accessibles pour la machinerie transcriptionnelle et ne seront donc pas actifs. Ceci permet donc de rendre silencieux les gènes dont l'activité n'est pas requise à un moment ou une localisation donnée. À l'inverse, la chromatine sous sa forme moins compacte, soit l'euchromatine, correspond à des gènes transcriptionnellement actifs, entre autres grâce à leur accessibilité (70). Ces régions peuvent être caractérisées comme étant plus sensibles à la désoxyribonucléase I (ADNase I) (71). Ainsi, les cellules ont la capacité de répondre en fonction de leur environnement et de diverses conditions, dont la réponse aux œstrogènes, par une multitude de mécanismes, y compris par la régulation transcriptionnelle de leurs gènes. Ceci implique qu'un gène non actif, car situé dans une région où la chromatine est condensée, doit pouvoir devenir accessible rapidement. Plusieurs mécanismes existent pour arriver à ce résultat, dont le recrutement de complexes de remodelage de la chromatine ou de modification des

histones. Ces facteurs doivent être recrutés à des sites spécifiques sur l'ADN par des facteurs pionniers.

Ce terme est apparu pour la première fois dans une publication datant de 2002 avec l'identification du rôle dans l'ouverture de la chromatine des facteurs FOXA1 (anciennement HFN3) et GATA4, donnant ainsi naissance à cette nouvelle classe fonctionnelle de facteurs de transcription. Les auteurs de cette étude se sont intéressés à ces facteurs et leur rôle dans l'activation transcriptionnelle du gène codant pour l'albumine dans les cellules précurseurs hépatiques. Cette activation se fait majoritairement grâce à un amplificateur (« *enhancer* ») en amont du site d'initiation de la transcription du gène. Cet amplificateur est normalement situé dans une région hautement condensée de la chromatine, et doit donc devenir accessible dans ces cellules afin d'assurer la synthèse de l'albumine. Ils ont démontré par l'analyse des sites hypersensibles à l'ADNase I que FOXA1 et GATA4, en se liant à des sites situés dans l'amplificateur, permettait l'ouverture de la chromatine condensée, rendant accessible l'ADN de cette région. Cette interaction est possible grâce au domaine C-terminal de FOXA1 qui peut se lier aux histones centrales H3 et H4 (72). Ainsi, les facteurs pionniers sont des facteurs de transcription pouvant à la fois lier l'hétérochromatine à des séquences précises et initier une modification de l'état de la chromatine, permettant de recruter d'autres facteurs de transcription aux régions régulatrices impliquées et ainsi de modifier l'activité transcriptionnelle des gènes influencés.

Lors de la caractérisation des sites de fixation de ER α sur l'ADN, un enrichissement de sites de FOXA1 a été observé, et la suppression de FOXA1 a permis d'abolir presque totalement la liaison à l'ADN de ER α , conduisant à la conclusion que FOXA1 est un facteur pionnier pour ER α . Cependant, FOXA1 régule aussi l'expression de ER α et coopère pour le recrutement de cofacteurs différents. L'expression de FOXA1 est de plus fortement corrélée avec celle de ER α dans les cellules de tumeurs luminales du cancer du sein. FOXA1 contribue donc à la fonction proliférative du récepteur et à son rôle dans la tumorigénèse (73).

3.1.3.2 ER α peut réguler ses gènes cibles sur de longues distances, tel qu'observé pour la régulation de GREB1

L'existence d'éléments EREs liés par ER à grande distance des promoteurs de gènes cibles suggère la capacité de ce récepteur à induire la formation de boucles de chromatine. Dans le cas du gène régulé dans le cancer du sein 1 (de l'anglais « *Gene Regulated in Breast Cancer 1* » ou GREB1). GREB1, trois EREs répartis sur plus de 20 kb coopèrent afin d'induire une forte activité transcriptionnelle, en formant une boucle de chromatine rapprochant chacun de ces EREs avec le site d'initiation de la transcription en réponse à E2 (74). GREB1 est un gène important dans le contrôle de la prolifération et de la croissance de cellules ER α +. Il serait impliqué dans la réponse précoce de la signalisation oestrogénique par ER, notamment en activant les voies de signalisation PI3K/Akt (75). Puisque ce gène est activé rapidement dans la voie de signalisation oestrogénique, et que sa régulation par ER α est bien documentée, nous l'avons utilisé comme gène cible lors de nos expériences visant à vérifier le recrutement de protéines d'intérêt aux EREs.

3.1.3.3 ER α peut recruter une vaste gamme de cofacteurs aux éléments cis-régulateurs de gènes régulés

ER α se lie principalement à des régions cis-régulatrices, les amplificateurs (de l'anglais « *enhancers* »), correspondant à des éléments de l'ADN d'environ 500-1000 pb (76-78). Plusieurs sites de liaisons pour des facteurs de transcription y sont retrouvés et permettent le recrutement d'une combinaison de facteurs de transcription en fonction d'une situation donnée. Ces facteurs, dont ER α , vont coopérer pour le recrutement de coactivateurs et corépresseurs transcriptionnels.

De nombreuses protéines impliquées dans la médiation de l'activité transcriptionnelle de ER α dans les cellules mammaires normales ou de tumeurs mammaires lumineales. Par exemple, la famille des coactivateurs des récepteurs nucléaires (NCOA/2/3) en complexe avec les protéines interagissant avec CREB (CBP) est recrutée à l'ADN quelques minutes après la liaison de ER α aux EREs régulés. L'interaction entre les NCOA et ER α est possible car les SRC possèdent un domaine d'interaction aux récepteurs (RID) qui contient trois motifs LXXLL mentionnés plus tôt (79). Les NCOA possèdent une faible activité histone acétyl-transférase (HAT) et permettent de recruter CBP, qui a une forte activité HAT. Cette activité HAT permet une plus grande acétylation des histones, rendant plus accessible les gènes avoisinants. Ainsi, leur activité est requise pour

l'activité transcriptionnelle de beaucoup de gènes ciblés par ER α . De plus, ces facteurs permettent le recrutement d'autres coactivateurs importants dans la signalisation par ER α tels que CBP et p300 (80-82). Les coactivateurs peuvent faciliter l'expression des gènes ciblés par ER α par une multitude de mécanismes, dont ceux impliquant une modification et un remodelage de la chromatine ou encore par une facilitation du recrutement de la machinerie transcriptionnelle ou d'autres cofacteurs(83). Les coactivateurs de ER α sont des cibles thérapeutiques potentielles puisque leur inhibition peut interférer avec la signalisation par ER α . Le recrutement de coactivateurs par ER α est généralement facilité par la liaison d'agonistes (52).

ER α peut également recruter des corépresseurs à ses sites de liaison. En effet, les cellules doivent pouvoir réguler la signalisation par ER α ou pour réprimer d'autres gènes. Un exemple de complexe répresseur recruté par ER α est le corépresseur des récepteurs nucléaires (NCoR). Ce corépresseur initie la formation d'un très gros complexe multiprotéique répresseur dont certaines sous-unités ont des activités histone désacétylase (HDAC). L'activité HDAC de ces protéines permet de désacétyler les histones, conférant à la chromatine une structure plus compacte et moins accessible (84). Une séquence retrouvée sur NCoR similaire au LXXLL des coactivateurs, la boîte CoRNR (de l'anglais « *CoRepressor/Nuclear Receptor* ») L/I-XX-I/V-L a été décrite et celle-ci permettrait l'interaction entre le corépresseur et le LBD de ER α (85,86). Le recrutement de corépresseurs par ER α est généralement facilité par la liaison d'antagonistes ou l'absence de ligands (52).

4. Les thérapies hormonales contre les tumeurs mammaires du cancer du sein

Une corrélation entre l'activité œstrogénique et la tumorigénèse mammaire a été longtemps soupçonnée, notamment dû au risque accru de cancer du sein des femmes dont l'exposition aux œstrogènes endogènes et exogènes est plus grande (puberté précoce, ménopause tardive ou prise de traitement hormonaux) (87,88). De plus, l'effet antiprolifératif de thérapies hormonales dont le tamoxifène, un anti-œstrogène, confirme la dépendance œstrogénique globale des tumeurs mammaires ER α + (89). L'implication directe de ER α dans la tumorigénèse mammaire a été mise en évidence grâce à la suppression du gène codant pour ER α dans des souris (souris

ER α KO) (90). Ainsi, l'importance de la signalisation œstrogène-dépendante dans le cancer du sein a été, et est toujours, un sujet de recherche de grande importance. Ceci a mené au développement de petites molécules synthétiques pouvant interférer avec la voie de signalisation de ER α . Contrairement aux thérapies plus traditionnelles, telle que la chimiothérapie ou la radiothérapie, les thérapies endocrines engendrent généralement moins d'effets secondaires.

4.1 Les agents de thérapies hormonales utilisées contre le cancer du sein peuvent être classés en deux catégories selon leur mécanisme d'action

Une stratégie pour inhiber la signalisation oestrogénique est de cibler l'enzyme nécessaire à la biosynthèse des œstrogènes, l'aromatase, mentionnée plus tôt. En effet, les inhibiteurs de l'aromatase (IA), tels que l'anastrozole (Figure 7A) vont empêcher l'aromatation des androgènes en œstrogènes. Toutefois, ces traitements ne sont prescrits que chez les femmes post-ménopausées.

Une deuxième stratégie utilisée dans le traitement du cancer du sein consiste à administrer des antiœstrogènes (AE), qui sont des petites molécules synthétiques stéroïdiennes, ou semblable à des stéroïdes. Les AE vont entrer en compétition avec E2 pour la liaison au LBD de ER α , ce qui provoquera un changement de sa conformation, notamment au niveau de l'hélice H12. Les AE peuvent être classés en deux groupes différents (91), décrits ci-dessous.

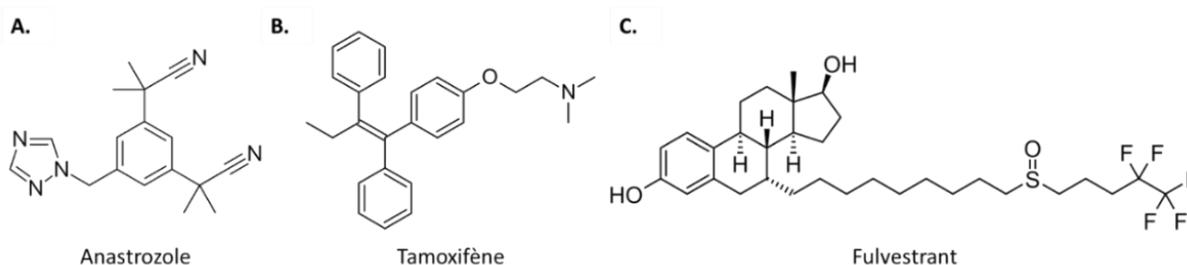


Figure 8 – Structure de différentes molécules de thérapies hormonales utilisées contre les tumeurs mammaires ER α +. **A.** Anastrozole (Inhibiteur des aromatasés), **B-C.** Anti-oestrogènes tamoxifène (SERM) (**B**) et Fulvestrant (SERD) (**C**).

4.1.1 Modulateurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes (SERMs)

Les SERM sont caractérisés par une activité tissu- et gène-spécifique. Le tamoxifène est le premier SERM à avoir été cliniquement approuvé pour traiter les cancers du sein ER α +. Cette molécule

avait été initialement synthétisée comme contraceptif oral. Brièvement, la liaison du tamoxifène au LBD de ER α est comparable à celle de E2. Toutefois, le tamoxifène possède une chaîne latérale (Figure 7B) qui empêche le positionnement de H12 nécessaire pour le recrutement de coactivateurs dans la conformation active du récepteur. Par exemple, il a été démontré que ER α lié au tamoxifène pouvait provoquer le recrutement de NCoR aux ERE de gènes ciblés par ER α dans les MCF-7, une lignée cellulaire ER+ luminaire souvent utilisée comme modèle dans la recherche sur le cancer du sein (92-94). Les SERMs sont généralement considérés comme des AE partiels puisqu'ils se comportent comme antagonistes ou agonistes partiels selon les tissus. Pour reprendre l'exemple du tamoxifène, cette molécule est un antagoniste dans les tissus mammaires et a des effets antiprolifératifs. Toutefois, cette molécule possède également des activités agonistes, notamment dans les os et l'utérus (95). Ceci peut d'ailleurs avoir des effets positifs ou négatifs. Par exemple, l'activité oestrogénique dans les os des femmes ménopausées réduit les risques d'ostéoporose (96). L'utilisation à long terme du tamoxifène mène cependant à une prolifération du tissu utérin dans les souris traitées et ce processus est dépendant de l'expression de ER α , ce qui augmente les risques de cancer de l'endomètre (91,97,98). Il a été proposé que l'équilibre entre une activité agoniste ou antagoniste soit en partie influencé par l'expression différentielle de cofacteurs dans les différents tissus. En effet, il a été observé que le coactivateur 1 des récepteurs nucléaires (NCOA1), qui est fortement exprimé dans l'utérus, est recruté aux EREs de gènes cibles par ER α lié au tamoxifène dans ce tissu. De plus, la surexpression de NCOA1 dans deux lignées cellulaires de tumeurs mammaires, MCF-7 et T47D, permet une activité agoniste partielle du tamoxifène (99,100). Afin de contrer les effets néfastes du tamoxifène, des analogues de cette molécule ont été développés. Jusqu'à présent, aucun nouveau SERM n'a prouvé être plus efficace que le tamoxifène dans le traitement du cancer du sein. Toutefois, une grande partie des tumeurs traitées avec le tamoxifène acquièrent une résistance contre ce traitement, tout en restant dépendantes de la voie de signalisation oestrogénique (91,101,102).

4.1.2 Dégradeurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes (SERDs)

De nouveaux AE ont été développés dans le but de trouver des solutions aux effets secondaires dû à l'activité agoniste partielle et à la résistance observée avec les SERMs. Le fulvestrant (Fulv), est un AE stéroïdien, et est considéré comme un AE pur puisqu'il ne possède pas d'activité

agoniste dans d'autres tissus, contrairement aux SERMs (91). Le Fulv possède une plus longue chaîne latérale comparativement au Tam (Figure 8C). La caractérisation d'anti-oestrogènes avec des chaînes latérales de taille variable a permis de démontrer que l'activité anti-oestrogénique pure est dépendante de la longueur de la chaîne latérale (103). De plus, il a été observé que le fulvestrant accélérât la dégradation de ER α par la voie de dégradation du protéasome-ubiquitine (91,104,105). En effet, Wijayaratne et McDonnell (2001, (106)) ont démontré que la liaison de ER α avec le fulvestrant augmenterait de 2 fois l'ubiquitination du récepteur. Des études de CHIP-seq dans les MCF7 ont montré que le complexe ER α : Fulvestrant était lié à de nombreux EREs de gènes ciblés par ER α après 1h de traitement, mais d'autres ont montré que le ce même complexe n'était plus lié à l'ADN après 3h de traitement, ce qui pourrait refléter sa dégradation (78,91,107). Toutefois, l'antiœstrogénicité du Fulvestrant ne peut être entièrement attribuée à l'augmentation de la dégradation de ER α puisque sa surexpression entraînant une saturation du récepteur ne supprime pas l'activité antagoniste du Fulvestrant (108) et l'administration d'un inhibiteur du protéasome ne supprime la perte de liaison à l'ADN (109). Notre laboratoire a de plus démontré que le fulvestrant induisait fortement la SUMOylation de ER α et que cette modification post-traductionnelle joue un rôle dans l'anti-œstrogénicité du fulvestrant (103). Ceci pourrait être dû à l'effet de la SUMOylation sur le recrutement de cofacteurs de ER α , comme il a été observé pour d'autres récepteurs stéroïdiens (AR et GR) (103,110). Le fulvestrant est un SERD approuvé en clinique dans le traitement du cancer du sein, mais seulement en 2^e ligne de défense chez les patientes ne répondant pas ou plus au tamoxifène. En effet, le fulvestrant n'est pas aussi efficace que le tamoxifène ou les IA dans le traitement des tumeurs mammaires ER α +, probablement dû à sa faible biodisponibilité orale. Ceci a motivé de nombreuses équipes de recherche à mieux comprendre les mécanismes d'action du fulvestrant afin de développer de nouvelles molécules pouvant être utilisées dans la thérapie hormonale contre le cancer du sein. Il est important de noter que la liaison au fulvestrant rend ER α insoluble, possiblement en interagissant avec les cytokines CK8/CK18 (111), ce qui rend son étude plus difficile par des approches de protéomique traditionnelles.

Ainsi, les SERM et les SERD ont différents mécanismes d'action, qui peuvent être influencés par de nombreux facteurs. Une meilleure compréhension de ceux-ci permettrait le développement

de nouvelles molécules pour le traitement du cancer du sein, ayant moins d'effets secondaires et moins sujettes au développement de résistance, tout en ayant une bonne biodisponibilité.

5. Criblage par TurboID pour l'identification de l'interactome de ER α dans la lignée cellulaire ER α + ZR-75.1

Les sections précédentes ont démontré que la signalisation par ER α dans les cellules normales et cancéreuses du sein pouvait impliquer un bon nombre de facteurs. Il est important de mieux caractériser l'interactome de ER α en fonction de différents ligands dans les cellules tumorales du cancer du sein. Ceci pourrait contribuer à une meilleure compréhension de la tumorigénèse et des mécanismes impliqués dans la résistance thérapeutique, et ainsi aider au développement de nouvelles thérapies contre le cancer du sein ER α +. Afin de mieux connaître l'interactome ligand-spécifique de ER α dans les lignées cellulaires de tumeurs mammaires ER α +, un criblage par TurboID a été effectué dans notre laboratoire par Dr. Elham Dianati dans la lignée cellulaire du cancer du sein ZR-75-1. Les cellules ZR-75-1 sont des modèles souvent utilisés pour l'étude des propriétés des tumeurs mammaires, notamment puisqu'elles expriment grandement ER α , mais en moins grand nombre que les MCF-7. En plus de pouvoir bien représenté le comportement cellulaire de ces tumeurs, ces cellules comportent plusieurs avantages au niveau de leur manipulation en laboratoire : temps de division rapide, adhérences, transfection simple, etc.

5.1 BioID, une méthode d'étiquetage de proximité pour étudier les protéines voisines d'une protéine d'intérêt

L'étiquetage de proximité (de l'anglais « *Proximity labeling* ») est une méthode permettant d'explorer le réseau d'interaction d'une protéine d'intérêt par analyse protéomique. Cette technique repose sur la fusion d'une enzyme permettant l'étiquetage avec notre protéine d'intérêt. Il existe différentes enzymes pouvant être utilisés pour cette méthode, incluant une version mutée d'une biotine ligase d'origine bactérienne (*Escherchia coli*), BirA-R118G, de 35 kDa. Cette enzyme est utilisée dans la technique BioID (de l'anglais « *proximity-dependant biotin identification* ») développé par Roux *et al.* (2012. (112)). Contrairement à plusieurs autres techniques biochimiques et génétiques, la technique du BioID permet d'effectuer le criblage de

protéines présentes à proximité de notre protéine d'intérêt dans un environnement cellulaire presque physiologiquement normal. De plus, contrairement à d'autres techniques d'étiquetage de proximité, comme APEX2, les conditions nécessitant l'exécution du BioID n'engendrent pas de cytotoxicité (113). Dans la technique de BioID, l'étiquetage se fait simplement avec l'ajout de biotine dans le milieu cellulaire.

La biotine, aussi connue comme vitamine B₇, est une molécule synthétisée chez les plantes et les bactéries. Cette molécule est souvent utilisée dans différentes techniques biochimiques puisqu'elle peut former une très forte interaction avec la streptavidine. Cette forte interaction permet l'utilisation du complexe biotine:streptavidine pour isoler les protéines biotinylées tout en résistant à plusieurs facteurs tels que les détergents, les sels ou encore une températures ou un pH extrêmes (114).

Dans les cellules de mammifères, la biotinylation est une modification assez rare, qui est restreinte à quelques carboxylases (115). La biotinylation se fait en deux étapes : la première implique la formation du biotinoyl-5'-AMP (bioAMP) grâce à la combinaison de la biotine active et de l'AMP. La bioAMP a une forte affinité avec BirA (non muté) jusqu'à la rencontre d'une lysine à proximité d'un « tag » d'accepteur de biotine (BAT). La mutation de BirA-R118G diminue de près de deux fois l'affinité de bioAMP avec BirA, ce qui permet une biotinylation restreinte aux lysines se trouvant en forte proximité (112,116,117). Toutefois, la cinétique du BioID est très lente et nécessite de 18 à 24h de traitement avec la biotine afin d'avoir une quantité suffisante de biotinylation pour l'analyse subséquente (118).

5.1.1 Le TurboID est une version plus rapide du BioID

La cinétique très lente du BioID pose des limitations dans l'étude de l'interactome de protéines. Par exemple, ER α est dégradé après un certain temps en présence de fulvestrant. L'équipe du Dr. Alice Ting a développé une variante de cette technique avec une cinétique beaucoup plus rapide, soit 10 min au lieu d'un minimum de 18h (113). Le TurboID est une BirA ayant 14 mutations (Figure 8A) comparativement au BirA non muté. TurboID a été obtenue à la suite d'une évolution contrôlée de BirA-118S et la sélection de plusieurs générations de clones possédant des caractéristiques particulières, par exemple, une absence de forte auto-biotinylation. La protéine

utilisée pour l'évolution contrôlée n'était pas la même BirA que celle utilisée pour le BioID (BirA-R118G) car BirA-118S était 2 fois plus active que BirA-118S, ce qui augmentait sa cinétique et donc sa vitesse de biotinylation (113). Les étapes d'un criblage par TurboID sont représentées dans la figure 8B. Brièvement, les vecteurs comportant la protéine de fusion TurboID-protéine d'intérêt sont transfectés dans les cellules de choix. Ces cellules sont ensuite traitées pour un minimum de 10 minutes avec de la biotine pour ensuite être récoltées. Les protéines sont ensuite extraites et dénaturées et les protéines biotinylées sont isolées par capture par affinité avec des billes couplées à la streptavidine. Les protéines isolées sont ensuite analysées par spectrométrie de masse.

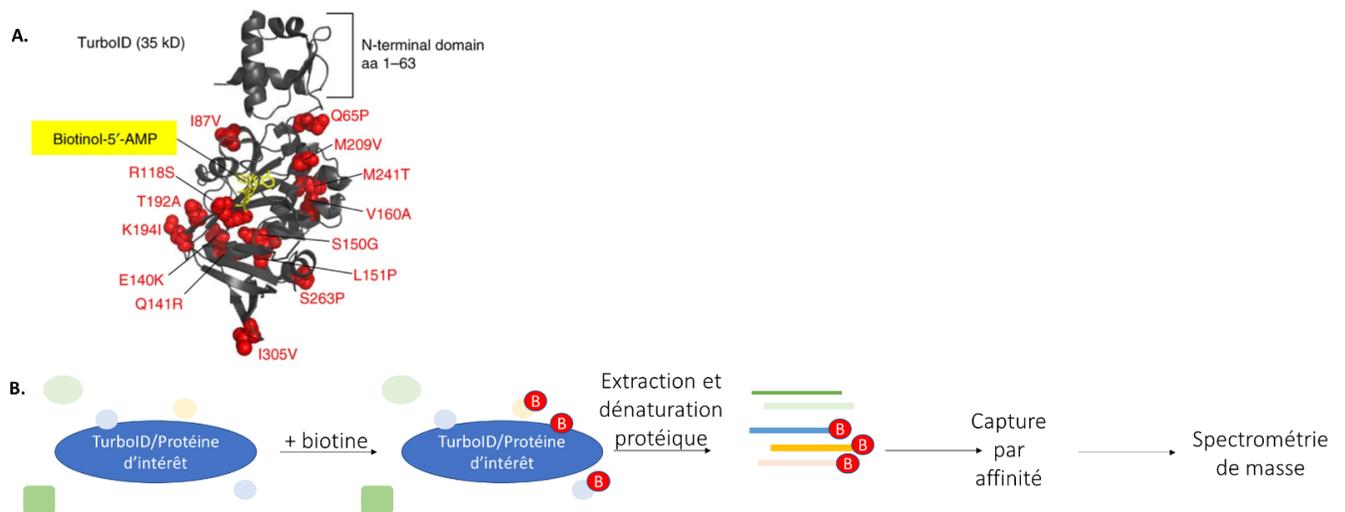


Figure 9 – Approche TurboID pour le criblage de protéines à forte proximité d'une protéine d'intérêt. **A.** Structure 3D de l'enzyme TurboID et ses mutations obtenues par évolution dirigée (113) **B.** Étapes générales de la technique de criblage par TurboID

5.2 Méthodologie du criblage par TurboID pour l'identification de protéines à proximité de ER α dans les ZR75.1

Tel que mentionné précédemment, notre laboratoire s'est intéressé à l'identification de protéines interagissant avec ER α dans les cellules de cancer du sein en présence de différents ligands dans une lignée cellulaire luminale de tumeurs mammaires, soit les ZR-75-1. Pour ce faire, les protéines de fusion ont été générées en utilisant la méthode de l'assemblage Gibson (Figure 9A et 9B). Deux vecteurs différents ont été utilisés pour ER α : 1. pSG5-HEG0 qui exprime ER α

« *Wild-type* » et 2. pSG5-HE257G qui est une variation de ER α sans son NLS. L'assemblage Gibson a permis de former les constructions représentées dans la Figure 9B. Les cellules non transfectées (Z1) ou des constructions TurboID avec NLS ou nuclear export signal (Z3 et Z5) sont considérés comme des contrôles afin de déterminer les protéines biotinyllées en absence de ER α . Les constructions TurboID^{NLS-}-ER α ^{NLS+} (Z2) et TurboID^{NES+}-ER α ^{NLS-} (Z4) devraient être exprimées dans le noyau et dans le cytoplasme, respectivement.

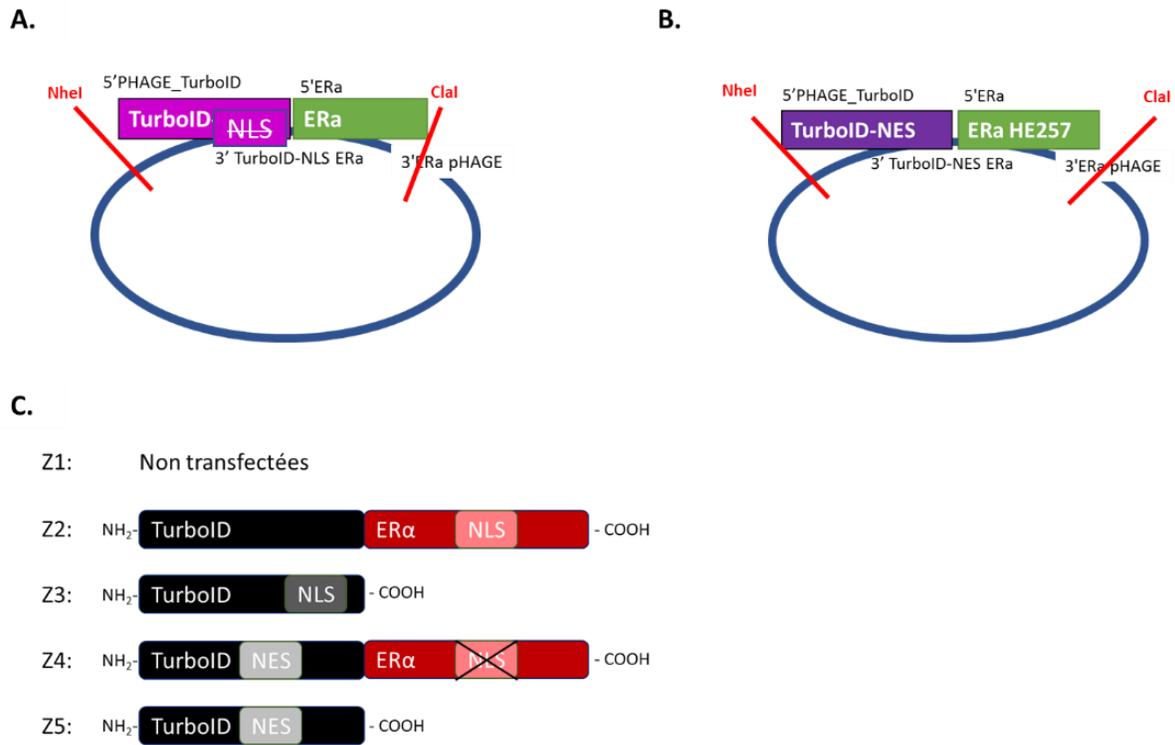
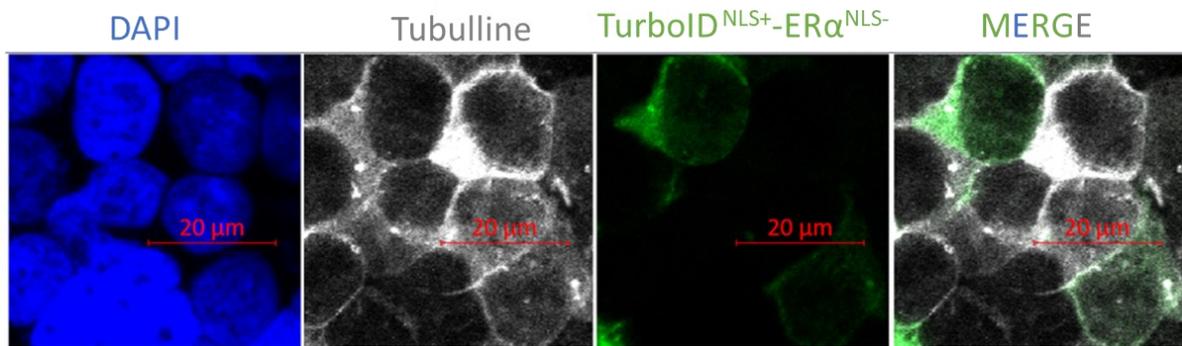
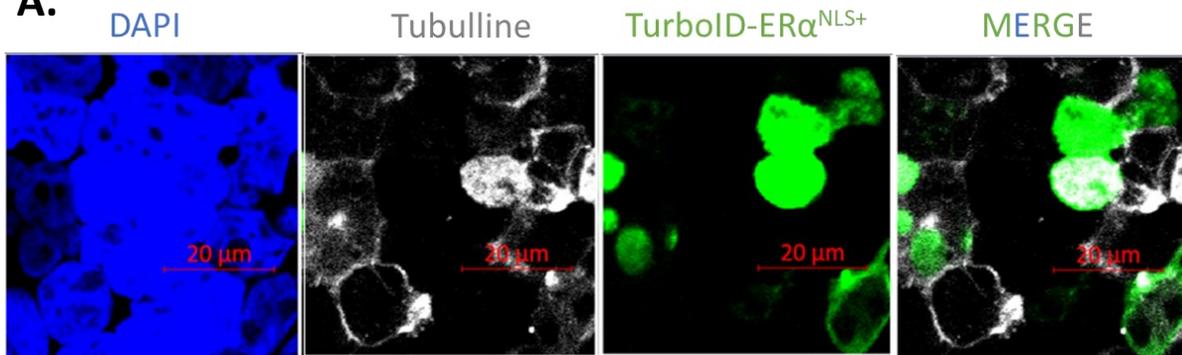
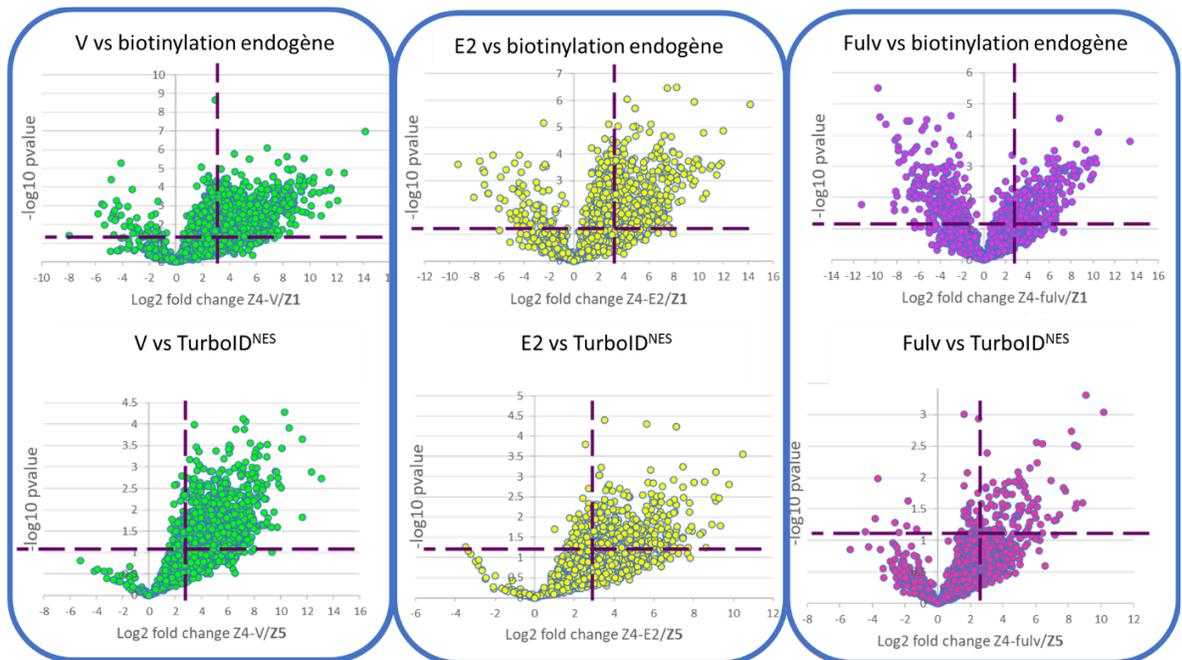


Figure 10 – Stratégies pour la construction des vecteurs nécessaires pour le criblage par TurboID dans les ZR-75-1 Produit final obtenu par assemblage de Gibson pour la condition **A.** TurboID^{NLS-}-ER α ^{NLS+} (Z2) et **B.** TurboID^{NES+}-ER α ^{NLS-} (Z4). (Dianati et al., en préparation). **C.** Conditions (Z1-5) pour le criblage par TurboID dans les ZR-75-1 effectué par Elham Dianati.

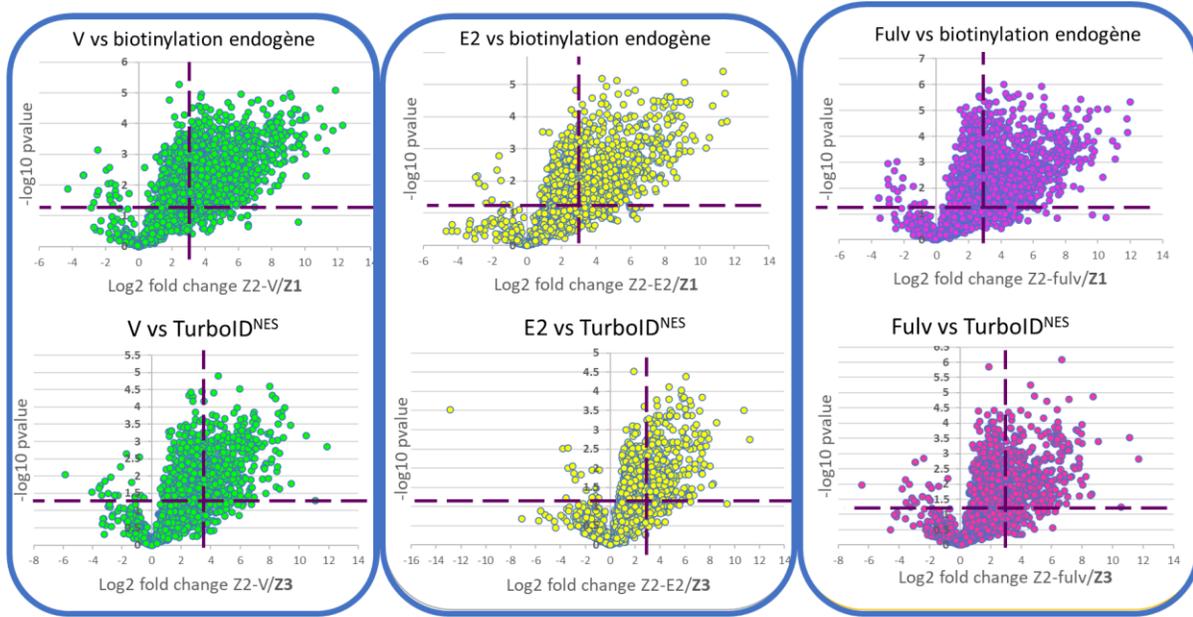
Une co-immunofluorescence a été effectuée pour vérifier que les vecteurs étaient exprimés dans les bons compartiments cellulaires (Figure 10A) : TurboID-ER α est bien exprimé dans le noyau, mais, comme attendu, pas TurboID^{NES+}-ER α ^{NLS-}.

Le criblage par TurboID a été fait en transfectant les cellules ZR-75-1 avec l'un des vecteurs représentés dans la Figure 9C (conditions Z1-5). Ces cellules ont été traitées 1h avec le véhicule, E2 (25 nM) ou le Fulvestrant (100 nM) et 15 min de traitement à la biotine (50 μ M). Les cellules ont été récoltées et soumises à toutes les étapes du criblage par TurboID représentée dans la Figure 8B. L'analyse par spectrométrie de masse a permis d'obtenir une grande liste de protéines identifiées comme pouvant être à proximité de ER α .

L'analyse des résultats de protéomique a conduit à sélectionner les cibles dont l'enrichissement est supérieur à *Log2 Fold change* (Student's T-test, $p < 0.005$) lorsque les conditions testées sont comparées avec les conditions contrôles (Figure 10B et 10C). Finalement, nous avons confirmé que des interacteurs connus de ER α étaient bel et bien identifiées par ce criblage (Figure 10D). Dans cette image, nous pouvons observer la biotinylation de ER α (*ESR1*), qui peut survenir par auto-biotinylation de la protéine de fusion ou par biotinylation du ER α WT hétérodimérisant avec la protéine de fusion. Ensuite, nous pouvons observer NCOA5 un coactivateur de ER α connu pour interagir avec ER α de manière ligand-dépendante (119). Finalement, nous pouvons également observer la présence de FOXA1, qui comme nous l'avons décrit précédemment, est un facteur pionnier crucial dans la signalisation par ER α .

A.**B.**

C.



D.

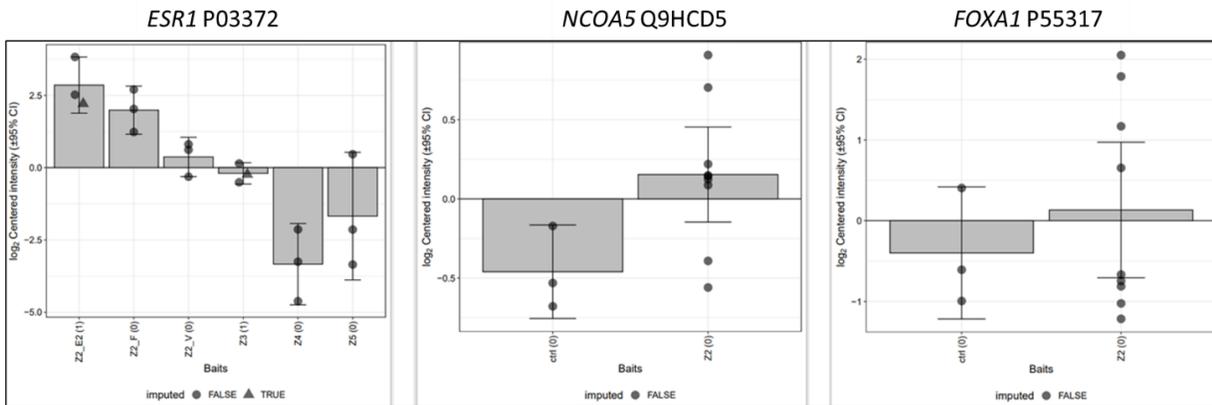


Figure 11 - Contrôles pour la fiabilité du criblage par TurboID dans les lignées cellulaires ZR-75-1 et sélection des cibles. **A.** Co-IF ciblant TurboID^{NLS-}-ER α ^{NLS+} (images du haut) et TurboID^{NES+}-ER α ^{NLS-} (images du bas) dans les ZR-75-1 transfectées. Le noyau est représenté en bleu (DAPI), le cytoplasme en blanc (tubuline) et TurboID-ER α (vert). **B.** Élimination des interacteurs non-spécifiques de TurboID^{NES+}-ER α ^{NLS-} comparés aux cellules non-transfectées et aux enzymes seules. **C.** Élimination des interacteurs non-spécifiques de TurboID^{NLS-}-ER α ^{NLS+} comparés aux cellules non-transfectées et aux enzymes seules en conservant le log2 fold change (cut-off > log₂, 2, Student's

t-test, $p < 0.005$). **D.** Biotinylation de ER α , NCOA5, FOXA1 dans les différentes conditions obtenues par l'analyse par spectrométrie de masse. * résultats obtenus par Dr E. Dianati.

5.3 Le criblage par TurboID a permis d'identifier deux potentiels nouveaux interacteurs de ER α , GATAD2B et AIP

Dans le cadre de ce mémoire, deux cibles ont été choisies, soient GATAD2B (de l'anglais « *GATA zinc finger domain containing 2B* ») et AIP (de l'anglais « *Aryl hydrocarbon receptor (AhR) Interacting Protein* ») (Figure 11). Ces protéines nous ont intéressé par leur enrichissement en fonction des différents traitements, mais également par leur implication directe ou indirecte déjà connue dans la signalisation par ER α .

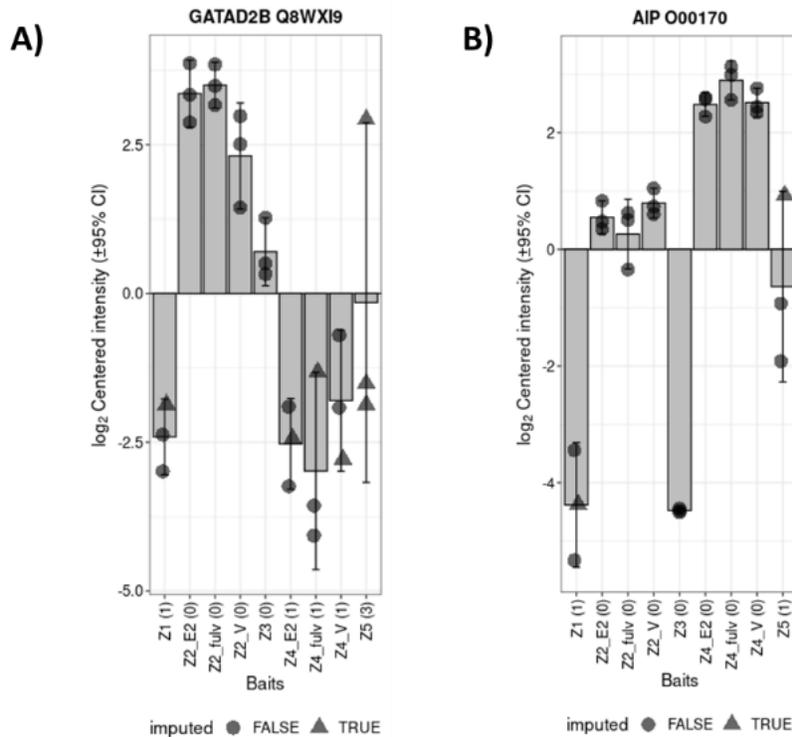


Figure 12 –Compte peptidique obtenu par spectrométrie de masse lors du criblage par TurboID dans les ZR-75-1 pour A. GATAD2B et B. AIP Le compte peptidique est obtenu pour les cinq conditions (Z1-5). Z1, Z3 et Z5 sont des contrôles et aucun ou peu d'enrichissement devrait être observé. Les cellules transfectées avec les conditions Z2 (TurboID^{NLS-}-ER α ^{NLS+}) et Z4(TurboID^{NES+}-ER α ^{NLS-}) ont été traitées 1h avec E2 (25 nM), Fulv (100 nM) ou le véhicule (EtOH 0.01%) et 15 min avec la biotine (50 μ M). *Résultats obtenus par Elham Dianati.

GATAD2B semble être en proximité avec ER α dans le noyau, mais pas dans le cytoplasme (Figure 11A). Comparativement au contrôle Z3 (TurboID^{NLS+}), un enrichissement est observé dans les trois conditions de traitement. La biotinylation de AIP est moins enrichie dans le noyau, mais beaucoup plus dans le cytoplasme, et ce encore dans toutes les conditions de traitement.

5.3.1 GATAD2B est une sous-unité du complexe NuRD

Le complexe de remodelage des nucléosomes et de désacétylation des histones (NuRD) est un complexe composé de plusieurs sous-unités, qui comprend une activité de remodelage de la chromatine ATP-dépendante en plus d'une activité d'histone désacétylase, toutes deux dans la répression transcriptionnelle du récepteur de l'hormone thyroïdienne (120). Depuis, ce complexe a été le focus de plusieurs études puisqu'il est impliqué dans une multitudes de processus biologiques telle la répression transcriptionnelle, le développement embryonnaire, la tumorigénèse ou encore la différenciation cellulaire (121). Pour plusieurs des sous-unités, il existe différents paralogues et isoformes, pouvant pour certains être mutuellement exclusifs. Ceci suggère qu'il existe différentes versions coexprimées ou non en fonction des conditions cellulaires, tissulaires et physiologiques.

L'activité de remodelage ATP-dépendante du complexe NuRD dépend des sous-unités CHD (de l'anglais « *Chromodomain Helicase DNA-binding protein* »). Chez l'humain, neuf CHD ont été identifiées, mais le complexe NuRD comporterait CHD3 et/ou CHD4, des ATPase d'environ 220 kDa. Certains isoformes de CHD3 possèdent des motifs d'interaction-SUMO (SIM) qui permettent de reconnaître des protéines SUMOylées comme la protéine 1 associée à KRAB (KAP-1), associée à l'hétérochromatine (121,122).

L'activité HDAC du complexe NuRD est attribuable à HDAC1 et HDAC2, deux protéines de 55 kDa fortement conservées et omniprésentes chez les Eucaryotes. La désacétylation des histones est fortement associée à la répression transcriptionnelle. En effet, ces enzymes peuvent retirer les acétyles de lysines d'histone, ce qui va permettre à l'ADN de s'enrouler de manière plus serrée sur les histones, la rendant moins accessible pour les facteurs de transcription (123). Toutefois, des études ont également montrés que l'inhibition des HDAC pouvaient mener à la répression de plusieurs gènes (124).

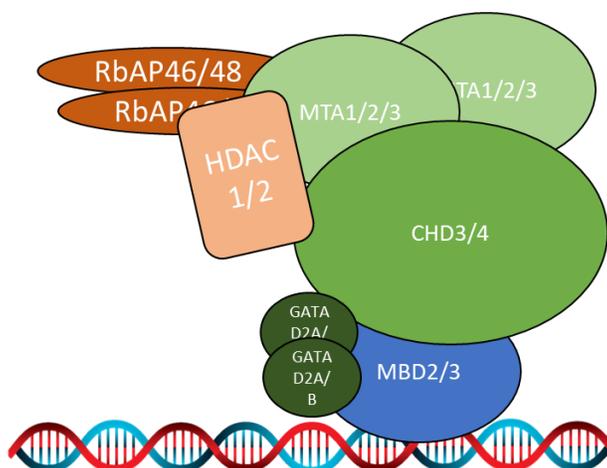


Figure 13 – Complexe NuRD et ses sous-unités principales

En plus des sous-unités avec des activités enzymatiques, le complexe NuRD comprend plusieurs autres composantes (Figure 12). Ainsi, NuRD comporte deux protéines MTA (de l'anglais « *Metastasis Associated* »), MTA1, 2 ou 3, codées par trois gènes différents. Toutefois, il a été proposé que ces homologues seraient mutuellement exclusifs et que la présence d'un homologue ou un autre pouvait justifier différentes fonctions (125). Les protéines MTA peuvent recruter différents cofacteurs en fonction de leurs modifications post-transcriptionnelles et peuvent se lier à des séquences précises de l'ADN (126). Ces protéines peuvent être en interactions directes avec les HDAC de NuRD et une autre sous-unité, RbAp48 (127,128). RbAP48 ou RbAp46 peuvent interagir avec les histones et jouent un rôle important dans la stabilisation et le recrutement des multiples unités du complexe NuRD (129). Une autre composante de NuRD est un membre des protéines MBD (de l'anglais « *Methylated CpG-Binding domain Proteins* »), MBD2 ou 3. MBD2 se lie avec une forte affinité à l'ADN méthylé, mais pas MBD3. Ces homologues semblent être mutuellement exclusifs et les complexes NuRD formés avec l'un ou l'autre semble posséder différentes propriétés et exercer différentes fonctions (130). D'autres études ont plutôt proposé que MBD3 était l'une des composantes centrales du complexe NuRD, et que MBD2 pouvait être recruté par la suite, permettant d'exercer une répression transcriptionnelle de l'ADN méthylé (131).

Finalement, le complexe NuRD comprend les paralogues GATAD2A et GATAD2B, deux protéines de 66 kDa pouvant interagir avec MBD2 et MBD3. La répression transcriptionnelle observée par MBD2 nécessiterait la présence d'au moins l'un de ces deux paralogues, mais il existerait une synergie entre GATAD2A et GATAD2B qui augmenterait drastiquement la répression. Toutefois, l'expression de l'une ne dépend pas de l'autre (132). De plus, ces protéines sembleraient aider au recrutement du complexe NuRD via MBD2 ou MBD3 à des locus spécifiques de l'ADN (131). Une plus grande étude de GATAD2A et GATAD2B a permis de proposer l'hypothèse que MBD2 et MBD3 seraient finalement des protéines interchangeableables dans le complexe NuRD et que le recrutement de l'une ou de l'autre pouvait se faire via GATAD2A/B (130,133).

Il est important de noter que dans les résultats du criblage de Dr. Elham Dianati, d'autres sous-unités mieux connues du complexe NuRD (Figure supplémentaire 8A) ont été identifiés comme étant de potentiels nouveaux interacteurs de ER α , renforçant l'idée que GATAD2B est un interacteur potentiel de ER α faisant partie du complexe NuRD.

5.3.1.1 La structure de GATAD2B

GATAD2A et GATAD2B, aussi appelées p66 α et p66 β , sont deux protéines codées par deux gènes différents, *GATAD2A* et *GATAD2B*, mais ces deux protéines sont hautement similaires. GATAD2B, tout comme GATAD2A, possède deux régions conservées (CR) à travers différentes espèces, CR1 et CR2, suggérant leur importance (Figure 13).

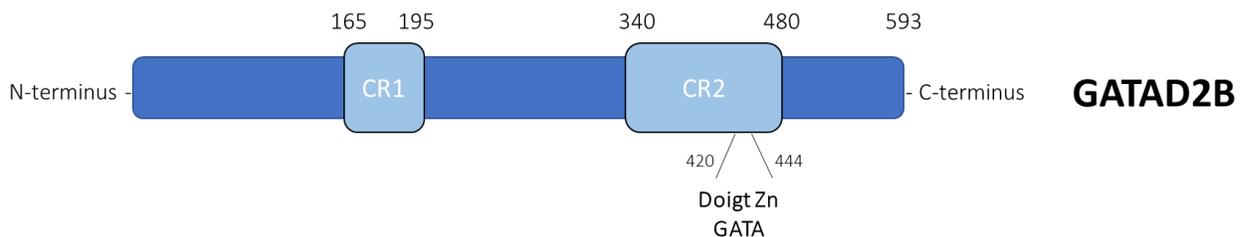


Figure 14 – Structure de GATAD2B

CR1 serait nécessaire pour le recrutement de GATAD2B au complexe NuRD. En effet, dans des HEK293T transfectées avec GATAD2B ne comprenant pas CR1, les composantes MTA2, HDAC1/2, RbAp46/48 ou MBD3 (et MBD2) n'étaient plus co-immunoprécipitées, contrairement à la version complète de GATAD2B. De plus, la répression transcriptionnelle impliquant GATAD2B nécessite

CR1 (131,132). Des études suggèrent que la SUMOylation de la lysine K33 est importante dans la capacité répressive de GATAD2B, en plus de permettre son interaction avec RbAp46 (134). CR2 est responsable de la localisation précise de GATAD2B, mais aussi de MBD3, sur l'ADN. Ceci serait en partie grâce au doigt de zinc de type-GATA qui reconnaîtrait des séquences précises sur l'ADN. Toutefois, GATAD2B se lierait probablement à des séquences ne correspondant pas exactement à la séquence GATA puisqu'il manque des acides aminés connus comme étant nécessaire pour s'y lier. Le recrutement de GATAD2B à l'ADN via CR2 pourrait peut-être se faire via l'interaction d'une protéine lié à l'ADN (131,135). De plus, l'association directe de GATAD2B avec les queues des histones H2A, H2B, H3 et H4 a été observée lorsque celle-ci ne sont pas acétylées (132,136).

5.3.1.2 Rôle de NuRD dans la signalisation par ER α

Des sous-unités du complexe NuRD ont été impliquées dans la signalisation de ER α . Premièrement, des membres de la famille des MTA peuvent avoir différents impacts. Il a été observé dans les MCF-7 que MTA1 peut interagir avec l'AF-2 de ER α et les HDAC1/2 pour exercer une répression transcriptionnelle des gènes ciblés par ER α lorsque les cellules étaient traitées avec l'héréguline- β -1, un facteur de croissance (137). Il a également été observé que MTA3 exerce une répression transcriptionnelle directe sur Snail, une protéine cruciale dans la régulation de la transition épithéliale-à-mésenchymateuse (EMT), de manière œstrogène-dépendante (125). De plus, le complexe NuRD est recruté par le facteur TWIST sur le gène *ESR1* dans les lignées cellulaires ER α - telle que MDA-MB-231 et inhibe ainsi l'expression de ER α (138). Finalement, l'implication de NuRD dans la réponse au tamoxifène a été observée dans les cellules ER α + MCF-7. En effet, NuRD est présent sur les ERE des gènes ciblés par ER α , *TFF1* et *MYC* après 40 min de traitement avec le tamoxifène et que ceci induirait une répression transcriptionnelle, probablement en changeant la conformation de la chromatine sous une forme transcriptionnellement inactive (92). Ainsi, NuRD est impliqué dans différents aspects de la signalisation de ER α , ce qui révèle l'importance d'une meilleure compréhension du rôle de ses sous-unités, comme GATAD2B.

5.3.2 AIP fait partie du complexe AhR

AhR est un membre ligand-dépendant de la famille des facteurs de transcription hélice-boucle-hélice (bHLH) /Per-Arnt-Sim (PAS) (bHLH-PAS). Ces protéines sont caractérisées par la présence de deux hélices- α liées par une boucle et cette structure serait impliquée dans leur liaison à l'ADN et la dimérisation avec d'autres protéines (139). AhR médie la réponse aux xénobiotiques en régulant les gènes de la famille des cytochromes P450 tel que *CYP1A1*, *CYP1A2* et *CYP1B1* (140). Les ligands les plus connus de AhR sont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les hydrocarbures aromatiques halogénés (HAH) (141,142). La 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) est l'un des ligands avec la plus forte affinité pour ce récepteur. Depuis, l'étude de ce récepteur a permis d'identifier de plus en plus de ligands exogènes, y compris une multitude de polluants environnementaux, mais aussi endogènes, tels que les indoles. Finalement, ce récepteur semble avoir un rôle dans la réponse immunitaire, dans la différenciation cellulaire et dans le maintien de cellules souches (143,144). La figure 14 illustre le mécanisme d'action général du complexe AhR.

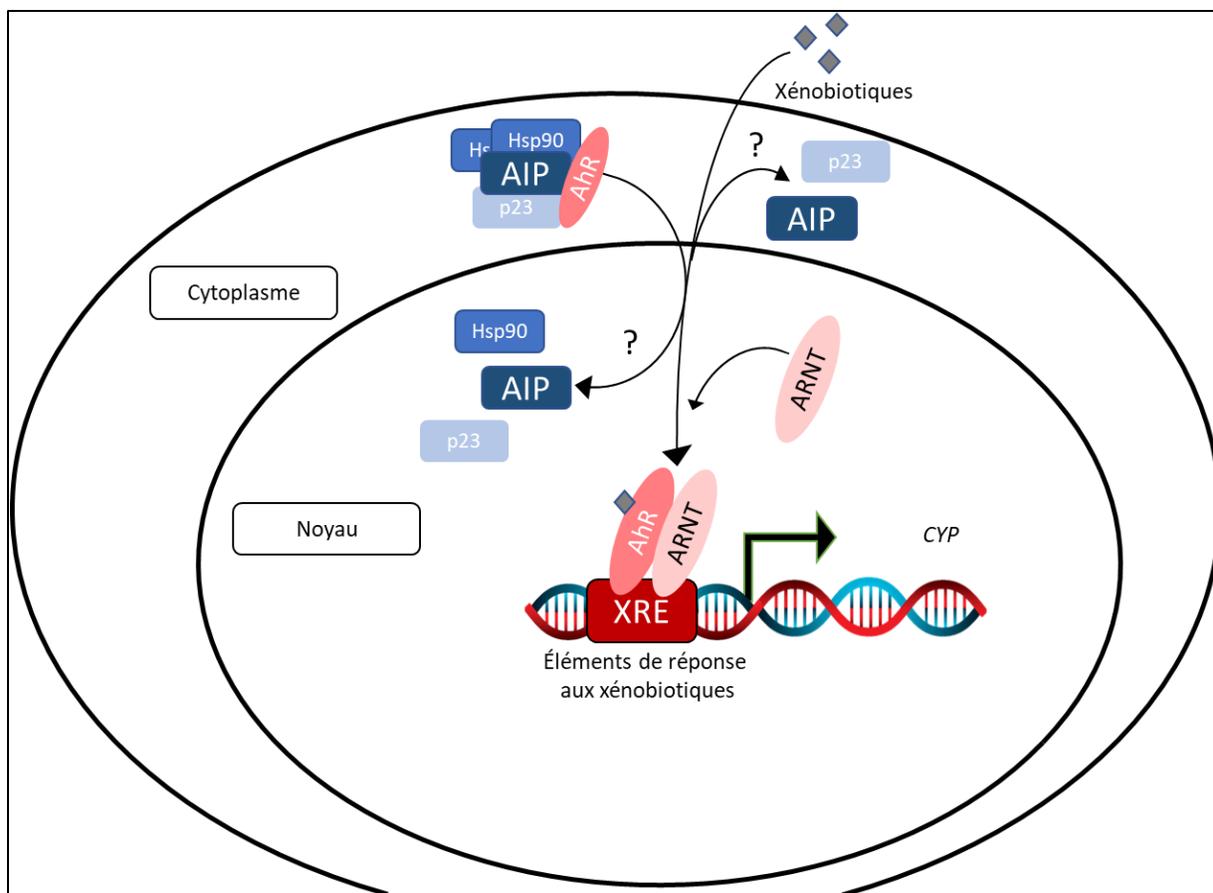


Figure 15 – Mécanisme d'action du complexe AhR

AhR est un facteur de transcription dont la localisation est cytosolique lorsqu'il n'est pas lié à l'un de ses nombreux ligands. AhR est séquestré dans le cytoplasme par la formation d'un complexe inactivateur avec deux chaperonnes de la famille des protéines de choc thermique (Hsp), Hsp90, une co-chaperonne, p23, et AIP (145-149). De manière intéressante, AhR se lie à Hsp90, comme le fait ER α , par une interaction impliquant les a.a 272-617 de Hsp90 (150). Hsp90 permettrait la stabilisation du récepteur dans le cytoplasme, en plus de le maintenir dans une conformation propice à la liaison d'un ligand (151). Après la liaison à l'un de ses ligands, AhR commence à changer de conformation dans un processus ligand- et température-dépendant, la *transformation*. Les changements de conformation permettraient au récepteur de se dissocier de Hsp90, qui est remplacée par Arnt (de l'anglais « *Aryl Hydrocarbon receptor nuclear translocator* » (152,153). Le dimère AhR :Arnt peut alors se lier sur les éléments de réponse aux xénobiotiques (XRE), 5'-T/GNGCGTGA/CG/CA-3' au niveau de gènes cibles (154).

Plusieurs études ont établi que AIP semble augmenter l'activité transcriptionnelle de AhR, notamment en stabilisant AhR dans le cytoplasme, ce qui augmente la quantité du récepteur (155). Toutefois, une contradiction existe dans la littérature puisque d'autres équipes ont plutôt observé une activité répressive de AIP sur la signalisation par AhR. Ceci serait probablement dû à une activité espèce- et tissu-spécifique (156). Il a été observé que AIP pouvait protéger AhR de l'ubiquitination et, ainsi, diminuer le niveau de dégradation du récepteur par la voie du protéasome (157). La littérature ne permet pas de déterminer si AIP se dissocie de AhR avant ou après sa translocation dans le noyau. Cette protéine semble être majoritairement cytoplasmique, mais la protéine de fusion YFP (de l'anglais « *Yellow Fluorescent Protein* ») -AIP est observable dans le noyau (155). Finalement, AIP interagit également avec la partie C-terminale de Hsp90 dans le complexe AhR (149). Cette interaction permet d'ailleurs à AIP de ralentir la translocation de GR dans le noyau, ce qui résulte en une diminution de son activité transcriptionnelle (158). AIP est aussi nécessaire pour l'activation et l'activité transcriptionnelle du récepteur des hormones thyroïdiennes beta 1 (TR β 1) (159).

5.3.2.1 Structure de AIP

AIP, une protéine de 38 kDa, a été clonée et caractérisée pour la première fois grâce à son association avec la protéine X du virus de l'hépatite B (HBV), via la technique du « *yeast two-hybrid assay* » (160). Cette protéine fait partie de la famille des protéines liant FK506 (FKBP), un agent immunosuppresseur, et possèdent de fortes similitudes de séquences avec d'autres membres de cette famille, FKBP12 et FKBP52. De manière intéressante, FKBP52 lie d'autres récepteurs nucléaires, y compris ER α (161). La structure de AIP est représentée dans la figure 16.

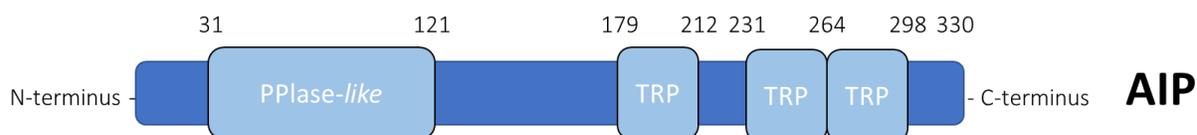


Figure 16 – Structure de AIP

AIP contient une région hautement similaire à une région de FKBP12 et FKBP52, possédant une activité peptidyl-prolyl-isomérase (PPlase-like) en N-terminal. L'activité PPlase permet entre

autres de catalyser le bon repliement des protéines. Cette région permet également l'interaction avec FK506, qui définit la famille des FKBP (162). AIP contient également trois motifs de répétition tetratricopeptide (TRP) similaires à FKBP52 en C-terminal. Le dernier de ces motifs est particulièrement important pour l'interaction entre AIP et AhR et Hsp90 (147). Les motifs TRP sont des séquences d'environ 34 a.a formant deux hélices- α donnant lieu à une structure amphipatique antiparallèle impliquée dans de nombreuses interactions protéines-protéines (163).

5.3.2.2 Rôle du complexe AhR dans la signalisation par ER α

AhR a également un impact sur la signalisation de nombreux autres facteurs de transcription, y compris ER α . L'impact de AhR sur la signalisation de ER α peut varier en fonction du ligand ou encore, en fonction des conditions cellulaires. Par exemple, il a été observé que dans les MCF-7 traitées avec le 3-methylcholanthrene (3MC), un ligand connu de AhR, la quantité de ER α diminue au niveau protéique, mais pas au niveau des ARNm. Ceci serait expliqué par le recrutement par AhR, sur ER α , d'un complexe E3-ubiquitine ligase, le complexe cullin 4B ubiquitine ligase (CUL4B^{AhR}), qui ubiquitinerait ER α , entraînant ainsi sa dégradation (164). Toutefois, il a également été observée que les MCF-7 traitées avec le 3MC sans E2 voyait une augmentation de l'activité transcriptionnelle de ER α , mais que celle-ci diminuait lorsque les cellules étaient traitées avec E2 et 3MC. Ceci concordait avec la présence du dimère AhR : Arnt en interaction avec ER α sur les ERE des gènes cibles tels que *TFF1* et *FOS* (165). Il a également été observée que Arnt pouvait interagir avec le LBD de ER α dans les cellules traitées avec E2. De plus, Arnt était recruté aux ERE de *TFF1* en présence de E2 et entraînait une augmentation de l'activité transcriptionnelle E2-dépendante (166). Finalement, des analyses par CHIP-seq ont démontré que AhR et Arnt pouvaient se lier aux EREs dans les MCF7 traitées avec le TCDD (167). D'autres ligands d'AhR, le Tranilast et l'Aminoflavone, semblent resensibiliser les cellules MCF-t et T47D résistantes au tamoxifène (TamR) (168). Ainsi, il existe une signalisation croisée entre AhR et ER α qui semble varier en fonction du ligand et du contexte cellulaire. Pour conclure, Arnt a également été identifié via le criblage par TurboID (voir Figure supplémentaire 8B) comme étant un potentiel interacteur de ER α dans le cytoplasme et le noyau des cellules ZR-75-1.

Hypothèses et objectifs

À la suite du criblage par TurboID dans les cellules ER α +, GATAD2B et AIP ont été identifiées comme des protéines interagissant potentiellement avec ER α dans les cellules de cancer du sein ZR-75-1. Ces protéines sont impliquées dans des voies de signalisation connues comme ayant un impact dans la signalisation par ER α . Ceci nous permet d'émettre l'hypothèse que ces protéines pourraient être des cofacteurs de ER α . Ainsi, l'interaction entre GATAD2B pourrait être impliquée dans une répression transcriptionnelle des gènes cibles de ER α via le recrutement du complexe répresseur NuRD. Puisque l'interaction de ER α et AIP semble plus importante dans le cytoplasme, et en prenant en compte le rôle de AIP dans la séquestration et stabilisation de AhR dans le cytoplasme, AIP pourrait exercer le même rôle pour ER α . Pour mieux comprendre les rôles de chacune de ces protéines dans la signalisation par ER α dans le contexte du cancer du sein, nous avons comme objectif de 1) vérifier la proximité entre GATAD2B ou AIP et ER α dans le cytoplasme et le noyau 2) de vérifier si nos protéines d'intérêt peuvent interagir avec ER α , 3) de vérifier si ces protéines peuvent être recrutées aux EREs de gènes cibles de ER α et 4) d'étudier l'impact de nos protéines d'intérêt sur l'expression et la signalisation de ER α .

Pour atteindre ces objectifs, 1) nous utiliserons les techniques de « *Pull-down assay* », de co-immunofluorescence (co-IF) et d'essai de ligation de proximité (PLA), 2) nous vérifierons l'interaction entre nos protéines d'intérêt et ER α en utilisant la technique de co-immunoprécipitation (Co-IP), 3) nous vérifierons le recrutement de nos protéines d'intérêt sur les EREs de gènes cibles de ER α par immunoprécipitation de la chromatine et analyse par réaction en chaîne par polymérase (ChIP-qPCR) et 4) nous vérifierons l'impact de nos protéines d'intérêt sur l'expression et la signalisation de ER α en effectuant des « *knockdown* » par petits ARN interférant (siRNA) et en faisant une analyse par séquençage des ARN (RNAseq).

Dans leur ensemble, ces travaux nous permettront de mieux comprendre l'impact de GATAD2B et AIP sur la signalisation de ER α dans les cellules du cancer du sein ER α +

Matériel et méthodes

Culture cellulaire et traitements hormonaux

Toutes les lignées cellulaires utilisées dans le cadre de ce mémoire ont été maintenues en conditions stériles dans des incubateurs à 37°C en présence de 5% de dioxyde de carbone (CO₂). Les MCF-7 (lignée de tumeur mammaire humaine, ER α +) sans traitement ont été cultivées dans la modification alpha du milieu minimum essentiel Eagle (α -MEM) contenant du Rouge Phénol comme indicateur de pH, supplémenté de sérum foetal bovin (FBS, 10% v/v), de L-Glutamine (1% v/v) et de Pénicilline/Streptomycine (P/S, 1% v/v). Les ZR-75-1 (lignée de tumeur mammaire humaine, ER α +) sans traitement ont été cultivées dans le milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) rouge supplémenté de FBS (10% v/v), de sodium pyruvate (1% v/v) et de N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid (HEPES, 1% v/v, pH 7). Les SK-BR-3 (lignée de tumeur mammaire humaine, ER α -) et les HEK-293 (lignée hépatique embryonnaire humaine, ER α -) sans traitement ont été cultivées dans le milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) rouge supplémenté de FBS (10%, v/v) et de P/S (1%, v/v).

Lorsque les cellules devaient être traitées avec le E2 (25 nM), le Fulvestrant (100 nM) ou le véhicule (Ethanol : EtOH 0.01% v/v), celles-ci étaient maintenues dans le milieu de culture blanc approprié dépourvu de composés oestrogéniques 72h précédant les traitements. Les MCF-7, SK-BR-3 et HEK293 étaient maintenues dans du DMEM blanc supplémenté de FBS traité au charbon (FBS-T, 10% v/v), de L-Glutamine (2% v/v) et de P/S (1% v/v). Les ZR-75-1 étaient maintenues dans le RPMI blanc supplémenté de FBS-T (10% v/v), de P/S (1% v/v), de Pyruvate de Sodium (1% v/v) et d'HEPES (1% v/v, pH 7). Les solutions intermédiaires de E2 (10 μ M, Sigma #E1024) et de Fulvestrant (100 μ M, CedarLane #10011269) étaient faites à partir de poudre dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et maintenues à -20°C jusqu'à leur dilution subséquente (1 :1000) dans le milieu de culture.

Un passage était effectué lorsque les cellules atteignaient une confluence de 90%. Les cellules étaient lavées avec du tampon phosphate salin 1X (PBS; 137 mM Chlorure de Sodium (NaCl), 2.7 mM Chlorure de potassium (KCl), 10 mM Di-sodium phosphate (Na₂HPO₄), 1.8 mM

Monopotassium phosphate (KH_2PO_4). Les cellules étaient ensuite détachées du récipient de culture avec de la Trypsine-acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA).

Analyse Western

Les cellules ont été lavées avec le PBS 1X, ou PBS1X-N-ethylmaleimide (PBS-NEM) pour les cellules traitées, et ont ensuite été détachées du récipient de culture avec la trypsine-EDTA. Les cellules sont récoltées avec un grattoir à cellules et un culot cellulaire est obtenu par centrifugation (4 min., 1000 g, 4°C). Le culot cellulaire est resuspendu et incubé dans le tampon de lyse RIPA (50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Sodium Deoxycholate, 1% Triton X-100) supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases sur glace pendant 15 min. Pour les tests d'efficacité d'extraction des protéines, les recettes des tampons de lyses utilisés sont indiquées dans la figure 22. Les cellules sont ensuite soniquées durant 10 min (30 Sec ON/OFF, 4°C, Diagenode Bioruptor, #UCD-200). Le lysat cellulaire est centrifugé (10 min., 13 000g, 4°C) pour éliminer les débris cellulaires. Les protéines sont dosées selon la méthode modifiée de Lowry avec le *kit* d'essai colorimétrique DC *Protein assay* (Bio-Rad, #5000116).

La quantité appropriée de protéines a été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (10%) en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) dans du tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM glycine, 3.5 mM SDS). Les protéines ont été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) selon la méthode de transfert semi-humide (Bio-rad, Trans-blot Turbo Transfer System, #1704150; Trans-Blot Turbo RTA Midi 0.45 μm LF PVDF Transfer Kit, #1704275). Les membranes ont ensuite été bloquées dans du lait écrémé 5% (dans PBS-Tween20 0.05%, PBS-T) et ont été incubées dans les solutions d'anticorps primaires (voir Tableau supplémentaire 1 pour les dilutions des anticorps primaires) durant la nuit, à 4°C. Les membranes ont ensuite été lavées trois fois avec le PBS-T, puis incubées une heure dans les solutions d'anticorps secondaires (voir Tableau supplémentaire 1). Après trois lavages au PBS-T, les membranes ont été traitées avec une solution de luminol et peroxydase (Clarity Western ECL Substrate; Bio-Rad, #1705061). L'acquisition des images a été fait avec le ChemiDoc XRS+ imager (Bio-Rad, #1708265) et leur analyse a été fait avec le logiciel ImageLab.

Inhibition de l'expression par siARN

En conditions stériles, les cellules ont étéensemencées dans des Pétri de 100 mm (1.6×10^6 cellules/condition). Le lendemain (jour 0), les mixtes suivants ont été préparés pour la transfection. Le mixte 1 consiste à 14 μL SilenFect (Bio-Rad #1703361) dans un volume total de 500 μL de milieu de culture non-complémenté. Le mixte 2 consiste au volume de siARN (voir tableau supplémentaire 3) correspondant à 40 nM dans un volume total de 125 μL de milieu de culture non-complémenté. Les mixtes 1 et 2 ont été mélangés ensemble et incubés (température ambiante, 20 min.) avant d'être ajouté aux cellules pour une concentration finale des siARN de 40 μM . Le milieu de culture des cellules a été changé au jour 1 et les cellules ont été récoltées au jour 2 ou au jour 3 dans deux tubes différents/conditions (en prévision de l'analyse Western Blot et RNAseq) et maintenus à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Préparation des plasmides

Les cellules bactériennes (TOP10) ont été transformées avec les vecteurs appropriés (voir Tableau supplémentaire 4), en effectuant un choc thermique (5 min. sur glace, 45 sec à 95°C) et mises en culture sur de l'agar LB-ampicilline ou LB-zeomycine durant la nuit (37°C , 250 rpm). Les colonies bactériennes ont ensuite été récoltées en prévision des mini- et large- préparations.

Pour les préparations (mini ou large) de l'ADN plasmidique, les cultures bactériennes ont été cultivées dans 500 mL ou 1.5 L de bouillon lysogène (LB) à 37°C . Les bactéries ont ensuite été resuspendues dans le tampon Tris-EDTA-Glucose (TEG; 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Glucose), lysées dans le tampon de lyse (1% SDS, 0.2 M NaOH) et incubées (température ambiante, 5 min.). La suspension bactérienne a été neutralisées avec du KOAc 3M + acide acétique (11.5%) et centrifugées (4°C , 4000 rpm, 15 min.).

Pour les mini-préparations, le surnageant bactériens a été collectées et les nucléotides ont été précipités avec l'EtOH (100% v/v, température ambiante, 2 min.). Le précipité d'ADN a été lavé (EtOH 70% v/v), séché à l'air ambiant et resuspendus dans le tampon Tris-EDTA (TE; 10 mM Tris Base, 1 mM EDTA, pH 8.0) + 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNaseA. Pour les large-préparations, les surnageants bactériens ont été collectés et les nucléotides ont été précipités avec l'isopropanol (100% v/v). Le précipité d'ADN a été lavé (EtOH 70% v/v), séché à l'air ambiant et resuspendus dans le tampon

TE. L'ARN a été enlevé en la précipitant avec un volume 1 :1 de Chlorure de Lithium (LiCl, 5M). L'ADN a été précipité en ajoutant un volume 1 :1 d'isopropanol (100 % v/v). Le précipité d'ADN a été lavé (EtOH 70% v/v) et resuspendus dans le tampon TE + 20 µg/mL RNaseA durant la nuit. L'ADN a été purifié avec le chlorure de sodium (NaCl 0.8 M) + polyéthylène glycol 8000 (PEG 8000 6.5%) et le phénol-chloroforme. L'ADN pure a été précipité avec le NH₄OAc 2M et 2 :1 d'EtOH 100% pour ensuite être centrifugé (12 000 rpm, 5 min.). Les culots d'ADN ont été lavés avec l'EtOH 70% et resuspendus dans le TE. La quantité d'ADN a été dosé avec un nanophotomètre (MBI NanoPhotometer, Lid 50, paramètres dsDNA, 260 nm).

Transfection des cellules avec l'ADN plasmidique

Au jour 0, les cellules HEK293 ont étéensemencées (5×10^6 cellules/Pétri) dans les boîtes de Pétris 100 mm. Au jour 1, lorsqu'elles ont atteint une confluence de 75%, leur milieu de culture a été changé. En prévision de la transfection, les mixtes 1 et 2 ont été faits (**Mixte 1** : 6 µg d'ADN : 100 µL de NaCl (150 mM), **Mixte 2** : PEI (1mg/mL) dans NaCl (150 mM) (ratio 1 :1)). Les mixte 1 et 2 ont été mélangées (ratio 1 :1) et incubé à température pièce pour 13 minutes. La solution de transfection finale a été ajouté aux cellules (200 µL :10 mL milieu de culture). Le milieu de culture a été changé au jour 2. Les cellules ont été récoltées au jour 3 (48h post-transfection). Au jour 2 et au jour 3, des images des cellules transfectées avec GFP (contrôle +) ont été prises au microscope à fluorescence (ZOE™ *Fluorescent Cell Imager*) pour vérifier l'efficacité de transfection.

Pull-down assay

Les cellules ont été lavées avec le PBS 1X, ou PBS1X-N-ethylmaleimide (PBS-NEM) pour les cellules traitées, et ont ensuite été détachées du récipient de culture avec la trypsine-EDTA. Les cellules sont récoltées avec un grattoir à cellules et un culot cellulaire est obtenu par centrifugation (4 min., 1000 g, 4°C). Le culot cellulaire est resuspendus et incubé dans le tampon de lyse RIPA (50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Sodium Deoxycholate, 1% Triton X-100) supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases sur glace pendant 15 min. Les cellules sont ensuite soniquées durant 10 min (30 Sec ON/OFF, 4°C, Diagenode Bioruptor, #UCD-200). Le lysat

cellulaire est centrifugé (10 min., 13 000g, 4°C) pour éliminer les débris cellulaires. Les protéines sont dosées selon la méthode modifiée de Lowry avec le *kit* d'essai colorimétrique DC *Protein assay* (Bio-Rad, #5000116).

La suspension de billes de streptavidine (ThermoFisher Scientific, Dynabeads™ M-280 Streptavidin, #11205D) a été préparées comme suit : un volume de 80 µL de la solution de conservation des billes a été prélevé (multiplié par le nombre de conditions). La solution de conservation a été retirée grâce à un support magnétique et les billes ont été lavées quatre fois avec du PBS 1X pour finalement être resuspendues dans du tampon RIPA (dilution finale des billes 1 :2). Pour chaque condition, 1 mg du lysat protéique a été incubé avec la solution de billes (160 µL billes : 1 mL volume final protéines + RIPA) durant toute la nuit en rotation à 4°C. Le lendemain, les billes ont été lavées cinq fois avec le PBS 1X. Après le lavage final, l'élution des protéines a été faite en ajoutant 60 µL de tampon Laemmli 6X et les protéines ont été dénaturées à 95°C durant 10 min. Une analyse Western Blot a ensuite été faite tel que décrit précédemment.

Co-immunofluorescence (Co-IF)

Les cellules ont étéensemencées (5×10^5 cellules/ Pétri) dans des boîtes de Pétri 35 mm avec lamelle en verre (14 mm) pour microscopie (MatTek Corporation, lames enduites de Poly-d-lysine, #P35GC-1.5-14-C) dans le milieu de culture blanc. Le lendemain, lorsque les cellules ont atteint une confluence de 70%, les cellules ont été traitées tel que décrit précédemment (V, E2 ou Fulv) durant 1 heure. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS 1X et fixées avec de la formaldéhyde (10 % v/v) pendant 10 min à température ambiante. Un lavage a ensuite été effectué avec du PBS 1X et les cellules ont été perméabilisées avec du PBS 1X – Tween 0.01% durant 10 min à la température ambiante. Les cellules ont ensuite été bloquées avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) 3% (dans PBS 1X-Tween 0.01%) durant 1 heure à 37°C. La solution de blocage a ensuite été enlevée et les cellules ont été incubées dans la solution d'anticorps primaires (voir tableau supplémentaire 1) dilués dans le PBS 1X-Tween 0.01% à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'au lendemain.

Le lendemain, trois lavages ont été faits avec le PBS 1X -Tween 0.1% (5 min/lavage) pour ensuite incuber les cellules avec la solution d'anticorps secondaires (voir tableau supplémentaire 1) pour

une heure à température ambiante. Trois lavages de 5 min dans le PBS 1X – Tween 0.01% ont été réalisés et les cellules ont été incubées dans une solution de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 300 µM) durant 5 min à température ambiante. Le milieu de montage *Fluoromount* (ThermoFisher Scientific, FluoroMount™ Mounting Medium, #00-4958-02) a été ajouté directement sur les cellules et une lamelle a été déposée sur la région vitrée de la boîte de pétri. Les cellules ont été imagées par microscopie confocale à balayage laser (LSM-700, Zeiss) et les images résultantes ont été analysées avec le logiciel Zen black et Zen blue 3.3 de Zeiss. La quantification de l'intensité de fluorescence a été effectuée dans ImageJ en calculant la moyenne de la fluorescence cellulaire totale corrigée (CTCF, de l'anglais « *Corrected total cell fluorescence* ») des cellules présentes dans deux champs de visions différents par condition. La CTCF individuelle est calculée selon la formule suivante et en fonction des valeurs obtenues dans le logiciel ImageJ:

$$\text{CTCF} = \text{Densité intégrée} - (\text{Aire de la cellule sélectionnée} \times \text{Fluorescence moyenne du bruit de fond})$$

Test de ligature de proximité (ou *Proximity Ligation Assay*, PLA)

En condition stérile, les cellules ont étéensemencées (5×10^5 cellules/ Pétri) dans les boîtes de Pétri 35 mm avec lamelle en verre (14 mm) pour microscopie (MatTek Corporation, enduit Poly-d-lysine, #P35GC-1.5-14-C) dans le milieu de culture blanc. Le lendemain, lorsque les cellules ont atteint une confluence de 70%, les cellules ont été traitées tel que décrit précédemment (V, E2 ou Fulv) durant 1 heure.

Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS 1X et fixées avec du formaldéhyde (10 % v/v). Les cellules ont été incubées 10 min à température ambiante. Un lavage a ensuite été fait avec du PBS 1X et les cellules ont été perméabilisées avec du PBS 1X – Tween 0.01% durant 10 min à la température ambiante. Les cellules ont ensuite été bloquées avec la solution de blocage Duolink® (Sigma, Duolink® Blocking Solution 1X, #DUO82007-4ML) durant 1 heure à 37°C. La solution de blocage a ensuite été enlevé et les cellules ont été incubées dans la solution d'anticorps primaires PLA *PLUS* (Sigma, DUOLINK™ *In Situ* PLA® Probe Anti-Mouse PLUS, #DUO92001-100RXN) et PLA *MINUS* (Sigma, DUOLINK™ *In Situ* PLA® Probe Anti-Mouse PLUS, #DUO92005-100RXN) diluées

1 :5 dans le diluant d'anticorps Duolink® (Sigma, Duolink® Antibody Diluent 1X, #DUO82008-8ML). Une incubation a ensuite eu lieu à 4°C et à l'abri de la lumière jusqu'au lendemain.

Le lendemain, trois lavages (5 min/lavage) ont été fait avec la solution de lavage A (Sigma, Duolink® *In Situ* Wash Buffers, Fluorescence, #82049-4L) pour ensuite être incubées dans la solution d'anticorps secondaires (voir tableau supplémentaire 1) pour une heure à température ambiante. Le PLA a été fait avec l'ensemble Duolink™ *In Situ* Detection Reagents Orange (Sigma, #DUO92007-100RXN). Trois autres lavages de 5 min dans la solution de lavage A ont été fait. Les cellules ont ensuite été incubées dans la solution de ligase (ratio 1 :40) pour 30 min à 37°C et lavées trois fois avec la solution de lavage A (5 min/lavage). Les cellules ont ensuite été incubées avec la solution de polymérase (1 :80 dans la solution d'amplification) pour 1h40 à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois dans la solution de lavage B 1X (10 min/lavage) à la température ambiante. Un dernier lavage avec la solution de lavage B 0.01X a été fait pendant une minute. Les cellules ont été incubées dans une solution de DAPI (300 µM) durant 5 min à température ambiante. Le milieu de montage *Fluoromount* (ThermoFisher Scientific, FluoroMount™ *Mounting Medium*, #00-4958-02) a été ajouté directement sur les cellules et une lamelle a été déposées sur la région vitrées de la boîte de pétri. Les cellules ont été imagées par microscopie confocale à balayage laser (LSM-700, Zeiss) et les images résultantes ont été analysées avec le logiciel Zen black et Zen blue 3.3 de Zeiss. La quantification de l'intensité de fluorescence a été effectué dans ImageJ tel que décrit précédemment.

Coimmunoprécipitation (Co-IP)

Les cellules HEK293 ont été transfectées tel que décrit précédemment. Les cellules HEK293-T et les cellules ZR-75-1 ont été récoltées et centrifugées (5 min, 1000g, 4°C). Le culot cellulaire a ensuite été resuspendus dans le tampon de lyse pour immunoprécipitation (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP-40). La suspension cellulaire a été incubée sur glace durant 10 min, puis soniquée (2,5 min., 30 sec ON/30 sec OFF, paramètre faible (« *low* »)). Les débris cellulaires ont ensuite été éliminées par centrifugation (15000g, 10 min, 4°C). La quantité de protéines a été dosées selon la méthode modifiée de Lowry avec le *kit* d'essai colorimétrique DC *Protein assay* (Bio-Rad, #5000116).

Pour chacune des IP, 1 mg de protéines a été incubées avec 4 µg durant la nuit. Le lendemain, le volume nécessaire (375µg/IP) de la solution billes (ThermoFisher Scientific, Dynabeads™ Protein A, #10002D) a été prélevé et la solution de conservation a été enlevée. Les billes ont été lavées avec le tampon de lyse IP et puis bloquées dans le BSA 0.5% (10 min., température ambiante, en rotation). Ensuite, deux lavages ont été fait avec le tampon pour IP complétés avec un mixte d'inhibiteurs de protéases. Les billes ont été resuspendus dans le tampon pour IP. À partir de cette solution de bille, 375 µg ont été ajoutés à chacune des IP. Les IP ont été incubées durant 4h (4°C, en rotation). Les IP ont ensuite été lavées deux fois avec le tampon pour IP et quatre fois le PBS 1X. Les protéines ont été éluées avec 60 µL de Laemmli 2X et séparée en deux (30 µL). Les protéines ont ensuite été analysées par Western Blot, tel que décrit précédemment.

Immunoprécipitation de la chromatine et analyse par réaction en chaîne par polymérase

Le protocole suivant nous a été fourni par le laboratoire de Dr. Geneviève Deblois (IRIC) avec quelques modifications par Dr. Elham Dianati. Les cellules ont étéensemencées (6 x 10⁶ cellules/Pétri) et traitées tel que décrit précédemment. Les cellules ont ensuite été fixées avec du formaldéhyde (1% v/v) durant 10 min à température ambiante. La fixation a été arrêté en ajoutant de la glycine (0.15 M) durant cinq minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées en faisant deux lavages avec du PBS 1X, puis récoltées, centrifugées (5 min, 1000g, 4°C) et le surnageant a été enlevé (on devrait avoir environ 10 x 10⁶ cellules/Pétri).

Pour chaque IP, les cellules ont été resuspendus dans 1 mL du tampon A (0.25% Triton, 10mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA, 0.5 mM EGTA) supplémenté d'un mixte d'inhibiteurs de protéases, puis incubées durant cinq minutes sur la glace. Afin d'homogénéiser le nombre de cellules par CHIP, les échantillons de la même condition sont mélangés ensemble puis redistribuer dans les Eppendorf. Les cellules sont ensuite centrifugées (3 min, 2000 rpm, 4°C), le surnageant éliminé, et les cellules sont resuspendus dans 1 mL du tampon B (200 mM NaCl, 10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA, 0.5 mM EGTA) supplémenté d'un mixte d'inhibiteurs de protéases, puis incubées durant 30 min. Les cellules sont ensuite centrifugées (3 min, 2000 rpm, 4°C), puis resuspendues dans 700 µL de tampon de sonication (0.5% SDS, 0.5% Triton, 0.05% NADOC, 10mM Tris pH 8.0, 140 mM

NaCl, 1mM EDTA, 0.5 mM EGTA) supplémenté du mixte d'inhibiteurs de protéases. Chacun des échantillons (environ 10^6 cellules) est séparé en deux pour la sonication. Les cellules sont alors soniquées (QSonica Sonicator, #Q125 sonicator, sonde #4422, 2 x 1min30sec, 15 sec ON/5 sec OFF, amplitude 20%). Les échantillons de la même condition sont à nouveau remis ensemble afin d'homogénéiser les échantillons en prévision du CHIP, puis centrifugés (15 min, 12500 rpm, 4°C) et le surnageant est récupéré. À cette étape, la taille des fragments d'ADN devrait être d'environ 500 pb. Pour la vérifier, nous avons prélevé 20 μ L du lysat cellulaire que nous avons ensuite incubé avec 30 μ L de tampon d'éluion (1% SDS, 50mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA) et 1 μ L de protéinase K. La solution a ensuite été incubée durant deux heures à 62°C. Pour chacune des conditions, 20 μ L a été chargée sur un gel d'agarose 0.8% en utilisant une échelle de la taille d'ADN (*New England Biolabs Inc.*, 100bp DNA ladder, #N3231L).

Les « *inputs* » ont été préparés en prélevant 35 μ L du lysat cellulaire et l'incubant avec trois volumes du tampon de dilution (1% Triton, 10mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2mM EDTA) et trois volumes d'EtOH 100% à 80°C durant la nuit. Le lendemain, les échantillons ont été centrifugés (12000g, 10 min). Le culot a été séché à l'air ambiant et resuspendu dans le tampon de « *decrosslinking* » (DB; 1% SDS, 10mM NaHCO₃) pour finalement être incubé durant toute la nuit à 65°C.

Pour chacun des CHIP, 40 μ L de billes (ThermoFisher Scientific, Dynabeads™ Protein A, #10002D) ont été lavées trois fois avec 1 mL de tampon de dilution froid en plaçant les échantillons sur un support magnétique et le surnageant a été retiré. Ensuite, 4 μ g d'anticorps ont été incubés dans 1 mL de tampon de dilution durant toute la nuit (4°C, en rotation). Le lendemain, le surnageant a été retiré. Au 700 μ L des lysats cellulaires précédent, 300 μ L de tampon de sonication a été ajouté. Cette solution finale a été séparée en deux (2 x 500 μ L) et le volume a été complété à 1 mL avec le tampon de dilution. Ce volume final a été incubé avec les billes préparées tel que décrit durant toute la nuit (4°C, en rotation). Le lendemain, chacun des CHIP a été lavé avec les solutions et l'ordre suivant : solution de lavage 1 (0.5% NP-40, 150 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA), solution de lavage 2 (0.5% Triton, 0.1% NaDOC, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0), solution de lavage 3A (0.5% Triton, 0.1% NaDOC, 400 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0), solution de lavage 3B (0.5% Triton, 0.1% NaDOC, 500 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0), solution de lavage 4 (0.5% NP-40,

0.5% NaDOC, 250 mM LiCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) et TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA). Après le dernier lavage, les échantillons ont été resuspendus dans 120 μ L de DB, puis incubés à 65°C durant la nuit. Le lendemain, les ChIP ont été traités avec la RNase A (20 μ g/mL) durant 30 min à 37°C, puis avec la protéinase K (0.8 mg/mL) durant une heure à 65°C. L'ADN a ensuite été purifié en utilisant un ensemble de purification d'ADN (BioBasic, EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit, #BS664-250Preps).

La qPCR a été fait avec 1.5 μ L de l'ADN purifié en réaction avec le mixte *TaqMan* (Applied Biosystems, TaqMan Fast Advanced Master Mix, #4444557) et en utilisant les sondes provenant de la Bibliothèque Universelle de Sondes (de l'anglais « *Universal Probe Library* » ou UPL) et les oligonucléotides appropriés (voir Tableau supplémentaire 2) dans les plaques de 384 puits. Les réactions de qPCR se sont faites selon le protocole rapide (*Fast protocol*) du système QuantStudio 7 (Applied Biosystems, *QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR system*, #4485701). Les valeurs de C_T ont été déterminés par le logiciel *QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR system* selon les paramètres automatiques de seuil de C_T . La quantité relative en pourcentage d'input (% input) a été calculée selon la méthode de $\Delta\Delta C_T$ sur Microsoft Excel.

Extraction de l'ARN et séquençage de prochaine génération

L'ARN des cellules ZR-75-1 traitées avec les siARN a été extrait selon les étapes du protocole d'extraction d'ARN fourni avec le QIAzol (Quiagen, #79306). L'ARN a ensuite été purifié avec l'ensemble de purification d'ARN de BioBasic (BioBasic, EZ-10 Spin Column RNA Cleanup and Concentration Kit, # BS91315). L'ARN purifié a été dosé au nanophotomètre à une longueur d'onde de 260 nm (MBI NanoPhotometer, *lid 10*, paramètre de dosage d'ARN). Les échantillons d'ARN purifiés ont ensuite été confiés à Jennifer Huber de la plateforme génomique de l'IRIC pour le RNAseq (Illumina Nextseq500) et l'analyse bioinformatique (DESeq2 1.28.1) a été fait par Patrick Gendron de la plateforme de bioinformatique de l'IRIC. Les gènes régulés résultants ont été analysés sur le site (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/annotate.jsp>) d'analyse à une analyse d'enrichissement d'ensembles fonctionnels de gènes (de l'anglais « *Gene Set Enrichment analysis* » ou GSEA).

SECTION POUR SUPPORT SUPPLÉMENTAIRE

Afin de simplifier la lecture, nous avons décidé de mettre les figures et tableaux supportant nos expériences, y compris les contrôles, n'ayant pas nécessairement un lien direct avec le narratif de ce mémoire et les deux protéines concernées, dans une section supplémentaire.

Résultats

L'expression de GATAD2B et AIP ne semble pas dépendre de l'expression de ER α

Avant d'étudier la possibilité d'une interaction entre ER α et GATAD2B ou AIP, nous voulions savoir si l'expression de nos protéines d'intérêt pouvait être impactée par le statut d'expression de ER α . Nous avons sélectionné quatre lignées cellulaires de tumeurs mammaires, dont deux sont ER α + (MCF-7 et ZR-75-1) et deux sont ER α - (SK-BR-3 et MDA-MB-231). L'expression des protéines a été évaluée par Western Blot.

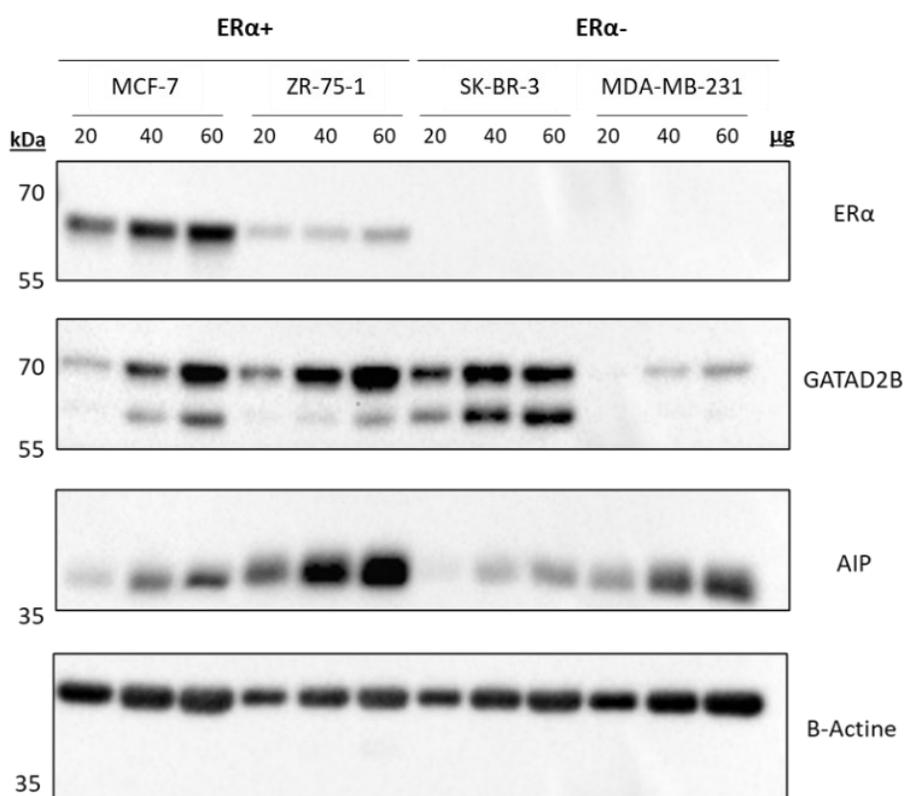


Figure 17. Expression protéique de ER α , GATAD2B et AIP dans les lignées cellulaires de tumeurs mammaires. Les cellules ER α + (MCF-7 et ZR-75-1) et ER α - (SK-BR-3 et MDA-MB-231) ont été cultivées dans le milieu rouge avant d'être récoltées. Les protéines ont été extraites et dosées, puis différentes quantités d'extraits (20,40 ou 60 μ g) ont été migrés par électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE, 10%). Des anticorps contre ER α (67 kDa), GATAD2B (66 kDa) et AIP (38 kDa) ont été utilisés. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge. L'échelle des poids moléculaires est en kDa. Les anticorps et dilutions d'anticorps utilisées peuvent être retrouvée dans le tableau supplémentaire (Tableau Supplémentaire 1). N=2.

Tel qu'observé sur la figure 17, ER α est plus exprimé dans les MCF-7 que dans les ZR-75-1, et n'est pas exprimé dans les SK-BR-3 et MDA-MB-231. GATAD2B est plus exprimé dans les MCF-7, les ZR-75-1 et les SK-BR-3, et est présent en moins grande quantité dans les MDA-MB-231. Il est à noter que deux bandes sont observées pour GATAD2B (environ 66 kDa et 71 kDa), sauf dans les MDA-MB-231. La bande inférieure n'est pas toujours observable. Nous avons donc voulu s'assurer de la spécificité de chacune de ces deux bandes, en effectuant une inhibition de l'expression de GATAD2B avec des siARN spécifiques (Voir figure supplémentaire 1). Les deux bandes disparaissent également en présence de siGATAD2B, suggérant qu'elles sont spécifiques.

AIP est également exprimé dans les quatre lignées cellulaires, l'expression étant plus importante dans les ZR-75-1 et moins importante dans les SK-BR-3. L'expression de AIP entre les MCF-7 et les MDA-MB-231 semble être plutôt comparable.

Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de corrélation entre l'expression de ER α et celles de GATAD2B ou AIP au niveau protéique.

GATAD2B et AIP sont en forte proximité avec la protéine de fusion TurboID-ER α

Nous avons ensuite voulu confirmer les résultats du criblage par TurboID dans les cellules ZR-75. Nous avons donc transfecté les cellules HEK-293 avec les constructions utilisées pour le criblage (TurboID-ER α avec ou sans NLS, Figure 10C) pour procéder à une biotinylation et un « *pull-down assay* » des protéines biotinylées en ciblant spécifiquement nos protéines d'intérêt par analyse Western. Les étapes de cette technique sont identiques à celles effectuées pour le criblage par TurboID, mais les protéines ne sont pas analysées par spectrométrie de masse.

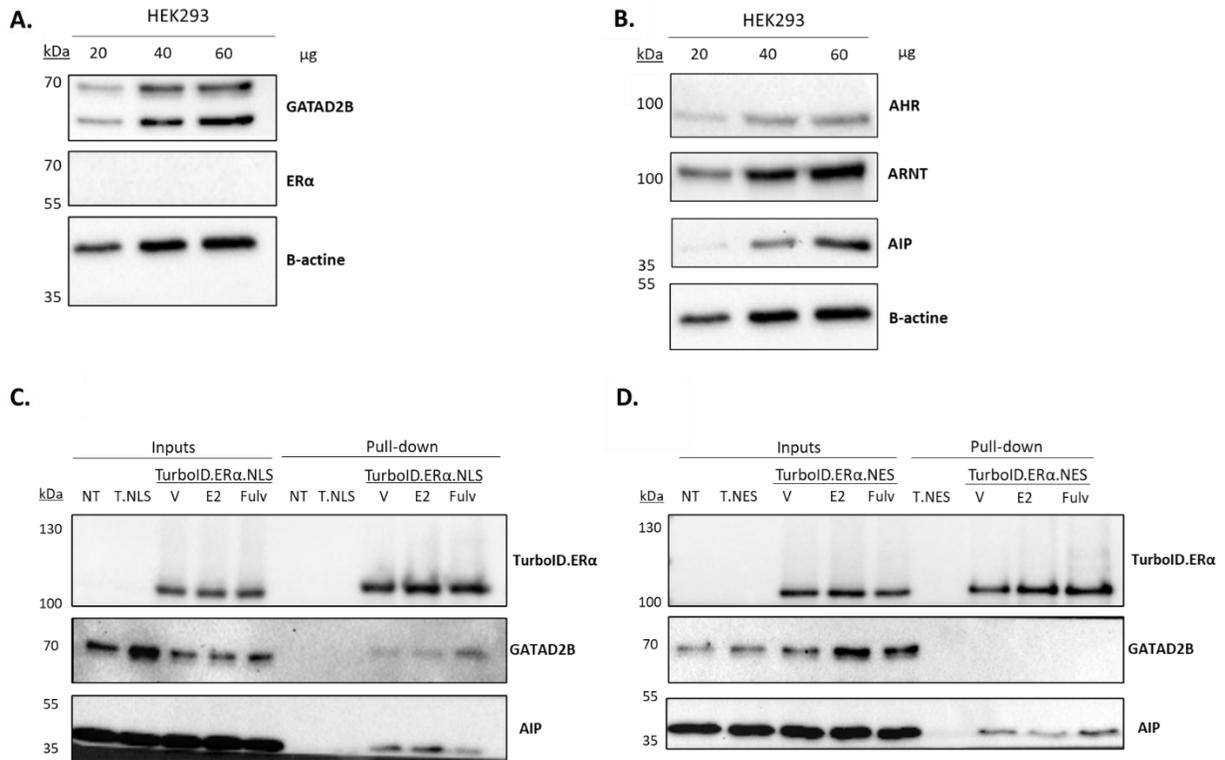


Figure 18. Biotinylation de GATAD2B ou AIP par TurboID-ERα dans les HEK293. **A-B.** Analyse Western de l'expression endogène de GATAD2B (66 kDa) et ERα (67 kDa) (**A**) et AhR (96 kDa), ARNT (95 kDa, mais détection à 122 kDa) et AIP (38 kDa) (**B**). Les cellules HEK293T ont été cultivées en présence de Rouge Phénol avant d'être récoltées. Les protéines ont été extraites et dosées, puis 30 μg d'extrait protéique total ont été séparés par SDS-PAGE (10%). La quantité de β-actine a été utilisée comme contrôle de charge. L'échelle des poids moléculaires est en kDa. N=2. **C-D.** Capture par affinité des protéines biotinylées par la protéine de fusion TurboID-ERα dans le noyau (**C**) et dans le cytoplasme (**D**) des cellules HEK-293T. Les cellules ont été cultivées dans du milieu sans Rouge Phénol et traité au charbon activé pour dépléter les œstrogènes 72h avant les traitements. Les cellules ont été transfectées avec les constructions TurboID-ERα avec ou sans NLS (Z2 et Z4, Figure 10) ou les constructions contrôles sans ERα (T.NLS, T.NES, Z3 et Z5, respectivement à la figure 10), ou encore traitées par les agents de transfection (PEI) sans plasmide. Les cellules ont été traitées pendant 1h avec E2 (25 nM), Fulv (100 nM) ou le véhicule V (EtOH 0.01%), puis récoltées. Les protéines biotinylées ont été capturées par affinité avec les billes de streptavidine. Les protéines isolées ont été analysées par SDS-PAGE (10%) et analyse Western contre TurboID-ERα (110 kDa), GATAD2B (66 kDa) et AIP (38 kDa). Un « pull-down assay » de RID-GFP après biotinylation par TurboID-ERα a été effectué comme contrôle positif (Figure Supplémentaire 2). Les dilutions d'anticorps utilisées sont indiquées dans le tableau supplémentaire (Tableau Supplémentaire 1). N=2.

Les cellules HEK-293T expriment de manière endogène GATAD2B (Figure 18A) et AIP (ou les autres protéines du complexe AhR, Figure 18B), mais pas ERα (Figure 18A). Un contrôle positif a été effectué avec des HEK-293T cotransfectées avec TurboID-ERα et une protéine de fusion entre GFP et le domaine d'interaction avec le récepteur (RID) de NCOA est connu comme un interacteur de ERα (Figure supplémentaire 2). Tel qu'attendu, RID-GFP est biotinylé par TurboID-ERα dans le

noyau des HEK293 cotransfectées. De plus, la capture par biotinylation semble être plus importante lorsque les cellules sont traitées avec de l'E2 en comparaison avec le véhicule, et moins efficace en réponse au fulvestrant, tel qu'attendu pour un coactivateur de ER α . Des contrôles négatifs ont également été effectués. Nous avons transfecté les HEK-293T avec TurboID avec NLS ou NES, sans ER α . Puisque ER α n'est pas présent, aucune capture n'est détectée, autant pour GATAD2B que AIP.

Tel qu'attendu, TurboID-ER α est également détecté, dû à une auto-biotinylation ou transbiotinylation lors de la formation de dimères. Pour ce qui est de nos protéines d'intérêt, il est possible d'observer une biotinylation de GATAD2B dans le noyau des cellules HEK-293T (Figure 18C), mais pas dans le cytoplasme (Figure 18D), ce qui était attendu, puisque GATAD2B est une protéine nucléaire. De plus, cette biotinylation semble plus importante lorsque les cellules sont traitées avec le fulvestrant, comparativement aux traitements avec le véhicule ou l'E2. Pour AIP, une biotinylation par TurboID-ER α est détectée dans le noyau (Figure 18C) et dans le cytoplasme (Figure 18D). L'intensité de ce marquage semble toutefois différer en fonction des traitements dans chacun des compartiments. Dans le cytoplasme, le marquage de AIP par TurboID-ER α semble moins efficace en présence de E2 comparativement à V ou au Fulv, reflétant probablement la moindre quantité de ER dans le cytoplasme après stimulation par cet agoniste. Ces observations sont en accord avec les observations obtenues lors du criblage par TurboID (Figure 12) pour GATAD2B et AIP dans les ZR-75-1. En présence de fulvestrant, les résultats sont toutefois différents dans le noyau pour GATAD2B et AIP, la biotinylation étant plus efficace pour GATAD2B et moins efficace pour AIP. Ensuite, nous avons voulu savoir si le niveau d'expression de nos protéines d'intérêt pouvait être influencé par différents traitements.

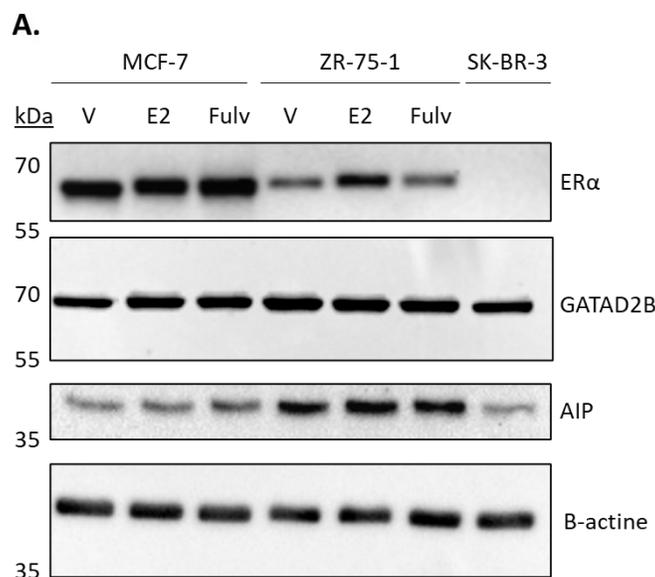


Figure 19. Expression protéique de ER α , GATAD2B et AIP en fonction de différents ligands dans les lignées cellulaires de tumeurs mammaires. Les cellules MCF-7, ZR-75-1 et SKBR3 ont été cultivées dans le milieu sans Rouge Phénol et privé de composés oestrogéniques 72h précédant les traitements de 1h avec E2 (25 nM), Fulv (100 nM) ou V (EtOH 0.01%), puis récoltées. Les protéines ont été extraites, dosées selon la méthode de Lowry et analysées par Western Blotting. 30 μ g du lysat protéique a été chargé dans chacun des puits. Les dilutions d'anticorps utilisées peuvent être retrouvées dans le tableau supplémentaire (Tableau Supplémentaire 1). N=2

ER α semble un peu plus exprimé en présence de E2 dans les ZR-75-1, mais l'inverse est observé dans les MCF-7, en accord avec la littérature (57) (Figure 19). Toutefois, l'expression de ER α semble plus importante dans les MCF-7 comparativement aux ZR-75-1, ce qui corrobore les niveaux d'expression observés à la Figure 17. Tel qu'attendu, les SK-BR-3 n'expriment pas ER α . Dans les MCF7 et les ZR-75-1, l'expression de GATAD2B ne semble pas être différente en réponse aux traitements. Pour AIP, le niveau de protéine ne semble pas influencé par les différents traitements. Le « *pull-down assay* » permettait de voir une proximité différentielle entre AIP et ER α en fonction des traitements et cette variation n'était pas la même dans le noyau et le cytoplasme. Finalement, GATAD2B et AIP sont exprimés dans les SK-BR-3, tel qu'observé dans la Figure 17.

Ainsi, les traitements (V, E2 ou Fulv) ne semblent pas avoir d'effet sur le niveau d'expression de AIP ou GATAD2B. Ceci suggère que l'augmentation du signal de proximité à la suite des « *pull-*

down assay » n'est pas le résultat d'une modulation de l'expression de nos protéines d'intérêt par les traitements.

3.1 GATAD2B et AIP peuvent colocaliser avec ER α dans le noyau des ZR-75-1

Nous avons pu établir que GATAD2B et AIP sont biotinylées par TurboID-ER α dans les ZR-75-1 (criblage TurboID) et dans les HEK293 (TurboID pull-down). Afin de confirmer leur co-localisation avec ER endogène, nous avons commencé par valider la co-localisation de chacune des protéines avec ER α endogène dans les cellules les ZR-75-1 par co-immunofluorescence.

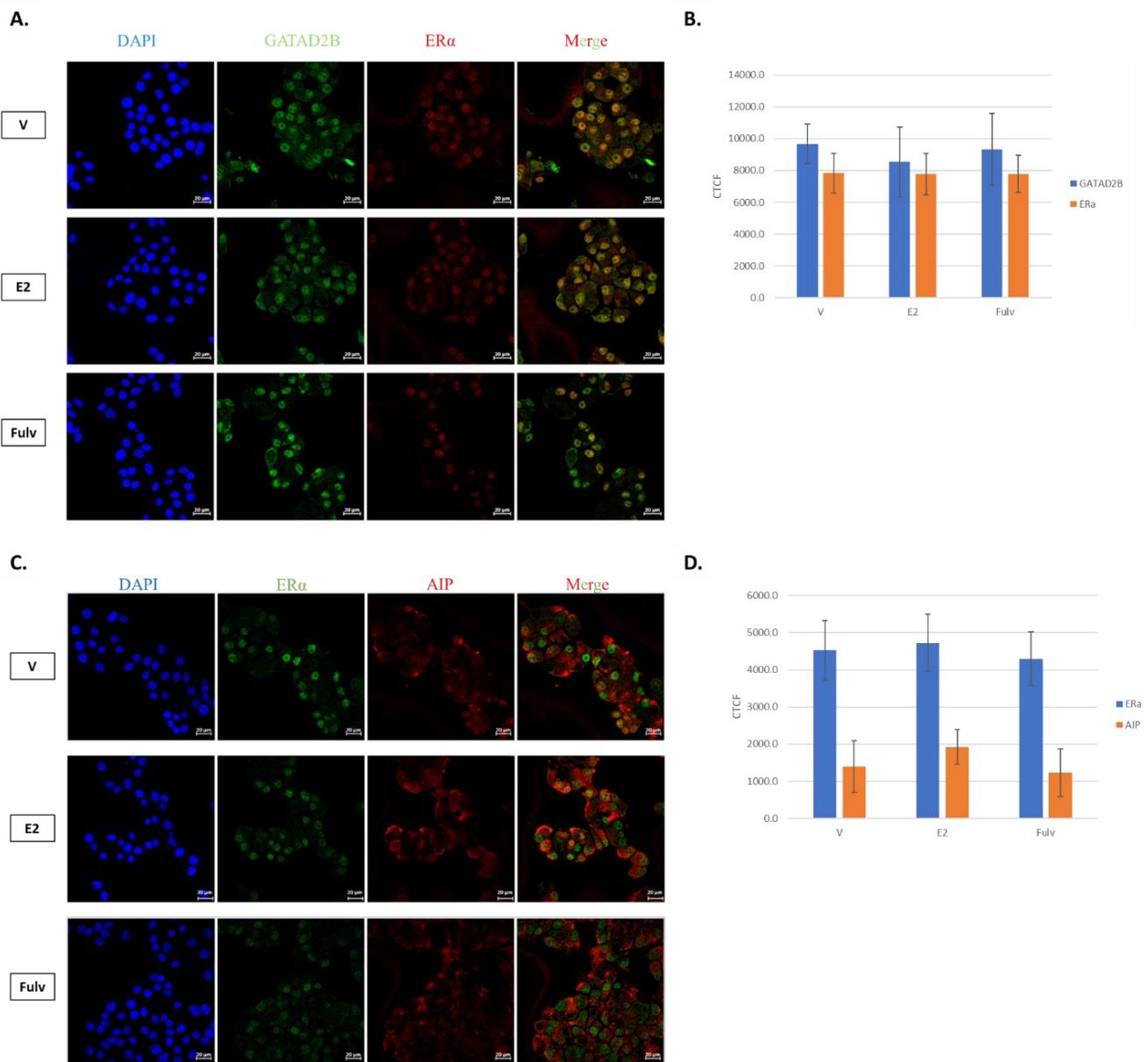


Figure 20. Colocalisation de GATAD2B ou AIP et ER α dans le noyau des cellules ZR-75-1. **A.** Immunofluorescence de GATA2B (en vert) et ER α (en rouge) **(A) B.** quantification des signaux en A. dans les cellules ZR-75-1 en réponse à différents ligands C. Immunofluorescence de AIP (en rouge) et ER α (en vert). **D.** quantification des signaux en C. dans les ZR-75-1 en réponse à différents ligands. Les cellules ZR-75-1 ont été cultivées dans du milieu sans Rouge Phénol et déprivé de composés oestrogéniques 72h précédant les traitements de 1h avec E2 (25 nM), Fulv (100 nM) ou V (EtOH 0.01%). La co-immunofluorescence a également été évaluée dans les SKBR3 comme contrôle négatif puisque ces cellules sont ER- (Figure supplémentaire 3). Les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (en bleu). Les anticorps détectant les protéines apparaissant en vert ont été marqués avec l’ALEXA-488 et les anticorps détectant les protéines apparaissant en rouge ont été marqués avec l’ALEXA-555. Les quantifications ont été faites en calculant la fluorescence cellulaire totale corrigée (CTCF) des cellules tel que décrit dans le Matériel et Méthodes et représentent les moyennes des résultats de deux champs de visions différents par condition. Pour chacune des conditions, un total de 40 cellules a été quantifié. L’écart-type, représenté par les barres d’erreurs, représente la variation et la dispersion de l’ensemble des CTCF. Les dilutions d’anticorps utilisées peuvent être retrouvées dans le tableau supplémentaire (Tableau Supplémentaire 1). N=1

Comme contrôle négatif, nous avons utilisé les cellules SK-BR-3 avec des anticorps ciblant nos protéines d’intérêts (GATAD2B ou AIP) et ER α . Seules nos protéines d’intérêt sont exprimées dans les SK-BR-3, et pas ER α . Comme attendu, seules AIP ou GATAD2B sont détectées, et pas ER α (Figure supplémentaire 3A). De plus, nous avons voulu vérifier que le signal obtenu ne provenait pas d’un bruit de fond provenant des anticorps secondaires seuls. Ainsi, nous avons fait répéter l’expérience sans anticorps primaires ciblant nos protéines d’intérêts, seulement avec les anticorps secondaires couplés aux fluorochromes ALEXA-488 ou ALEXA-594 (Figure supplémentaire 3B).

GATAD2B semble être localisée majoritairement dans le noyau dans les ZR-75-1 (Figure 20A). Selon ces co-IF, il ne semble pas y avoir de différences significatives de localisation en fonction du ligand (Figure 20B). De plus, lorsque les images sont superposées, nous pouvons voir un signal orange signifiant la colocalisation de GATAD2B et ER α dans les noyaux des ZR-75-1.

AIP semble être majoritairement à l’extérieur du noyau, mais une faible localisation nucléaire peut être observée. De plus, cette localisation nucléaire semble augmentée légèrement lorsque les cellules sont traitées avec E2 sans que la différence soit statistiquement significative. Considérant que selon nos expériences précédentes, l’expression de AIP n’était pas modulée par la présence de E2 ou de Fulv, ces résultats suggèrent que E2 pourrait avoir un impact sur la localisation cellulaire de AIP dans les ZR-75-1.

Pour conclure, si l'on regarde les cellules d'un seul champ visuel représentant un traitement, il est important de noter que l'intensité de la fluorescence représentant la localisation de chacune des protéines et de la colocalisation, n'est pas la même d'une cellule à l'autre. Ainsi, on observe une différence de signal inter-traitement, mais également intra-traitement. Ceci pourrait être justifié en une différence de l'expression d'une cellule à l'autre ou encore, à une moins bonne perméabilisation ou un moins bon marquage par les anticorps. Toutefois, nous avons tout de même une idée générale de la localisation de GATAD2B (principalement nucléaire), AIP (principalement cytoplasmique) et ER α (cytoplasmique et nucléaire). D'autres marqueurs de compartiments cellulaires ou sous-cellulaires (cytoplasmique, membranaire, nucléole, etc.) pourraient être également utilisés dans le futur afin d'avoir une idée plus précise de la localisation de chacune des protéines. De plus, des marqueurs permettant de différencier le stade du cycle cellulaire de chacune des cellules auraient pu nous permettre de voir si la localisation de chacune des protéines, ou encore, l'intensité de la fluorescence observée, pouvait être modulée par le cycle cellulaire. Finalement, la grande variabilité entre les cellules ne permet pas de conclure que les traitements peuvent réellement moduler la colocalisation des protéines. Une reproduction de cette expérience, pourrait permettre d'appliquer des statistiques et de déterminer s'il y a une différence significative ou non entre les traitements.

3.2 GATAD2B et AIP sont à proximité de ER α dans les ZR-75-1

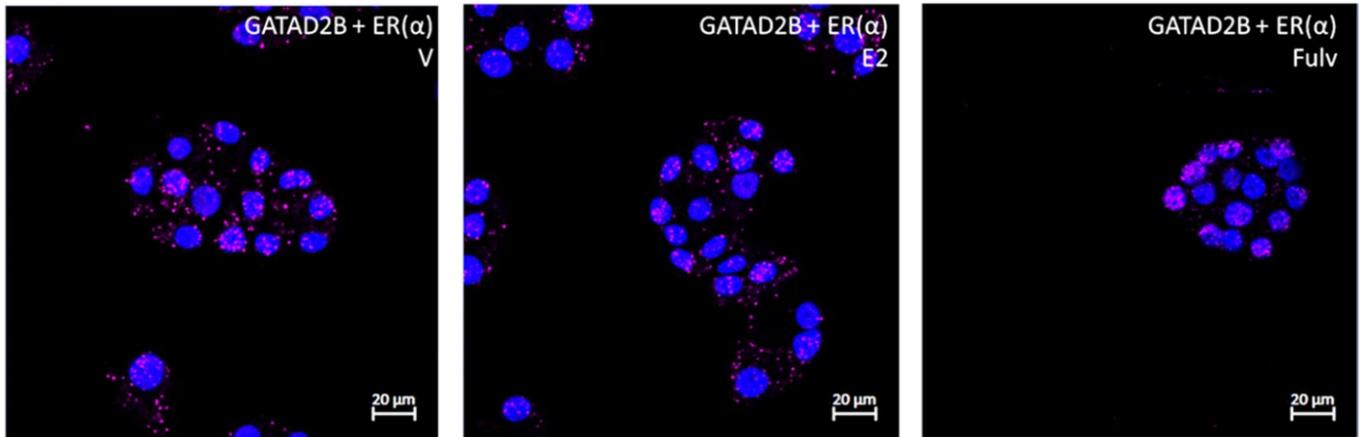
Dans la section précédente, nous avons observé que GATAD2B et AIP pouvaient colocaliser avec ER α dans le noyau des cellules ZR-75-1. Nous avons ensuite voulu évaluer la proximité entre ces protéines endogènes dans les cellules ZR-75-1 en présence de différents ligands en utilisant la ligature de proximité (PLA). Cette technique permet d'observer un signal représentant une proximité entre deux protéines ciblées à moins de 40 nm, comparativement à environ 10 nm pour le BioID (169).

Un contrôle positif a été tout d'abord réalisé afin de valider l'efficacité de cette technique pour observer la proximité de ER α endogène avec un autre facteur de transcription dont le motif est enrichi dans les régions d'ADN liées par ER α , FOXA1. Un signal très fort de proximité entre les deux protéines est présent dans les noyaux des ZR-75-1 (Figure supplémentaire 4A). Le PLA entre avec

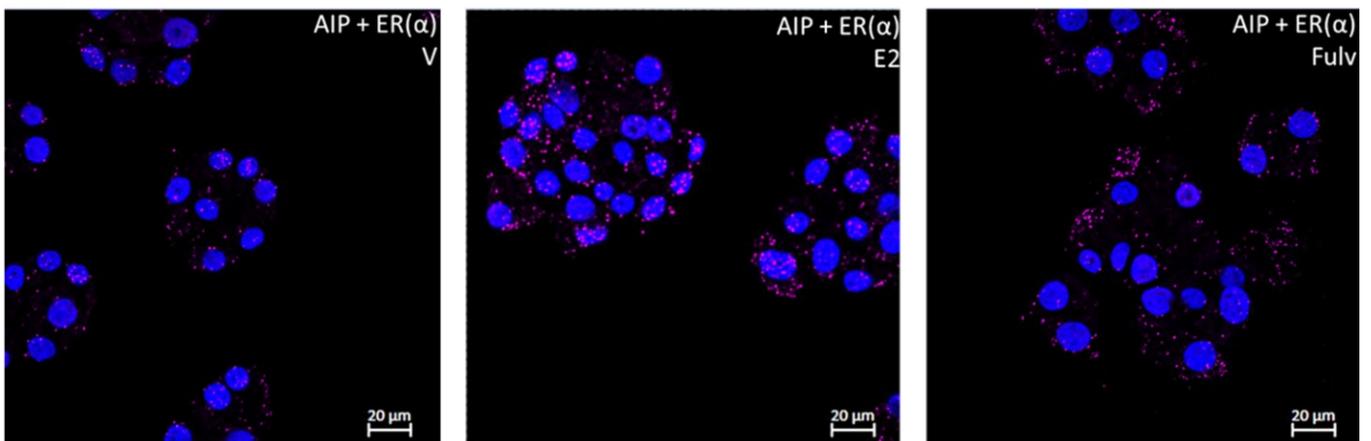
des anticorps contre FOXA1 et ER α a également été testé dans les SK-BR-3 à titre de contrôle négatif. Tel qu'attendu, aucun signal n'a pu être observé dû à l'absence de ER α .

D'autres contrôles négatifs ont également été ajoutés. Tout comme pour le co-IF, un PLA a également été fait dans les SK-BR-3 avec des anticorps ciblant nos protéines d'intérêts (GATAD2B ou AIP) et ER α (Figure supplémentaire 4C). De plus, des contrôles négatifs ont également été fait dans les ZR-75-1 avec seulement les anticorps secondaires (PLA- ou PLA+, soit les sondes couplées à des oligonucléotides permettant la formation de l'ADN circulaire lorsque la proximité le permet. Les sondes – et + reconnaissent un anticorps primaire provenant d'espèces différentes, (170) ou encore, en ne ciblant qu'une seule des protéines (ER α ou GATAD2B ou AIP) avec un anticorps primaire (Figure supplémentaire 4B). Tel qu'attendu, très peu ou pas de signal a été observé dans ces contrôles.

A.



B.



C.

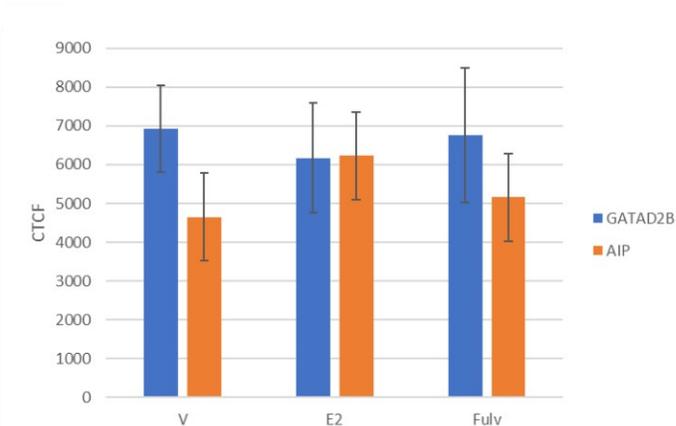


Figure 21. Proximité entre ER α et GATAD2B ou AIP dans les ZR-75-1 en réponse à différents ligands. **A.** Signal généré par PLA entre ER α et GATAD2B. **B.** Signal généré par PLA entre ER α et GATAD2B. **C.** Quantification du signal PLA entre ER α et GATAD2B ou AIP. Les cellules ZR-75-1 ont été cultivées dans du milieu blanc déprivé de composés oestrogéniques 72h avant les traitements de 1h avec E2 (25 nM), Fulv (100 nM) ou V (EtOH 0.01%) pour le PLA. Des contrôles positifs et négatifs ont également été effectués (Figure supplémentaire 4). Les noyaux des cellules sont

marqués au DAPI (en bleu). Le signal représentant une forte proximité apparaît en rose. Les quantifications ont été faites en calculant le CTCF des cellules tel que décrit précédemment et représentent les moyennes de deux champs de visions différents par condition. Pour chacune des conditions, un total de 40 cellules a été quantifié. L'écart-type, représenté par les barres d'erreurs, représente la variation et la dispersion de l'ensemble des CTCF. Les dilutions d'anticorps utilisées peuvent être retrouvée dans le tableau supplémentaire 1. N=1

Le PLA effectué entre GATAD2B et ER α (Figure 21A) permet d'observer une forte proximité entre ces deux protéines, notamment dans les noyaux. Les signaux de proximité entre GATAD2B et ER α ne semblent pas être affectés de façon notable lorsque les cellules sont traitées avec E2 ou Fulv. En ce qui concerne AIP, une proximité est également observée dans les noyaux des ZR-75-1 et à l'extérieur du noyau. La proximité semble majoritairement avoir lieu à l'extérieur du noyau, mais une tendance vers une plus grande intensité du signal nucléaire est observable lorsque les cellules sont traitées avec E2 (Figure 21B).

Pour conclure, un signal suggérant une forte proximité est détectable dans les cellules ZR-75-1 pour ER α et AIP ou GATAD2B. Pour les futurs tests, il serait intéressant, comme pour dans le co-IP, d'utiliser des marqueurs cytoplasmiques, membranaires et de d'autres compartiments cellulaires afin de mieux comprendre où cette proximité a lieu.

3.3 GATAD2B et AIP peuvent interagir avec ER α exogène dans les HEK293

Nous avons ensuite testé avec une co-IP si nos protéines d'intérêt pouvaient interagir avec ER α , tout d'abord dans un système de surexpression de ER α dans les HEK-293T. Comme le montrait la Figure 18A et 18B, GATAD2B et AIP sont exprimés dans les HEK-293T, mais ER α ne l'est pas.

Avant de procéder aux co-IPs, nous avons voulu déterminer l'efficacité d'extraction de nos protéines par différents tampons de lyse. Cette étape était importante puisque pour les co-IPs, nous devons bien extraire les protéines sans toutefois perturber les potentielles interactions. Nous avons testé huit tampons de lyses différent (Figure 22A), qui ont déjà été utilisé par les membres de notre laboratoire dans le passé, pour l'extraction de nos protéines d'intérêt dans les ZR-75-1 et HEK293.

A.

1. RIPA	2. IP buffer	3. Lysis Buffer: Nature Protocol (BioID)	4. Lysis buffer	5. Lysis buffer (High detergent)	6. Lysis Buffer (High salt)	7. Total lysis buffer	8. WCE buffer
50 mM Tris pH 8.0 150 mM NaCl 0.1 % SDS 0.5 % Na Deoxycholate 1 % Triton X-100	50 mM Tris HCl pH 7.5 150 mM NaCl 5 mM EDTA 0.1 % NP-40	50 mM Tris-HCl pH 7.5 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 % Triton 1 mM PMSF 0.1 % SDS	50 mM Tris-HCl 0.5 mM EDTA 0.02 % Na azide 0.5 % SDS 0.1 % NP-40 0.5 % Na Deoxycholate	150 mM KCl 50 mM Tris-HCl 2 M EDTA 0.5 % SDS 0.5 % Triton X-100 1 % NP-40	0.4 M KCl 20% Glycerol 20 mM Tris-HCl 2 mM EDTA	50 mM Tris-HCl 5 mM EDTA 150 mM NaCl 2 % SDS 0.5 % Triton X-100 1 % NP-40	0.4 M KCl 20 mM HEPES pH 7.4 1 mM DTT Glycerol 20%

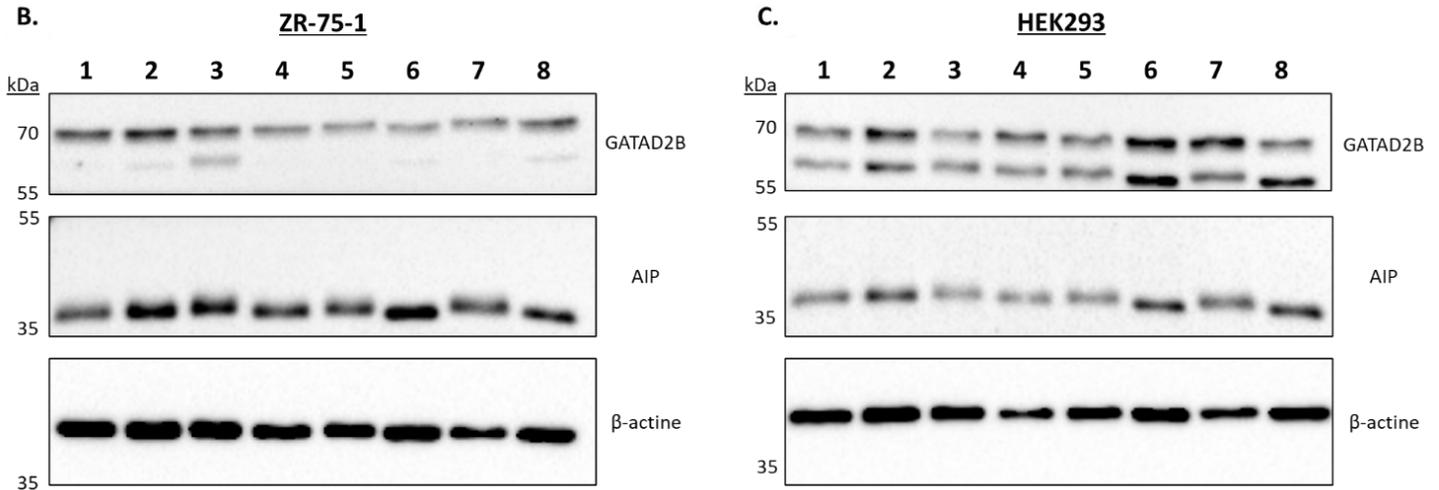


Figure 22. Efficacité d'extraction de GATAD2B et AIP dans les ZR-75-1 et dans les HEK293. Huit tampons de lyse (A) ont été testés pour l'extraction de GATAD2B et AIP dans les cellules ZR-75-1 (B) ou HEK293 (C). Les cellules ZR-75-1 et HEK293 ont été cultivées en milieu stérile dans du milieu de culture rouge. Les cellules ont été récoltées dans chaque tampons de lyse. Les extraits cellulaires ont été dosés, et puis analysés (30 µg) par SDS-PAGE (10%) et Western Blotting. Les dilutions d'anticorps utilisées peuvent être retrouvée dans le tableau supplémentaire (Tableau Supplémentaire 1). N=1.

Comme le montre la figure 6B-C, GATAD2B et AIP ont pu être extraites avec tous les tampons de lyse (Figure 6A), autant dans les ZR-75-1 que dans les HEK293. Les variations en détergents ou en sel (permettant généralement une meilleure extraction) semblent ne pas avoir d'effet sur l'extraction de GATAD2B dans les ZR-75-1, mais un peu plus dans les HEK293. Dans ces dernières, l'extraction de GATAD2B et de AIP semblaient plus efficace avec le tampon #2 (« *IP buffer* »), #6 (« *High salt lysis buffer* ») et #7 (« *Total lysis buffer* »). Parmi ces trois tampons, le tampon de lyse #2 possède les conditions les moins susceptibles de causer des perturbations sur les interactions entre les protéines. De plus, comme son nom l'indique, il s'agit d'un tampon généralement utilisé pour les expériences de co-IP. Nous avons donc procédé aux co-IPs en utilisant ce tampon.

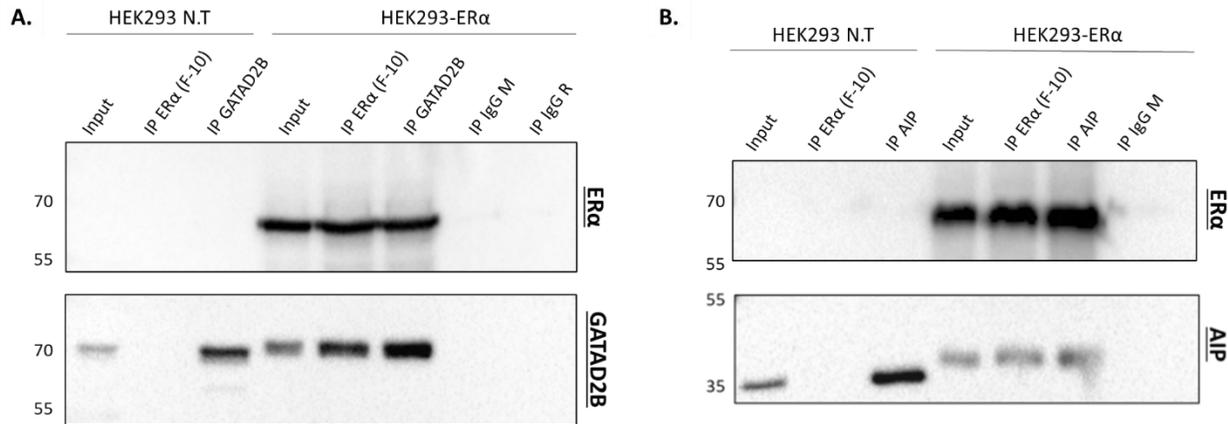


Figure 23. Co-immunoprécipitation entre ER α et GATAD2B ou AIP dans les HEK-293T. Interaction entre ER α (67 kDa) et GATAD2B (66 kDa) (A) et entre ER α (67 kDa) et AIP (38 kDa) (B) dans les cellules HEK-293T. Les cellules HEK-293T ont été cultivées dans le milieu rouge. Pour les HEK-293T-ER α , les cellules ont été transfectées avec 6 μ g d'ADN. Les protéines ont été extraites et dosées. Pour chacune des IP, 1000 μ g du lysat cellulaire a été incubés avec 4 μ g d'anticorps. Les échantillons ont été chargées (50 μ g pour les inputs) sur un gel SDS-PAGE (10%) et analysés par Western Blotting. L'échelle des poids moléculaires est en kDa. Les dilutions d'anticorps utilisées peuvent être retrouvée dans le tableau supplémentaire (Tableau Supplémentaire 1). GATAD2B : N=2, AIP : N=1

Tout d'abord, nous avons effectué les immunoprécipitations (IP) dans des cellules HEK293 non-transfectées (HEK293 N.T) afin de s'assurer de la spécificité du signal que l'on observe puisque les cellules HEK293 n'expriment pas ER α (Figure 23). Tel qu'attendu, lorsqu'une IP est réalisée avec un anticorps ciblant ER α , ER α ne peut pas être détecté, tout comme GATAD2B et AIP. De plus, lorsque l'on immunoprécipite GATAD2B ou AIP, ER α ne peut être détecté même si ces protéines le sont. Aussi, des IP avec des IgG contrôles (souris ou lapin, en fonction des anticorps ciblant nos protéines d'intérêt) ont également été fait afin de s'assurer de la spécificité du signal détecté.

Dans les cellules HEK293 transfectées avec ER α (HEK293-ER α), l'immunoprécipitation avec un anticorps contre ER α permet de détecter non seulement ER α (membranes du haut, Figure 23A et 23B) mais aussi GATAD2B (Figure 23A) et AIP (Figure 23B), suggérant une interaction entre GATAD2B ou AIP et ER α . Réciproquement, lorsque GATAD2B ou AIP était immunoprécipité, nous avons pu détecter ER α . Il est intéressant de noter qu'une légère augmentation du poids moléculaire peut être observée pour GATAD2B et AIP lorsque les cellules expriment ER α en comparaison aux HEK-293T n'exprimant pas ER α . Plus d'investigations et de réplicats sont nécessaires pour mieux comprendre ces résultats, mais une hypothèse pour justifier ces

observations serait que ER α entraîne des modifications post-traductionnelles (recrutement de cofacteurs pouvant faire des PTM) sur ces protéines ou encore que l'interaction entre ER α et GATAD2B ou AIP nécessite que ces dernières aient des PTM.

Finalement, ces résultats suggèrent que ER α peut interagir avec GATAD2B et AIP dans un système de surexpression de ER α .

3.4 GATAD2B et AIP peuvent interagir avec ER α dans les ZR-75-1

Maintenant que nous avons établi la possibilité d'une interaction entre ER α et GATAD2B ou AIP, nous avons voulu voir si cette interaction pouvait également avoir lieu avec ER α endogène. De plus, nous avons voulu savoir si cette interaction pouvait être modulée par différents ligands. Tel que présenté à la Figure 17, ER α , GATAD2B et AIP sont exprimés dans les ZR-75-1.

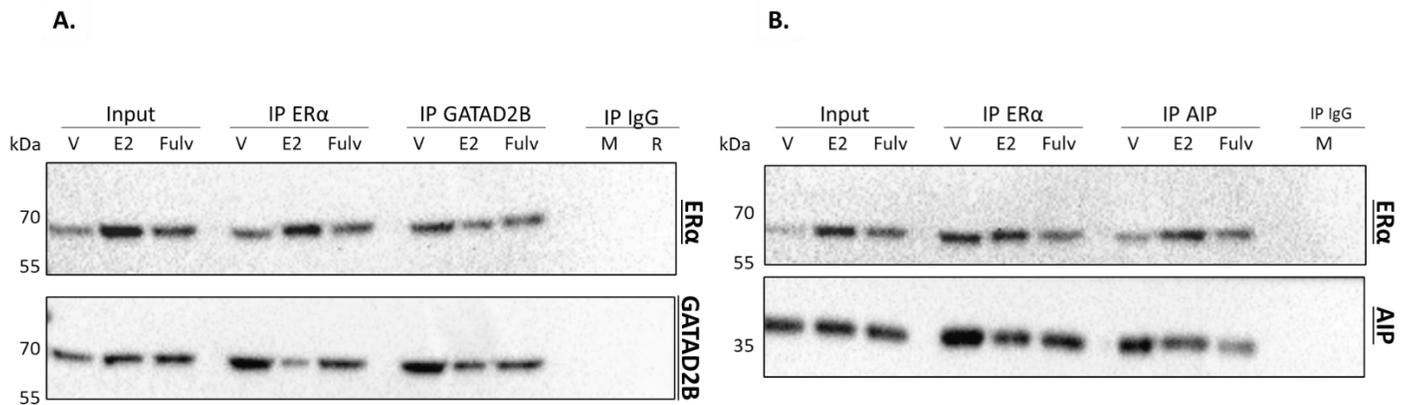


Figure 24. Co-immunoprécipitation entre ER α et GATAD2B ou AIP dans les ZR-75-1 en réponse à différents ligands. Interaction entre ER α (67 kDa) et GATAD2B (66 kDa) (A) et entre ER α (67 kDa) et AIP (38 kDa) (B) dans les cellules ZR-75-1. Les cellules ZR-75-1 ont été cultivées dans du milieu blanc déprivé de composés oestrogéniques 72h avant les traitements de 1h avec E2 (25 nM), Fulv (100 nM) ou V (EtOH 0.01%). Les protéines ont été extraites et dosées. Pour chacune des IP, 1000 μ g du lysat cellulaire a été incubés avec 4 μ g d'anticorps. Les échantillons ont été chargés (50 μ g pour les inputs) sur un gel SDS-PAGE (10%) et analysés par Western Blotting. L'échelle des poids moléculaires est en kDa. Les dilutions d'anticorps utilisées peuvent être retrouvée dans le tableau supplémentaire (Tableau Supplémentaire 1). N=1.

Encore une fois, nous avons effectué une IP de ER α , qui est exprimé de manière endogène dans les ZR-75-1. Tout d'abord, nous avons vérifié que l'IP fonctionne en vérifiant que ER α était bel et bien détecté quel que soit le traitement, comme dans les extraits avant IP. Ensuite, nous avons vérifié si nos protéines d'intérêt étaient aussi précipitées. Lorsqu'ER α est immunoprécipité, GATAD2B peut être détecté (Figure 24A). De plus, contrairement à ER α , GATAD2B semble moins

interagir avec ER α en présence de E2. Il est aussi important de noter que dans les extraits, l'expression de GATAD2B ne semble pas être modulée, par les traitements ce qui corrobore les analyses de l'expression de nos protéines en réponse aux ligands (Figure 19). L'interaction entre ER α et GATAD2B est également présente lorsque GATAD2B est immunoprécipité. Toutefois, dans cette situation, et contrairement aux résultats observés avec les extraits et l'IP de ER α , ER α n'est pas plus abondant en présence de E2.

Pour ce qui est de AIP, cette protéine est également détectée lorsque ER α est immunoprécipité (Figure 24B). Inversement, lorsqu'AIP est immunoprécipité, ER α est également présent. Encore une fois, ER α semble plus présent en présence de E2. Dans les extraits avant IP, l'expression de AIP ne semble pas changer en fonction des traitements, ce qui concorde avec les résultats obtenus dans la Figure 19.

Pour conclure, ces résultats suggèrent que GATAD2B et AIP sont des partenaires d'interaction de ER α dans les cellules ZR-75-1.

3.5 GATAD2B et AIP peuvent se lier aux EREs du promoteur de *GREB1*

Maintenant que nous avons établi que GATAD2B et AIP pouvaient interagir avec ER α , tout d'abord dans un système de surexpression dans les HEK293-ER α , et ensuite au niveau endogène dans la lignée cellulaire ER α + ZR-75-1, nous avons voulu mieux comprendre les rôles de ces interactions. Comme décrit précédemment, plusieurs cofacteurs sont recrutés aux EREs après la liaison de ER α , et les différents complexes formés peuvent médier l'activité transcriptionnelle de ER α . De plus, ce recrutement de cofacteurs est très dynamique et peut être modulé par la nature du ligand de ER α . Nous avons donc commencé par étudier la possibilité de recrutement de GATAD2B et AIP aux EREs du promoteur de *GREB1*, un gène cible connu de ER α , par CHIP-qPCR dans les cellules ZR-75-1 traitées avec V, E2 ou Fulv.

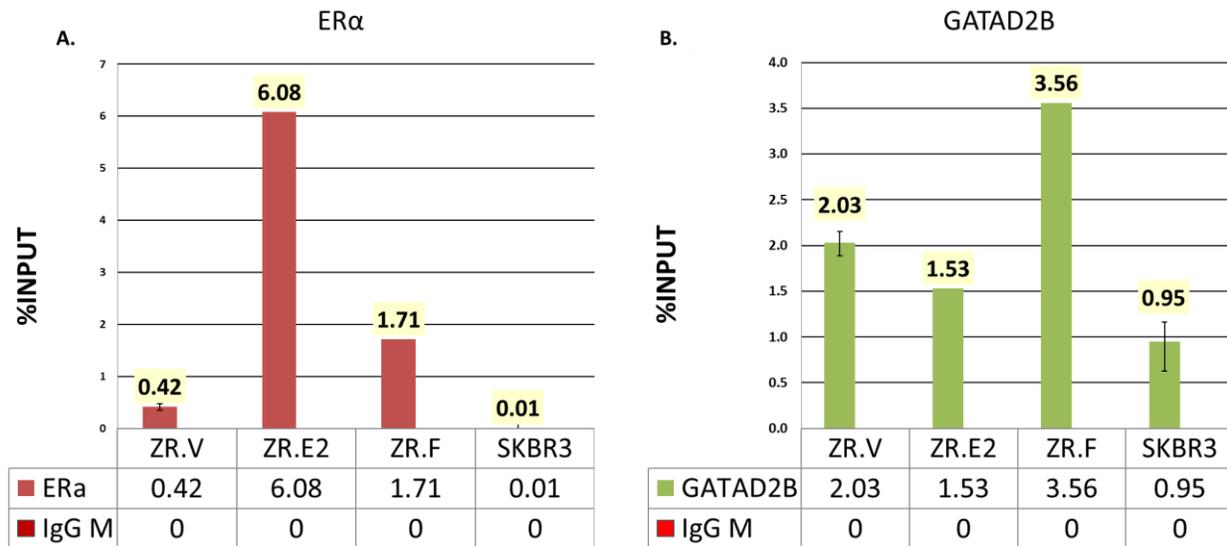


Figure 25. Recrutement de ER α et GATAD2B aux EREs situés dans le promoteur de *GREB1* dans les cellules ZR-75-1. Les CHIP-qPCR permettent d'observer le recrutement de ER α (A) et de GATAD2B (B). Les cellules ZR-75-1 et SKBR3 (sans traitement) ont été cultivées dans le milieu blanc privé de composés oestrogéniques 72h avant les traitements de 1h avec V (EtOH 0.01%), E2 (25 nM) et Fulv (100 nM). Les cellules ont été récoltées et ont été soumises à une immunoprécipitation de chromatine en utilisant 4 μ g d'anticorps pour les chacune des protéines ciblées. Après l'éluion de l'ADN, la présence de la séquence ciblée, *GREB1* #26, (Tableau supplémentaire 2) a été analysée par qPCR (sonde UPL #26, *GREB1* ERE). Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage des « inputs » (% INPUT). La qPCR a été effectué en n=3 et les résultats représentent la moyenne de ceux-ci. L'écart-type, représenté par les barres d'erreurs, représente la variation et la dispersion entre les %Input de n=3. Les résultats montrés ici sont représentatifs du patron de recrutement pour N=3.

Nous avons d'abord vérifié l'efficacité de nos CHIP en confirmant le recrutement de ER α aux ERE situés dans le promoteur de *GREB1* en réponse à différents traitements (Figure 25A). Ainsi, dans les ZR-75-1, ER α est recruté sur le promoteur de *GREB1* et ce recrutement est augmenté lorsque les cellules sont traitées avec E2 en comparaison à V (~15 fois). De plus, en présence de Fulv, ER α est également davantage recruté en comparaison au V (~4 fois), mais tout de même moins que pour les cellules traitées avec E2. De plus, nous avons également effectué les CHIP-qPCR dans les SK-BR-3 à titre de contrôle négatif puisque ER α n'y est pas exprimé. Ainsi, tel qu'attendu nous ne pouvons détecter qu'un très faible recrutement (0.01%), qui est probablement dû au bruit de fond de la technique.

Ensuite, nous pouvons voir que dans les ZR-75-1, GATAD2B est recruté aux ERE de *GREB1* de façon marquée par rapport au contrôle IgM, mais et le patron de recrutement ne suit pas celui de ER α (Figure 25B). Ainsi, en comparaison avec le véhicule, GATAD2B est légèrement moins recruté en présence de E2 (1.3 fois moins), mais l'est plus en présence de Fulv (1.75 fois plus). De plus,

comparativement à ER α , GATAD2B est recruté aux ERE de *GREB1* dans les SK-BR-3. Ce recrutement est toutefois moindre comparativement à celui observé dans les ZR-75-1. Ce patron de recrutement correspond au patron que l'on observe pour un autre corépresseur connu de ER α , NCOR1 (Figure supplémentaire 5B).

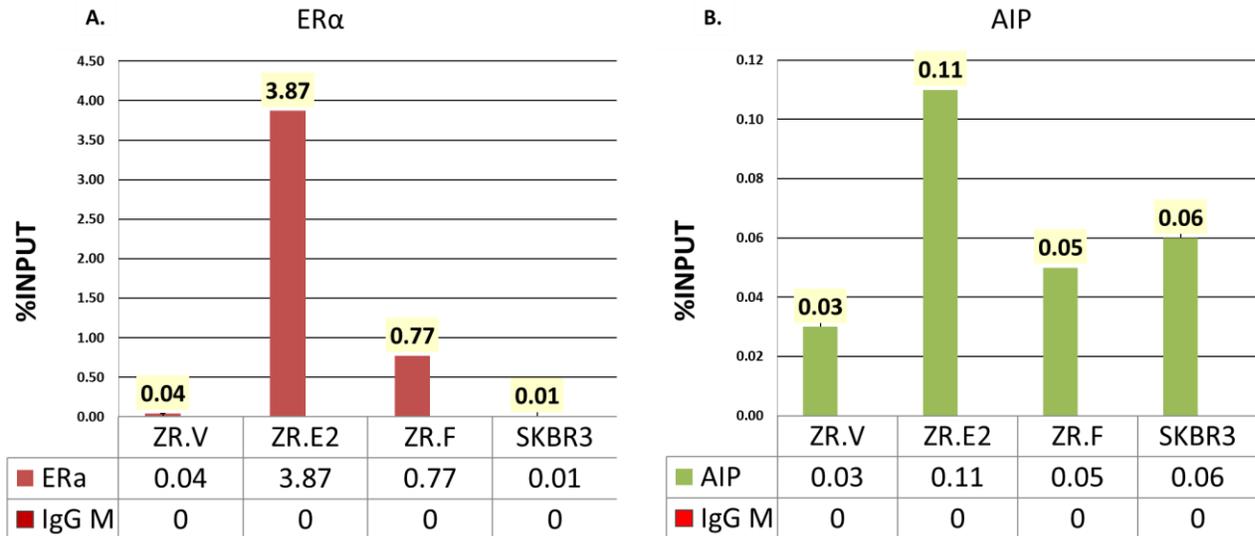


Figure 26. Recrutement de ER α et AIP aux EREs situés dans le promoteur de *GREB1* dans les cellules ZR-75-1. Les ChIP-qPCR permettent d'observer le recrutement de ER α (A) et de GATAD2B (B). Les cellules ZR-75-1 et SKBR3 (sans traitement) ont été cultivées dans le milieu blanc privé de composés oestrogéniques 72h avant les traitements de 1h avec V (EtOH 0.01%), E2 (25 nM) et Fulv (100 nM). Les cellules ont été récoltées et ont été soumises à une immunoprécipitation de chromatine en utilisant 4 μ g d'anticorps pour les chacune des protéines ciblées. Après l'éluion de l'ADN, la présence de la séquence ciblée, *GREB1* #26, (Tableau supplémentaire 2) a été analysée par qPCR (sonde UPL #26, *GREB1* ERE). Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage des « inputs » (% INPUT). La qPCR a été effectué en n=3 et les résultats représentent la moyenne de ceux-ci. L'écart-type, représenté par les barres d'erreurs, représente la variation et la dispersion entre les %Input de n=3. Les résultats montrés ici sont représentatifs du patron de recrutement pour N=3.

En ce qui concerne l'expérience avec AIP, le même patron de liaison de ER α aux ERE de *GREB1* en fonction des différents traitements (Figure 26A) est observé, avec un faible bruit de fond dans les SK-BR-3 est plus faible. Comme le montre la figure 26B, l'ERE du promoteur de *GREB1* est également enrichi avec un anticorps contre AIP alors que l'IgM ne l'est pas. En comparaison aux cellules traitées avec le véhicule, AIP est davantage recruté en présence de E2 (~3x) mais pas en présence de Fulv. Le recrutement de AIP dans les SK-BR-3 est comparable à celui de AIP dans les ZR-75-1 en présence de Fulv. Le patron de liaison de AIP dans les ZR-75-1 en fonction des différents traitements correspond au patron de liaison que l'on a pu l'observer avec un coactivateur connu de ER α , p300 (Figure supplémentaire 5A).

Considérant que nous avons un signal de recrutement à l'ERE de *GREB1* dans les SK-BR-3, nous avons voulu nous assurer que le recrutement que l'on pouvait observer dans les ZR-75-1 et les SK-BR-3 était spécifique de ce type de séquence. Nous avons donc effectué un CHIP-qPCR de contrôle dans une région du gène *GREB1* ne comportant pas de ERE (Voir tableau supplémentaire 2). Ainsi, pour GATAD2B (Figure supplémentaire 6), et AIP (Figure supplémentaire 7) un faible signal est observé. Afin de mieux comparer le recrutement en présence ou non de ERE, nous avons mis l'échelle au même niveau que dans les graphiques pour ER α et GATAD2B/AIP en présence de ERE. Ainsi, le signal demeure très faible en comparaison au recrutement obtenu en présence sur l'ERE. Ce faible signal pourrait donc être dû à un bruit de fond provenant de la technique, ou encore, d'un faible taux de recrutement non spécifique dans ces régions.

En conclusion, AIP et GATAD2B peuvent être recruté à l'ERE de *GREB1* dans les ZR-75-1 et ce recrutement est modulé en fonction des traitements (E2 ou Fulv). De plus, le patron de liaison de AIP s'apparente à ceux observés pour les coactivateurs, alors que celui de GATAD2B s'apparente plutôt aux patrons de liaison observés pour les corépresseurs.

3.7. L'inhibition de l'expression de GATAD2B par siRNA dans les ZR-75-1 entraîne une régulation à la hausse de gènes impliqués dans la signalisation par ER α

Afin de mieux comprendre l'impact de l'expression de GATAD2B (pour des raisons de ressources et de temps, AIP n'a pas pu être testé dans cette expérience) sur l'activité de ER α , nous avons effectué un séquençage de l'ARN (RNAseq) dans ces cellules après suppression de son expression.

Des cellules ZR-75-1 ont été traitées avec des siARN ciblant GATAD2B ou les contrôles appropriées (SilenFect et siScramble) (Tableau supplémentaire 3), et ont été récoltées 48h à 72h post-transfection. Les analyses Western démontrent que l'inhibition de GATAD2B dans les ZR-75-1 a bien fonctionné en comparaison aux contrôles, autant pour le jour 2 que pour le jour 3 (Figure 27A). Le knockdown de GATAD2B a également été réalisé dans les MCF-7 (Figure 27B) et s'est révélé efficace, bien qu'un peu moins que dans les ZR-75-1. Le knock-down de AIPa été un peu plus efficace dans les MCF-7 comparativement aux ZR-75-1 (Figure 27C et D). Ces analyses nous

permettent également de conclure que le niveau de GATAD2B ou AIP, dans les ZR-75-1 et les MCF-7, n'influence pas l'expression de ER α .

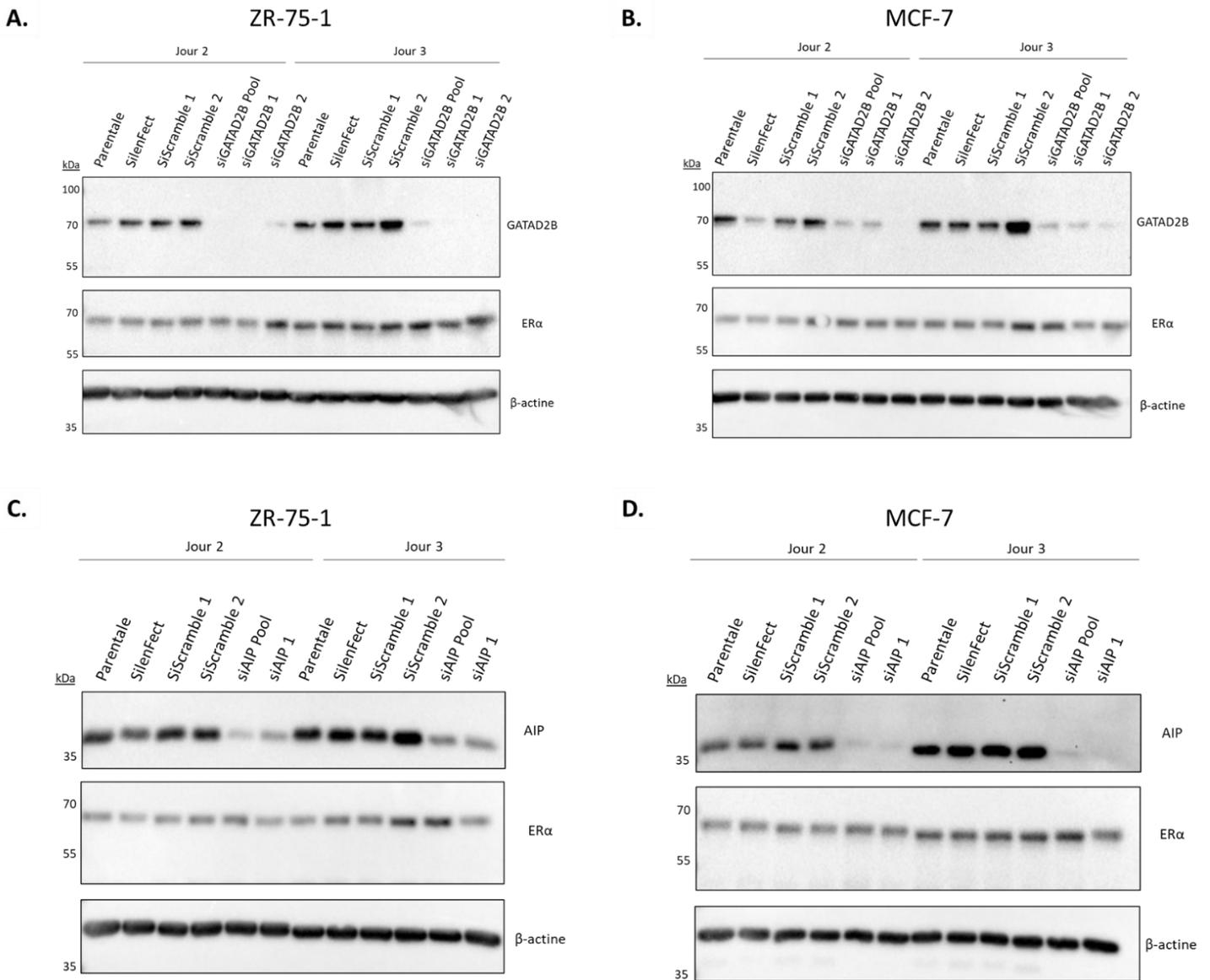


Figure 27 – Knockdown de GATAD2B et AIP par siARN dans les ZR-75-1 et les MCF-7. Expression de GATAD2B après son inhibition par siARN dans les ZR-75-1 (A) et les MCF-7 (B). Les cellules ZR-75-1 et MCF-7 ont été cultivées dans le milieu de culture rouge approprié. Les cellules ont été transfectées avec le siARN approprié en présence de SilenFect. Les cellules ont été collectées 48h (jour 2) et 72h (jour 3) post-transfection. Pour chacune des conditions, 30 μ g du lysat protéique a été séparé par SDS-PAGE et analysé par Western Blot. L'échelle des poids moléculaires est en kDa. GATAD2B (66 kDa), ER α (67 kDa), AIP (38 kDa) et β -actine (42 kDa). N=3

L'analyse différentielle des résultats du RNAseq entre les cellules traitées avec les siARN spécifiques contre GATAD2B versus les contrôles a permis d'identifier 284 gènes sous-régulés

(incluant GATAD2B) et 202 gènes sur-régulés lorsque GATAD2B est inhibé ($p < 0.005$). Les 100 premiers gènes les plus sur-régulés et les plus sous-régulés après l'inhibition de l'expression de GATAD2B ont été soumis à une analyse d'enrichissement d'ensembles fonctionnels de gènes (de l'anglais « *Gene Set Enrichment analysis* » ou GSEA). Les ensembles de gènes Hallmark identifiés sont représentés dans le tableau 1.

De manière intéressante, les ensembles de gènes sur-régulés principaux lorsque GATAD2B est inhibé comprennent les gènes impliqués dans la réponse précoce aux œstrogènes (14 gènes, FDR q-value : $6.01 \cdot 10^{-11}$, voir Tableau supplémentaire 5) ainsi que les gènes impliqués dans la réponse tardive aux œstrogènes (8 gènes, FDR q-value : $1.56 \cdot 10^{-4}$). Ces résultats suggèrent un rôle de GATAD2B dans la régulation de certains gènes impliqués dans les réponses aux œstrogènes dans les ZR-75-1. Tel qu'attendu, puisque le complexe NuRD est impliqué dans une multitude de processus cellulaires, d'autres ensembles de gènes ont également été identifiés comme étant sur-régulés après l'inhibition de GATAD2B. Ceci comprend des gènes impliqués dans la glycolyse et la gluconogénèse ou encore dans la signalisation par le complexe 1 de cible mammalienne de la rapamycine (MTORC1). L'inhibition de GATAD2B a aussi permis d'identifier des ensembles fonctionnels de gènes sous-régulés, mais avec une faible significativité. Parmi ceux-ci, l'ensemble se trouvant au sommet de la liste comprend des gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative (8 gènes, FDR q-value : $2.04 \cdot 10^{-3}$), alors que parmi ceux au bas de la liste se trouve un ensemble de gènes impliqués dans la signalisation par p53 (6 gènes, FDR q-value : $1.31 \cdot 10^{-2}$).

Ainsi, l'inhibition de GATAD2B a permis d'identifier des gènes impliqués dans la réponse œstrogénique pouvant être régulés par l'expression de GATAD2B. Ainsi, l'interaction entre ER α et GATAD2B pourrait influencer la signalisation de ER α sur les éléments de réponse de ces gènes.

Tableau 1. Gènes régulés par le knockdown par siARN de GATAD2B dans les ZR-75-1. Le RNAseq des cellules ZR-75-1 dont l'expression de GATAD2B a été inhibé par siARN ou sans inhibition a été analysé avec DESeq2. Une analyse d'enrichissement d'ensemble fonctionnels des 100 premiers gènes régulés à la hausse et à la baisse ($p < 0.05$) après l'inhibition de GATAD2B a été effectué en utilisant la collection des ensembles de gènes Hallmark (FDR < 0.05).

Gènes exprimés à la hausse				
Nom de l'ensemble des noms	Description	Nombre de gènes	p-value	FDR q-value
HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_EARLY	Gènes définissant la réponse précoce aux oestrogènes	14	1.20E-12	6.01E-11
HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_LATE	Gènes définissant la réponse tardive aux oestrogènes	8	6.24E-06	1.56E-04
HALLMARK_GLYCOLYSIS	Gènes codant les protéines impliquées dans la glycolyse et la gluconéogénèse	6	4.38E-04	5.47E-03
HALLMARK_MTORC1_SIGNALING	Gènes régulés à la hausse après l'activation du complexe mTORC1	6	4.38E-04	5.47E-03
HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING	Gènes régulés à la hausse par STAT5 en réponse à IL2	5	2.86E-03	2.86E-02
HALLMARK_UV_RESPONSE_DN	Gènes inhibés en réponse aux radiations ultra-violettes (UV)	4	5.29E-03	5.29E-03
Gènes exprimés à la baisse				
Nom de l'ensemble des noms	Description	Nombre de gènes	p-value	FDR q-value
HALLMARK_OXYDATIVE_PHOSPHORYLATION	Gènes codant des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative	8	7.55E-05	2.04E-03
HALLMARK_DNA_REPAIR	Gènes impliqués dans la réparation de l'ADN	7	8.17E-05	2.04E-03
HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP	Gènes régulés à la hausse par l'activation de KRAS	7	4.76E-04	6.56E-03
HALLMARK_PROTEIN_SECRETION	Gènes impliquées dans la signalisation par sécrétion de protéines	5	5.25E-04	6.56E-03
HALLMARK_FATTY_ACID_METABOLISM	Gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme d'acides gras	6	7.89E-04	7.89E-03
HALLMARK_MITOTIC_SPINDLE	Gènes important pour l'assemblage des fuseaux mitotiques	6	2.55E-03	1.31E-02
HALLMARK_HEME_METABOLISM	Gènes impliqués dans le métabolisme de l'hème et dans la différenciation des érythroblastes	6	2.61E-03	1.31E-02
HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	Gènes exprimés en réponse à IFNG	6	2.61E-03	1.31E-02
HALLMARK_P53_PATHWAY	Gènes impliqués dans les voies de signalisation par p53	6	2.61E-03	1.31E-02
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	Gènes régulés par NF- κ B en réponse aux TNF	6	2.61E-03	1.31E-02

Discussion

Le cancer du sein est une maladie complexe et hétérogène, dont environ 70% des tumeurs expriment ER α . Ces types de tumeurs ont généralement un bon pronostic puisqu'elles peuvent bénéficier de thérapies hormonales, tel que décrit précédemment. L'activité transcriptionnelle dictant les fonctions de ER α est largement modulé par l'interaction du récepteur avec des cofacteurs. Ces cofacteurs peuvent agir via différents mécanismes d'action et peuvent avoir un impact sur l'état de la chromatine, sur le recrutement de la machine transcriptionnelle ou encore, le recrutement de d'autres facteurs. Le recrutement des cofacteurs de ER α est grandement influencé par son environnement, notamment au niveau de la présence de ligands du récepteur. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de ER α , plusieurs équipes ont identifiés et étudiés ses cofacteurs. En général, on peut observer que l'interaction de ER α avec des coactivateurs est stimulée par la présence d'agonistes et que ceci facilite la transcription des gènes cibles. Une perturbation de l'activité des coactivateurs engendre souvent une perturbation des voies de signalisation ER α -dépendante, et ceux-ci représentent alors des cibles thérapeutiques intéressantes. En effet, de nombreux inhibiteurs de ces facteurs possèdent une activité antiproliférative dans les tumeurs ER α +. La présence d'antagonistes est plutôt associée avec l'absence de coactivateurs ou la présence de corépresseurs, ce qui engendrerait une inhibition de l'activité transcriptionnelle de ER α . Malgré ces grandes avancées scientifiques, il reste encore beaucoup à comprendre sur les mécanismes d'action de ER α dans la tumorigénèse du cancer du sein et donc, sur l'activité de ses cofacteurs.

L'objectif de ce mémoire était de valider des interacteurs potentiels de ER α identifiés par criblage par TurboID en présence de différents ligands et de mieux comprendre leur implication dans l'activité transcriptionnelle par ER α . Pour cela, nous avons confirmé la localisation de GATAD2B et AIP dans les cellules ZR-75-1 ainsi que leur colocalisation avec ER α en effectuant des co-IF. Nous avons ensuite observé la forte proximité et l'interaction entre ces protéines grâce à des PLA et des Co-IP. Puis, par CHIP.qPCR, nous avons confirmé que GATAD2B et AIP pouvaient être recrutées aux EREs de *GREB1*, et que ce recrutement était influencé par le traitement au

Fulvestrant. Finalement, nous avons observées que la répression de GATAD2B dans les ZR-75-1 entraînait une surexpression des gènes impliqués dans l'activité transcriptionnelle de ER α .

5.1 Avantages et désavantages du criblage par Turbo-ID pour l'identification de nouveaux interacteurs de ER α en présence de différents ligands

Tel que mentionné précédemment, la technique du TurboID pour les criblages est très avantageuse pour détecter les protéines de potentiels partenaires d'interaction de notre protéine d'intérêt dont l'interaction est faible ou transitoire. Ceci est notablement dû à la cinétique très élevée (15 min) de la réaction de biotinylation ainsi que de la forte stabilité des liens entre la biotine et la streptavidine. Un temps de traitement plus grand que 15 minutes permet d'obtenir un protéome plus vaste, mais ceci diminue la spécificité de la technique. Ceci serait probablement dû à la saturation des nucléophiles à proximité, ce qui permettrait à l'enzyme TurboID de se déplacer plus loin pour biotinyler de nouvelles cibles (113).

Malgré les nombreux avantages de cette technique, quelques facteurs sont à considérer dans le cas de l'identification de l'interactome de ER α par TurboID. Premièrement, le TurboID effectué par Dr. Dianati sur les ZR-75-1 a été fait dans le milieu de culture RPMI blanc. Ce milieu de culture contient de la biotine endogène. Ceci implique donc une biotinylation des protéines à proximité de l'enzyme tout le long que TurboID-ER α est exprimé. Ceci correspond donc à un temps de biotinylation plus grand que recommandé et risque d'entraîner l'obtention d'un plus grand protéome, mais moins spécifique. Ainsi, si ce criblage était à refaire, il faudrait considérer de changer le milieu de culture utilisé pour un milieu sans biotine, tel que le DMEM ou α MEM.

Un autre facteur important à considérer sont les résidus ciblés par la biotinylation. En effet, l'une des cibles principales de la biotinylation sont les groupements amines primaires de la chaîne latérale de la lysine. Les lysines sont également la cible de d'autres modifications post-traductionnelles, notamment de la sumoylation. Ceci est important puisque nous avons mentionné l'implication de la sumoylation dans l'antioestrogénécité du Fulvestrant. Tel que

mentionné, la sumoylation de ER α pourrait avoir un impact direct sur le recrutement des divers cofacteurs de ER α . Ainsi, la compétition entre la biotinylation et la sumoylation pour les résidus lysine de ER α est importante à prendre en compte car ces modifications pourraient avoir un impact sur l'interactome de ER α . Considérant que l'isoforme complet de ER α comporte environ 73 lysines, nous avons pris pour acquis que la biotinylation ne se fait pas sur 100% des résidus lysines de ER α et non plus sur 100% des protéines ER α exprimées, faisant en sorte que dans les cibles identifiées, nous avons également les interacteurs potentiels de ER α sumoylé, quoique peut-être en quantité moins importante.

1.2.1 Autre stratégie pour l'identification de l'interactome de ER α : RIME

Plusieurs méthodes de criblage pour l'identification de l'interactome des protéines d'intérêt existent. Nous avons ici utilisé une méthode d'étiquetage de proximité pour ER α . Malgré de nombreux avantages de ces méthodes, l'utilisation de protéines de fusion et de surexpression des enzymes et protéines d'intérêt entraîne toujours un risque de perturber le fonctionnement normal de la protéine ou de la cellule. Il pourrait donc être intéressant de comparer l'interactome obtenu avec la méthode du criblage par TurboID avec une autre méthode ne nécessitant pas l'usage de protéines de fusion ou de protéines exogènes.

Une technique récemment développée par l'équipe de Dr. Jason Carroll est la spectrométrie de masse à immunoprécipitation rapide de protéines endogènes (RIME, de l'anglais « *Rapid Immunoprecipitation Mass Spectrometry of Endogenous proteins* »). Le protocole de cette technique fut détaillé dans une publication de 2016. L'auteur principal, Hisham Mohammed, et ses collègues ont développés cette technique dans le but de mieux pouvoir identifier les complexes transcriptionnels et de protéines associées à la chromatine (171). Les principales étapes du RIME sont semblables à celles du ChIP, mais ce sont les protéines immunoprécipitées qui sont analysées plutôt que l'ADN.

La technique du RIME repose sur la purification par affinité d'une protéine d'intérêt via des anticorps couplés à des billes magnétiques. L'étude des protéines précipitées se fait par chromatographie liquide-spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), pour ensuite effectuer une analyse informatique des données. Le RIME devrait permettre d'identifier environ 300-900

interacteurs, dont 5-10% seraient spécifiques. De plus, l'exécution du RIME en parallèle d'un CHIP-seq permettrait de mieux comprendre la composition des complexes obtenus lors du CHIP-seq. Le RIME est avantageux pour différentes raisons. Premièrement, l'utilisation du formaldéhyde permet de détecter les interactions faibles et transitoires (171). Ceci est en partie dû à la petite taille de la molécule qui lui permet d'entrer facilement et rapidement dans la cellule sans manipulations externes. Il est également important de noter que l'action du formaldéhyde peut se faire sous des conditions physiologiquement normales, ce qui permet la détection des interactions protéines-protéines dans leur état naturel (172). De plus, la réaction réversible de la fixation avec le formaldéhyde permet d'obtenir moins de bruit de fond, une plus grande sensibilité et une petite quantité de matériel de départ. Finalement, cette technique, contrairement au TurboID, ne nécessite pas de bioingénierie des protéines étudiées, ce qui limite les chances d'avoir notre protéine d'intérêt dans un état non naturel. La technique du RIME possède également ses propres limitations, la principale étant que l'efficacité de la technique repose sur une haute spécificité et affinité des anticorps pour la protéine étudiée. Des essais peuvent être nécessaires afin de trouver l'anticorps adéquat et les conditions optimales (171).

Cette technique a d'ailleurs permis d'identifier de nouveaux interacteurs de ER α , tel que GREB1, et a montré que GREB1 recrutait ER α à la chromatine et stabilisait son association avec ses cofacteurs (173). Le RIME peut donc être utilisé en comparaison au TurboID. Nous pourrions comparer si nos protéines identifiées, GATAD2B et AIP, sont également des cibles obtenues par cette sorte de criblage. De plus, il serait intéressant de comparer si d'autres composantes des complexes dans lesquels ces protéines sont connues comme étant des sous-unités, tel que le complexe NuRD pour GATAD2B et le complexe AhR pour AIP. Il est à rappeler que le TurboID avait également identifié quelques sous-unités de ces complexes (NuRD : GATAD2B, GATAD2A, HDAC1, HDAC2, RBBP4 et AhR : AIP et Arnt). Ces cibles identifiées étaient intéressantes puisque des signalisations croisées entre ces complexes et ER α sont connues.

5.2 Résumé et limitations de nos observations de l'interaction entre GATAD2B ou AIP et ER α

À la suite du criblage par TurboID permettant d'obtenir de potentiels nouveaux interacteurs de ER α , nous avons voulu mieux comprendre la relation entre ER α et GATAD2B ou AIP dans les cellules du cancer du sein ER+. Nous avons donc commencé par valider que ces protéines colocalisaient (IF) et étaient en proximité (PLA) dans les cellules. Ensuite, nous avons confirmé l'interaction de nos protéines avec ER α par « *pull-down assay* » et par Co-IP. Nous avons ensuite observé le recrutement de GATAD2B et AIP au promoteur de *GREB1*. Finalement, nous avons inhibé l'expression de GATAD2B dans les ZR-75-1 pour voir l'impact de GATAD2B dans la signalisation de ER α .

5.2.1 Colocalisation et proximité de GATAD2B ou AIP avec ER α dans les noyaux des cellules tumorales du cancer du sein

La colocalisation et la proximité de GATAD2B et de ER α observée grâce au co-IF et au PLA dans les noyaux des ZR-75-1 étaient attendues puisque ces deux protéines sont de protéines nucléaires et sont exprimées dans les ZR-75-1. Pour ce qui est de AIP, cette protéine est clairement plus exprimée dans le cytoplasme. La littérature ne permettait pas de déterminer si AIP pouvait également se retrouver dans le noyau, mais nos résultats le suggèrent. Ceci est intéressant car l'association de AIP avec des protéines nucléaires, tel que AhR ou ER α , pourrait jouer un rôle dans leur signalisation. Ceci est d'autant plus intéressant puisque l'association entre AIP et d'autres récepteurs stéroïdiens était connu, et qu'il semblait y avoir un rôle stimulateur et répresseur. Plusieurs contractions existent dans la littérature sur l'impact de AIP sur la signalisation de AhR ou encore de GR. Il avait été suggéré que les différences observées dans les rôles de AIP pouvaient dépendre du contexte cellulaire. Nos résultats montrent la proximité de AIP avec ER α dans le cytoplasme et dans le noyau avec, alors peut-être que la localisation de l'interaction entre AIP et ses partenaires peuvent médier son rôle. En effet, l'interaction entre AIP et GR ralentissait sa translocalisation du récepteur au noyau, ce qui ralentissait son activité transcriptionnelle. Toutefois, il n'avait pas été mentionné de si AIP se dissociait de GR avant que celui-ci atteigne le noyau. Il est intéressant de constater que, bien que non statistiquement significative, il y a une tendance dans l'intensité du signal obtenu dans la colocalisation nucléaire et dans la proximité de

AIP et ER α . Ainsi, il était attendu d'avoir un plus grand signal de localisation pour ER α en présence de E2, mais la localisation de AIP semble également augmenter légèrement dans le noyau lorsque les cellules sont traitées avec E2. Ceci laisse présager que AIP peut translocaliser dans le noyau, potentiellement en association avec ER α .

Il est difficile de conclure plus que ceci dans les essais de co-IF et PLA puisqu'en raison de limitation au niveau du temps et des ressources, nous n'avons que N=1. De plus, nous aurions pu obtenir plus d'information en utilisant d'autres marqueurs cellulaires que le DAPI pour la délimitation du noyau cellulaire. Nous obtenons beaucoup de signal extranucléaire, autant dans le co-IF que dans le PLA, mais nous ne pouvons déterminer si ceci est exclusivement le cytoplasme (ou d'autres compartiments cytoplasmiques), ou bien du bruit de fond obtenu également à l'extérieur des cellules. Un exemple serait l'utilisation d'anticorps anti-tubuline permettant de localiser les microtubules cytoplasmiques et ainsi de mieux identifier les délimitations de la cellule entière. L'utilisation en parallèle du DAPI et de l'anti-tubuline nous permettrait également de voir si l'expression et la localisation des protéines étudiées varient en fonction des différentes phases du cycle cellulaire et si ceci expliquerait la différence du signal obtenu entre les cellules d'une même acquisition d'image de microscopie. Ceci serait intéressant sachant que AhR peut réguler la progression du cycle cellulaire dans les MCF-7 en s'associant avec CDK4, bien que l'implication ou non de AIP n'est pas connue dans ce mécanisme (174).

5.2.2 Validation de l'interaction entre GATAD2B ou AIP et ER α dans les ZR-75-1

Nous avons tout d'abord utilisé la technique du « *pull down assay* » pour valider les résultats du criblage par TurboID. Ces résultats ont permis de déterminer que le signal que l'on obtenait dans la localisation nucléaire de AIP était bel et bien présent. En effet, non seulement nous obtenons un signal pour AIP dans le cytoplasme tel qu'attendu, mais également dans le noyau. Pour GATAD2B, nous obtenons un signal que lorsque ER α se retrouve dans le noyau. Toutefois, l'idée que cette technique permette de confirmer une interaction est débattue au sein de la communauté scientifique, certains disant qu'il s'agit plutôt d'une forte proximité puisqu'il y a toujours un risque de biotinylation de protéines en forte proximité, sans interaction, de ER α . Afin de solidifier nos résultats, nous avons validé l'interaction par Co-IP. Ainsi, l'interaction a bel et bien lieu entre GATAD2B ou AIP et ER α (de manière exogène avec ER α surexprimé dans les HEK-

293 ou de manière endogène dans les ZR-75-1). Ces techniques ne nous permettent toutefois pas de savoir s'il s'agit d'une interaction directe ou indirecte via l'interaction de d'autres sous-unités de leur complexe respectif. Ainsi, il serait intéressant de faire des co-IP en inhibant l'expression de d'autres sous-unités connus de leur complexe respectif (NuRD ou AhR).

Par exemple, GATAD2B est connu pour interagir avec MBD2 du complexe NuRD. MBD2 n'est pas une sous-unité permanente du complexe NuRD et son activité peut moduler le rôle de NuRD dans différents contextes. HDAC1 permettrait le recrutement de MBD2 dans le complexe NuRD et ceci est intéressant car HDAC1 était également une cible du criblage par TurboID. L'activité répressive de MBD2 nécessite la présence de l'un des paralogues GATAD2A ou GATAD2B. Le complexe NuRD comprenant HDAC1, MBD2 et GATAD2B en association avec ER α pourrait donc se lier aux promoteurs des gènes ciblés, induire des PTM des histones, altérer la structure de la chromatine et ainsi réguler l'expression des gènes ciblés de ER α . Nous pourrions donc effectuer d'autres co-IP en inhibant l'expression de HDAC1 ou MBD2 et voir si nous obtenons toujours un signal pour l'interaction entre GATAD2B et ER α . La composition du complexe NuRD avec ER α peut aider à mieux comprendre sa fonction ainsi que son mécanisme d'action.

Pour le complexe AhR, il serait intéressant de savoir si l'interaction de AIP avec ER α a un rôle à jouer dans la signalisation croisée avec AhR et Arnt. Ainsi, nous pourrions faire un Co-IP avec AhR puisque cette protéine interagit avec AIP dans le cytoplasme et possiblement dans le noyau. Il serait également intéressant de faire le co-IP avec Arnt, car une exclusion et une compétition entre Arnt et AIP pourrait exister, autant dans la signalisation de AhR que celle de ER α . Finalement, la protéine chaperonne Hsp90 est connue pour interagir avec AIP dans le complexe AhR, mais fait également partie du complexe inactivateur de ER α . Ainsi, nous pourrions inclure cette protéine dans nos expérimentations futures, car elle pourrait faire partie du complexe. Ces expériences nous permettraient de mieux illustrer la composition du complexe impliquant ER α et AIP.

Finalement, une limitation de nos expériences de co-IP seraient que nous utilisons la totalité du lysat cellulaire pour la précipitation de nos protéines d'intérêt. Ceci fait en sorte que nous ne pouvons pas conclure sur la localisation de l'interaction que nous observons. Les expériences de

« *pull-down assay* » avec les protéines de fusion TurboID-ER α suggèrent que l'interaction de GATAD2B et ER α a lieu exclusivement dans le noyau alors qu'elle peut aussi avoir lieu dans le cytoplasme pour AIP. Pour y remédier, nous pourrions effectuer un fractionnement cellulaire par ultracentrifugation différentielle pour séparer l'extrait protéique des divers compartiments cellulaires et faire les co-IP avec les différentes fractions cellulaires.

5.3 Fonctions de l'interaction entre GATAD2B ou AIP et ER α – Observations préliminaires

La suite logique de notre étude sur l'identification de nouveaux interacteurs est d'en apprendre davantage sur leur implication dans la signalisation de ER α en effectuant des tests supplémentaires. Ainsi, autant pour AIP que GATAD2B, nous avons procédé à une analyse du recrutement de nos protéines cibles au ERE situés dans le promoteur de *GREB1* par ChIP-qPCR dans les cellules ER+ ZR-75-1. Ce gène est important dans la signalisation précoce par ER α en plus de stabiliser le récepteur à la chromatine et faciliter le recrutement de cofacteurs. Pour GATAD2B, nous avons procédé à un RNA-seq dans les ZR-75-1 en comparant les cellules normales à aux cellules où l'expression de GATAD2B était inhibé par siARN.

5.3.1 Fonction de l'interaction ER α -GATAD2B au sein du complexe NuRD

Nos analyses par ChIP-qPCR ont démontré qu'en plus d'interagir avec ER α , GATAD2B pouvait être recruté aux EREs situés dans la région du promoteur de *GREB1*. De plus, le patron de liaison de GATAD2B en fonction des ligands (E2 vs Fulv) ressemble à celui que l'on observe généralement pour les corépresseurs, comme il est observé avec NCoR. Ainsi, ceci laisse présager que le complexe NuRD pourrait être recruté aux gènes cibles de ER α , notamment en présence d'antagonistes, possiblement pour exercer une répression de l'activité transcriptionnelle de ER α .

Ces expériences sont intéressantes, car il a été observé que NCoR et NuRD pouvaient être recrutés de manière séquentiel aux promoteurs de gènes ciblés par ER α en présence de Tamoxifène. En effet, le traitement des MCF-7 avec le Tamoxifène entraîne un recrutement rapide de ER α aux EREs situés dans les gènes *PS2* et *c-myc*. Le complexe ER α -Tamoxifène permettrait d'abord le

recrutement de NCoR, entraînant la modification des histones, notamment de H3. Ensuite, NuRD serait recruté à son tour, et la sous-unité HDAC1 serait présente dans cette version du complexe répresseur, mais pas MBD2. Ainsi, NuRD serait impliqué dans la répression transcriptionnelle observée dans les cellules traitées avec le Tamoxifène (92). Il a été suggéré que la désacétylation de la lysine 9 de H3 par des HDAC, tel que NCoR, permettait sa méthylation subséquente. La sous-unité CHD3 du complexe NuRD comprend un chromodomaine qui lui permet de reconnaître les queues des histones méthylées, ainsi que MBD2 qui peut cibler l'ADN méthylé (175,176). Il a également été observé que CDH3 pouvait reconnaître les protéines sumoylées. Sachant que GATAD2B est connu pour interagir avec HDAC1 et MBD2 et que le Fulvestrant entraîne la sumoylation de ER α , un complexe NuRD comprenant HDAC1, CDH3/CDH4, MBD2 et GATAD2B pourrait avoir un rôle à jouer dans l'antiœstrogénicité du Fulvestrant. Afin de confirmer si le recrutement de GATAD2B aux EREs de *GREB1* en présence de Fulvestrant mène à une répression de l'activité transcriptionnelle, nous pourrions effectuer des essais d'activité de la luciférase en étudiant le promoteur de gène ciblé par ER α modifié pour comprendre 3xERE.

Finalement, l'analyse par RNAseq a permis d'observer que l'inhibition de GATAD2B menait à la surexpression de groupes de gènes impliqués dans la signalisation par ER α . Ceci suggère que GATAD2B, et possiblement le complexe NuRD, entraîne effectivement une répression de l'activité transcriptionnelle de ER α . En raison de limitations au niveau du temps et des ressources, nous n'avons pu effectuer ces expériences qu'avec les cellules ZR-75-1 sans traitement. Il serait donc intéressant de répéter le RNA-seq dans les cellules traitées avec E2 ou le Fulvestrant. Ceci nous permettrait possiblement d'identifier plus spécifiquement l'impact de GATAD2B sur l'ensemble des gènes impliqués dans la signalisation par ER α en fonction des ligands. Ainsi, nos travaux suggèrent que l'interaction entre GATAD2B et ER α mène à une répression transcriptionnelle de ER α . Cette répression pourrait être plus importante en présence d'antagonistes, tel que le Fulvestrant.

Nous avons donc schématisé (Figure 28) nos hypothèses préliminaires quant à la fonction potentielle de GATAD2B dans la signalisation par ER α . Les mécanismes d'action ainsi que les autres interacteurs impliqués dans ces voies de signalisation restent à être validés. De plus, il est important de rappeler que le paralogue de GATAD2B, soit GATAD2A, pourrait également faire

parti de ce complexe. Tel que mentionné précédemment, la littérature ne permet pas de déterminer clairement si GATAD2A et GATAD2B sont interchangeables ou présentes au sein d'un même complexe NuRD, mais il a été proposé qu'une action synergique pouvait exister entre ces deux paralogues pour augmenter l'activité répressive de MBD2 dans le complexe NuRD. Ainsi, le modèle suivant se concentre sur GATAD2B, mais il serait intéressant dans de futures expériences de travailler en parallèle avec GATAD2A.

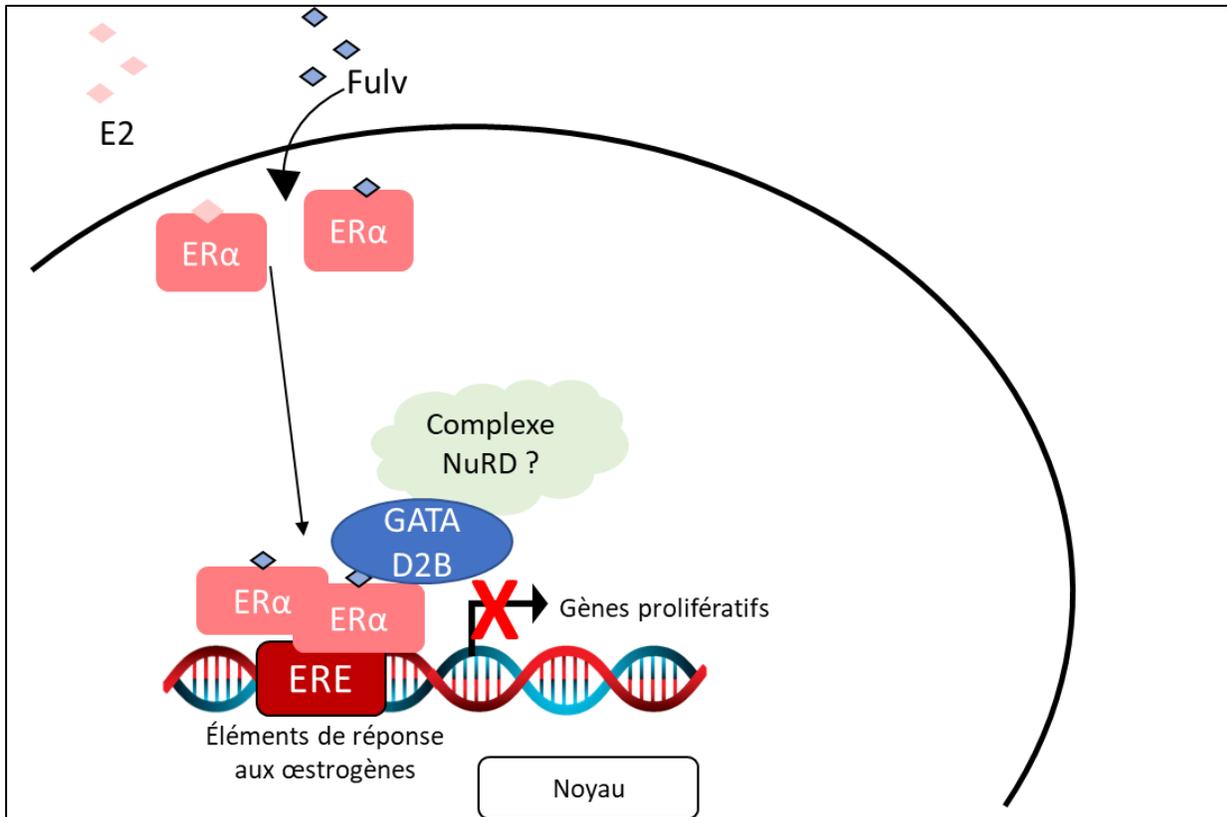


Figure 28. Schéma hypothétique de la fonction de l'interaction entre ER α et GATAD2B sur l'activité transcriptionnelle de ER α dans les cellules du cancer du sein. Selon nos résultats préliminaires, GATAD2B et ER α peuvent interagir ensemble dans le noyau des cellules ZR-75-1. GATAD2B est également recruté au promoteur de *GREB1*, un gène cible de ER α , selon un patron de liaison d'un répresseur. GATAD2B serait en complexe avec d'autres sous-unités du complexe NuRD telles que HDAC1, MBD2 et CDH3, et exercerait une répression transcriptionnelle des gènes ciblés dans la voie de signalisation de ER α .

5.3.2 Fonction de l'interaction ER α -AIP dans les ZR-75-1

L'interaction observée entre AIP et ER α était plus attendue dans le cytoplasme que dans le noyau des cellules. En effet, bien qu'AIP est qualifiée de protéine cytoplasmique, et que la littérature

parle majoritairement de ses interactions avec d'autres récepteurs dans le cytoplasme, l'idée de sa localisation nucléaire n'était pas éliminée. Nos analyses par CHIP-qPCR ont démontrées qu'en plus d'interagir avec ER α dans le cytoplasme, AIP pouvait être recruté aux EREs situés dans la région du promoteur de *GREB1*, ce qui renforce nos observations d'interaction nucléaire. De plus, le patron de liaison de AIP en fonction des ligands (E2 vs Fulv) ressemble à celui que l'on observe généralement pour les coactivateurs, comme il est observé avec p300. Ainsi, il serait intéressant de savoir si l'interaction entre AIP et ER α dans le cytoplasme et le noyau fait partie de la même voie de signalisation. Par exemple, il serait possible que l'interaction dans le cytoplasme ralentisse la translocalisation de ER α vers le noyau, ou encore, que AIP protège ER α d'ubiquitination ou d'autres PTM, tel qu'il a été observé avec AhR et GR. Toutefois, nos expériences ne semblent pas démontrer que AIP a un effet protecteur dans le cytoplasme puisque son inhibition par siARN ne semble pas avoir d'impact sur le niveau d'expression de ER α dans les ZR-75-1. De plus, sachant que les dimères Arnt : AhR sont connus comme pouvant être recrutés avec ER α aux gènes ciblés par ER α en fonction des ligands, il serait intéressant de savoir si AIP joue également un rôle dans cette signalisation croisée du complexe AhR et ER α . Le rôle de AIP au sein même du complexe AhR est encore débattu. À ce stade-ci, il serait pertinent de déterminer s'il existe une compétition entre l'interaction observée avec AIP et ER α et Arnt : AhR et ER α . De plus, on ne peut pas exclure que le recrutement de AIP aux EREs de *GREB1* soit fait de manière indépendante de ER α . Des expériences de CHIP-reCHIP nous permettrait de mieux comprendre si les deux protéines sont toujours en interaction lorsque AIP est observé au promoteur de *GREB1*.

Finalement, plus d'expériences sont nécessaires afin de mieux comprendre la nature de l'interaction entre AIP et ER α . Les contradictions dans la littérature ne permettent pas d'émettre des hypothèses sur le rôle à jouer de AIP. Il serait donc pertinent de faire des RNA-seq tel qu'il a été fait avec GATAD2B afin d'identifier des ensembles de gènes pouvant être régulés par AIP. Pour conclure, il serait également intéressant de faire un ChIPseq pour observer le patron de liaison à l'échelle du génome entier de nos protéines d'intérêt et voir à quels autres gènes ciblés par ER α ils seraient recrutés.

Conclusion

Pour conclure, nos travaux ont permis de valider l'interaction entre GATAD2B ou AIP et ER α observée lors du criblage par TurboID dans les ZR-75-1. Nous avons d'abord validé la colocalisation et la forte proximité entre ces protéines par co-IF et PLA. Nous avons ensuite testé l'interaction par co-IP. Tel qu'attendu, GATAD2B peut interagir avec ER α dans le noyau cellulaire, alors qu'AIP peut interagir avec ER α dans le cytoplasme, mais, de manière plus surprenante, aussi dans le noyau. Ces résultats sont renforcés par les observations résultant de nos analyses par CHIP-qPCR qui démontrent le recrutement de nos protéines d'intérêt aux EREs du gène cible de ER α , *GREB1*. La littérature et nos résultats de RNAseq suggèrent que GATAD2B pourrait agir comme corépresseur en étant en complexe avec plusieurs sous-unités du complexe NuRD pour exercer une répression transcriptionnelle de ER α , possiblement en modifiant l'état de la chromatine au niveau des gènes régulés. Cette répression pourrait d'ailleurs être stimulé par la présence d'antagoniste, tel que le Fulvestrant. La fonction de l'interaction entre AIP et ER α est moins évidente et plus d'expériences sont nécessaires afin de conclure le rôle de AIP comme cofacteur de ER α . Finalement, nos travaux ont permis d'en apprendre plus sur les cofacteurs de ER α , principalement sur la répression de l'activité transcriptionnelle par GATAD2B et le complexe NuRD.

Références bibliographiques

1. Canada, S. Table 13-10-0394-01 Leading causes of death, total population, by age group.
2. Brenner, D.R., Weir, H.K., Demers, A.A., Ellison, L.F., Louzado, C., Shaw, A., Turner, D., Woods, R.R., Smith, L.M. and Canadian Cancer Statistics Advisory, C. (2020) Projected estimates of cancer in Canada in 2020. *CMAJ*, **192**, E199-E205.
3. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
4. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646-674.
5. Wang, F., Shu, X., Meszoely, I., Pal, T., Mayer, I.A., Yu, Z., Zheng, W., Bailey, C.E. and Shu, X.O. (2019) Overall Mortality After Diagnosis of Breast Cancer in Men vs Women. *JAMA Oncol*, **5**, 1589-1596.
6. Sun, Y.S., Zhao, Z., Yang, Z.N., Xu, F., Lu, H.J., Zhu, Z.Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P.P. and Zhu, H.P. (2017) Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*, **13**, 1387-1397.
7. Canadian Cancer Statistics Advisory, C. (2019) In Society, C. C. (ed.), Toronto, ON.
8. Rozhok, A.I. and DeGregori, J. (2016) The evolution of lifespan and age-dependent cancer risk. *Trends Cancer*, **2**, 552-560.
9. Takeshima, H. and Ushijima, T. (2019) Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk. *NPJ Precis Oncol*, **3**, 7.
10. Yoshida, K. and Miki, Y. (2004) Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci*, **95**, 866-871.
11. Tsang, J.Y.S. and Tse, G.M. (2020) Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol*, **27**, 27-35.
12. Sims, A.H., Howell, A., Howell, S.J. and Clarke, R.B. (2007) Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Oncol*, **4**, 516-525.
13. Hammond, M.E., Hayes, D.F., Wolff, A.C., Mangu, P.B. and Temin, S. (2010) American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract*, **6**, 195-197.
14. Oh, D.Y. and Bang, Y.J. (2020) HER2-targeted therapies - a role beyond breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, **17**, 33-48.
15. Stocker, A., Hilbers, M.L., Gauthier, C., Grogg, J., Kullak-Ublick, G.A., Seifert, B., Varga, Z. and Trojan, A. (2016) HER2/CEP17 Ratios and Clinical Outcome in HER2-Positive Early Breast Cancer Undergoing Trastuzumab-Containing Therapy. *PLoS One*, **11**, e0159176.
16. Yam, C., Mani, S.A. and Moulder, S.L. (2017) Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field. *Oncologist*, **22**, 1086-1093.
17. Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslén, L.A. *et al.* (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, **406**, 747-752.

18. Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z. *et al.* (2009) Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*, **27**, 1160-1167.
19. Cancer Genome Atlas, N. (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, **490**, 61-70.
20. Arteaga, C.L. (2003) Trastuzumab, an appropriate first-line single-agent therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*, **5**, 96-100.
21. Pellacani, D., Tan, S., Lefort, S. and Eaves, C.J. (2019) Transcriptional regulation of normal human mammary cell heterogeneity and its perturbation in breast cancer. *EMBO J*, **38**, e100330.
22. Carson-Jurica, M.A., Schrader, W.T. and O'Malley, B.W. (1990) Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev*, **11**, 201-220.
23. Shibata, H., Spencer, T.E., Onate, S.A., Jenster, G., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1997) Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res*, **52**, 141-164; discussion 164-145.
24. Guerriero, G. (2009) Vertebrate sex steroid receptors: evolution, ligands, and neurodistribution. *Ann N Y Acad Sci*, **1163**, 154-168.
25. Tata, J.R. (2005) One hundred years of hormones. *EMBO Rep*, **6**, 490-496.
26. Marrian, G.F. (1930) The chemistry of oestrin: The chemical nature of crystalline preparations. *Biochem J*, **24**, 1021-1030.
27. Hagen, A.A., Barr, M. and Diczfalusy, E. (1965) Metabolism of 17-Beta-Oestradiol-4-14-C in Early Infancy. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **49**, 207-220.
28. Havelock, J.C., Rainey, W.E. and Carr, B.R. (2004) Ovarian granulosa cell lines. *Mol Cell Endocrinol*, **228**, 67-78.
29. Cui, J., Shen, Y. and Li, R. (2013) Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med*, **19**, 197-209.
30. Brisken, C. and O'Malley, B. (2010) Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**, a003178.
31. Chou, C.H. and Chen, M.J. (2018) The Effect of Steroid Hormones on Ovarian Follicle Development. *Vitam Horm*, **107**, 155-175.
32. Ikeda, K., Horie-Inoue, K. and Inoue, S. (2019) Functions of estrogen and estrogen receptor signaling on skeletal muscle. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **191**, 105375.
33. Iorga, A., Cunningham, C.M., Moazeni, S., Ruffenach, G., Umar, S. and Eghbali, M. (2017) The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. *Biol Sex Differ*, **8**, 33.
34. Jensen, E.V., Desombre, E.R., Kawashima, T., Suzuki, T., Kyser, K. and Jungblut, P.W. (1967) Estrogen-binding substances of target tissues. *Science*, **158**, 529-530.
35. Karlson, P. (1963) New concepts on the mode of action of hormones. *Perspect Biol Med*, **6**, 203-214.
36. Weinberger, C., Hollenberg, S.M., Ong, E.S., Harmon, J.M., Brower, S.T., Cidlowski, J., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M. (1985) Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection. *Science*, **228**, 740-742.

37. Green, S., Walter, P., Greene, G., Krust, A., Goffin, C., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M. and Chambon, P. (1986) Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem*, **24**, 77-83.
38. Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y. and Shine, J. (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, **231**, 1150-1154.
39. Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J.A. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5925-5930.
40. Gosden, J.R., Middleton, P.G. and Rout, D. (1986) Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24---q27 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, **43**, 218-220.
41. Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M. and Gustafsson, J.A. (1997) Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**, 4258-4265.
42. Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B. and Prossnitz, E.R. (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, **307**, 1625-1630.
43. Cagnet, S., Ataca, D., Sflomos, G., Aouad, P., Schuepbach-Mallepell, S., Hugues, H., Krust, A., Ayyanan, A., Scabia, V. and Brisken, C. (2018) Oestrogen receptor alpha AF-1 and AF-2 domains have cell population-specific functions in the mammary epithelium. *Nat Commun*, **9**, 4723.
44. Mader, S., Chambon, P. and White, J.H. (1993) Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucleic Acids Res*, **21**, 1125-1132.
45. Mader, S., Kumar, V., de Verneuil, H. and Chambon, P. (1989) Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature*, **338**, 271-274.
46. Schwabe, J.W., Chapman, L., Finch, J.T. and Rhodes, D. (1993) The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*, **75**, 567-578.
47. Ylikomi, T., Bocquel, M.T., Berry, M., Gronemeyer, H. and Chambon, P. (1992) Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J*, **11**, 3681-3694.
48. Zwart, W., de Leeuw, R., Rondaij, M., Neefjes, J., Mancini, M.A. and Michalides, R. (2010) The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *J Cell Sci*, **123**, 1253-1261.
49. Barone, I., Brusco, L. and Fuqua, S.A. (2010) Estrogen receptor mutations and changes in downstream gene expression and signaling. *Clin Cancer Res*, **16**, 2702-2708.
50. Kim, M.Y., Woo, E.M., Chong, Y.T., Homenko, D.R. and Kraus, W.L. (2006) Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Mol Endocrinol*, **20**, 1479-1493.

51. Ng, H.W., Zhang, W., Shu, M., Luo, H., Ge, W., Perkins, R., Tong, W. and Hong, H. (2014) Competitive molecular docking approach for predicting estrogen receptor subtype alpha agonists and antagonists. *BMC Bioinformatics*, **15 Suppl 11**, S4.
52. Edwards, D.P. (2000) The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **5**, 307-324.
53. Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A. and Carlquist, M. (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, **389**, 753-758.
54. Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V. and Gannon, F. (2000) Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J*, **19**, 4688-4700.
55. Maaroufi, Y., Lacroix, M., Lespagnard, L., Journe, F., Larsimont, D. and Leclercq, G. (2000) Estrogen receptor of primary breast cancers: evidence for intracellular proteolysis. *Breast Cancer Res*, **2**, 444-454.
56. Barraille, P., Chinestra, P., Bayard, F. and Faye, J.C. (1999) Alternative initiation of translation accounts for a 67/45 kDa dimorphism of the human estrogen receptor ERalpha. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 84-88.
57. Porras, L., Ismail, H. and Mader, S. (2021) Positive Regulation of Estrogen Receptor Alpha in Breast Tumorigenesis. *Cells*, **10**.
58. Zhang, X., Deng, H. and Wang, Z.Y. (2014) Estrogen activation of the mitogen-activated protein kinase is mediated by ER-alpha36 in ER-positive breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **143**, 434-443.
59. Marino, M., Galluzzo, P. and Ascenzi, P. (2006) Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics*, **7**, 497-508.
60. Chantalat, E., Boudou, F., Laurell, H., Paliierne, G., Houtman, R., Melchers, D., Rochaix, P., Filleron, T., Stella, A., Burlet-Schiltz, O. *et al.* (2016) The AF-1-deficient estrogen receptor ERalpha46 isoform is frequently expressed in human breast tumors. *Breast Cancer Res*, **18**, 123.
61. Vrtacnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrac, S. and Marc, J. (2014) The many faces of estrogen signaling. *Biochem Med (Zagreb)*, **24**, 329-342.
62. Furth, P.A. (2014) STAT signaling in different breast cancer sub-types. *Mol Cell Endocrinol*, **382**, 612-615.
63. Improta-Brears, T., Whorton, A.R., Codazzi, F., York, J.D., Meyer, T. and McDonnell, D.P. (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4686-4691.
64. Fuentes, N. and Silveyra, P. (2019) Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol*, **116**, 135-170.
65. O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K. and Hansen, U. (2004) Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol*, **18**, 1859-1875.
66. Li, C., Briggs, M.R., Ahlborn, T.E., Kraemer, F.B. and Liu, J. (2001) Requirement of Sp1 and estrogen receptor alpha interaction in 17beta-estradiol-mediated transcriptional

- activation of the low density lipoprotein receptor gene expression. *Endocrinology*, **142**, 1546-1553.
67. Blobel, G.A. and Orkin, S.H. (1996) Estrogen-induced apoptosis by inhibition of the erythroid transcription factor GATA-1. *Mol Cell Biol*, **16**, 1687-1694.
 68. Bourdeau, V., Deschenes, J., Metivier, R., Nagai, Y., Nguyen, D., Bretschneider, N., Gannon, F., White, J.H. and Mader, S. (2004) Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol*, **18**, 1411-1427.
 69. Carroll, J.S. and Brown, M. (2006) Estrogen receptor target gene: an evolving concept. *Mol Endocrinol*, **20**, 1707-1714.
 70. Tamaru, H. (2010) Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crosses the line. *Genes Dev.*, **24**, 1465-1478.
 71. Pipkin, M.E. and Lichtenheld, M.G. (2006) A reliable method to display authentic DNase I hypersensitive sites at long-ranges in single-copy genes from large genomes. *Nucleic Acids Res.*, **34**, e34.
 72. Cirillo, L.A., Lin, F.R., Cuesta, I., Friedman, D., Jarnik, M. and Zaret, K.S. (2002) Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol. Cell*, **9**, 279-289.
 73. Nakshatri, H. and Badve, S. (2007) FOXA1 as a therapeutic target for breast cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*, **11**, 507-514.
 74. Deschenes, J., Bourdeau, V., White, J.H. and Mader, S. (2007) Regulation of GREB1 transcription by estrogen receptor alpha through a multipartite enhancer spread over 20 kb of upstream flanking sequences. *J Biol Chem*, **282**, 17335-17339.
 75. Haines, C.N., Klingensmith, H.D., Komara, M. and Burd, C.J. (2020) GREB1 regulates PI3K/Akt signaling to control hormone-sensitive breast cancer proliferation. *Carcinogenesis*, **41**, 1660-1670.
 76. Ross-Innes, C.S., Stark, R., Teschendorff, A.E., Holmes, K.A., Ali, H.R., Dunning, M.J., Brown, G.D., Gojis, O., Ellis, I.O., Green, A.R. *et al.* (2012) Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature*, **481**, 389-393.
 77. Carroll, J.S., Meyer, C.A., Song, J., Li, W., Geistlinger, T.R., Eeckhoute, J., Brodsky, A.S., Keeton, E.K., Fertuck, K.C., Hall, G.F. *et al.* (2006) Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet*, **38**, 1289-1297.
 78. Welboren, W.J., van Driel, M.A., Janssen-Megens, E.M., van Heeringen, S.J., Sweep, F.C., Span, P.N. and Stunnenberg, H.G. (2009) CHIP-Seq of ERalpha and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands. *EMBO J*, **28**, 1418-1428.
 79. Li, L., Deng, C.X. and Chen, Q. (2021) SRC-3, a Steroid Receptor Coactivator: Implication in Cancer. *Int J Mol Sci*, **22**.
 80. Lanz, R.B., Bulynko, Y., Malovannaya, A., Labhart, P., Wang, L., Li, W., Qin, J., Harper, M. and O'Malley, B.W. (2010) Global characterization of transcriptional impact of the SRC-3 coregulator. *Mol Endocrinol*, **24**, 859-872.
 81. Johnson, A.B. and O'Malley, B.W. (2012) Steroid receptor coactivators 1, 2, and 3: critical regulators of nuclear receptor activity and steroid receptor modulator (SRM)-based cancer therapy. *Mol Cell Endocrinol*, **348**, 430-439.

82. Kraus, W.L. and Kadonaga, J.T. (1998) p300 and estrogen receptor cooperatively activate transcription via differential enhancement of initiation and reinitiation. *Genes Dev*, **12**, 331-342.
83. Farcas, A.M., Nagarajan, S., Cosulich, S. and Carroll, J.S. (2021) Genome-Wide Estrogen Receptor Activity in Breast Cancer. *Endocrinology*, **162**.
84. Oberoi, J., Fairall, L., Watson, P.J., Yang, J.C., Czimmerer, Z., Kampmann, T., Goult, B.T., Greenwood, J.A., Gooch, J.T., Kallenberger, B.C. *et al.* (2011) Structural basis for the assembly of the SMRT/NCoR core transcriptional repression machinery. *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 177-184.
85. Varlakhanova, N., Snyder, C., Jose, S., Hahm, J.B. and Privalsky, M.L. (2010) Estrogen receptors recruit SMRT and N-CoR corepressors through newly recognized contacts between the corepressor N terminus and the receptor DNA binding domain. *Mol Cell Biol*, **30**, 1434-1445.
86. Hu, X. and Lazar, M.A. (1999) The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature*, **402**, 93-96.
87. Josephy, P.D. (1997) Re: Feigelson, H.S. and Henderson, B.E. (1996) Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis*, **17**, 2279-2284. *Carcinogenesis*, **18**, 1859-1860.
88. Feigelson, H.S. and Henderson, B.E. (1996) Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis*, **17**, 2279-2284.
89. Fisher, B., Costantino, J.P., Wickerham, D.L., Redmond, C.K., Kavanah, M., Cronin, W.M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J. *et al.* (1998) Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 1371-1388.
90. Bocchinfuso, W.P. and Korach, K.S. (1997) Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **2**, 323-334.
91. Traboulsi, T., El Ezzy, M., Gleason, J.L. and Mader, S. (2017) Antiestrogens: structure-activity relationships and use in breast cancer treatment. *J Mol Endocrinol*, **58**, R15-R31.
92. Liu, X.F. and Bagchi, M.K. (2004) Recruitment of distinct chromatin-modifying complexes by tamoxifen-complexed estrogen receptor at natural target gene promoters in vivo. *J Biol Chem*, **279**, 15050-15058.
93. Lavinsky, R.M., Jepsen, K., Heinzl, T., Torchia, J., Mullen, T.M., Schiff, R., Del-Rio, A.L., Ricote, M., Ngo, S., Gemsch, J. *et al.* (1998) Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2920-2925.
94. Keeton, E.K. and Brown, M. (2005) Cell cycle progression stimulated by tamoxifen-bound estrogen receptor-alpha and promoter-specific effects in breast cancer cells deficient in N-CoR and SMRT. *Mol Endocrinol*, **19**, 1543-1554.
95. Jordan, V.C. (2004) Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer Cell*, **5**, 207-213.
96. Powles, T.J., Hickish, T., Kanis, J.A., Tidy, A. and Ashley, S. (1996) Effect of tamoxifen on bone mineral density measured by dual-energy x-ray absorptiometry in healthy premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Oncol*, **14**, 78-84.

97. Korach, K.S. (1994) Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science*, **266**, 1524-1527.
98. Hu, R., Hilakivi-Clarke, L. and Clarke, R. (2015) Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer (Review). *Oncol Lett*, **9**, 1495-1501.
99. Shang, Y. and Brown, M. (2002) Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science*, **295**, 2465-2468.
100. Romano, A., Adriaens, M., Kuenen, S., Delvoux, B., Dunselman, G., Evelo, C. and Groothuis, P. (2010) Identification of novel ER-alpha target genes in breast cancer cells: gene- and cell-selective co-regulator recruitment at target promoters determines the response to 17beta-estradiol and tamoxifen. *Mol Cell Endocrinol*, **314**, 90-100.
101. Martinkovich, S., Shah, D., Planey, S.L. and Arnott, J.A. (2014) Selective estrogen receptor modulators: tissue specificity and clinical utility. *Clin Interv Aging*, **9**, 1437-1452.
102. Chang, M. (2012) Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomol Ther (Seoul)*, **20**, 256-267.
103. Hilmi, K., Hussein, N., Mendoza-Sanchez, R., El-Ezzy, M., Ismail, H., Durette, C., Bail, M., Rozendaal, M.J., Bouvier, M., Thibault, P. *et al.* (2012) Role of SUMOylation in full antiestrogenicity. *Mol Cell Biol*, **32**, 3823-3837.
104. McDonnell, D.P. and Wardell, S.E. (2010) The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of ER modulators: implications for new drug discovery in breast cancer. *Curr Opin Pharmacol*, **10**, 620-628.
105. Chen, D., Pace, P.E., Coombes, R.C. and Ali, S. (1999) Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol*, **19**, 1002-1015.
106. Wijayaratne, A.L. and McDonnell, D.P. (2001) The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J Biol Chem*, **276**, 35684-35692.
107. Reid, G., Hubner, M.R., Metivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J. and Gannon, F. (2003) Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell*, **11**, 695-707.
108. Wardell, S.E., Marks, J.R. and McDonnell, D.P. (2011) The turnover of estrogen receptor alpha by the selective estrogen receptor degrader (SERD) fulvestrant is a saturable process that is not required for antagonist efficacy. *Biochem Pharmacol*, **82**, 122-130.
109. Traboulsi, T., El Ezzy, M., Dumeaux, V., Audemard, E. and Mader, S. (2019) Role of SUMOylation in differential ERalpha transcriptional repression by tamoxifen and fulvestrant in breast cancer cells. *Oncogene*, **38**, 1019-1037.
110. Shih, H.M., Chang, C.C., Kuo, H.Y. and Lin, D.Y. (2007) Daxx mediates SUMO-dependent transcriptional control and subnuclear compartmentalization. *Biochem Soc Trans*, **35**, 1397-1400.
111. Long, X. and Nephew, K.P. (2006) Fulvestrant (ICI 182,780)-dependent interacting proteins mediate immobilization and degradation of estrogen receptor-alpha. *J Biol Chem*, **281**, 9607-9615.
112. Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M. and Burke, B. (2012) A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol*, **196**, 801-810.

113. Branon, T.C., Bosch, J.A., Sanchez, A.D., Udeshi, N.D., Svinkina, T., Carr, S.A., Feldman, J.L., Perrimon, N. and Ting, A.Y. (2018) Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol*, **36**, 880-887.
114. Dundas, C.M., Demonte, D. and Park, S. (2013) Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, **97**, 9343-9353.
115. Chapman-Smith, A. and Cronan, J.E., Jr. (1999) Molecular biology of biotin attachment to proteins. *J Nutr*, **129**, 477S-484S.
116. Choi-Rhee, E., Schulman, H. and Cronan, J.E. (2004) Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. *Protein Sci*, **13**, 3043-3050.
117. Cronan, J.E. (2005) Targeted and proximity-dependent promiscuous protein biotinylation by a mutant *Escherichia coli* biotin protein ligase. *J Nutr Biochem*, **16**, 416-418.
118. Uezu, A., Kanak, D.J., Bradshaw, T.W., Soderblom, E.J., Catavero, C.M., Burette, A.C., Weinberg, R.J. and Soderling, S.H. (2016) Identification of an elaborate complex mediating postsynaptic inhibition. *Science*, **353**, 1123-1129.
119. Wagner, M., Koslowski, M., Paret, C., Schmidt, M., Tureci, O. and Sahin, U. (2013) NCOA3 is a selective co-activator of estrogen receptor alpha-mediated transactivation of PLAC1 in MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer*, **13**, 570.
120. Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Cote, J. and Wang, W. (1998) NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell*, **2**, 851-861.
121. Torchy, M.P., Hamiche, A. and Klaholz, B.P. (2015) Structure and function insights into the NuRD chromatin remodeling complex. *Cell Mol Life Sci*, **72**, 2491-2507.
122. Goodarzi, A.A., Kurka, T. and Jeggo, P.A. (2011) KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response. *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 831-839.
123. Milazzo, G., Mercatelli, D., Di Muzio, G., Triboli, L., De Rosa, P., Perini, G. and Giorgi, F.M. (2020) Histone Deacetylases (HDACs): Evolution, Specificity, Role in Transcriptional Complexes, and Pharmacological Actionability. *Genes (Basel)*, **11**.
124. Zupkovitz, G., Tischler, J., Posch, M., Sadzak, I., Ramsauer, K., Egger, G., Grausenburger, R., Schweifer, N., Chiocca, S., Decker, T. *et al.* (2006) Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol*, **26**, 7913-7928.
125. Fujita, N., Jaye, D.L., Kajita, M., Geigerman, C., Moreno, C.S. and Wade, P.A. (2003) MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell*, **113**, 207-219.
126. Merika, M. and Orkin, S.H. (1993) DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol*, **13**, 3999-4010.
127. Watson, P.J., Fairall, L., Santos, G.M. and Schwabe, J.W. (2012) Structure of HDAC3 bound to co-repressor and inositol tetrakisphosphate. *Nature*, **481**, 335-340.
128. Lejon, S., Thong, S.Y., Murthy, A., AlQarni, S., Murzina, N.V., Blobel, G.A., Laue, E.D. and Mackay, J.P. (2011) Insights into association of the NuRD complex with FOG-1 from the crystal structure of an RbAp48.FOG-1 complex. *J Biol Chem*, **286**, 1196-1203.
129. Murzina, N.V., Pei, X.Y., Zhang, W., Sparkes, M., Vicente-Garcia, J., Pratap, J.V., McLaughlin, S.H., Ben-Shahar, T.R., Verreault, A., Luisi, B.F. *et al.* (2008) Structural basis

- for the recognition of histone H4 by the histone-chaperone RbAp46. *Structure*, **16**, 1077-1085.
130. Le Guezennec, X., Vermeulen, M., Brinkman, A.B., Hoeijmakers, W.A., Cohen, A., Lasonder, E. and Stunnenberg, H.G. (2006) MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties. *Mol Cell Biol*, **26**, 843-851.
 131. Feng, Q., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Zhang, Y. (2002) Identification and functional characterization of the p66/p68 components of the MeCP1 complex. *Mol Cell Biol*, **22**, 536-546.
 132. Brackertz, M., Gong, Z., Leers, J. and Renkawitz, R. (2006) p66alpha and p66beta of the Mi-2/NuRD complex mediate MBD2 and histone interaction. *Nucleic Acids Res*, **34**, 397-406.
 133. Denslow, S.A. and Wade, P.A. (2007) The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene*, **26**, 5433-5438.
 134. Gong, Z., Brackertz, M. and Renkawitz, R. (2006) SUMO modification enhances p66-mediated transcriptional repression of the Mi-2/NuRD complex. *Mol Cell Biol*, **26**, 4519-4528.
 135. Omichinski, J.G., Clore, G.M., Schaad, O., Felsenfeld, G., Trainor, C., Appella, E., Stahl, S.J. and Gronenborn, A.M. (1993) NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. *Science*, **261**, 438-446.
 136. Jin, S.G., Jiang, C.L., Rauch, T., Li, H. and Pfeifer, G.P. (2005) MBD3L2 interacts with MBD3 and components of the NuRD complex and can oppose MBD2-MeCP1-mediated methylation silencing. *J Biol Chem*, **280**, 12700-12709.
 137. Stoica, G.E., Franke, T.F., Wellstein, A., Morgan, E., Czubayko, F., List, H.J., Reiter, R., Martin, M.B. and Stoica, A. (2005) Heregulin-beta1 regulates the estrogen receptor-alpha gene expression and activity via the ErbB2/PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene*, **24**, 1964.
 138. Fu, J., Zhang, L., He, T., Xiao, X., Liu, X., Wang, L., Yang, L., Yang, M., Zhang, T., Chen, R. *et al.* (2012) TWIST represses estrogen receptor-alpha expression by recruiting the NuRD protein complex in breast cancer cells. *Int J Biol Sci*, **8**, 522-532.
 139. Moglich, A., Ayers, R.A. and Moffat, K. (2009) Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure*, **17**, 1282-1294.
 140. Baker, J.R., Sakoff, J.A. and McCluskey, A. (2020) The aryl hydrocarbon receptor (AhR) as a breast cancer drug target. *Med Res Rev*, **40**, 972-1001.
 141. Hankinson, O. (1979) Single-step selection of clones of a mouse hepatoma line deficient in aryl hydrocarbon hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 373-376.
 142. Denison, M.S. and Nagy, S.R. (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **43**, 309-334.
 143. Kawajiri, K. and Fujii-Kuriyama, Y. (2017) The aryl hydrocarbon receptor: a multifunctional chemical sensor for host defense and homeostatic maintenance. *Exp Anim*, **66**, 75-89.
 144. Esser, C. (2016) The Aryl Hydrocarbon Receptor in Immunity: Tools and Potential. *Methods Mol Biol*, **1371**, 239-257.
 145. Kewley, R.J., Whitelaw, M.L. and Chapman-Smith, A. (2004) The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 189-204.

146. Meyer, B.K., Pray-Grant, M.G., Vanden Heuvel, J.P. and Perdew, G.H. (1998) Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol*, **18**, 978-988.
147. Carver, L.A. and Bradfield, C.A. (1997) Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem*, **272**, 11452-11456.
148. Kazlauskas, A., Poellinger, L. and Pongratz, I. (1999) Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem*, **274**, 13519-13524.
149. Ma, Q. and Whitlock, J.P., Jr. (1997) A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem*, **272**, 8878-8884.
150. Meyer, B.K. and Perdew, G.H. (1999) Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization. *Biochemistry*, **38**, 8907-8917.
151. Petrulis, J.R. and Perdew, G.H. (2002) The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem Biol Interact*, **141**, 25-40.
152. McGuire, J., Whitelaw, M.L., Pongratz, I., Gustafsson, J.A. and Poellinger, L. (1994) A cellular factor stimulates ligand-dependent release of hsp90 from the basic helix-loop-helix dioxin receptor. *Mol Cell Biol*, **14**, 2438-2446.
153. Petrulis, J.R. and Bunce, N.J. (2000) Competitive behavior in the interactive toxicology of halogenated aromatic compounds. *J Biochem Mol Toxicol*, **14**, 73-81.
154. Lusska, A., Shen, E. and Whitlock, J.P., Jr. (1993) Protein-DNA interactions at a dioxin-responsive enhancer. Analysis of six bona fide DNA-binding sites for the liganded Ah receptor. *J Biol Chem*, **268**, 6575-6580.
155. Meyer, B.K., Petrulis, J.R. and Perdew, G.H. (2000) Aryl hydrocarbon (Ah) receptor levels are selectively modulated by hsp90-associated immunophilin homolog XAP2. *Cell Stress Chaperones*, **5**, 243-254.
156. Trivellin, G. and Korbonits, M. (2011) AIP and its interacting partners. *J Endocrinol*, **210**, 137-155.
157. Kazlauskas, A., Poellinger, L. and Pongratz, I. (2000) The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol Chem*, **275**, 41317-41324.
158. Laenger, A., Lang-Rollin, I., Kozany, C., Zschocke, J., Zimmermann, N., Ruegg, J., Holsboer, F., Hausch, F. and Rein, T. (2009) XAP2 inhibits glucocorticoid receptor activity in mammalian cells. *FEBS Lett*, **583**, 1493-1498.
159. Froidevaux, M.S., Berg, P., Seugnet, I., Decherf, S., Becker, N., Sachs, L.M., Bilesimo, P., Nygard, M., Pongratz, I. and Demeneix, B.A. (2006) The co-chaperone XAP2 is required for activation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone transcription in vivo. *EMBO Rep*, **7**, 1035-1039.
160. Kuzhandaivelu, N., Cong, Y.S., Inouye, C., Yang, W.M. and Seto, E. (1996) XAP2, a novel hepatitis B virus X-associated protein that inhibits X transactivation. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4741-4750.

161. Ward, B.K., Mark, P.J., Ingram, D.M., Minchin, R.F. and Ratajczak, T. (1999) Expression of the estrogen receptor-associated immunophilins, cyclophilin 40 and FKBP52, in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **58**, 267-280.
162. Carver, L.A., LaPres, J.J., Jain, S., Dunham, E.E. and Bradfield, C.A. (1998) Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9. *J Biol Chem*, **273**, 33580-33587.
163. Goebel, M. and Yanagida, M. (1991) The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends Biochem Sci*, **16**, 173-177.
164. Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T. *et al.* (2007) Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature*, **446**, 562-566.
165. Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P. *et al.* (2003) Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, **423**, 545-550.
166. Brunberg, S., Pettersson, K., Rydin, E., Matthews, J., Hanberg, A. and Pongratz, I. (2003) The basic helix-loop-helix-PAS protein ARNT functions as a potent coactivator of estrogen receptor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6517-6522.
167. Lo, R. and Matthews, J. (2012) High-resolution genome-wide mapping of AHR and ARNT binding sites by ChIP-Seq. *Toxicol Sci*, **130**, 349-361.
168. Campbell, P.S., Mavingire, N., Khan, S., Rowland, L.K., Wooten, J.V., Opoku-Agyeman, A., Guevara, A., Soto, U., Cavalli, F., Loaiza-Perez, A.I. *et al.* (2018) AhR ligand aminoflavone suppresses alpha6-integrin-Src-Akt signaling to attenuate tamoxifen resistance in breast cancer cells. *J Cell Physiol*, **234**, 108-121.
169. Varnaite, R. and MacNeill, S.A. (2016) Meet the neighbors: Mapping local protein interactomes by proximity-dependent labeling with BioID. *Proteomics*, **16**, 2503-2518.
170. Gomes, I., Sierra, S. and Devi, L.A. (2016) Detection of Receptor Heteromerization Using In Situ Proximity Ligation Assay. *Curr Protoc Pharmacol*, **75**, 2 16 11-12 16 31.
171. Mohammed, H., Taylor, C., Brown, G.D., Papachristou, E.K., Carroll, J.S. and D'Santos, C.S. (2016) Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins (RIME) for analysis of chromatin complexes. *Nat Protoc*, **11**, 316-326.
172. Srinivasa, S., Ding, X. and Kast, J. (2015) Formaldehyde cross-linking and structural proteomics: Bridging the gap. *Methods*, **89**, 91-98.
173. Mohammed, H., D'Santos, C., Serandour, A.A., Ali, H.R., Brown, G.D., Atkins, A., Rueda, O.M., Holmes, K.A., Theodorou, V., Robinson, J.L. *et al.* (2013) Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor. *Cell Rep*, **3**, 342-349.
174. Bar Hoover, M.A., Hall, J.M., Greenlee, W.F. and Thomas, R.S. (2010) Aryl hydrocarbon receptor regulates cell cycle progression in human breast cancer cells via a functional interaction with cyclin-dependent kinase 4. *Mol Pharmacol*, **77**, 195-201.
175. Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D. and Grewal, S.I. (2001) Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, **292**, 110-113.
176. Alvarado, S., Wyglinski, J., Suderman, M., Andrews, S.A. and Szyf, M. (2013) Methylated DNA binding domain protein 2 (MBD2) coordinately silences gene expression through

activation of the microRNA hsa-mir-496 promoter in breast cancer cell line. *PLoS One*, **8**, e74009.

Tableaux supplémentaires

Tableau supplémentaire 1 - Dilution des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les WB, PLA et Co-IF

Anticorps	Utilisation	Hôte	Dilution		Fournisseur	Techniques
			WB	PLA / CoIF		
Anti-ER α F-10	Primaire	Souris	1:2000	1:50	Santa Cruz sc-8002	WB, PLA, IF, CoIP, ChIP
Anti-ER α clone 60C	Primaire	Lapin	1:2000	1:100	EMD Millipore Corp. 04-820	PLA, IF
Anti-GATAD2B	Primaire	Lapin	1:1000	1:200	Bethyl Laboratories Inc. A301-281A	WB, PLA, IF, CoIP, ChIP
Anti-AIP	Primaire	Souris	1:1000	1:80	Santa Cruz sc-5973	WB, PLA, IF, CoIP, ChIP
Anti- β -actine clone AC-15	Primaire	Souris	1:10000	-	Sigma A-5441	WB
Anti-FOXA1	Primaire	Lapin	-	1:200	Abcam 23738	PLA, IF
Anti-IgG contrôle isotype G3A1	Primaire	Souris	-	-	NEB 5415S	WB, PLA, IF, CoIP, ChIP
Anti-IgG souris-HRP	Secondaire	Chèvre	1:10000	-	Jackson ImmunoResearch	WB
Anti-IgG lapin-HRP	Secondaire	Chèvre	1:10000	-	Jackson ImmunoResearch	WB
Anti-IgG souris-Alexa555	Secondaire	Chèvre	-	1:1000	Invitrogen A28180	PLA, IF
Anti-IgG souris-Alexa488	Secondaire	Chèvre	-	1:1000	Molecular Probes A-11034	PLA, IF

Tableau supplémentaire 2 - Séquences des oligonucléotides utilisés pour le CHIP-qPCR

Gène ciblé	# sonde UPL	Séquences oligonucléotides	
<i>GREB1</i>	26	Sens	GAGAGGGTGGTGACACTTGG
		Anti-sens	GGCAGCAAACCTTGTGGTAGGTATG
<i>GREB1</i> non-ERE	33	Sens	CCACCAGTGCATCCTCGAAT
		Anti-sens	TTTCCCTTAGATGGACGGCG

Tableau supplémentaire 3 - Séquences des siRNA utilisés en prévision du RNA-seq

Name	Sequence	Company	Catalogue number
siGATAD2B Pool	CAAAUUGGCUCUUCGCAA	Dharmacon	L-013892-00-0005
	GGAAGAAGUCGUACAGAGU		
	AAACUUAACGGGAAUCUCA		
	CAACAUGAAUCCCGCAUC		
siGATAD2B #1	CAAAUUGGCUCUUCGCAA	Dharmacon	J-013892-05
siGATAD2B #2	GGAAGAAGUCGUACAGAGU	Dharmacon	J-013892-06
siAIP Pool	UCAACAAGUACGACGACAA	Dharmacon	L-006325-00-0005
	CCAAGAGUCUCCGCAACAU		
	CGGGAGGACGGGAUCCAAA		
	AGUGCAAGCUGGUGGUCGA		
siAIP #1	AAGGAGGAUGGCGGAUAUCAU	Dharmacon	CTM-702855
SiScramble #1	UGGUUUACAUGUCGACUAAUU	Dharmacon	CTM-495439
SiScramble #2	UCAUUCAACUCUGGAGCUA	Dharmacon	CTM-495440

Tableau supplémentaire 4 - Description des plasmides utilisées pour les « pull-down assay » et les co-immunoprécipitation

Plasmide	Compagnie/ Provenance	Utilisation
3HA-TurboID-NLS_pcDNA3	AddGene (#107171)	Pull-down assay
V5-TurboID-NES_pcDNA3	AddGene (#107169)	Pull-down assay
ER-NLS mutant HE257G	LPP - Sougir (PLB) Laboratoire Simak Ali (Séquencé Oct2018 PLB)	Pull-down assay
PSG5-HEG0 (WT ER α)	Laboratoire Dr. P.Chambon (Université de Strasbourg)	Pull-down assay, Co-IP
pMIG-RID-GFP	AddGene (#9044)	Pull-down assay, Co-IP

Tableau supplémentaire 5 - Gènes impliqués dans la réponse précoce et tardive aux œstrogènes régulés par GATAD2B

Gène (symbole)	Entrez Gene ID	Voie de signalisation		Description
		E2 précoce	E2 late	
ADD3	120	X	X	adducin 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:245]
SCARB1	949	X	X	scavenger receptor class B member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1664]
HSPB8	26353	X	X	heat shock protein family B (small) member 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30171]
WFS1	7466	X	X	wolframin ER transmembrane glycoprotein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12762]
ABCA3	21	X	X	ATP binding cassette subfamily A member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:33]
OPN3	23596	X	X	opsin 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14007]
MYB	4602	X	X	"MYB proto-oncogene, transcription factor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7545]"
IGF1R	3480	X		insulin like growth factor 1 receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5465]
ENDOD1	23052	X		endonuclease domain containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29129]
SLC7A2	6542	X		solute carrier family 7 member 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11060]
MYBBP1A	10514	X		MYB binding protein 1a [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7546]
ADCY1	107	X		adenylate cyclase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:232]
MED13L	23389	X		mediator complex subunit 13L [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:22962]
MYBL1	4603	X		MYB proto-oncogene like 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7547]
SERPINA3	12		X	serpin family A member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16]

Figures supplémentaires

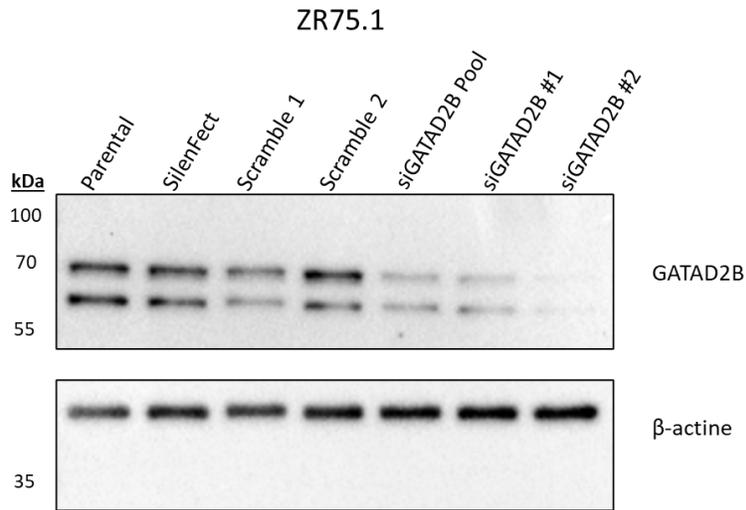


Figure supplémentaire 1. Validation de la spécificité des bandes par l'inhibition de l'expression de GATAD2B par siARN dans les ZR-75-1. Les cellules ZR-75-1 ont été cultivées dans le milieu de culture rouge approprié. Les cellules ont été transfectées avec le siARN approprié en présence de SilenFect. Les cellules ont été collectées 48h post-transfection. Pour chacune des conditions, 30 μ g du lysat protéique a été séparé par SDS-PAGE (10%) et analysé par Western Blot. L'échelle des poids moléculaires est en kDa. GATAD2B (66 kDa) et β -actine (42 kDa). N=3

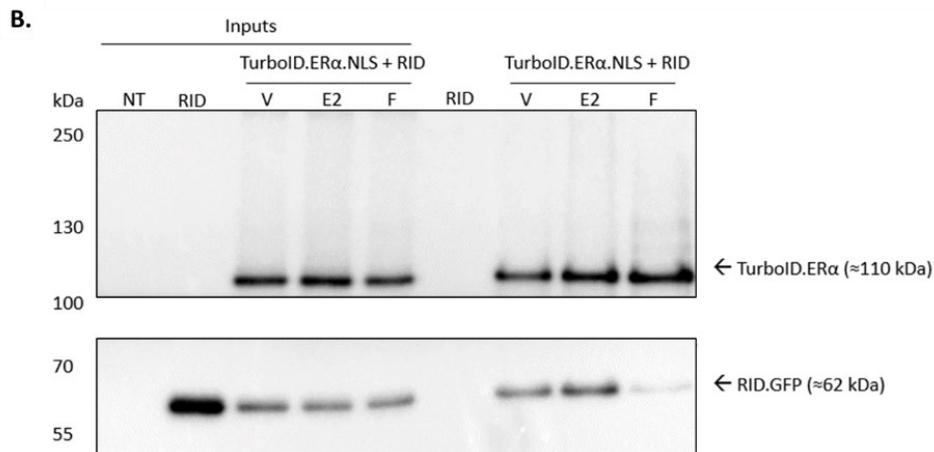
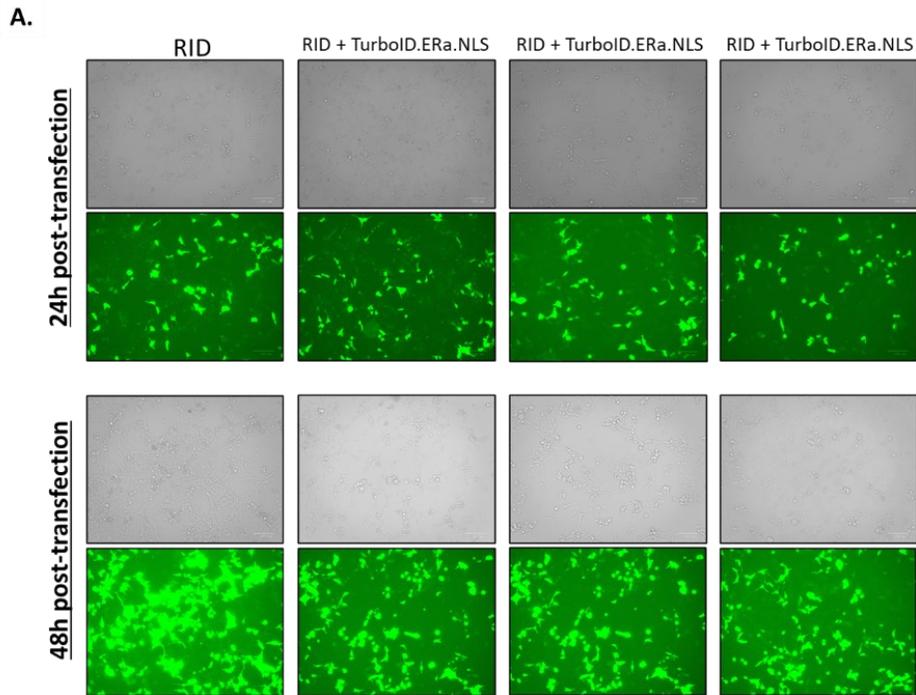
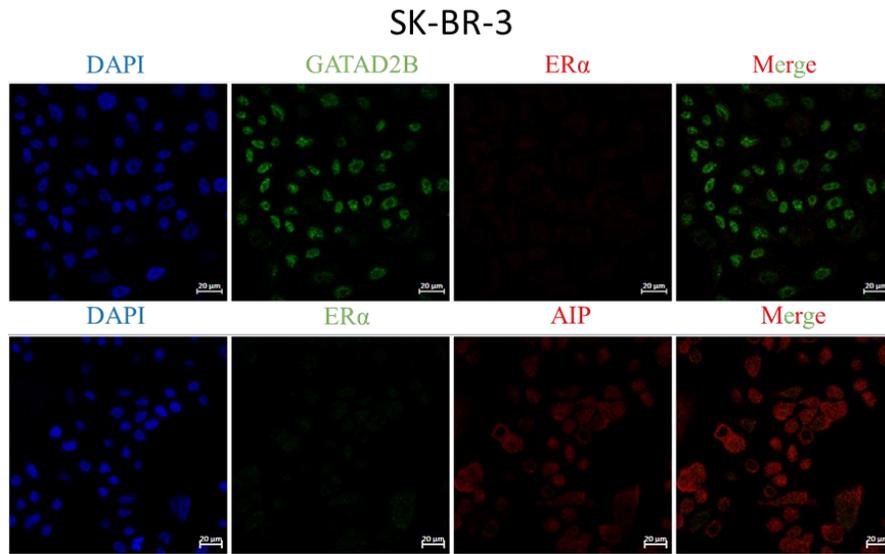


Figure supplémentaire 2 – Efficacité de transfection pour le « Pull-down assay » de TurboID-ERα et RID des HEK293 avec traitements. Imagerie par microscopie pour valider l'efficacité de transfection (A). Capture par affinité des protéines biotinylées par la protéine de fusion TurboID-ERα dans le noyau (B). Les cellules HEK-293T ont été cultivées dans du DMEM blanc trois jours avant d'ensemencer 5 x 10⁶ millions de cellules par pétri 100 mm. Les cellules ont été transfectées avec 6 µg d'ADN. Les cellules traitées avec RID ou RID+TurboID-ERα ont été analysé par microscopie à fluorescence pour vérifier l'efficacité de transfection (signal émis par RID-GFP) 24h et 48h post-transfection. Les cellules ont été traitées 48h post-transfection avec le traitement approprié (V : EtOH 0.01%, E2 25 nM ou Fulv 100 nM) durant une heure et traitées à la biotine 15 min pour ensuite être récoltées. Les protéines ont été extraites et 1 mg a été utilisé pour la précipitation avec les billes de streptavidine toute la nuit. Les billes ont ensuite été laver cinq fois avec du PBS 1X et l'élution a été fait avec du Laemmli 4X. 30 µL de la solution éluée a été chargé dans les puits. Les inputs correspondent à 10 µg de protéines du lysat cellulaire. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (10%). L'échelle des poids moléculaires est en kDa. Les dilutions d'anticorps utilisées peuvent être retrouvée dans le tableau supplémentaire 1. N=2

A.



B.



Figure supplémentaire 3 – Contrôles négatifs pour la coimmunofluorescence de AIP ou GATAD2B avec ER α dans les cellules de tumeurs mammaires. **A.** Co-IF entre AIP ou GATAD2B et ER α dans les SK-BR-3 et **B.** Co-IF sans anticorps primaires dans les ZR-75-1. Les cellules ZR-75-1 et SK-BR-3 ont été cultivées dans le milieu rouge pour la coimmunofluorescence. Les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (en bleu). Les protéines apparaissant en vert ont été marquées avec ALEXA-488 et les protéines apparaissant en rouge ont été dévoilées avec l’ALEXA-555. Les dilutions d’anticorps utilisées peuvent être retrouvée dans le tableau supplémentaire (Tableau Supplémentaire 1). N=1

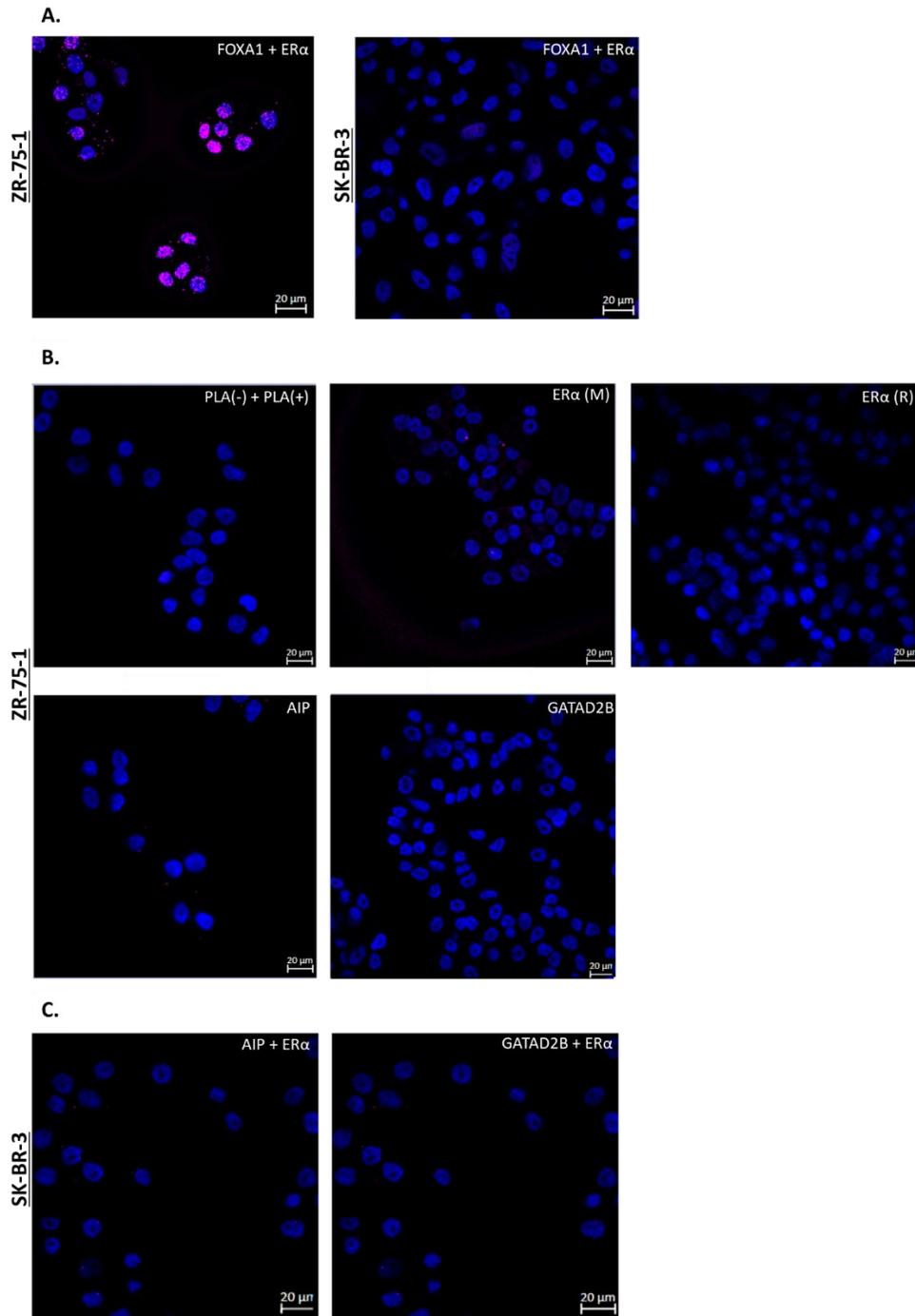


Figure supplémentaire 4. Contrôles positifs et négatifs pour le PLA dans les ZR-75-1 et SK-BR-3. **A.** PLA entre FOXA1 et ER α dans les ZR-75-1 et SK-BR-3. **B.** PLA avec un seul anticorps primaire ou seulement les anticorps secondaires. **C.** PLA entre AIP ou GATAD2B et ER α dans les SK-BR-3. Les cellules ZR-75-1 et SK-BR-3 ont été cultivées dans le milieu rouge pour le PLA. Les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (en bleu). Le signal représentant une forte proximité sont révélés en rose. Les dilutions d'anticorps utilisées peuvent être retrouvée dans le tableau supplémentaire (Tableau Supplémentaire 1). N=1

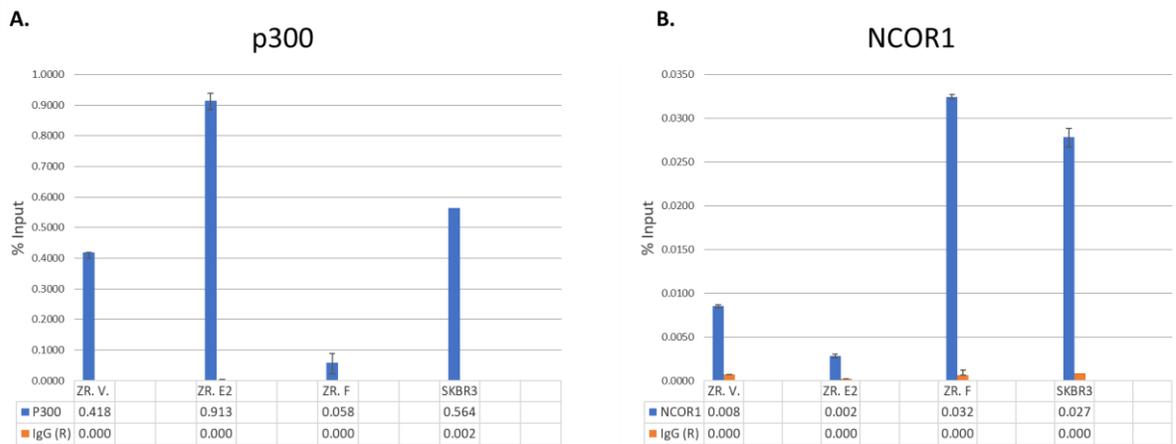


Figure supplémentaire 5 - Recrutement de ER α et GATAD2B aux EREs situés dans le promoteur de *GREB1* dans les cellules ZR-75-1. Les ChIP-qPCR permettent d'observer le recrutement de p300 (A) et de NCOR1 (B). Les cellules ZR-75-1 et SKBR3 (sans traitement) ont été cultivées dans le milieu blanc déprivées de composés oestrogéniques 72h précédant les traitements de 1h avec V (EtOH 0.01%), E2 (25 nM) et Fulv (100 nM). Les cellules ont été récoltées et ont été soumises aux étapes du ChIP en utilisant 4 μ g d'anticorps pour les chacune des protéines ciblées. Après l'éluion de l'ADN, la présence de la séquence ciblée (Tableau supplémentaire 2) a été analysée par qPCR (sonde UPL #26, *GREB1* ERE). Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage des « inputs » (% INPUT). La qPCR a été effectué en n=3 et les résultats représentent la moyenne de ceux-ci. Les résultats montrés ici sont représentatifs du patron de recrutement pour N=3.

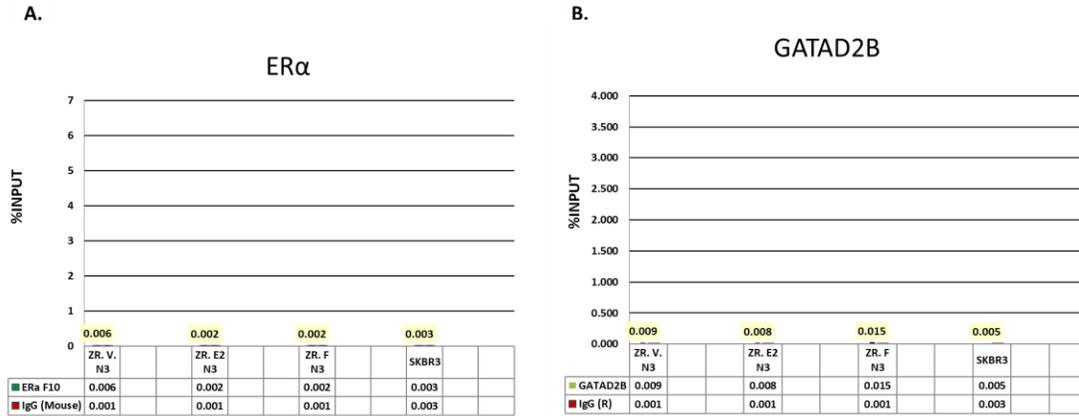


Figure supplémentaire 6. Recrutement de **A.** ER α et **B.** GATAD2B au promoteur de *GREB1* ne comportant pas de ERE dans les cellules ZR-75-1. Les cellules ZR-75-1 et SKBR3 (sans traitement) ont été cultivées dans le milieu blanc déprivées de composés oestrogéniques 72h précédant les traitements de 1h avec V (EtOH 0.01%), E2 (25 nM) et Fulv (100 nM). Les cellules ont été récoltées et ont été soumises aux étapes du CHIP en utilisant 4 μ g d'anticorps pour chacune des protéines ciblées. Après l'éluion de l'ADN, la présence de la séquence ciblée (Tableau supplémentaire 2) a été analysée par qPCR (sonde UPL #33, *GREB1* non-ERE). Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage des « inputs » (% INPUT). La qPCR a été effectué en n=3 et les résultats représentent la moyenne de ceux-ci. Les résultats montrés ici sont représentatifs du patron de recrutement pour N=3.

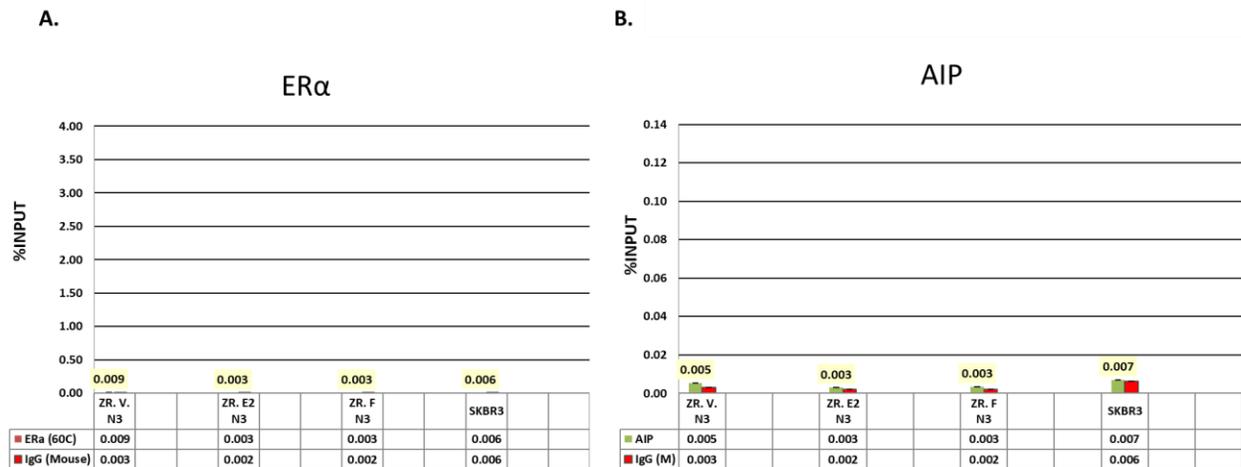


Figure supplémentaire 7. Recrutement de **A.** ER α et **B.** AIP au promoteur de *GREB1* ne comportant pas de ERE dans les cellules ZR-75-1. Les cellules ZR-75-1 et SKBR3 (sans traitement) ont été cultivées dans le milieu blanc déprivées de composés oestrogéniques 72h précédant les traitements de 1h avec V (EtOH 0.01%), E2 (25 nM) et Fulv (100 nM). Les cellules ont été récoltées et ont été soumises aux étapes du CHIP en utilisant 4 μ g d'anticorps pour chacune des protéines ciblées. Après l'éluion de l'ADN, la présence de la séquence ciblée (Tableau supplémentaire 2) a été analysée par qPCR (sonde UPL #33, *GREB1* non-ERE). Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage des « inputs » (% INPUT). La qPCR a été effectué en n=3 et les résultats représentent la moyenne de ceux-ci. L'écart-type, représenté par les barres d'erreurs, représente la variation et la dispersion entre les %Input de n=3. Les résultats montrés ici sont représentatifs du patron de recrutement pour N=3.

A.

NuRD complex

ID	Gene Name	Species
GATAD2A	GATA zinc finger domain containing 2A(GATAD2A)	Homo sapiens
GATAD2B	GATA zinc finger domain containing 2B(GATAD2B)	Homo sapiens
RBBP4	RB binding protein 4, chromatin remodeling factor(RBBP4)	Homo sapiens
HDAC1	histone deacetylase 1(HDAC1)	Homo sapiens
HDAC2	histone deacetylase 2(HDAC2)	Homo sapiens

B.

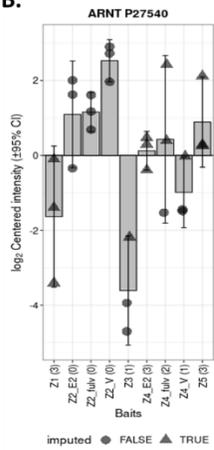


Figure supplémentaire 8. Autres interacteurs potentiels provenant du criblage par TurboID dans les ZR-75-1. **A.** Membres du complexe NuRD et **B.** Membre du complexe AhR. (Elham Dianati et Sylvie Mader).