

Université de Montréal

Régulation protéasome-dépendante de l'activité transcriptionnelle
des récepteurs des estrogènes

par

Catherine Charbonneau

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences
en biochimie

Janvier 2004

© Catherine Charbonneau, 2004



W

4

U58

2004

v. 101

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Régulation protéasome-dépendante de l'activité transcriptionnelle
des récepteurs des estrogènes

présenté par :
Catherine Charbonneau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Nikolaus Heveker

.....
président-rapporteur

Dr André Tremblay

.....
directeur de recherche

Dr Audrey Claing

.....
membre du jury

RÉSUMÉ

La voie ubiquitine-protéasome 26S est un système de dégradation essentiel à la cellule pour contrôler diverses fonctions biologiques impliquées dans la régulation cellulaire. Les récepteurs des estrogènes ER α et ER β font partie de la famille des récepteurs nucléaires qui agissent comme facteurs de transcription en réponse à un signal hormonal et qui sont dégradés de façon hormono-dépendante par la voie ubiquitine-protéasome. Nous avons montré que la voie de dégradation ubiquitine-protéasome est nécessaire pour obtenir une réponse maximale de ER α et ER β aux estrogènes. Basé sur des résultats antérieurs du laboratoire concernant la modulation transcriptionnelle de ER β par la signalisation des facteurs de croissance, nous étudions le rôle possible du protéasome sur la régulation ligand-indépendante de ER β . Nos résultats suggèrent un rôle du protéasome dans la réponse de ER α et ER β aux estrogènes mais également dans leur activité ligand-indépendante. De plus, nous avons observé que la fonction d'activation AF-1, qui est responsable de la réponse de ER β aux facteurs de croissance, participe à la régulation protéasome-dépendante de ER β en absence d'estrogènes. Nous avons observé que deux résidus participent à la régulation protéasome-dépendante de ER β dont l'un est impliqué dans le recrutement de coactivateurs transcriptionnels. Enfin, nous avons rapporté que l'activité transcriptionnelle ligand-indépendante de ER β semble être régulée par le protéasome 26S via la voie de signalisation de la MAPK p38. Ces résultats suggèrent donc que la voie ubiquitine-protéasome joue un rôle de régulation dans le contrôle des diverses fonctions des récepteurs des estrogènes par des mécanismes favorisant la phosphorylation de l'AF-1.

Mots-clés : Transcription, Récepteur nucléaire, Stéroïdes, Estrogènes, Dégradation, Voie ubiquitine-protéasome 26S, Phosphorylation, Signalisation par les MAPK, Expression génique

ABSTRACT

The ubiquitin-proteasome pathway of degradation is an essential system in cells to control a variety of biological functions involved in cellular regulation. Like most of the steroid hormone receptors that belong to the nuclear receptor family, estrogen receptor (ER) protein levels are subjected to hormone-dependent down-regulation in most cells and tissues. The ubiquitin-proteasome pathway was shown to be necessary to obtain a maximal transcriptional activity of ER α and ER β in response to hormones. Based on our previous results on the regulation of ER β by growth factor signaling, we initiated studies on the role of the proteasome on ligand-independent regulation of ER β . We demonstrate that not only the ligand-dependent activation of ER α and ER β is regulated by the proteasome, but also their ligand-independent activity. We show that activation function AF-1 participates in the proteasome-dependent response of ER β in absence of estrogens. In addition, p38 MAPK signaling was shown to be involved in the regulation of ER β AF-1 activity by the proteasome. We also found that two serine, which one of two was previously reported to be required in the recruitment of coactivator SRC-1 to mediate ligand-independent activation of ER β , were involved in the proteasome-dependent regulation of ER β . Taken together, these results provide a regulatory role for the ubiquitin-proteasome pathway in the control of AF-1 mediated functions of estrogen receptor.

Keywords : Transcription, Nuclear receptor, Steroids, Estrogens, Degradation, Ubiquitin-proteasome pathway, Phosphorylation, MAPK signalling, Gene expression

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTES DES ABBRÉVIATIONS	ix
REMERCIEMENTS	xiv
1. INTRODUCTION	1
1.1 LES ESTROGÈNES	2
1.1.1 BIOSYNTHÈSE ET FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DES ESTROGÈNES	2
1.2 LES RÉCEPTEURS DES ESTROGÈNES	5
1.2.1 DESCRIPTION ET STRUCTURE	5
1.2.2 ACTIVATION LIGAND-DÉPENDANTE DE ER.....	8
1.2.2.1 ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE ET MODÈLE COMBINATOIRE	9
1.2.2.2 ACTIVATION PAR CDK7	11
1.2.2.3 ACTIVATION PAR LES MAPK.....	11
1.2.2.4 CORÉPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE	12
1.2.3 ER ET CANCERS GYNÉCOLOGIQUES	13
1.2.4 ACTIVATION LIGAND-INDEPENDANTE DE ER.....	14
1.2.4.1 ACTIVATION PAR LES MAPK.....	14
1.2.4.2 ACTIVATION PAR PKA.....	15
1.2.4.3 ACTIVATION PAR AKT	16
1.2.4.4 ACTIVATION PAR LES CDK.....	17
1.2.4.5 ACTIVATION PAR PKC	18
1.2.4.6 AUTRES MÉCANISMES D'ACTIVATION.....	19
1.2.5 SIGNALISATION NON-GÉNOMIQUE DES ER	20
1.3 LA VOIE UBIQUITINE-PROTÉASOME	22
1.3.1 FONCTIONS BIOLOGIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DU PROTÉASOME	23
1.3.2 ANATOMIE ET MÉCANISME D'ACTION DU PROTÉASOME	26
1.3.3 INHIBITEURS.....	28
1.3.4 L'UBIQUITINATION DES PROTÉINES	30
1.3.4.1 DESCRIPTION ET MODE D'ACTION	30
1.3.4.2 LES LIGASES D'UBIQUITINE E3.....	31
1.3.4.3 SIGNAUX ET UBIQUITINATION	33
1.3.4.4 PROTÉASOME ET CANCERS.....	34

1.4 RÔLE NON-PROTÉOLYTIQUE DE LA VOIE UBIQUITINE-PROTÉASOME	37
1.5 TRANSCRIPTION ET VOIE UBIQUITINE-PROTÉASOME	40
1.6 RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES ET VOIE UBIQUITINE-PROTÉASOME	41
1.6.1 RÉCEPTEUR DES ESTROGÈNES.....	41
1.6.2 RÉCEPTEUR DES ANDROGÈNES	42
1.6.3 RÉCEPTEUR DE LA PROGESTÉRONE	44
1.6.4 RÉCEPTEUR DES GLUCOCORTICOÏDES.....	46
1.7 HYPOTHÈSES.....	47
1.8 BUTS ET OBJECTIFS	48
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	49
2.1 VECTEURS D'EXPRESSION.....	50
2.2 CULTURE CELLULAIRE, TRANSFECTION D'ADN, ESSAI LUCIFÉRASE.....	51
2.3 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN.....	52
2.4 IMMUNOPRÉCIPITATION.....	53
2.5 FRACTIONNEMENT CELLULAIRE	54
2.6 MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE	55
2.7 ANALYSE FRAP	56
3. RÉSULTATS	57
4. DISCUSSION	97
5. BIBLIOGRAPHIE.....	119

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Fonctions physiologiques de la voie ubiquitine-protéasome et cibles protéiques visées.....	24
Tableau II. Cibles de phosphorylation de ER α et ER β et activité transcriptionnelle.....	85

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Domaines fonctionnels de ER α et ER β	6
Figure 2. Effet du protéasome sur l'activation ligand-dépendante de ER α et ER β	59
Figure 3. Effet du protéasome sur l'activation ligand-indépendante de ER α ou ER β	61
Figure 4. Rôle des domaines fonctionnels de ER α et ER β dans la réponse transcriptionnelle ligand-indépendante.....	64
Figure 5. La régulation protéasome-dépendante de l'activité de ER β n'est pas dépendante du contexte du gène rapporteur.	66
Figure 6. La régulation protéasome-dépendante de l'activité de ER β n'est pas dépendante du contexte cellulaire.	67
Figure 7. La réponse transcriptionnelle de ER β ne dépend pas des effets de l'apoptose dans la cellule.	69
Figure 8. MG132 provoque l'accumulation de ER β dans les cellules.....	72
Figure 9. MG132 provoque l'accumulation des formes ubiquitinées de ER β	74
Figure 10. Effet du protéasome sur la distribution cellulaire.	77
Figure 11. Compartimentalisation cellulaire de ER β	79
Figure 12. Effet du protéasome sur la mobilité intranucléaire de ER β	83
Figure 13. Rôle des sites consensus de phosphorylation sur la régulation protéasome-dépendante de ER β	88
Figure 14. Effet de l'activation de l'oncogène ras sur la régulation protéasome-dépendante de ER β	90
Figure 15. Contribution des MAPKs sur l'effet de l'inhibition de la phosphorylation.	92
Figure 16. Le rôle de la voie de signalisation de p38 dans la régulation protéasome-dépendante de ER β	96
Figure 17. Modèle proposé de la régulation transcriptionnelle de ER β	116

LISTES DES ABBRÉVIATIONS

°C : degré Celcius

μL : microlitre

μm : micromètre

μM : micromolaire

A : Alanine

ACTR : Activator for thyroid hormone and retinoid receptors

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AF-1 : Activation function 1

AF-2 : Activation function 2

AIB1 : Amplified in breast cancer 1

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

APC : Anaphase-promoting complex

AR : Androgen receptor

ARC : Activator-recruited cofactor

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine triphosphate

Bcl-2 : B-cell leukemia/lymphoma 2

BRCA : Breast cancer

CAK : Cdk-activating kinase

CBP/p300 : CREB-binding protein

Cdk : Cyclin-dependent kinase

Cdki : Cyclin-dependent kinase inhibitor

CFTRΔF508 : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator lacking phenylalanine

508

ChIP : Chromatin immunoprecipitation

c-IAP : cellular inhibitor-of-apoptosis protein

COUP : Chicken ovalbumin upstream promoter
CTD : Carboxy-terminal domain
DAPI : 4', 6-diamidino-2-phenylindole, dilactate
DBD : DNA-binding domain
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO : Dimethyl sulfoxide
DRIP : Vitamin D receptor (VDR) interacting protein
DTT : Dithiothreitol
E : Acide glutamique
E6-AP : E6-associated protein
EDTA : ethylenediamine-tetraacetic acid
Efp : Estrogen-responsive RING finger protein
EGF : Epidermal growth factor
EGFP : Eukaryote green fluorescent protein
ER : Estrogen receptor
ERE : Estrogen response element
Erk : Extracellular signal-regulated kinase
ERR : Estrogen receptor-related receptor
EYFP : Eukaryote yellow fluorescent protein
FBS : Fetal bovine serum
FL : Full-length
Forskolin/IBMX : forskolin plus 3-isobutyl-1-methylxanthine
FRAP : Fluorescence recovery after photobleaching
FSH : Hormone folliculostimulante
GCNF : Germ cell nuclear factor
GEF : Guanine exchange factor
GR : Glucocorticoid receptor
GRIP1 : Glucocorticoid receptor interacting protein 1
GSK-3 : Glycogen synthase kinase-3
HA : Hemagglutinin

HAT : Histone acetyltransferase
HDAC : Histone déacétylase
HECT : Homologous to E6-AP carboxy terminus
HEPES : N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HIF : Hypoxia-inducible factor
HMG-CoA : Hydroxymethylglutaryl coenzyme A
HRE : Hormone response element
HRP : Horse-raddish peroxydase
IGF-1 : Insulin-like growth factor-1
I κ B : Inhibitor of NF- κ B
JAK : Janus kinase
JNK : c-Jun N-terminal kinase
K : lysine
KCl : Chlorure de potassium
K_D : Constante de dissociation
K_i : Constante d'inhibition
LBD : Ligand-binding domain
LH : Hormone lutéinisante
mA : milliampère
MAPK : Mitogen activated protein kinase
Mdm2 : Murine double minute 2
MEKK : MAP kinase kinase kinase
MgCl₂ : Chlorure de magnésium
MKK ou MEK : MAP kinase kinase
mL : millilitre
mM : millimolaire
MMTV : Mouse mammary tumor virus
MR : Mineralocorticoid receptor
Na₃VO₄ : Orthovanadate de sodium
NaF : Fluoride de sodium

N-CoR : nuclear receptor corepressor
NER : Nucleotide excision repair
NLS : Nuclear localisation sequence
nM : nanomolaire
NO : Nitric oxyde
OHT : 4-hydroxytamoxifène
ONPG : O-nitrophenyl-beta-d-galactopyranoside
P : Proline
p/CAF : p300/CBP-associated factor
p/CIP : p300/CBP/interacting protein
PARP : Poly-ADP-ribose-polymerase
PB : Phosphate buffer
PBS : Phosphate buffer solution
PCR : Polymerase chain reaction
PI 3-kinase : Phosphoinositide 3-kinase
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PMSF : Phenylmethylsulfonylfluoride
Pol II : ARN Polymérase II
PR : Progesterone receptor
PSA : Prostate-specific antigen
PTEN : Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
R : Arginine
RAC3 : Receptor-associated coactivator 3
RAR : Retinoid acid receptor
RING : Really interesting new gene
RLU : Relative luciferase unit
ROI : Region of interest
RTK : Recepteur tyrosine kinase
RXR : Retinoid X receptor

S : Serine

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

Ser : Serine

SF-1 : Steroidogenic factor 1

Smads : Intracellular signal-transducing molecules

SMCC : SRB/MED-containing complex

SMRT : silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors

Smurf : Smad ubiquitination regulatory factor

SRB : Complexe de protéines Srb associé à la PolIII

SRC : Steroid receptor coactivator

STAT : Signal transducers and activators of transcription

SUN-CoR : small ubiquitous nuclear corepressor

T : Thréonine

TAF : Transcription associated factor

TBP : TATA-binding protein

TCR : Transcription-coupled repair

TFII : Transcription factor II

TGF : Tumor growth factor

TIF2 : Transcriptional intermediary factor 2

Tk : Thymidine kinase

TNF α : Tumor necrosis factor α

TR : Thyroid receptor

TRAP : TR-associated protein

UBA : ubiquitin-activating enzyme

UBC : ubiquitin-conjugating enzyme

UV : Ultra-violet

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VHL : Von Hippel-Lindau

XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes collègues et amis Véronique, Mélanie, Julie, Roberta, Martine et Simon qui m'ont toujours aidée, encouragée et donné de judicieux et précieux conseils.

Un merci tout spécial à mon père pour sa présence autant dans les bons que dans les mauvais moments et pour sa confiance en moi.

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, André Tremblay, qui a été plus que disponible pour répondre à mes innombrables questions et qui m'a bien supervisée.

Merci à tous les étudiants, professionnels de recherche et chercheurs du premier étage ainsi qu'au CRSNG pour le support financier.

Merci à Patrick Gauvin.

1. INTRODUCTION

1.1 LES ESTROGÈNES

Les hormones stéroïdiennes sont de petites molécules lipophiliques qui jouent des rôles importants dans plusieurs fonctions physiologiques dont la croissance, la différenciation, le métabolisme des glucides, l'équilibre hydro-électrolytique, l'anabolisme des protéines et la morphogenèse chez les organismes supérieurs et les humains (1).

1.1.1 BIOSYNTÈSE ET FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DES ESTROGÈNES

Les estrogènes font partie des hormones stéroïdiennes et sont synthétisés à partir principalement de précurseurs androgéniques. L'estradiol (E2), la forme biologiquement active des estrogènes, vient de l'aromatase de la testostérone par la cytochrome P450 aromatasase des tissus gonadiques et joue un rôle essentiel dans les fonctions de reproduction mâles et femelles, au niveau des systèmes nerveux, osseux et cardio-vasculaire, mais est aussi associée aux cancers des tissus gynécologiques (2;3). La principale source d'estrogènes se trouve dans l'ovaire, soit au niveau des follicules en développement et du corps jaune. Chez la femme, la FSH, une hormone folliculostimulante, sécrétée par les cellules gonadotropes de la glande hypophysaire et transportée par le sang depuis l'adénohypophyse jusqu'aux ovaires, stimule le développement et la maturation des follicules ovariens. L'hormone lutéinisante (LH), en association avec la FSH, déclenche l'ovulation et stimule la synthèse et la sécrétion d'estradiol par les follicules. Elle stimule également la formation du corps jaune, structure ovarienne formée après l'ovulation, et la sécrétion d'une autre hormone sexuelle femelle, la progestérone (4).

Plusieurs fonctions sont attribuées aux estrogènes. Tout d'abord, ces stéroïdes stimulent la croissance et la maturation des organes reproducteurs et des seins au moment de la puberté et maintiennent leur fonctionnement et leurs dimensions à l'âge adulte. Ils assurent le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires qui comprennent la

distribution des graisses à la poitrine, à l'abdomen et aux hanches, la tonalité de la voix, un bassin large et une distribution caractéristique de la pilosité. Ils activent également la phase proliférative du cycle menstruel ainsi que l'ovogenèse et l'ovulation en stimulant l'expression de récepteurs de la FSH sur les cellules folliculaires (4). Les estrogènes sont des hormones sexuelles qui provoquent la capacitation du spermatozoïde, c'est-à-dire sa maturation en vue de la fécondation, dans les voies génitales de la femme grâce à leurs effets sur les sécrétions vaginales et utérines (5). Au cours de la grossesse, ces stéroïdes stimulent les mitoses des cellules myométriales ainsi que la croissance de l'utérus et des glandes mammaires. Ils interagissent également avec la relaxine pour produire le ramollissement et le relâchement des ligaments pelviens et de la symphyse pubienne favorisant la dilatation du col de l'utérus à la fin de la grossesse (6). Dans le tissu mammaire, les estrogènes stimulent la croissance et la différenciation du canal épithélial, stimulent l'activité mitotique des cellules cylindriques des canaux et stimulent la croissance des tissus conjonctifs (7). Ils produisent également un effet vasodilatateur, semblable à l'effet de l'histamine, sur la microcirculation du tissu mammaire (4).

Les estrogènes jouent également un rôle dans le système nerveux central. Dans les tissus du cerveau de rats adultes, les estrogènes induisent un remodelage synaptique et dendritique (8) et provoquent la formation d'astrocytes, source la plus abondante de cellules gliales dans le cerveau, suite à une lésion au cerveau (9). De plus, les astrocytes participent aux effets cellulaires des estrogènes en libérant des substances neuroactives et en régulant l'accumulation de facteurs de croissance spécifiques tels que IGF-1 (insulin-like growth factor-1) impliqués dans la plasticité synaptique et le contrôle neuroendocrinien induits par les estrogènes (9). Dans les neurones de l'hippocampe, les estrogènes augmentent la densité des récepteurs N-méthyl-D-aspartate responsables d'une grande partie de la transmission synaptique rapide excitatrice dans le système nerveux central et augmentent la sensibilité des neurones à être stimulés par ces récepteurs (10). Dans des cellules de neuroblastome en culture, les estrogènes protègent les neurones en réduisant la génération de peptides beta-amyloïdes responsables de la formation de plaques séniles impliquées dans le développement de la maladie d'Alzheimer (11). D'ailleurs, certaines

données épidémiologiques suggèrent que chez les femmes post-ménopausées, une déficience en estrogènes est associée à un déclin des fonctions cognitives de ces femmes et à une augmentation des risques de la maladie d'Alzheimer (12).

Des effets vasoprotecteurs sont également attribués aux estrogènes. Les estrogènes causent une rapide vasodilatation en augmentant la formation et la libération d'oxyde nitrique et de prostacycline dans les cellules endothéliales (13). Un rôle de protection des estrogènes contre l'athérosclérose a aussi été suggéré suite à l'observation d'une réduction de la progression de l'athérosclérose des artères coronaires chez des singes ayant subi une ovariectomie, puis traités aux estrogènes (14). Dans le foie, les estrogènes provoquent aussi l'augmentation des récepteurs lipoprotéiques, résultant en une diminution de la concentration sérique des lipoprotéines de basse densité (LDL) composées du cholestérol impliqué dans la formation des plaques athérosclérotiques (15).

Les ostéoclastes et les ostéoblastes sont tous deux des tissus cibles des estrogènes, mais somme toute, les estrogènes sont classées comme étant des agents anti-résorptifs (16;17). Chez des souris ovariectomisées, la déficience en estrogènes provoque l'augmentation de la production des interleukines-1 et 6 et du facteur TNF α (tumor necrosis factor α) dans les ostéoblastes. Ces facteurs stimulent indirectement la différenciation des ostéoclastes et donc la résorption des os (18). Dans des extraits d'os de femmes post-ménopausées atteintes d'ostéoporose, les niveaux d'ARN messager des interleukines-1 et 6 sont également élevés. La déficience en estrogènes est donc reconnue pour accélérer la perte de tissu osseux et pour augmenter la susceptibilité aux fractures (19). Il semble aussi que les estrogènes agissent sur le système osseux en provoquant l'allongement des os longs et la féminisation du squelette. Ils inhibent également la résorption osseuse et stimulent la soudure des cartilages épiphysaires.

Les effets biologiques des estrogènes sur les tissus cibles surviennent suite à la liaison de l'hormone à son récepteur, soit les récepteurs des estrogènes.

1.2 LES RÉCEPTEURS DES ESTROGÈNES

1.2.1 DESCRIPTION ET STRUCTURE

Le signal des estrogènes dans la cellule est transmis par deux types de récepteurs, soit le récepteur des estrogènes alpha ($ER\alpha$) et le récepteur des estrogènes beta ($ER\beta$) (20). Ces deux récepteurs, encodés par deux ARNm distincts contenant 8-9 exons chacun, appartiennent à la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires (21;22). Les membres de cette famille agissent comme facteurs de transcription contrôlant l'expression de gènes cibles en se liant à leur élément de réponse hormonale spécifique ou HRE situé dans les régions promotrices des gènes (23). Cette superfamille comprend quatre grandes classes de récepteurs (24;25). Tout d'abord, la Classe I est constituée des récepteurs des stéroïdes s'associant en homodimères pour se lier à des HRE constitués de séquences palindromiques inversées. Cette classe comprend les récepteurs des estrogènes (ER), des androgènes (AR), des glucocorticoïdes (GR), des minéralocorticoïdes (MR) et de la progestérone (PR). La Classe II regroupe les récepteurs qui s'associent en hétérodimères avec le récepteur RXR (retinoid X receptor) et pour lesquels des ligands physiologiques ont été identifiés comme le récepteur de l'acide rétinoïque RAR. La Classe III inclue les récepteurs orphelins, c'est-à-dire les récepteurs pour lesquels aucun ligand n'a été découvert, qui fonctionnent en homodimères et qui se lient à des séquences HRE répétées directes sur l'ADN, comme les récepteurs de la Classe II, tels que le récepteur RXR, le récepteur COUP (chicken ovalbumin upstream promoter) et le récepteur GCNF (germ cell nuclear factor). Enfin, les récepteurs orphelins qui agissent en monomères pour se lier à des sites simples HRE de l'ADN constituent la Classe IV. Cette classe comprend le récepteur SF-1 (steroidogenic factor 1) et les récepteurs ERR (estrogen-related receptor).

Les récepteurs des estrogènes $ER\alpha$ et $ER\beta$ font partie de la Classe I. $ER\alpha$ se situe sur le chromosome 6 tandis que $ER\beta$ est localisé sur le chromosome humain 14 (26). $ER\alpha$ fut initialement cloné en 1986 (27;28) et ce n'est qu'en 1996 que la découverte d'un second

récepteur, ER β , a été rapportée (29;30). ER α et ER β sont des facteurs de transcription et comme les autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, les ERs possèdent une structure modulaire comportant différents domaines (**Figure 1**).

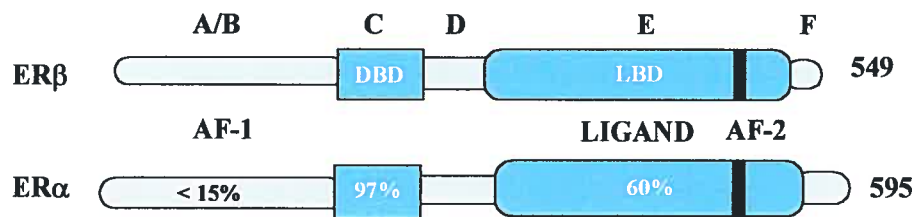


Figure 1. Domaines fonctionnels de ER α et ER β .

Les deux récepteurs, dû à leur grande homologie, partagent un grand nombre de caractéristiques fonctionnelles. ER α et ER β ont un domaine de liaison à l'ADN (DBD), fortement conservé avec 97% d'homologie en acides aminés. Le DBD ou région C contient deux structures de doigt de zinc intervenant dans la liaison directe du récepteur à l'ADN (31;32). Le récepteur des estrogènes reconnaît une séquence spécifique sur l'ADN appelée élément de réponse aux estrogènes (ERE). Cet élément consiste en un palindrome inversé constitué du motif consensus AGGTCA entrecoupé de trois nucléotides. Les récepteurs des estrogènes agissent sur l'expression des gènes cibles suite à leur homo- ou à leur hétérodimérisation.

Le domaine de liaison au ligand (LBD) est situé dans la portion C-terminale des récepteurs des estrogènes. Cette région du récepteur présente une homologie de séquence de 60% entre les deux isoformes (2). Le LBD arbore une séquence de localisation nucléaire (NLS) (33) et une séquence intervenant dans la dimérisation du récepteur (34) située dans la région charnière, appelée aussi domaine D. Une séquence d'activation transcriptionnelle, appelée fonction d'activation 2 (AF-2), est située dans la région COOH-terminale du LBD. L'AF-2 consiste en une hélice- α , l'hélice 12 (H12), fortement conservée dans la majorité

des récepteurs nucléaires, essentielle pour l'activation transcriptionnelle en réponse au ligand. Cette hélice permet la liaison des coactivateurs transcriptionnels tels que ceux appartenant à la famille des SRC (2). Une fonction d'activation, AF-1, est également présente dans ER α et ER β . L'AF-1 est située dans une région moins conservée du récepteur, soit dans la région NH₂-terminale, identifiée comme le domaine A/B (20). L'AF-1 est une fonction d'activation constitutive qui ne lie pas l'hormone, mais répond plutôt à des signaux intracellulaires d'activation de protéines kinases (35). Cette région permet également le recrutement de coactivateurs transcriptionnels (36). L'AF-1 et l'AF-2 peuvent activer le récepteur en synergie ou de façon indépendante, mais il a été démontré que leur activité est influencée par le contexte du promoteur et par le type de cellules exprimant les ERs (37;38).

ER α et ER β ne sont pas toujours exprimés de façon équivalente et conjointe de sorte que la diversité dans leur patron d'expression laisse suggérer que chaque ER possède des fonctions biologiques bien distinctes. Nous retrouvons conjointement les deux types de ER dans le système nerveux central, tel que dans le cerveau, dans les glandes mammaires, le tractus urogénital, les os et les tissus vasculaires. Cependant, ER α est l'isoforme prédominant dans certains tissus tels que les glandes mammaires, l'utérus et le vagin, tandis que la prédominance de l'expression de ER β est évidente dans les ovaires, la prostate, les testicules, les poumons, l'hypothalamus et le thymus (39). Dans le foie, se trouve majoritairement ER α tandis que dans les tissus gastro-intestinaux, ER β y est plutôt exprimé seul (40). Ces différences d'expression et de régulation des ERs peuvent constituer des cibles importantes pour l'action d'agonistes ou d'antagonistes spécifiques. L'effet spécifique des ERs pourrait alors dépendre de son hormone, du sous-type de récepteur impliqué, des caractéristiques du promoteur du gène cible et de la balance entre coactivateurs et corépresseurs transcriptionnels qui moduleront la réponse transcriptionnelle avec les ERs. Dans cette perspective, les deux récepteurs pourraient donc avoir certaines fonctions redondantes, mais également promouvoir l'expression de gènes qui leur sont spécifiques.

1.2.2 ACTIVATION LIGAND-DÉPENDANTE DE ER

Le mécanisme reconnu d'action des estrogènes est l'activation dépendante du ligand de ER. Ce modèle d'activation des récepteurs nucléaires stipule qu'en absence de l'hormone, le récepteur est séquestré par un complexe multiprotéique d'inhibition. Ces protéines servent de chaperones qui maintiennent le récepteur dans un état inactif ou masquent le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs (4). La localisation exacte des récepteurs dans cette conformation n'est pas claire. Une distribution équilibrée survient probablement entre le cytoplasme et le noyau pour l'ensemble des récepteurs nucléaires. Cet équilibre serait donc renversé après la liaison de l'hormone. Par contre, les récepteurs des estrogènes sont majoritairement nucléaires même en absence de leur ligand (41;42). Des études de mobilité électrophorétique ont montré une affinité différente des ERs pour le ligand et pour l'élément de réponse sur l'ADN (20). Malgré une affinité légèrement plus faible de ER β que ER α pour l'ADN et pour le ligand (K_D de 0.5 nM pour ER β avec E2 et K_D de 0.2 nM pour ER α), ER β peut, tout comme ER α , activer l'expression de gènes cibles (43), mais dans un contexte physiologique pour lequel les niveaux d'estrogènes circulants sont élevés (20).

Le mécanisme d'activation ligand-dépendante se définit par la stimulation des récepteurs suite à la liaison de leur hormone. La liaison du ligand survient sur le domaine LBD et induit un changement conformationnel du récepteur provoquant son activation, son homo- ou son hétérodimérisation et sa liaison spécifique au ERE, élément présent dans les régions régulatrices des gènes cibles (2). Les domaines de transactivation AF-1 et AF-2 participent conjointement à l'activation E2-dépendante du récepteur. Lors de la liaison du ligand au récepteur, celui-ci se trouve alors dans un état hyperphosphorylé (44). La liaison du complexe à l'ADN conduit alors au recrutement de protéines coactivatrices pour former un complexe de coactivation transcriptionnelle assurant les interactions nécessaires avec la machinerie transcriptionnelle de base et le remodelage de la chromatine (45).

Les coactivateurs possèdent un motif de signature qui leur permet d'interagir avec le domaine AF-2 des récepteurs liés par leur ligand. En effet, l'arrivée du ligand favorise une conformation adéquate de l'hélice- α 12 pour permettre au récepteur d'interagir avec le motif LXXLL des coactivateurs. Ce motif signature LXXLL, où L représente une leucine et X un acide aminé quelconque se retrouve dans plusieurs coactivateurs des récepteurs nucléaires dont ceux de la famille des SRC/p160 (46-48).

1.2.2.1 ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE ET MODÈLE COMBINATOIRE

Les protéines cofacteurs incluent les coactivateurs reliés à la famille des p160, soit SRC-1, GRIP1/TIF2, et AIB1/RAC3/ACTR/p/CIP (49;50), les coactivateurs CBP/p300 (CREB-binding protein) (51), et p/CAF, le facteur associé à CBP/p300, et le complexe TRAP/DRIP/ARC. Ces coactivateurs possèdent différentes activités enzymatiques intrinsèques. Leurs activités d'acétylation des histones (HAT), de ligation de l'ubiquitine et de méthyltransférase provoquent la formation d'un complexe de pré-initiation de la transcription et permettent le recrutement de l'ARN polymérase II (52). Un autre complexe de remodelisation de la chromatine est également important dans la formation du complexe de pré-initiation de la transcription et il s'agit du complexe Swi/Snf/BRG (53), un complexe de remodelage dépendant de l'ATP.

Un modèle d'activation transcriptionnelle sous le contrôle d'un complexe combinatoire a été proposé pour les récepteurs nucléaires, modèle étroitement relié au mécanisme d'activation de la transcription chez la levure (53). En effet, selon des études récentes des mécanismes de régulation de la transcription du gène *HO*, impliqué dans la détermination du type sexuel chez la levure, et en considérant la variété des diverses activités des complexes impliqués dans les fonctions des récepteurs nucléaires, il a été émis que les complexes de remodelage de la chromatine ainsi que les complexes comportant des activités HAT sont recrutés initialement au promoteur (54-56). L'action répressive de la

chromatine est alors renversée par ces facteurs, facteurs qui sont analogues aux complexes SWI/SNF et SAGA, qui acétylent les histones nucléosomales et interagissent avec la protéine TBP (TATA-binding protein) (57), intervenant dans l'activation des récepteurs nucléaires. Le recrutement de ces complexes prépare alors le complexe d'initiation de la transcription pour la deuxième étape d'activation génique qui est, elle aussi, dépendante de la chromatine (53). Pour se faire, des facteurs avec des activités HAT sont recrutés par les protéines du complexe de remodelage de la chromatine. Finalement, ces facteurs, tels que P/CAF, CBP/p300 et p160/SRC, requièrent l'action de complexes additionnels qui incluent les protéines TRAP/DRIP/ARC. Récemment, il a été proposé que les facteurs de la famille des p160 et CBP sont libérés du promoteur suite à l'activation de la transcription par le récepteur nucléaire RAR, suggérant une régulation des complexes durant ou à la fin des événements d'activation de la transcription (58).

L'expression des gènes nécessite également plusieurs facteurs de transcription. Chez les eucaryotes, l'ARN polymérase II (Pol II) recrute des facteurs généraux de transcription tels que TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF et TFIIH (59). La transactivation de gènes se produit directement ou par l'intermédiaire d'interactions entre les facteurs de transcription et les éléments de la machinerie transcriptionnelle de base tels que la protéine de liaison de la séquence promotrice TATA (TBP) et les facteurs associés à TBP (TAFs), TFIIB et TFIIH (60). TFIIH est également impliqué dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER) et contient une activité kinase Cdk-dépendante (CAK), c'est-à-dire, une activité kinase directement dépendante d'une Cdk, qui phosphoryle l'extrémité du domaine C-terminal (CTD) de la Pol II. Le complexe CAK est composé, entre autres, de la kinase dépendante de la cycline 7 (Cdk7) et de la cycline H. CAK semble être impliqué dans la régulation de la progression du cycle cellulaire, dans la phosphorylation de la Pol II et dans la phosphorylation de facteurs de transcription (61). D'autres kinases dépendantes de cyclines, les Cdk8 et Cdk9, impliquées également dans la phosphorylation de la Pol II et donc dans les événements d'initiation et d'élongation de la transcription, interagissent directement ou indirectement avec des régulateurs transcriptionnels. Cdk8 (Srb10) fait partie du complexe associé à la Pol II connu sous le nom de SRB ou de complexe SMCC

qui contient plusieurs TAFs. Le SMCC est similaire, sinon identique, au complexe de protéines TRAP/DRIP qui s'associe aux récepteurs nucléaires liés à leur ligand pour en stimuler leur activation (62;63). Ainsi, dans le mécanisme d'activation ligand-dépendante des récepteurs nucléaires, il se produit une hyperphosphorylation du récepteur.

1.2.2.2 ACTIVATION PAR CDK7

Pour le récepteur des estrogènes ER α , la phosphorylation ligand-dépendante de la serine de la serine 118 (64) est provoquée par la surexpression de la Cdk7 causant l'augmentation de l'activité de la transcription. De plus, la phosphorylation de la S118 survient suite à l'interaction de TFIIH avec le domaine de liaison au ligand (LBD) de ER α . Pour se faire, l'interaction de ER α avec TFIIH, composé de CAK, requiert l'intégrité de l'hélice- α 12 de l'AF-2 du LBD de ER α . De plus, l'association des sous-unités p62 et XPD de TFIIH avec l'AF-2 de ER α dans un mode d'activation ligand-dépendante est également nécessaire (65).

1.2.2.3 ACTIVATION PAR LES MAPK

L'activité transcriptionnelle de ER est également régulée par la MAP kinase p38 en présence du ligand (E2) et de sa MAP kinase kinase kinase 1, soit MEKK1. ER α est activé de façon p38-dépendante par les estrogènes dans des cellules d'adénocarcinome endométrial et p38 est responsable de la phosphorylation du récepteur. La phosphorylation ligand-dépendante de ER α ne se fait pas sur l'AF-1, mais le site de phosphorylation identifié se situe plutôt au niveau de l'hélice 1 du LBD, soit à la thréonine-311 (66). La mutation de la thréonine-311 en alanine n'affecte pas la liaison du ligand au récepteur, mais compromet son interaction avec les coactivateurs. De plus, l'inhibition de l'activité de p38 abolit la relocalisation estrogènes-dépendante du récepteur du cytoplasme vers le noyau, en

plus d'inhiber l'activation de la transcription de ER α provoquée par le ligand et MEKK1. L'activation ligand-dépendante de ER α est donc régulée par la phosphorylation de p38 qui favorisera la localisation nucléaire du récepteur ainsi que son interaction avec les coactivateurs de la famille des p160 (66).

1.2.2.4 CORÉPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE

Les récepteurs nucléaires hormonaux peuvent réprimer la transcription dans certaines circonstances. La répression survient en absence de ligand ou lors de la liaison d'un antagoniste au récepteur (67;68). La répression transcriptionnelle implique plusieurs mécanismes. Elle peut résulter de la liaison directe d'un répresseur à l'ADN, provenir de la compétition entre deux protéines pour un même élément d'ADN empêchant ainsi la liaison d'un activateur ou être directement causée par la répression de la machinerie de transcription basale indépendamment de la présence ou de l'absence d'un activateur. C'est de cette dernière façon que la plupart des récepteurs nucléaires participent à la répression transcriptionnelle. Le recrutement de corépresseurs tels que SMRT (silencing mediator for retinoic and thyroid hormone receptors), N-CoR (nuclear receptor corepressor) et SUN-CoR (small ubiquitous nuclear corepressor) participe à la répression des gènes contrôlés par ER (69). Lors de leur liaison au complexe ER-ERE, les corépresseurs répriment l'ouverture de la chromatine et bloquent la transcription par le recrutement d'un complexe contenant des déacétylases d'histones (HDAC) et le répresseur mSin3 (52). Le recrutement des HDAC peut se faire directement à l'activateur ou par le biais de facteurs généraux de transcription tels TFIIB comme dans le cas du récepteur de la thyroïde (TR) (70). Il a été démontré que ER et PR n'interagissent pas avec N-CoR ou SMRT en l'absence de leur ligand (71). Il semble cependant que leur antagoniste respectif, soit le tamoxifène et le RU486, favorise une telle interaction (67;71).

1.2.3 ER ET CANCERS GYNÉCOLOGIQUES

Les estrogènes sont fortement impliqués dans le développement et la progression du cancer du sein et de l'utérus et beaucoup d'efforts ont été déployés pour contrevenir à ces effets indésirables que ce soit par la découverte d'un traitement efficace ou pour améliorer le pronostic de la maladie. Au Canada, en 2003, le cancer le plus fréquent chez les femmes reste le cancer du sein. Son incidence (21100 nouveaux cas) et sa mortalité (5300 morts), quoique très élevées selon les prédictions, ont diminué grandement depuis 1986 grâce à l'accroissement des examens des seins par la mammographie et la thérapie hormonale (72). L'inhibition de l'activité des récepteurs des estrogènes dans les cellules cancéreuses par les antiestrogènes tels le 4-hydroxytamoxifène (OHT), un antiestrogène partiel, a conduit à l'utilisation de ces composés comme agents thérapeutiques pour le traitement ou la prévention du cancer du sein. Cependant, les études au laboratoire utilisant le OHT et le ICI 164,384, un antiestrogène pur, indiquent que malgré l'inhibition des effets des estrogènes par ces composés, leur mode d'action diverge. OHT provoque le blocage de la fonction d'activation 2 tandis que le ICI 164,384 inhibe l'activation de l'AF-1 et de l'AF-2. Par ce fait, il a été montré que l'utilisation de OHT engendre un effet mixte, soit un effet antagoniste dans le tissu mammaire, mais également un effet agoniste dans le tissu utérin limitant les bénéfices thérapeutiques du tamoxifène. En effet, avec l'utilisation du tamoxifène chez les femmes atteintes de cancer du sein s'installe une résistance thérapeutique qui conduit souvent à l'apparition de métastases et d'un taux de survie diminué (73). Cet effet, qualifié d'effet de résistance des cellules au 4-hydroxytamoxifène, active ER α et requiert un domaine AF-1 intact (74). Un des mécanismes possibles responsables de l'activation des récepteurs des estrogènes dans les cellules résistantes est l'utilisation de voies non-hormonales ou ligand-indépendantes.

1.2.4 ACTIVATION LIGAND-INDEPENDANTE DE ER

En plus, de leur activation ligand-dépendante, les récepteurs des estrogènes peuvent être modulés par des signaux intracellulaires et extracellulaires en absence de ligand. En effet, il existe plusieurs composés non-stéroïdiens pouvant efficacement activer la transcription par les récepteurs des estrogènes tels que la dopamine, les facteurs de croissance EGF (epidermal growth factor), TGF α (tumor growth factor α), IGF-1 (insulin growth factor-1) AMPc et le phorbol ester (tetradecanoylphorbol) (75;76). Les récepteurs des estrogènes sont des phosphoprotéines pour lesquelles les fonctions peuvent être altérées par des changements dans leur état de phosphorylation en absence de leur hormone ou de l'état de phosphorylation de protéines avec lesquelles elles interagissent. Le récepteur des estrogènes est principalement phosphorylé sur des résidus serines se situant dans la région A/B (AF-1), mais la phosphorylation de résidus tyrosine et serine dans la région D/E/F a également été observée (77-79). La plupart des résidus serines de l'AF-1 sont contenus à l'intérieur de sites consensus pour les MAPK. Par conséquent, les activateurs de MAPK, tels que les facteurs de croissance, favorisent l'activation estrogènes-indépendante du récepteur en induisant la phosphorylation de sites spécifiques sur ER α et ER β (80).

1.2.4.1 ACTIVATION PAR LES MAPK

La signalisation par les MAPK (mitogen-activating protein kinase) consiste en une voie alternative d'activation des ERs. La cascade d'événements intracellulaires qui transmet le signal EGF ou un autre facteur de croissance pour activer ER débute par la stimulation de la voie de signalisation Ras-Raf-MAPK par les récepteurs membranaires tyrosine kinase tels EGFR. Par la suite, cette activation mène à la phosphorylation de ER sur des résidus serines appartenant à des séquences consensus de phosphorylation par les MAPK, soit le motif PXX-S/T-P où P signifie proline, S, serine et T, thréonine. Ainsi ER α est phosphorylé sur la serine 118 en réponse à EGF et il s'ensuit alors une activation de la

transcription (81). La phosphorylation sur l'AF-1 de ER β se fait, entre autres, sur les serines 106 et 124 par les MAPK. Récemment, une relation a été établie entre la phosphorylation de sites sur ER β et l'activation de la transcription. En effet, il a été montré que la phosphorylation des serines 106 et 124 par les MAPK provoque le recrutement du coactivateur SRC-1 et ce, en absence d'estrogènes (82). Une autre étude démontre que l'activation dépendante de EGF de ER α se produit par la phosphorylation de la serine 167 par la kinase pp90^{rsk1} (83) suite à l'activation de pp90^{rsk1} par les MAPK. Enfin, les coactivateurs jouent un rôle important dans l'habilité des facteurs de croissance à activer ER. Il a été montré que les coactivateurs de la famille p160 sont des cibles des MAPK et que cette phosphorylation favorise l'interaction avec p300/CBP et possiblement avec d'autres coactivateurs (84;85). Ces interactions mènent, par la suite, à une régulation directe de la transcription par le récepteur.

1.2.4.2 ACTIVATION PAR PKA

La voie de signalisation de la protéine kinase A (PKA) module également l'activité de ER. Il a été montré que le neurotransmetteur dopamine stimule la transactivation des récepteurs des estrogènes possiblement par l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPC et l'activation de la PKA (86;87). Cependant, il s'avère que l'activation de ER α par la PKA ne requiert pas la phosphorylation de la serine 118 ou du domaine A/B (88). Par conséquent, la participation de la voie dépendante de l'AMPC dans l'activation de ER en absence d'une augmentation de la phosphorylation suggère que les protéines associées au récepteur sont elles-mêmes des cibles de phosphorylation occasionnant l'activation de la transcription. Il a en effet été montré que le 8-bromo-AMPC (8Br-AMPC), un activateur de la PKA, provoque la phosphorylation du coactivateur SRC-1 (89) et que la mutation des sites phosphorylés de SRC-1 réduit l'activation transcriptionnelle autant de façon ligand-indépendante que ligand-dépendante des ERs. Récemment, il a été observé que la phosphorylation provoquée par PKA sur ER α survient sur la serine 236, située dans le

domaine de liaison à l'ADN. Dans ce cas-ci, la phosphorylation ne participe pas à la régulation de l'activité transcriptionnelle du récepteur en modulant l'interaction des domaines d'activation de celui-ci avec les coactivateurs, mais plutôt en empêchant la liaison du récepteur à l'ADN et en abrogeant sa dimérisation (79). Des différences mécanistiques existent cependant dans l'activation ligand-indépendante des gènes par ER α et de ER β par la voie d'activation de l'AMPc (90). Il semble que les deux récepteurs ne recrutent pas les mêmes cofacteurs suite à l'activation intracellulaire de la voie de PKA. En effet, même si les coactivateurs CBP et ceux de la famille des p160 sont nécessaires à la stimulation PKA-dépendante de la transcription par ER α et ER β , la mutation des deux sites de phosphorylation de SRC-1 inductibles par l'AMPc ou encore la mutation des sept sites connus de phosphorylation sur SRC-1 n'atténue pas, de façon significative, l'activation de ER α par l'AMPc (90). De plus, la régulation de la transcription par la forskolin/IBMX (forskolin plus 3-isobutyl-1-méthylxanthine), qui augmente la quantité d'AMPc intracellulaire, ne nécessite pas les mêmes domaines fonctionnels sur ER α et sur ER β (90). Les domaines E/F de ER α sont suffisants à l'activation de la transcription par la forskolin/IBMX s'accompagnant d'une augmentation de la phosphorylation du récepteur. Cependant, la signalisation par l'AMPc sur ER β en réduit la phosphorylation des domaines correspondants ce qui corrèle avec une absence de stimulation de l'activité transcriptionnelle.

1.2.4.3 ACTIVATION PAR AKT

Les antiestrogènes, tels que le tamoxifène, inhibent la croissance des cancers du sein ER-positifs en réduisant l'expression des gènes régulés par les estrogènes. Cependant, la résistance des tumeurs ER-positives aux antiestrogènes restent un problème clinique des plus importants (91). Un lien existe entre l'activation de la voie de survie PI 3-kinase/AKT par les facteurs de croissance, l'activation hormono-indépendante de ER α , et l'inhibition de l'apoptose causée par le traitement au tamoxifène. En effet, bien que la PI 3-kinase puisse

augmenter l'activité de l'AF-1 et de l'AF-2 de ER α , AKT, quant à lui, stimulera l'activité de l'AF-1 (92). Dans la membrane plasmique, PI 3-kinase promouvoit la formation de phosphoinositides phosphorylés en 3' qui, à leur tour, se lient à AKT. AKT, lié aux phosphoinositides, se relocalise du cytoplasme à la membrane plasmique où il sera activé suite à sa phosphorylation sur la thréonine 308 et la serine 473 (93). L'activation de AKT provoquera alors la survie cellulaire, la prolifération et la croissance cellulaire en phosphorylant et en modulant l'activité d'une variété de facteurs de transcription dans le noyau. Une étude récente a démontré que même si une activation prolongée des MAPK provoque l'inhibition de la croissance de cellules du cancer du sein, une activation cellulaire en parallèle de la voie PI 3-kinase/AKT par EGF et IGF-1 est suffisante pour empêcher une telle inhibition de croissance (94). Selon le modèle proposé par les auteurs, ces facteurs de croissance utilisent la voie de la PI 3-kinase pour activer ER α sur un site consensus de phosphorylation par AKT (RXRXX(S/T)) (94), soit la serine 167 située dans l'AF-1, ce qui confère alors une croissance ligand-indépendante des cellules (92).

1.2.4.4 ACTIVATION PAR LES CDK

Les résidus serines sont les acides aminés de ER α qui sont couramment modifiés, et quatre d'entre eux (Ser-104, Ser-106, Ser-118 et Ser-167) sont concentrés dans la région N-terminale de l'AF-1 du récepteur (64). Les séquences qui contiennent ces serines appartiennent aux sites consensus ciblés par des protéines kinases dirigées vers les sites serine/proline telles que les MAPK, la GSK-3 (glycogen synthase kinase-3) et les Cdk. En particulier, les serines 104 et 106 de ER α ont été identifiées comme étant des cibles de phosphorylation par le complexe cycline A-Cdk2 (95). Durant la phase S du cycle cellulaire, la phosphorylation des composants de la machinerie de réplication de l'ADN par le complexe cycline A-Cdk est importante pour l'initiation de la réplication et pour restreindre l'initiation à une seule fois par cycle. Durant la mitose, le rôle de la cycline A est incertain, mais elle semble contribuer au contrôle de la stabilité de la cycline B. La

cycline A est très abondante durant la phase S et est rapidement dégradée par le protéasome avant la métaphase de la cellule (96). Les serines 104 et 106 de ER α participent donc à l'activation transcriptionnelle de ER α suite à leur phosphorylation par le complexe cycline A-Cdk2. De plus, l'activation cycline A-Cdk2-dépendante de la transcription provoquée par ER α est AF-2-indépendante. Il a donc été proposé que la phosphorylation ligand-indépendante de ER α sur les serines 104 et 106 par ce complexe module le recrutement de protéines additionnelles sur l'AF-1 de ER α telles que les coactivateurs de la famille p160 (97), selon que le récepteur provoque la prolifération ou inhibe la différenciation cellulaire. Également, le niveau d'activation du complexe cycline A-Cdk2 pourrait engendrer des variations des niveaux de phosphorylation et ainsi, moduler l'interaction de ER α avec des protéines intervenant dans la transcription (95).

1.2.4.5 ACTIVATION PAR PKC

Les réponses transcriptionnelles hormono-indépendantes de ER α peuvent également être influencées par des agents stimulant la signalisation intracellulaire de la protéine kinase C (PKC) (80;98). En effet, l'activation de gènes rapporteurs par ER peut être bloquée par un inhibiteur de PKC, soit le GF109203X (98). De plus, il a été montré qu'il se produit une augmentation de la phosphorylation du domaine A/B de ER α suite à la stimulation de cellules avec un activateur de la voie de PKC, le phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (99;100). Bien que cette voie d'activation ligand-indépendante de ER reste peu caractérisée, la phosphorylation de la serine 118 semble jouer un rôle dans la réponse de ER α à la voie de la PKC (101).

1.2.4.6 AUTRES MÉCANISMES D'ACTIVATION

D'autres mécanismes cellulaires qui n'impliquent pas forcément la phosphorylation conduisent à une transactivation ligand-indépendante de ER. La cycline D1, par un mécanisme indépendant d'une Cdk, a la propriété d'activer ER (102;103). Le modèle propose que la cycline D1 interagisse directement avec SRC-1 par le biais d'une région qui est similaire à la séquence signature d'interaction des coactivateurs (LXXLL) dans l'AF-2. Dans ce contexte, la cycline D1 est nécessaire au recrutement de coactivateurs en absence de ligand et agit comme facteur de liaison entre le récepteur et SRC-1 (104). La cycline D1 joue ainsi un rôle crucial dans l'activation de ER en recrutant des protéines de modification de la chromatine telles que les histones acétyltransférases (HAT). D'autres coactivateurs tels que P/CAF ont également des associations fonctionnelles avec la cycline D1 (105).

Les récepteurs des estrogènes peuvent non seulement réguler l'expression de gènes cibles par le biais des éléments de réponse aux estrogènes (ERE), mais également par des éléments non-consensus. Les ERs modulent la transcription de façon ERE-dépendante sur des éléments alternatifs tels que les sites AP-1 (106). Ces sites lient les facteurs de transcription Jun et Fos, mais n'interagissent pas directement avec les ERs. La liaison de Jun/Fos est donc requise sur les sites AP-1 pour que ER puisse moduler l'activité transcriptionnelle intrinsèque de Jun/Fos sans toutefois lui être nécessaire. L'hétérodimère Jun/Fos stimule la transcription en recrutant les protéines coactivatrices CBP/p300 et des membres de la famille p160 tout comme ER recrute les coactivateurs transcriptionnels au ERE. Toutefois, les patrons d'interaction semblent différents. Ainsi Jun/Fos lie directement CBP tandis que ER a des contacts directs avec les composants p160. Ceci signifie que les contacts de liaison avec les cofacteurs sont toujours accessibles pour ER au moment où les coactivateurs sont recrutés par Jun/Fos et que, par conséquent, les ERs lient les protéines de la famille p160 déjà recrutés par Jun/Fos (107). L'activation de l'expression des gènes de IGF-1 et de la collagénase par ER α est causée par l'interaction du récepteur avec le complexe Jun/Fos au site AP-1 (2). Il existe également des gènes cibles

des ERs qui sont constitués de promoteurs riches en séquences GC, caractéristiques des sites Sp-1, qui sont activés suite à des interactions ER α -Sp1 et ER β -Sp1 (108).

1.2.5 SIGNALISATION NON-GÉNOMIQUE DES ER

Contrairement aux mécanismes relativement bien décrits de l'action génomique des stéroïdes, l'action non-génomique des stéroïdes est, quant à elle, moins bien connue. En effet, les estrogènes ont des effets cellulaires qui ne peuvent s'expliquer par une activation de la transcription de leur récepteur. La signalisation non-génomique des stéroïdes possèdent quelques caractéristiques. Tout d'abord, les réponses intracellulaires se produisent à l'intérieur de quelques minutes, soit des temps trop rapides pour donner place à des événements de transcription et de traduction qui demandent des délais plus longs. Ensuite, la signalisation non-génomique causée par ces stéroïdes provoque des réponses cellulaires qui sont réfractaires aux inhibiteurs de la transcription et de la traduction (80). Des effets non-génomiques ont été répertoriés pour plusieurs types de stéroïdes dont les estrogènes.

Un des exemples les plus étudiés de l'action cytoplasmique des estrogènes est l'activation de la voie Src/Ras/Erk (extracellular signal-regulated kinase), un mécanisme d'action qui met en perspective les effets prolifératifs des estrogènes (109). En effet, il semble que les estrogènes (E2) activent rapidement Erk1/Erk2. Dans des cellules mammaires cancéreuses, sous des conditions dépendante des estrogènes, il a été montré qu'une activation rapide et transitoire des MAPK, Erk1/Erk2 survient, accompagnée d'une augmentation de la forme active de la protéine p21^{ras} (110).

De plus, la progestine, ligand du récepteur de la progestérone, stimule également la signalisation Src/Erk par le biais de ER (109). Ainsi, l'association ER-Src est requise pour l'activation de la signalisation par les estrogènes, mais également pour l'action de la

progestérone. La liaison de la progestine avec le récepteur de la progestérone, préalablement associé à ER, induit l'association entre PR, ER et c-Src et initie ainsi la cascade des MAPK jusqu'au noyau (109).

Dans des cellules exprimant le récepteur des androgènes (AR) et le récepteur des estrogènes, une stimulation aux androgènes et aux estrogènes couple des récepteurs stéroïdiens à une signalisation cytoplasmique. Ainsi la prolifération de cellules prostatiques cancéreuses survient suite à l'induction d'un complexe tertiaire ER-AR-Src (111). Par conséquent, il a été montré que l'activation de la signalisation par Src dans des cellules prostatiques survient grâce à des interactions directes entre les récepteurs stéroïdiens et leurs hormones avec Src. Src interagit avec ER α et ER β par l'entremise de son domaine SH2. De plus, AR interagit avec le domaine SH3 de Src à l'aide de sa séquence riche en proline (111). Chacun des deux stéroïdes, en présence de AR et ER, est capable de provoquer l'activation de la kinase Src en favorisant la formation du complexe ternaire ER-AR-Src indispensable à l'activation de la signalisation des MAPK. Tout empêchement de l'assemblage de ce complexe par des antagonistes de ER ou de AR prévient l'activation de Src.

L'existence d'un nouveau mécanisme non-génomique de signalisation des ERs dans les cellules endothéliales peut expliquer la libération rapide d'oxyde nitrique (NO) suite à une stimulation des estrogènes (112). ER α peut interagir avec la kinase lipidique PI 3-kinase. Une fois ER lié par son hormone, il se produit une interaction physique et fonctionnelle entre la sous-unité régulatrice de la PI 3-kinase, p85 α , et ER α provoquant l'activation de la PI3K et de sa signalisation. (113). Cette association est strictement dépendante de la concentration d'estradiol et peut être renversée par des antagonistes purs tel que le ICI 182,780. Un traitement à l'estradiol provoque une augmentation rapide de la libération de NO due à l'activation de la eNOS, la synthase de NO, dans les cellules endothéliales.

Les protéines STAT (signal transducers and activators of transcription) sont des facteurs de transcription qui, inactifs, sont présents dans le cytoplasme et qui sont activés en réponse à

un large éventail de cytokines, de facteurs de croissance et d'hormones. Lors de la liaison d'un ligand à son récepteur cytokine approprié, l'activation des protéines associées au récepteur, soit les kinases de la famille Janus (JAK), s'en suit et celles-ci provoquent la phosphorylation d'un résidu tyrosine dans la région C-terminale des Stats. Les Stats phosphorylés se dimérisent alors, et se relocalisent vers le noyau où ils régulent la transcription (114). Dû aux faits que les Stats sont activés par la phosphorylation et parce que le 17 β -estradiol provoque l'induction rapide de cascades de phosphorylation dans le cytoplasme, il a été montré que les ERs liés à leur ligand activent des voies de signalisation cytoplasmiques résultant en une activation des promoteurs régulés par les Stats via les protéines Stat5 et Stat3. La phosphorylation de résidus tyrosine et serine de Stat5 et Stat3 est provoquée par l'estradiol et les voies de signalisation des MAPK, de la PI 3-kinase et de la kinase Src sont requises à l'activation estradiol-dépendante des promoteurs régulés par les Stats. Bref, ce mécanisme d'action des estrogènes lie les effets génomiques aux effets non-génomiques des ERs (115).

1.3 LA VOIE UBIQUITINE-PROTÉASOME

Les cellules exploitent une variété de mécanismes afin de contrôler étroitement les fonctions des activateurs transcriptionnels. Les processus qui limitent l'activité, la localisation et l'abondance des facteurs de transcription jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes et le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ainsi, en plus d'une régulation par la phosphorylation et la déphosphorylation, les activités cellulaires sont maintenues grâce à une balance entre la synthèse et la dégradation des molécules intervenant dans la signalisation cellulaire. Un mécanisme proéminent de régulation des fonctions des facteurs de transcription est donc la protéolyse. Par conséquent, la destruction rapide et contrôlée des facteurs de transcription tels que Myc, Jun, p53 et E2F-1 garde les niveaux intracellulaires de ces protéines assez bas et favorables à répondre à un stimulus environnemental (116). Plusieurs processus protéolytiques sont

impliqués dans la dégradation de facteurs de transcription. Le clivage de protéines par les calpaines (117) et l'action des protéases du lysosome (118) en sont deux types, mais le mécanisme de dégradation le plus répandu de dégradation de facteurs de transcription est la protéolyse gouvernée par l'ubiquitine et le protéasome.

La voie ubiquitine-protéasome est le principal système de dégradation protéique des cellules eucaryotes (119). Cette voie de dégradation, dépendante de l'ATP (adénosine triphosphate), a été découverte il y a plus de 20 ans, mais l'implication et le rôle de ces diverses composantes dans la cellule n'ont été démontrées qu'à la fin des années 1980 (120). La compréhension de l'importance de ce système dans la régulation de différents processus cellulaires provient d'études biochimiques faites à partir d'extraits de cellules de mammifères et d'études génétiques sur la levure (119;121).

1.3.1 FONCTIONS BIOLOGIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DU PROTÉASOME

C'est avec le développement d'inhibiteurs perméables aux cellules tels que le MG132 et le Clasto-lactacystine- β -lactone qui permettent de bloquer l'activité fonctionnelle du protéasome que les connaissances de son rôle physiologique dans les cellules de mammifères se sont développées. En effet, l'utilisation de ces inhibiteurs a permis de démontrer que le protéasome ne catalyse pas seulement la dégradation des protéines possédant une courte demi-vie, mais également, celles possédant un temps de vie plus long (122). De plus, les études utilisant ces composés ont démontré que la voie ubiquitine-protéasome est responsable de la dégradation d'une large variété de protéines et qu'elle est essentielle à la régulation de plusieurs mécanismes cellulaires (**Tableau I** (119)).

Tableau I. Fonctions physiologiques de la voie ubiquitine-protéasome et cibles protéiques visées

Fonctions	Cibles	Références
Progression du cycle cellulaire	p27 ^{Kip1} , p21, cyclines	(123-125)
Oncogenèse	p53, p27 ^{Kip1} , bax, IκB	(126-130)
Apoptose	Bcl-2, cIAP, XIAP	(131-135)
Régulation de l'expression génique	c-Jun, E2F-1, IκB, β-caténine	(116)
Inflammation	IκB, précurseur p105 de NF-κB	(133-137)
Mémoire à long terme	Sous-unité régulatrice de la protéine kinase A	(138)
Régulation des voies métaboliques	Ornithine décarboxylase, HMG-CoA réductase	(139)
Surveillance immune	Protéines cytosoliques et nucléaires	(140)
Atrophie musculaire	Alpha-lactalbumin	(141;142)
Contrôle de qualité des protéines	CFTRΔF508, α ₁ -antitrypsine (Z-variant), calmoduline mature	(143;144)
Régulation du rythme circadien	Protéine Timeless	(145)
Photomorphogénèse des plantes	Facteur de transcription Hy5	(146;147)

Par exemple, la progression du cycle cellulaire est contrôlée par la dégradation protéasomale des cyclines et des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (Cdk) (124), tandis que la dégradation des protéines kinases activées, *src* (123) et protéine kinase C (125), est essentielle à la terminaison de cascades dans la transduction de signaux cellulaires.

La voie ubiquitine-protéasome joue également un rôle important dans la régulation de plusieurs processus physiologiques dans le développement d'un grand nombre de maladies humaines majeures. Par exemple, la dégradation du suppresseur de tumeur p53 et des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines p27^{Kip1} et p21 (Cdk) favorisent la tumorigénèse. Il semble en effet que des niveaux cellulaires bas de p27 et de p21 soient associés à un facteur de pronostic faible dans plusieurs cancers (126;128) tels que les cancers du sein et de la prostate (127). Par contre, les inhibiteurs de protéasome, qui induisent une régulation à la hausse de ces Cdk, favorisent l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses (131;132). La dégradation protéasomale de I κ B, l'inhibiteur du facteur de transcription NF- κ B, est essentielle à l'initiation de la réponse inflammatoire (136;137). En effet, lors de circonstances normales, NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme et maintenu inactif par son inhibiteur protéique I κ B. Lors d'un stress cellulaire, I κ B est dégradé par le protéasome permettant à NF- κ B de se relocaliser vers le noyau. NF- κ B favorise alors la survie cellulaire en initiant la transcription de gènes encodant des enzymes de réponse au stress, des molécules d'adhésion cellulaire, des cytokines pro-inflammatoires et des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, cIAP1 et cIAP2 (133-135). NF- κ B est constitutivement actif dans certains types de tumeurs malignes et agit sur la survie des cellules tumorales, puis dans la réduction de l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses (130). L'activité constitutive de NF- κ B corrèle avec la résistance *in vitro* aux traitements (130). Il a été montré que l'inhibition du protéasome dans la cellule bloque l'activation de NF- κ B induite par la chimiothérapie et qu'elle correspond à une augmentation de la sensibilité de la chimiothérapie et à une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales (129).

La voie ubiquitine-protéasome agit également aussi bien sur la surveillance immune (140), l'atrophie musculaire (141;142), la régulation des voies métaboliques (139), l'acquisition d'une mémoire à long terme (138) que sur la régulation des rythmes circadiens (145) et sur la photomorphogénèse des plantes (146;147).

Une autre fonction de la voie ubiquitine-protéasome est la dégradation sélective de protéines mutées, endommagées et/ou mal repliées. En effet, environ le tiers des protéines nouvellement synthétisées ne se replient pas de façon adéquate et sont ainsi dégradées par le protéasome (143;146). De plus, les dommages post-traductionnels, tels que les dommages occasionnés par les radicaux oxygène ou par l'isomérisation des résidus acides aspartiques, pouvant se produire, par exemple, durant la maturation de la calmoduline (144), provoquent aussi la dégradation rapide d'une protéine.

1.3.2 ANATOMIE ET MÉCANISME D'ACTION DU PROTÉASOME

La voie de dégradation ubiquitine-protéasome est composée du protéasome 26S qui est un complexe protéolytique multifonctionnel ATP-dépendant de 2.5 MDa constitué d'au moins 44 polypeptides. Le noyau de ce complexe se compose d'une sous-unité centrale protéolytique, le protéasome 20S (720 kDa), située entre deux complexes régulateurs 19S (890 kDa) aussi appelées PA 700 (119).

Le protéasome 20S consiste en une cavité cylindrique formée de 4 anneaux superposés. Chacun des anneaux externes est composé de 7 sous-unités α différentes tandis que les anneaux internes sont constitués de 7 différentes sous-unités β (148). Trois différents sites protéolytiques actifs sont contenus dans chaque anneau β et ces sites, identifiés par diffraction aux rayons X, sont les sites de liaison d'une classe de composés inhibiteurs du protéasome 26S, les peptides aldéhydes. Un des sites, appelé « chymotrypsin-like », coupe préférentiellement les peptides en C-terminal des résidus hydrophobes, tandis que le site

« trypsin-like » clive les peptides après les acides aminés basiques et le site « caspase-like » coupe les protéines en C-terminal des résidus acides aspartiques. De plus, même si le mécanisme de protéolyse est similaire aux protéases serines, une caractéristique unique du protéasome 26S est son utilisation de résidus catalytiques thréonine (149). Les sites actifs du protéasome font face à la cavité interne du cylindre et la seule façon, pour les substrats, de les atteindre est par leur passage à travers le canal formé par les sous-unités α . Également observé par diffraction aux rayons X, ces canaux sont complètement fermés lorsque le protéasome 20S est libre et latent, contrairement à la majorité des autres protéases qui ont des sites actifs facilement accessibles (150). Les sites actifs du protéasome 26S, étant confinés dans la partie interne du protéasome central 20S, favorisent donc la dégradation contrôlée des protéines cellulaires.

Les complexes de régulation 19S contrôlent l'accès des substrats dans le cœur protéolytique du protéasome 26S. Chacune des particules 19S est composée d'un socle ou base et d'un détecteur. Le détecteur contient au moins 9 polypeptides et se lie, avec une grande affinité, à la chaîne de polyubiquitines accrochée au substrat pour la cliver du substrat. Le socle ou base est composé de 8 polypeptides incluant 6 ATPases homologues de la famille AAA et est associé au protéasome 20S. Les ATPases interagissent directement avec les anneaux α du 20S provoquant ainsi l'ouverture ATP-dépendante du canal formé par les anneaux α ce qui permet, par la suite, l'entrée des polypeptides dénaturés dans le cœur protéolytique du protéasome. Les ATPases déplient et dénaturent également les protéines et catalysent leur relocalisation vers le 20S. Contrairement à la grande majorité des protéases qui coupent d'abord les peptides puis libèrent ensuite les 2 fragments, le protéasome 26S coupe les polypeptides à de multiples endroits, sans libérer les fragments créés, puis génère de petits peptides de 3 à 22 résidus. Durant ce processus, les molécules d'ubiquitine sont libérées par les complexes 19S pour être réutilisées dans la dégradation de d'autres substrats (151;152).

1.3.3 INHIBITEURS

Les inhibiteurs du protéasome interagissent sur l'activité protéolytique centrale du protéasome 20S. Ces inhibiteurs lient réversiblement ou irréversiblement les sites actifs thréonine du protéasome 26S. Il existe 5 classes d'inhibiteurs de protéasome 26S, soient les peptides aldéhydes, les peptides boronates, les peptide vinyl sulfones, les peptides epoxyketones et les inhibiteurs non-protéiques β -lactone (153). Les données recueillies à partir d'études animales ne sont disponibles que pour les peptides aldéhydes, les peptides boronates et les inhibiteurs β -lactone tandis que pour les autres classes, les études ont été limitées à des expériences sur des lignées cellulaires. Le bortezomib ($K_i = 0.62$ nM), un peptide boronate, est le premier inhibiteur de protéasome à avoir été testé sur les humains (153;154). Dans les modèles d'essais pré-cliniques sur différents types de tumeurs, soient mammaire, poumons, colon, pancréas et ovaires, le bortezomib démontre l'activité la plus efficace de réduction du volume des tumeurs lorsque combiné avec des agents standards de chimiothérapie (154). Les données pré-cliniques suggèrent alors que dans ces circonstances, le bortezomib induirait l'inhibition de la voie de NF- κ B et causerait la réduction de la croissance tumorale.

Les peptides aldéhydes inhibent l'activité « chymotrysin-like » du protéasome 20S en se liant aux sites actifs. Ces composés sont, par contre, perméables et agissent de façon réversible. Sans doute le plus connu des peptides aldéhydes est le MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) ($K_i = 4.0$ nM) qui est un inhibiteur possédant un potentiel d'efficacité très élevé pour inhiber le protéasome en plus d'avoir une meilleure sélectivité sur les différents systèmes de dégradation (119). Dû à son action rapide de réversibilité, le MG132 est le premier choix d'inhibiteur utilisé dans l'étude du protéasome sur des cellules et des tissus (119).

Les peptides boronates (K_i entre 0.03 et 0.62 nM), plus efficaces que les peptides aldéhydes, agissent selon le même mécanisme d'inhibition que les aldéhydes. Ils forment

un adduct tétrahydrique avec la thréonine des sites actifs, ce qui les rend réversibles, mais de part leur lenteur à s'en dissocier, ils deviennent irréversibles (153).

L'inhibiteur lactacystine, un métabolite des *Streptomyces*, est un composé qui peut induire la différenciation des cellules neuronales en culture (155). Cependant, lors de l'étude de son mode d'action, il a été montré qu'il peut sélectivement modifier une des sous-unités β ($\beta 5$) du protéasome 20S de mammifère et qu'il peut en bloquer l'activité catalytique de façon irréversible (119;156). Il a également été montré que la lactacystine, par elle-même, n'est pas active contre l'activité du protéasome, mais elle doit subir une réaction spontanée qui la transforme en clasto-lactacystine- β -lactone à un pH physiologique. Cette β -lactone, plus sélective que les peptides aldéhydes, est considérée comme un inhibiteur irréversible, même si l'adduct formé avec la thréonine est lentement hydrolysable par l'eau restaurant l'action de protéolyse du protéasome (157).

Les inhibiteurs du protéasome sont des outils essentiels à la découverte de substrats de la voie ubiquitine-protéasome 26S et dans l'établissement des rôles de cette même voie dans différents processus biologiques. Étant donné l'importance du protéasome dans diverses fonctions cellulaires, ces inhibiteurs ont de multiples et complexes effets sur les cellules vivantes. Ils inhibent donc la dégradation des protéines cellulaires (122), provoquent l'induction de la réponse à un choc thermique (158) et il sont cytotoxiques (159). Par contre, leur capacité à inhiber la prolifération cellulaire et l'angiogénèse, et à induire sélectivement l'apoptose en font des candidats susceptibles d'être considérés dans les traitements anti-cancéreux. D'ailleurs, citons le bortezomib, décrit précédemment, qui provoquerait la réduction de la croissance tumorale (160-162). Enfin, les inhibiteurs du protéasome engendrent des réponses anti-inflammatoires dans la cellule (137;160;161), bloquent la libération et la maturation du HIV et de d'autres rétrovirus dans les cellule (163) en plus d'inhiber la présentation d'antigènes (140).

1.3.4 L'UBIQUITINATION DES PROTÉINES

1.3.4.1 DESCRIPTION ET MODE D'ACTION

Chez les eucaryotes, l'ubiquitine, un polypeptide de 76 résidus, agit par son action de conjugaison covalente à des protéines intracellulaires (164;165). Les substrats marqués d'une chaîne de polyubiquitines, déterminant majeur de la stabilité protéique, sont ciblés par le protéasome 26S. Les substrats marqués d'une ou de quelques molécules d'ubiquitine sont plutôt ciblés par l'activité lysosomale (166).

L'ubiquitination d'une protéine requiert l'action de trois classes d'enzymes nommées enzyme activatrice d'ubiquitine E1 (UBA), enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2 (UBC) et enzyme de ligation de l'ubiquitine E3 (167;168). L'enzyme activatrice E1 forme un lien thiol ester, ATP-dépendant, avec le groupe carboxyl de la glycine 46 de l'ubiquitine favorisant l'activation de la portion C-terminale de la molécule pour les attaques nucléophiliques subséquentes. L'enzyme de conjugaison E2 acceptera alors l'ubiquitine active de E1, puis à l'aide de l'enzyme de ligation E3, provoquera le transfert de l'ubiquitine sur un résidu lysine du substrat ou d'une autre molécule d'ubiquitine. Dans certains cas, l'ubiquitine est directement transférée de la E2 vers la protéine ciblée par la formation d'un lien entre le groupe amine de résidus lysines de la protéine et la portion C-terminale de l'ubiquitine. Le cycle continu de la cascade E1-E2-E3 donne alors naissance à la chaîne de polyubiquitines, chaîne qui sera reconnue par la sous-unité régulatoire du protéasome (169). Une fois l'association du substrat avec l'appareil de dégradation établie, les molécules d'ubiquitine sont coupées de la protéine par des enzymes isopeptidases et sont alors recyclées (170).

1.3.4.2 LES LIGASES D'UBIQUITINE E3

L'organisation de la cascade enzymatique de la conjugaison de l'ubiquitine est très hiérarchique. Alors qu'il n'existe qu'une seule E1 et un nombre limité de E2, il n'est pas surprenant de constater, vu la grande diversité de substrats à cibler, qu'il existe environ une centaine de E3 potentielles qui ont été identifiées dans le génome humain.

Les enzymes ubiquitine ligase E3 sont généralement divisées en 3 classes majeures basées sur les motifs structuraux spécifiques qui les composent. Il y a d'abord les E3 Cullin-based qui incluent le complexe SCF, composé des protéines Skp1/Cul1/F-box, le complexe promoteur de l'anaphase APC et le complexe VBC, constitué du supresseur de tumeur von Hippel Landau et du complexe de Élongin BC. La deuxième classe de E3 comprend les protéines ayant le domaine HECT (homologous to E6-AP carboxy terminus) auxquelles la protéine E6-AP (E6-associated protein) appartient. Enfin, il y a la classe des E3 comprenant le domaine RING (really interesting new gene), qui inclue Mdm2 (murine double minute2) et Cbl (165).

Le complexe SCF est une ubiquitine ligase modulaire composée de Skp-1, de Cul1 (un membre de la famille des Cullines), de Rbx1 (une protéine de la classe RING) et d'une protéine comportant la séquence F-Box. Les sous-unités Cul1 et Rbx1 forment le cœur du complexe et les protéines F-Box servent de molécules adaptatrices responsables du recrutement des substrats au complexe d'ubiquitination. La spécificité de ce complexe SCF repose sur la protéine F-Box et l'interaction du substrat avec ce type de protéine dépendante de la phosphorylation du substrat (169). Par conséquent, les protéines F-Box responsables de la reconnaissance de 2 protéines régulatrices importantes dans le contrôle de la phase G1 du cycle cellulaire, soit la cycline E et la protéine p27, sont donc étroitement contrôlées, tout comme le sont les autres protéines cellulaires régulatrices. Ainsi, la cycline E phosphorylée lie la protéine F-Box, Fbw7/hCdc4, et le complexe SCF^{Fbw7/hCdc4} est alors responsable de la dégradation phosphorylation-dépendante de la cycline E (169;171;172). De façon surprenante, il a été montré que Fbw7 est muté dans les cancers humains de

l'ovaire et de l'endomètre, et que dans les lignées cellulaires du cancer du sein qui surexpriment la cycline E, un niveau très bas de Fbw7 a été identifié (173). Certaines des mutations de Fbw7 affectent son habilité à interagir avec la cycline E.

La protéine E6-AP est une ubiquitine ligase qui agit spécifiquement comme E3 de p53. Le domaine HECT de 350 résidus, qui constitue E6-AP, se situe dans la région C-terminale des E3. Il existe un résidu cystéine, positionné à 35 résidus en amont du domaine C-terminal, qui est requis pour l'ubiquitination de p53 parce qu'il agit en tant que site de formation d'un lien thiol ester avec l'ubiquitine (174). De plus en plus d'évidences démontrent que toutes les HECT E3 utilisent un mécanisme de catalyse covalente similaire, souvent avec les enzymes de conjugaison E2, UbcH7 ou UbcH8 (175-177). La région N-terminale de E6-AP confère l'habilité à la protéine de se lier au substrat à dégrader, tandis que le domaine HECT de la région C-terminale aura plutôt comme fonction de transférer directement l'ubiquitine de la E1, soit à partir du lien thiol ester, vers le substrat en se liant directement avec une E2 (165).

Le domaine C-terminal de Mdm2, une ubiquitine ligase, contient un domaine RING qui dirige le supresseur de tumeur p53 et lui-même (auto-ubiquitination de Mdm2) vers une dégradation rapide par le protéasome 26S. Mdm2 régule p53 par deux mécanismes, soit en inhibant l'activité transcriptionnelle de p53, soit en ciblant p53 pour l'ubiquitination (178). Le domaine N-terminal de Mdm2 lie directement le domaine d'activation de p53 et le prévient donc de toutes interactions avec la machinerie transcriptionnelle. Contrairement aux E3 de la classe des protéines HECT, les protéines ayant un domaine RING ne formeront pas de lien thiol ester avec l'ubiquitine, mais elles serviront plutôt de protéines adaptatrices entre le substrat et E2. Récemment, il a été montré que l'activité ubiquitine ligase de Mdm2 est critique pour l'exportation de p53 du noyau vers le cytoplasme (179). Ainsi, la plupart des dommages à l'ADN stimulent l'activation de kinases qui viennent phosphoryler Mdm2 et p53 pour en abolir leur interaction et permettre l'activation de p53. Les gènes transactivés par le facteur de transcription p53 favorisent alors l'arrêt du cycle cellulaire afin de donner un temps nécessaire à la réparation de l'ADN ou de provoquer

l'apoptose. Le gène *MDM2* est fréquemment surexprimé dans plusieurs sarcomes humains exprimant p53 sauvage (180).

1.3.4.3 SIGNAUX ET UBIQUITINATION

Une ubiquitination productive dépend donc de l'interaction efficace des E3 avec au moins 2 éléments protéiques. Le premier signal d'ubiquitination à être caractérisé est la boîte de destruction ou D-box, identifiée chez les cyclines mitotiques (165;181;182) et chez plusieurs autres substrats de APC. La séquence D-Box est caractérisée par la séquence consensus RXALGXIXN, où l'arginine (R) et la leucine (L) sont des résidus déterminants de la spécificité du signal (183). Le deuxième signal est l'interaction spécifique de la E3 avec l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2. Ces signaux favorisent ainsi la régulation des réactions de conjugaisons entre protéines. Par exemple, la modification de la E3 devra être effectuée avant qu'elle puisse interagir avec un de ces signaux (184) ou l'expression induite d'une E2 appropriée sera nécessaire (185). E2 et E3 pourraient également être régulées par des interactions avec des facteurs additionnels. Il existe en effet le cas d'au moins une E3 qui doit être régulée de façon allostérique par des dipeptides constitués de résidus déstabilisants en N-terminal (139). Le signal D-box peut aussi nécessiter une modification chimique ou conformationnelle avant de pouvoir interagir avec une E3, telle que la phosphorylation (186-188). Dans certains cas, l'habileté d'une E3 à reconnaître un signal de phosphorylation s'explique par la présence de motifs de liaison spécifiques riches en tryptophane et en acide aspartique, dans son domaine de liaison au substrat ou sur une de ses sous-unités. Un grand nombre de protéines rapidement dégradées possèdent une région de leur séquence appelée séquence PEST caractérisée par des acides aminés proline (P), acide glutamique (E), serine (S) et thréonine (T). Les régions de séquences PEST sont composées de sites de phosphorylation, d'acides aminés hydrophiles et sont entourées de résidus lysine, arginine et histidine. La régulation de l'interaction E3-substrat via la

phosphorylation est évidente dans la régulation du cycle cellulaire où la protéolyse est couplée à l'activité des kinases dépendantes des cyclines.

1.3.4.4 PROTÉASOME ET CANCERS

La voie de dégradation ubiquitine-protéasome est un élément clé de la régulation intracellulaire par ses diverses fonctions au niveau de la progression du cycle cellulaire, de la différenciation et de l'apoptose (189). Il n'est donc pas surprenant que la dérégulation de la dégradation dépendante de la voie ubiquitine-protéasome soit impliquée dans certains types de cancers (190;191).

La transformation oncogénique cellulaire est souvent associée à une dérégulation de la progression normale du cycle cellulaire, à l'activation anormale ou à l'inhibition de cascades de signalisation, à une absence de réponse aux stimuli apoptotiques ou encore à l'activation défectueuse des points de contrôle (checkpoint) du cycle cellulaire. Récemment, plusieurs évidences suggèrent que la machinerie de conjugaison de l'ubiquitine (UBC et E3) joue un rôle critique dans ces processus de transformation oncogénique en ciblant les protéines cellulaires clés pour la dégradation par le protéasome 26S ou en altérant leur activité biochimique ou leur localisation intracellulaire (170).

Un des exemples qui met en relation l'oncogenèse et l'action d'une enzyme de ligation de l'ubiquitine (E3) se situe dans la signalisation des TGF- β . En effet, TGF- β , est un facteur de sécrétion impliqué dans plusieurs processus cellulaires incluant les réponses inflammatoires et il agit dans la suppression de la progression du cycle cellulaire et de la prolifération (192). La stimulation de TGF- β mène à un arrêt du cycle cellulaire par l'inhibition des cyclines dépendantes des kinases (Cdks) en phase G1. Le signal de TGF- β est transmis par les facteurs de transcription de la famille des Smads (intracellular signal-transducing molecules). Après leur phosphorylation dans la région C-terminale suite à

l'activation du récepteur membranaire de TGF- β par son ligand, les Smads sont libérés de la membrane plasmique et s'accumulent dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles. La dégradation des Smads est régulée par 2 enzymes E3 de la famille HECT nommées Smurf-1 et Smurf-2 (Smad ubiquitination regulatory factor) (193). Tandis que Smurf-1 reconnaît et dirige l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de Smad-1 et 5, Smurf-2 agit sur les Smads-1 et 2 pour réduire leur habilité à promouvoir la transcription (194). Smurf-2 régule donc la signalisation de TGF- β en provoquant la dégradation de Smad-2. Chez des patients atteints respectivement de cancers colorectal et pancréatique, on a retrouvé des mutations sur un résidu arginine conservé sur le domaine N-terminal des Smads-2 et 4 dans les tumeurs (195). Cette mutation n'inhibe pas la phosphorylation ni même la relocalisation des Smads-2 et 4 de la membrane au noyau, mais plutôt leur susceptibilité à être ubiquitinés et dégradés par le protéasome 26S. Par conséquent, il s'avère que la machinerie d'ubiquitination qui régule la stabilité des Smads est responsable du dysfonctionnement de la croissance et de la formation de ces formes de cancer en particulier.

Il semble que le supresseur de tumeur BRCA1 (breast cancer 1) soit également impliqué dans l'oncogenèse, soit dans celle des tissus mammaires, de par ses caractéristiques comme ubiquitine ligase E3. En effet, la présence du motif RING dans la région N-terminale de BRCA1 le prédit comme une E3 (196). Des évidences de l'importance du rôle de E3 de BRCA1 dans ses fonctions de supresseur de tumeur dérivent d'études effectuées sur des mutations observées dans des carcinomes familiaux du cancer du sein (197). Des mutations associées à la tumeur au niveau des résidus coordonnant l'ion Zn dans le *RING finger* de BRCA1 abrogent son activité E3 intrinsèque.

Un autre cas mettant en relation une E3 et le développement de cancer est celui de la protéine F-Box, Skp2, de la classe des E3 du complexe SCF. Skp2 est spécialisée dans la dégradation de régulateurs du cycle cellulaire incluant l'inhibiteur de Cdk p27 (198). La protéine Skp2 est habituellement absente des cellules ayant subi la mitose et son expression dans les cellules en division est régulée selon le cycle cellulaire, atteignant un niveau élevé

durant la phase S. L'augmentation de l'activité de Skp2 corrèle avec la prolifération cellulaire et il a d'ailleurs été récemment démontré que Skp2 est un oncogène (199;200). Ainsi, Skp2 se retrouve induit dans plusieurs variétés de cancers tels que dans les carcinomes du sein, de la prostate, du poumon, de l'estomac, et dans les cancers colorectaux, en plus des lymphomes (201-204). Il existe également une très forte relation entre la perte de p27 et l'induction de Skp2 dans plusieurs cancers humains. De plus, il a été suggéré que l'induction de Skp2 corrèle avec la perte du supresseur de tumeur PTEN dans le cancer de la prostate (203) provoquant ainsi la destruction de p27.

La protéine supresseur de tumeur von Hippel-Lindau, est le module de reconnaissance des substrats de la E3 ubiquitine ligase de la classe SCF qui cible le facteur HIF (facteur inductible par l'hypoxie) pour la dégradation en présence de oxygène. Cette protéine est également impliquée dans la tumorigénèse. La maladie von Hippel-Lindau (VHL) est causée par une mutation germinale du gène supresseur de tumeur VHL et est caractérisée par le développement de multiples tumeurs, incluant celles des vaisseaux sanguins (hémangioblastomes) de la rétine, du système nerveux central et des glandes surrénales (phéochromocytome) (205). Le développement tumoral est lié à l'inactivation somatique de l'allèle VHL non-mutée restante. Des études ont montré que des cellules tumorales déficientes en VHL surexpriment des ARNm inductibles par l'hypoxie tels que les ARNm du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) indépendamment de la présence élevée ou non d'oxygène. Plusieurs gènes inductibles par l'hypoxie sont sous le contrôle de HIF, un facteur composé d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . La sous-unité α de HIF est normalement polyubiquitinée et dégradée s'il y a présence d'oxygène dans la cellule. Dans les cellules déficientes en VHL, l'ubiquitination ne se produit pas, ce qui mène à une accumulation inappropriée de HIF et de ses gènes cibles (205). Ainsi, la dérégulation de l'expression des cibles de HIF, soit VEGF et TGF- α (transforming growth factor α) provoquée par la perte de VHL est impliquée dans la pathogenèse du carcinome de rein et dans l'hémangioblastome. VHL semble également intervenir dans la régulation du cycle cellulaire au niveau de la dégradation de la cycline D1 (206). En effet, il a été montré que des cellules déficientes en VHL ne terminent pas leur cycle cellulaire

normalement. Somme toute, la E3 VHL participe à la croissance et au développement des cancers (205-207).

Un autre exemple impliquant une E3 ubiquitine ligase dans l'oncogenèse est celui de la protéine Efp (Estrogen-responsive finger protein) (169;208). Efp est un gène cible du récepteur des estrogènes et comporte un domaine RING (209). Cette protéine, exprimée dans une grande variété d'organes femelles et dans les tissus mammaires, semble être un régulateur positif de la prolifération cellulaire, car suite à son ablation génomique dans des souris, ces dernières démontrent une insensibilité aux estrogènes (169;170). En fait, cette protéine est une E3 ubiquitine ligase qui stimule la polyubiquitination de la chaperone 14-3-3 σ , une protéine qui régule l'action inhibitrice de p53, une protéine qui arrête le cycle cellulaire à la transition G2/M en inhibant l'importation du complexe Cdc2/cycline B vers le noyau. Ainsi, il a été montré que Efp est surexprimée dans certains cancers du sein. En effet, l'expression de Efp provoque, chez des cellules du cancer du sein, la prolifération et la formation des tumeurs chez des souris immunodéficientes ayant subi une ovariectomie (208). De plus, dans des cellules de cancer du sein traitées avec un anti-sens de Efp, une réduction de la croissance cellulaire est survenue. Ces études démontrent ainsi un rôle prépondérant de la voie ubiquitine-protéasome 26S dans l'oncogenèse de plusieurs formes de cancers.

1.4 RÔLE NON-PROTÉOLYTIQUE DE LA VOIE UBIQUITINE-PROTÉASOME

Bien que le système ubiquitine-protéasome soit bien connu dans ses fonctions de destruction de protéines, l'ubiquitine et le protéasome possèdent plusieurs fonctions non-protéolytiques. Des fonctions régulatrices intervenant dans des domaines aussi diversifiés que dans l'internalisation de récepteur (210), dans les fonctions ribosomales (211) et dans la réparation de nucléotide par excision (212), en plus de fonctions contrôlant la

distribution, l'abondance et l'activité des composantes de la machinerie de transcription leur sont attribuées (213).

Le premier événement qui démontra l'implication de l'ubiquitine dans la régulation de la chromatine transcriptionnellement active a été l'association des histones H2A et H2B, suite à leur ubiquitination, avec des gènes actifs en transcription (214). Le lien entre transcription et ubiquitination s'explique par le fait que les histones ubiquitinées influencent d'autres modifications de la chromatine telles que l'acétylation et la méthylation qui viennent contrôler la transcription (215;216). En effet, l'ubiquitination de H2B (uH2B) est requise pour la méthylation d'une autre histone, H3, sur les résidus lysines 4 (K4) et 79 (K79) puis, la méthylation de H3, est à son tour, requise dans la régulation de l'inhibition des gènes par les télomères. L'interrelation entre uH2B et méthyl-H3 établit un mécanisme par lequel uH2B contribue à l'inhibition de l'expression des gènes et indique que l'ubiquitination des histones est un élément intégral du code des histones que les cellules utilisent afin de différencier la chromatine transcriptionnellement active de la chromatine inactive (217;218). Ainsi, l'ubiquitination des histones joue un rôle structural directe ou indirecte dans la modification de la chromatine. Les histones ubiquitinées provoquent la relaxation et l'ouverture de la chromatine, et le recrutement de facteurs tels que le protéasome et des protéines déacétylases d'histones permettant la modification subséquente de la chromatine (219).

La participation de l'ubiquitine dans les processus non-protéolytiques tels que la transcription peut se faire également par le biais de certaines composantes du protéasome 26S au complexe de transcription (220). Il a d'ailleurs été montré que des enzymes adénosine triphosphate (ATPases) de type AAA du complexe 19S, Sug 1 et Sug 2, mais aucune protéase du complexe 20S, sont associées aux promoteurs actifs des gènes transcrits (219) et que ces sous-unités régulatrices du protéasome sont impliquées dans la transcription (221). En effet, il a été montré que le complexe 19S est requis pour l'élongation efficace de l'ARN polymérase II (Pol II). Des souches de levure ayant les allèles de *SUG1* et *SUG2* mutées, encodant des composantes du complexe 19S, exhibent

des phénotypes de défauts d'élongation. De plus, il semble que la transcription soit inhibée lorsque des anticorps sont dirigés vers Sug1 sauvage, mais il semble également que l'élongation de la transcription soit restaurée en ajoutant un complexe 19S immunopurifié. Enfin, le facteur d'élongation Cdc68 coimmunoprécipite avec le complexe 19S indiquant alors une interaction physique entre les éléments du protéasome 26S et de la transcription (221).

Le but ultime de tous processus de contrôle transcriptionnel est sans aucun doute celui de contrôler le recrutement et l'activité de l'ARN polymérase II (Pol II). La Pol II étant elle-même soumise à des mécanismes de régulation incluant la régulation par son ubiquitination, un exemple connu de la régulation de la transcription par la Pol II suite à l'action de la voie ubiquitine-protéasome se situe au niveau du processus de réparation couplée à la transcription (TCR). Les cellules eucaryotes sont très souvent exposées à des agents endommageant l'ADN. Une des priorités de la cellule dans ce cas est de réparer l'ADN des gènes transcriptionnellement actifs (222). En effet, lorsqu'une Pol II active est freinée à une lésion de l'ADN, celle-ci est ubiquitinée et dégradée. Par la suite, lorsque l'ADN est libérée de sa Pol II active, simultanément, la machinerie de réparation de l'ADN est recrutée et la réparation de l'ADN endommagée s'effectue. La cellule est alors en mesure de repérer un dommage à l'ADN en utilisant la Pol II et de réprimer l'expression des gènes jusqu'à ce que l'ADN soit réparé. Pour se faire, ce mécanisme dépend de l'efficacité de la E3 à reconnaître les molécules de Pol II transcriptionnellement actives, mais freinées à une lésion de l'ADN. La phosphorylation du domaine carboxy-terminal (CTD) de la plus grosse sous-unité de la Pol II est probablement la modification qui permet l'identification de la lésion. Durant l'élongation de la transcription, l'état de phosphorylation du CTD de la Pol II change et il semble que cet état consisterait en un signal bien spécifique de l'activation de la Pol II durant la transcription. Par conséquent, en assumant que la phosphorylation du CTD provoque l'ubiquitination de la Pol II, un patron de phosphorylation particulier du CTD indiquerait alors que la Pol II est freinée à une lésion de l'ADN et ainsi, l'ubiquitination se produirait.

1.5 TRANSCRIPTION ET VOIE UBIQUITINE-PROTÉASOME

Certaines composantes du système ubiquitine-protéasome 26S telles que l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine UBC9 et les enzymes ubiquitine ligases E6-AP et RPF/RSP5 sont en mesure d'interagir avec des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux et d'en moduler leur fonction de transactivation (223;224). La voie ubiquitine-protéasome participe donc à la régulation de l'expression des gènes engendrée par les récepteurs hormonaux (182). À cet effet, les domaines d'activation transcriptionnels de certains facteurs de transcription tels que Fos, Jun, Myc et p53 agissent également comme signal pour leur ubiquitination et leur dégradation (181). Il existe donc une superposition dans les fonctions d'activation et de destruction pour un même domaine supportant une corrélation dans l'habilité d'un tel domaine à activer la transcription et à signaler la dégradation. La superposition de ces éléments révèle donc la convergence de deux différents processus et suggère une dynamique dans le processus transcription-dégradation. De même, il semble que les facteurs de transcription soient dégradés grâce à leur habilité à activer la transcription (181).

Un exemple de cette convergence a été rapportée récemment avec l'identification d'un nouveau coactivateur de la famille des récepteurs des stéroïdes appelé E6-AP (E6-associated protein) (225). E6-AP, exprimé dans plusieurs tissus tels que le cœur, le cerveau, le placenta, le poumon, le foie, les muscles squelettiques, le rein, le pancréas, la glande mammaire, l'utérus, l'ovaire et les testicules, a été identifié comme ubiquitine ligase (E3) qui agit également comme coactivateur dans l'expression de gènes dépendants de récepteurs stéroïdiens (224). Le phénotype de souris pour lesquelles le gène de E6-AP a été délété se caractérise par divers effets physiologiques dépendants de l'action des stéroïdes tels qu'une réduction de la taille des gonades et de la fertilité chez les deux sexes et une altération de la production et de la fonction des spermatozoïdes et de l'ovulation. La croissance des tissus prostatiques induite par la testostérone et la croissance des tissus utérins par l'estradiol est également diminuée avec l'ablation de la E6-AP. Par conséquent, l'ubiquitine ligase E6-AP, joue un rôle important en tant que coactivateur de récepteur

stéroïdien en provoquant une action spécifique des tissus aux divers stéroïdes (224). Cependant, la relation entre son action sur la dégradation et sur la transcription n'est pas connue. Non seulement, la fonction des coactivateurs transcriptionnels est affectée par la voie ubiquitine-protéasome, mais également celle des récepteurs nucléaires hormonaux eux-mêmes tel que présenté dans la prochaine section.

1.6 RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES ET VOIE UBIQUITINE-PROTÉASOME

Le rôle fondamental de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome dans la transcription est un domaine d'intérêt très marqué depuis ces dernières années. Plusieurs études ont ainsi permis de mieux comprendre l'interrelation entre ces deux processus cellulaires en particulier dans la régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires qui semble utiliser différents mécanismes (226).

1.6.1 RÉCEPTEUR DES ESTROGÈNES

La réponse hormonale de plusieurs récepteurs nucléaires dont $ER\alpha$ provoque une baisse dans les quantités de protéines dans le but d'éviter une réponse transcriptionnelle exagérée. De plus, la dégradation de $ER\alpha$ dépend directement de la voie ubiquitine-protéasome et plus spécifiquement des enzymes UBA et UBC de ce processus de dégradation (168). Cette régulation hormono-dépendante, pour $ER\alpha$, est bloquée par l'inhibiteur du protéasome MG132 qui provoque ainsi l'accumulation de $ER\alpha$. La convergence des mécanismes de dégradation et d'activation de la transcription a été mise en évidence par le blocage de la protéolyse de $ER\alpha$ par des inhibiteurs du protéasome provoquant une diminution de l'habilité de $ER\alpha$ à activer la transcription ligand-dépendante. Il a en effet été montré que le fonctionnement de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome 26S est

requis pour que ER α puisse agir comme activateur transcriptionnel (227). Cette régulation ne semble pas impliquer la fonction de certains coactivateurs comme les membres de la famille des SRC qui sont aussi sujets à la dégradation par le protéasome 26S, mais qui semblent conserver leur activité intrinsèque d'activateur de la transcription lors de l'inhibition de cette voie de dégradation (227).

Plusieurs chercheurs se sont, par la suite, penchés sur les mécanismes d'action du protéasome 26S sur l'activité transcriptionnelle de ER α (227-230). Il a donc été montré que ER α , lié ou non par son ligand, orchestre le recrutement cyclique des enzymes ubiquitine ligases (E3) et des sous-unités ATPases du protéasome 19S sur des promoteurs spécifiques répondants aux ERs (231). De plus, il a été observé que l'inhibition de la transcription par l'utilisation d'inhibiteurs de la Pol II stabilise ER α tandis que l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome inhibe la transcription dépendante de ER α et immobilise ER α au niveau de la matrice nucléaire, c'est-à-dire dans un réseau dynamique d'interactions nécessaire dans plusieurs processus nucléaires incluant l'organisation de la chromatine active permettant la transcription (231). Par conséquent, il a été proposé que les événements de transcription qui sont dépendants du récepteur ER α ubiquitiné provoquent le recrutement du complexe ATPase du protéasome 26S qui transfère, à son tour, ER α ubiquitiné sur la matrice nucléaire, où le récepteur sera dégradé par la suite (231). Il est toutefois encore mal compris comment l'accumulation de ER α sur la matrice nucléaire en présence d'inhibiteur du protéasome affecte la transcription de ER α sur des promoteurs répondants aux ERs.

1.6.2 RÉCEPTEUR DES ANDROGÈNES

Une interrelation entre la dégradation d'un récepteur nucléaire et sa fonction d'activateur de la transcription a également été démontrée avec le récepteur des androgènes (AR). AR, une fois lié pas son ligand, la testostérone, se relocalise du cytoplasme vers le noyau et se lie à

ses éléments de réponse sur des promoteurs spécifiques pour moduler l'expression de gènes cibles. Le traitement de cellules prostatiques LNCaP avec le MG132 provoque une augmentation du niveau protéique de AR suggérant que le récepteur AR, tout comme ER, est dégradé via la voie ubiquitine-protéasome 26S (232). Le MG132 supprime également la transactivation de AR dans un processus dépendant des androgènes dans des lignées cellulaires de cancer de la prostate LNCaP et PC-3 (233). De plus, il semble que la transfection d'une sous-unité du protéasome, PSMA7, active la transactivation de AR et ce, de façon dose-dépendante. Une étude tentant d'éclaircir les mécanismes de convergence entre la dégradation et l'activité transcriptionnelle de AR indique que le MG132 semble supprimer l'activité transcriptionnelle de AR en provoquant l'inhibition de la relocalisation de AR du cytoplasme vers le noyau et/ou en inhibant les interactions de AR avec ses corégulateurs tels que ARA70 ou TIF2 (233).

De plus, le protéasome 26S semble directement impliqué dans l'assemblage dynamique du complexe transcriptionnel du récepteur des androgènes (232). On a analysé la formation du complexe transcriptionnel de AR sur des promoteurs de gènes spécifiques aux androgènes, tels que le promoteur PSA (prostate-specific antigen) et le promoteur de la kallikréine 2 par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Ainsi, l'arrivée de AR et le recrutement de la Pol II sur ces promoteurs est un phénomène transitoire, soit de courte durée. De plus, il semble que la formation du complexe de transcription de AR soit de nature cyclique étant donné qu'il se produit une association transitoire des coactivateurs GRIP1 et CBP (CREB-binding protein) et de l'histone H3 acétylée sur le promoteur PSA lors de l'initiation de la transcription. L'implication du protéasome dans la régulation AR-dépendante de la transcription a été montrée par l'utilisation de l'inhibiteur du protéasome MG132. En effet, le MG132 empêche le récepteur de se libérer du promoteur PSA et il bloque également l'accumulation androgènes-dépendante de l'ARNm de PSA. De plus, suite aux récentes découvertes indiquant que certaines sous-unités du complexe 19S du protéasome 26S sont recrutées sur des promoteurs actifs (219), on a démontré, par ChIP, que le traitement de cellules à la testostérone provoque le recrutement transitoire de la sous-unité S1 du complexe 19S sur le promoteur PSA, tandis que le traitement au MG132, de

façon similaire aux effets observés pour AR, empêche la libération de la sous-unité S1 du promoteur après le premier cycle de formation du complexe transcriptionnel de AR (232). Le protéasome semble donc jouer un rôle important dans la transcription dépendante de AR et l'un des processus permettant au protéasome de réguler l'expression des gènes semble être la libération de AR des régions promotrices (232).

Un autre mécanisme d'action a également été rapporté dans la régulation protéasome-dépendante de l'activité transcriptionnelle provoquée par AR. Ainsi, il semble que Akt et Mdm2 forment un complexe avec AR pour favoriser l'ubiquitination de AR dans un processus phosphorylation-dépendant occasionnant la dégradation de AR par le protéasome 26S (234). L'effet de la signalisation de Akt sur l'ubiquitination et la dégradation de AR est abrogé dans une lignée cellulaire nulle en Mdm2, suggérant ainsi l'implication de Mdm2 dans la dégradation et l'ubiquitination de AR provoquée par Akt. Il a aussi été montré que l'activité E3 ligase de Mdm2 et la phosphorylation directe de Mdm2 par Akt sont des éléments essentiels pour que Mdm2 affecte l'ubiquitination de AR et sa dégradation. En somme, l'ubiquitination et la dégradation d'un AR phosphorylé par Akt requiert l'action E3 ligase de Mdm2 elle-même phosphorylée (234).

1.6.3 RÉCEPTEUR DE LA PROGESTÉRONE

La dégradation ligand-dépendante est caractéristique de plusieurs récepteurs stéroïdiens nucléaires incluant également le récepteur de la progestérone (PR). En effet, dans des cellules cancéreuses de sein, plus de 95% des PRs sont dégradés moins de 6 heures après le début d'un traitement à la progestine, le ligand de PR. Afin de mieux comprendre la régulation protéasome-dépendante de la transcription par PR, les inhibiteurs spécifiques du protéasome 26S, soient la lactacystine et l'inhibiteur de la calpaïne, ont permis de démontrer que l'inhibition de la voie ubiquitine-protéasome bloque la dégradation de PR induite par la progestine et provoque l'accumulation de formes ubiquitinées de PR dans les cellules (235). La dégradation ligand-dépendante de PR est également bloquée par

l'inhibition spécifique des MAPKs p42 et p44 et par la mutation de la serine 294 du récepteur en alanine. Ces résultats suggèrent que le mécanisme d'action de la dégradation de PR implique la liaison du ligand au récepteur pour favoriser la phosphorylation de PR par les MAPKs à site un spécifique et permettre la dégradation de PR (235).

Récemment, une étude démontrant le lien entre la dégradation d'un récepteur des stéroïdes, le récepteur de la progestérone (PR), et l'activation maximale de la transcription a été publiée (236). Tout d'abord, il a été montré que l'expression de la kinase MEKK1 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase1), un activateur des MAPK p42 et p44, augmente la transcription de PR de façon progestine-dépendante de 8 à 10 fois. Les niveaux protéiques de PR ne changent pas avec l'expression de MEKK1 en absence de ligand, cependant PR est dégradé de façon hormono-dépendante en présence de MEKK1. L'expression de MEKK1 dans des cellules de cancer du sein cause la phosphorylation de PR sur la serine 294, reconnue pour causer la dégradation ligand-dépendante de PR. En bloquant la phosphorylation de la serine 294 par des inhibiteurs de MEK, l'activité maximale de transcription obtenue en présence de MEKK1 et de la progestine est atténuée (236). Parallèlement, la stabilisation de PR par l'inhibition du protéasome 26S produit les mêmes effets que l'inhibition de la phosphorylation du récepteur. De même, l'utilisation d'une lignée stable de cellules de cancer du sein T47D exprimant le mutant PR S294A a permis de démontrer que PR n'est pas dégradé de façon ligand-dépendante mais qu'il est résistant à l'induction synergique de la transcription par MEKK1 et la progestine tout en répondant à son ligand seul (236). Par conséquent, il a été suggéré qu'un lien existe entre la phosphorylation de PR par les MAPK suite à une activation de la signalisation des facteurs de croissance et le contrôle hormonal des stéroïdes sur la croissance cellulaire du cancer du sein. En somme, la dégradation du récepteur est grandement couplée à sa fonction d'activateur transcriptionnel.

1.6.4 RÉCEPTEUR DES GLUCOCORTICOÏDES

Comme nous pouvons le constater, la voie ubiquitine-protéasome interfère avec l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires ER, AR et PR en présence de leurs ligands. Cependant, l'action du protéasome ne semble pas avoir les mêmes effets pour tous les récepteurs des hormones stéroïdiennes. En effet, bien que le récepteur des glucocorticoïdes (GR) soit un substrat de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome 26S, il semble que la transcription dépendante des glucocorticoïdes ne soit pas modulée de la même façon que ER, AR et PR lors de l'inhibition du protéasome (237). En effet, le MG132 bloque la dégradation de GR dépendante de son ligand, la dexaméthasone, mais augmente la transactivation de GR de façon synergique sur le promoteur MMTV (mouse mammary tumor virus) (238). De plus, l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de GR lors de l'inhibition du protéasome semble se produire après les étapes initiales de remodelage de chromatine puisqu'elle ne corrèle pas avec une augmentation des événements de remodelage de la chromatine dans les cellules. Par des études sur la mobilité intranucléaire de GR et sur son association à la matrice nucléaire, on a démontré que le blocage des événements de dégradation de GR réduit la mobilité du récepteur dans le noyau, ce qui semble corrélérer avec le fait que GR est davantage associé à la matrice nucléaire dans ces circonstances (237). Ainsi, même si l'altération de la mobilité des récepteurs des stéroïdes lors de l'inhibition du protéasome semble être une caractéristique commune, GR, quant à lui, demeure unique dans la réponse de l'activité transcriptionnelle qu'il génère quand les fonctions du protéasome sont compromises. Enfin, l'étude de la séquence primaire du récepteur des glucocorticoïdes a mené à la découverte d'un motif de dégradation de séquence PEST candidat qui permettrait d'expliquer le processus d'ubiquitination de GR observé par immunoprécipitation lors de l'inhibition du protéasome. Il semble en effet que la mutation de la lysine-426 faisant partie de l'élément de séquence PEST de GR abroge la dégradation ligand-dépendante du récepteur et empêche l'augmentation de la transcription causée par GR sauvage lors du dysfonctionnement de la voie ubiquitine-protéasome (238). Ces observations suggèrent un rôle majeur du processus de dégradation ubiquitine-

protéasome dans la régulation de GR au niveau de sa dégradation et de sa fonction dans la transcription, et donc dans la modulation des réponses cellulaires propres à GR.

1.7 HYPOTHÈSES

Suite à la récente identification d'un deuxième isoforme du récepteur des estrogènes, soit ER β , un des intérêts du laboratoire est de caractériser les fonctions associées au récepteur des estrogènes ER β dans la signalisation intracellulaire. Les récepteurs des estrogènes ER α et ER β possèdent une structure caractéristique des récepteurs nucléaires avec une forte homologie entre les domaines DBD et LBD. Cependant, au niveau du domaine A/B, qui comporte la fonction d'activation AF-1, des différences majeures sont observées dans la séquence d'acides aminés suggérant que les fonctions AF-1 de ER α et ER β peuvent jouer des rôles bien distincts. Basé sur des résultats antérieurs du laboratoire concernant la modulation transcriptionnelle ligand-indépendante de ER β , il semble exister des mécanismes différentiels de signalisation qui régulent la fonction AF-1 de ER α et ER β par la phosphorylation en réponse aux facteurs de croissance.

La régulation de l'expression des gènes cibles des récepteurs des estrogènes peut se faire par différents processus tels que par la modulation de l'activité des cofacteurs et par les modifications de la chromatine au site d'initiation de la transcription, mais elle peut se faire également par les événements de dégradation menant à la destruction des ERs. Nous avons vu que l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante de ER α , de PR, de AR et de GR est régulée par le protéasome 26S. De plus, des voies de signalisation par les protéines kinases et des signaux protéiques spécifiques participent à la reconnaissance des récepteurs par certains éléments de la voie ubiquitine-protéasome pour moduler l'activité des récepteurs en réponse à l'hormone. Nous croyons que la réponse ligand-indépendante de l'expression des gènes cibles par ER β est également régulée par la voie du protéasome 26S. De ces observations, notre hypothèse est que le protéasome 26S régule la dégradation et l'activité

transcriptionnelle ligand-indépendante des récepteurs des estrogènes α et β par des mécanismes impliquant des événements de phosphorylation intracellulaire.

1.8 BUTS ET OBJECTIFS

Dans le but de mieux comprendre la régulation de ER α et ER β en tant qu'activateurs transcriptionnels et afin de mieux saisir l'impact de la dégradation par le protéasome 26S sur cette régulation, plusieurs objectifs devront être atteints. Le premier objectif de mon projet est de déterminer l'importance du protéasome 26S dans la dégradation et la régulation ligand-dépendante de la transcription de ER β . Le deuxième objectif consiste à élucider le rôle de la voie ubiquitine-protéasome dans l'activation ligand-indépendante de la transcription de ER α et ER β . Établir le rôle de l'AF-1 dans la régulation de la dégradation des récepteurs des estrogènes β est le troisième objectif de mon projet. Un quatrième objectif est d'identifier les sites de phosphorylation de ER β pouvant être ciblés par le protéasome responsables de la régulation et de la dégradation. Enfin, mon projet comporte un cinquième objectif qui est de déterminer le rôle des voies de signalisation modulant l'activité AF-1 de ER β dans un processus protéasome-dépendant.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 VECTEURS D'EXPRESSION

Le plasmide d'expression du récepteur des estrogènes de souris mER β (pCMX-mER β -549) a été construit en introduisant un fragment en 5' du gène à l'aide des sites *Sall*-*BstEII* (GenBank, accession number AF067422) dans le vecteur pCMX-mER β (de 485 résidus) de 2.1 kb décrit antérieurement (43). Ce fragment allonge le cadre de lecture ouvert de 64 acides aminés placés en N-terminal ce qui amène mER β à 549 résidus. Le gène de mER β a été initialement obtenu par une combinaison de PCR et de sélection de banque d'ADNc avant d'être sous-cloné dans le vecteur pBluescriptKSII et par la suite dans le vecteur pCMX utilisant les enzymes de restriction *Sall* et *EcoRI*. L'introduction du gène mER β dans les vecteurs pCMX-HA, EGFP, EYFP et Gal4 s'est effectuée en sous-clonant le gène dans les vecteurs en les digérant avec des enzymes de restriction appropriées. Le vecteur d'expression pCMX-mER α a été produit en ligant le fragment de 1.9 kb limité aux extrémités par les sites de digestion *NaeI*-*EcoRI* de mER α dans les sites adéquats du vecteur d'expression eucaryote pCMX. Les vecteurs d'expression des mutants de délétion pCMX-ABCD α , pCMX-ABCD β , pCMX-CDEF α et pCMX-CDEF β et des protéines chimériques pCMX-ER $\alpha\beta$ et pCMX-ER $\beta\alpha$ ont été construits en amplifiant les fragments appropriés par PCR ou en les sous-clonant à l'aide d'une digestion du vecteur sauvage avec des enzymes de restriction suivie d'une auto-ligation du vecteur digéré. L'introduction des gènes mABCD β et mCDEF β dans les vecteurs pCMX-HA et/ou EGFP s'est effectuée en sous-clonant les gènes dans les vecteurs en les digérant avec des enzymes de restriction spécifiques. Les mutations ponctuelles des résidus serines en alanines pour les vecteurs pCMX-mER β et pCMX-mABCD β ont été générées par la mutagenèse par PCR en utilisant la polymérase *pfu* (Stratagene) ou en sous-clonant certaines régions mutées dans les vecteurs par une digestion du vecteur avec des enzymes de restriction appropriées. Les gènes rapporteurs vitA2-ERE-BLuc et vitA2-ERE-TKLuc ont été obtenus en faisant la ligation de l'oligonucléotide vitA2-ERE dans les vecteurs pGL3-Tkluc et -Bluc digérés avec les enzymes de restriction *Sall*-*BamHI*. Le gène rapporteur Gal5bluc a été réalisé en ligant la séquence correspondant au site de liaison consensus du facteur de levure Gal4 dans

un vecteur pGL3-Bluc digéré *Sall-BamHI*. Pour vérifier le cadre de lecture des vecteurs produits, toutes les constructions ont été séquencées. Les plasmides d'expression H-Ras^{V12}, HA-p38 et Mkk6-glu ont été gracieusement obtenus.

2.2 CULTURE CELLULAIRE, TRANSFECTION D'ADN ET ESSAI LUCIFÉRATE

Les cellules HEK 293-T, COS-1 et HS5 78-T ont été cultivées dans des pétris cellulaires de 100-mm (Corning Incorporated) et incubées dans un milieu humidifié à 37°C contenant 5% de CO₂. Les cellules sont maintenues dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma) supplémenté avec 5% de sérum fœtal bovin (FBS) (Gibco). Pour les expériences, les cellules sont transférées dans du DMEM sans rouge de phénol (Sigma) avec 5% de stripped FBS pour minimiser les effets estrogéniques du milieu de culture complet. À 50-60% de confluence cellulaire, les cellules sont transitoirement transfectées dans des plaques de 24 puits (Corning Incorporated) avec 2 µg d'ADN total incluant 500 ng des plasmides rapporteur ERE-bluc, ERE-tkluc ou Gal5bluc, 100 ng de vecteur d'expression de ERβ sauvage de souris, de forme mutée de ERβ ou de ERα de souris, de 200 ng de vecteur d'expression de kinase ou de protéine à activité GTPase, 250 ng de plasmide de β-galactosidase par la méthode de précipitation de l'ADN au calcium-phosphate (239). Le milieu DMEM est remplacé 5-6 heures après la transfection par du milieu frais contenant divers traitements pour les cellules. Pour les traitements avec le ligand des récepteurs des estrogènes, 10 nM de 17β-estradiol (Sigma) solubilisé dans de l'éthanol est ajouté durant 20 heures. Pour les études d'inhibition du protéasome, MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO) (Sigma) ou Clasto-Lactacystine-β-Lactone (BIOMOL) est ajouté aux cellules à des concentrations variant entre 0 et 5 µM solubilisé dans le DMSO. Pour les études sur l'apoptose, les cellules sont traitées 30 minutes avec 40 µM d'inhibiteur général de caspases Z-VAD-fmk (R&D Systems), puis le milieu DMEM est remplacé par du milieu frais comprenant ou non du MG132. Pour les études liées à la signalisation des MAPK, des traitements avec 10 µM d'inhibiteur de la kinase p38, SB 203580,

(CALBIOCHEM), 10 μM d'inhibiteur de JNK, SP 600125, (BIOMOL) ou 50 μM d'inhibiteur de MEK, PD98059, (BIOMOL) sont ajoutés aux cellules durant 20 heures. À la suite des traitements, les cellules sont recueillies avec un tampon de lyse de phosphate de potassium contenant 1% Triton X-100, puis un essai luciférase est alors réalisé en déterminant les niveaux d'expression de la luciférase. Pour se faire, l'émission de lumière générée par l'addition du substrat de la luciférase, la D(-)-Luciférine (Roche), est mesurée à l'aide d'un luminomètre (Wallac). Les valeurs de luciférase, réalisées en duplicata et reproduites au moins pour un nombre $n=2$ ou $n=3$ expériences, sont ensuite normalisées avec l'activité de la β -galactosidase et exprimées en unité relative de luciférase (RLU), puis converties en niveau ou en % d'activité en corrigeant les RLU des cellules traitées avec les RLU des cellules non-traitées en fixant leur niveau d'activation à 1.0.

2.3 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN

Pour l'immunodétection de ER β et de ses formes tronquées, de la β -actine, de p38 ou de p38 phosphorylée dans des extraits cellulaires totaux, la croissance des cellules HEK 293-T se fait sur des pétris cellulaires de 100mm de diamètre dans le milieu DMEM en absence de rouge de phénol contenant 5% de sérum dépourvus d'hormones stéroïdienne et thyroïdienne. Par la suite, après transfection transitoire par la méthode de phosphate de calcium utilisant 10 μg total d'ADN et les traitements appropriés dans les cellules, celles-ci sont lavées 2 fois dans une solution saline de phosphate (PBS) et lysées dans un tampon d'extraction. Le tampon de lyse utilisé, le RIPA, contient 1% de PBS, 0.1% de SDS, 0.5% d'acide désoxycholique, 1% de Triton X-100, 1mM d'orthovanadate de sodium, 1mM de fluorure de sodium, 1mM de phénylméthanesulfonylfluorure (PMSF) et des inhibiteurs de protéases (Roche). Les lysats cellulaires sont préparés en centrifugeant les cellules 10 minutes à 13 000g dans une microcentrifugeuse réfrigérée suite à une incubation des cellules durant 30 minutes à 4⁰C dans le RIPA. Les protéines solubles ont été mises sur gel SDS/PAGE et subséquemment transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham

pharmacia biotech). Les membranes sont par la suite incubées durant 16-20 heures à 4⁰C en présence d'anticorps dirigé contre l'épitope HA, pour la détection de ER β et de ses formes tronquées fusionnés au peptide HA. Par la suite, les protéines marquées de leur anticorps primaire anti-HA sont reconnues par un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase HRP (horse radish peroxidase) (Biosource International) avant d'être détectées avec un système de chimioluminescence ECL (Perkin Elmer Life Sciences). Pour l'immunodétection de p38 et de p38 phosphorylée (PO4-p38), les nitrocelluloses sont incubées avec un anticorps spécifique pour p38 et pour PO4-p38 (New England Biolab) suivi de l'ajout d'un anticorps lié au HRP anti-souris (Biosource International) pour la détection de chacun des anticorps primaires. Un anticorps monoclonal (Novus Biologicals) a été utilisé pour détecter l'expression endogène de la β -actine dans les cellules pour normaliser les quantités en protéines. Pour tous les anticorps secondaires utilisés, le système de détection ECL a permis de visualiser les bandes par autoradiographie.

2.4 IMMUNOPRÉCIPITATION

Des cellules HEK 293-T sont transfectées, durant 5-6 heures, de façon transitoire avec 4 μ g de plasmide d'expression HA-Ubiquitine, 4 μ g de vecteur de ER β ou de ABCD β , puis avec 1 μ g de plasmide de β -gal et 1 μ g de pKS. Vingt heures après leur traitement, les cellules sont lavées une solution saline de phosphate (PBS) et lysées dans le tampon d'extraction RIPA décrit précédemment. Les lysats cellulaires sont ensuite placés sur glace durant 30 minutes et centrifugés à 4⁰C pendant 10 minutes à 13 000g. Le surnageant est incubé à 4⁰C avec 1.2 μ g d'anticorps polyclonal de ER β H-150 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) durant 16-20 heures. Par la suite, 8 μ L de billes de protéines d'agarose A/G (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) sont ajoutées aux lysats durant 2-4 heures sur la rôtissoire à 4⁰C. Enfin, après plusieurs lavages des lysats faits à l'aide du tampon RIPA, les immunoprécipités sont analysés par immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps anti-HA après les avoir été mis sur gel SDS-PAGE 10% puis transférés sur une

membrane de nitrocellulose. L'analyse de la quantité d'IgG primaire, soit le ER β H-150, sert de contrôle.

2.5 FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

Pour la préparation des extraits cytosoliques et nucléaires, la croissance des cellules HEK 293-T se fait sur des pétris cellulaires de 100-mm de diamètre dans le milieu DMEM contenant 5% de sérum dépourvus d'hormones stéroïdienne et thyroïdienne. Les cellules transfectées avec les vecteurs d'expression de HA-ER β ou de HA-ABCD β (9 μ g d'ADN) sont traitées avec 10 nM de 17 β -estradiol et 1 μ M de MG132. Après 16-20 heures de traitement, les cellules sont lavées dans la solution de PBS, puis lysées dans un tampon hypotonique contenant 10 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM de MgCl₂, 10 mM de KCl, 0.5 mM de dithiothréitol (DTT), 0.5 mM de PMSF, supplémenté de 1mM d'orthovanadate de sodium Na₃VO₄ et de 1mM de fluorure de sodium NaF et ce, durant 20 minutes sur glace. Les lysats cellulaires sont ensuite centrifugés 20 secondes à 8000 rpm à 4⁰C, puis la fraction cytoplasmique, correspondant au surnageant, est récupérée. Le culot cellulaire est alors dissout et lysé pendant 30 minutes sur glace avec des agitations occasionnelles dans un tampon hypertonique contenant 20 mM HEPES (pH 7.9), 25% de glycérol, 1.5 mM de MgCl₂, 420 mM de KCl, 0.2 mM de EDTA, 0.5 mM de dithiothréitol (DTT), 0.5 mM de PMSF, 1mM d'orthovanadate de sodium Na₃VO₄ et 1mM de fluorure de sodium NaF. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation à 8000 rpm à 4⁰C durant 5 minutes et la fraction nucléaire qui se retrouve dans le surnageant est alors récupérée. L'analyse d'immunobuvardage de type Western, telle que décrite plus haut, est alors effectuée sur les fractions cytosolique et nucléaire en utilisant un anticorps anti-HA pour détecter la présence de ER β dans les compartiments cellulaires et avec un anticorps anti-PARP (Poly-ADP-ribose-polymerase) (BD Biosciences) pour le contrôle de la contamination des fractions cytoplasmiques.

2.6 MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

Dans des plaques de six puits (Corning Incorporated) dans lesquelles des lamelles de verre (Fisher Scientific 22mm par 22mm) ont été déposées, des cellules croissent durant 16 heures dans du milieu DMEM sans rouge de phénol contenant 5% de sérum sans hormones. Par la méthode de précipitation de l'ADN au calcium de phosphate, les cellules HEK 293-T ont été transfectées avec 3 μg de GFP-ER β ou de GFP-ABCD β en présence de 0.5 μg de plasmide de β -galactosidase et de pKS durant 5-6 heures suivi de leur traitement au MG132, au ligand ou laissées non-traitées. Après 20 heures de traitement, le milieu DMEM contenant les traitements est retiré, puis les cellules sont alors fixées sur les lamelles de verre en utilisant 1mL de 4% de paraformaldéhyde dans une solution tampon de phosphate (PB) à pH 7.4 durant 5 minutes à la température ambiante. Les lamelles sont ensuite lavées trois fois avec une solution PB pH 7.4 durant 5 minutes et 300 nM de 4',6-diamidino-2-phénylindole, dilactate (DAPI) dilué dans une solution de PBS permettant la coloration des noyaux des cellules est ajouté aux cellules. Par la suite, un produit accentuant la fluorescence des protéines de fusion et du DAPI, le composé FluoroguardTM Antifade (BIO-RAD) est déposé, à raison de 10 μL , sur une lame (Fisherbrand Superfrost Microscope Slides Precleaned; Fisher Scientific) avant d'inverser la lamelle, où les cellules sont fixées, sur le Fluoroguard mis sur la lame. Une fois la lamelle placée sur la lame, du vernis à ongles est étendu sur les bordures de la lamelle pour la sceller à la lame. Les cellules sont alors analysées par microscopie de fluorescence en utilisant un microscope vertical à image droite (Nikon Microscope ECLIPSE E800). Le programme d'application utilisé pour l'analyse des données à partir de la caméra digitale DXM1200 (Nikon) du microscope est le programme ACT-1. Pour l'étude requérant l'observation de la GFP, la longueur d'onde d'excitation est 489 nm et la longueur d'onde d'émission est de 508 nm. L'étude de la coloration des noyaux au DAPI se fait à une longueur d'onde d'excitation de 358 nm en ultra-violet (UV).

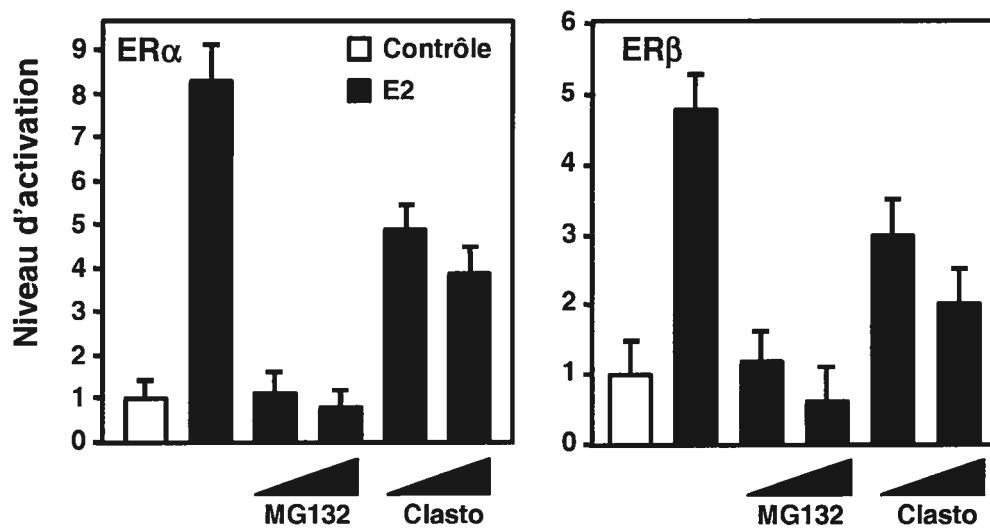
2.7 ANALYSE FRAP

Le principe de FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) se base sur l'observation de la vitesse de récupération de la fluorescence d'une région cible suite à un intense blanchiment de cette région par une lumière laser. La vitesse de récupération se fait en fonction du mouvement d'un marqueur de fluorescence dans cette région cible contenant ce même marqueur, mais qui, suite au blanchiment, devient non-fluorescent. Une région noire de molécules photoblanchies entourée de molécules fluorescentes qui n'ont pas été blanchie apparaîtra suite à l'intense émission de lumière. Les molécules qui n'ont pas été photoblanchies vont diffuser, autant qu'elles le pourront, dans cette région. La région noire augmentera graduellement en intensité au fur et à mesure que les molécules fluorescentes y diffuseront. L'analyse FRAP a été réalisée avec un microscope confocal Zeiss LSM 510 équipé d'un laser de 25 mW. La croissance des cellules se fait dans des chambres constituées de lamelles de verre en borosilicate de 22 mm par 22 mm (Lab-Tek Brand Products, Nalge Nunc International) qui sont directement utilisées pour l'analyse au microscope. Vingt heures après avoir déposé des cellules HEK 293-T dans les chambres, les cellules ont été transfectées durant 5-6 heures avec 3 µg de vecteur d'expression YFP-ERβ. Par la suite, les cellules ont été stimulées ou non avec 10 nM de E2 durant 20 heures, puis elles ont été traitées ou non avec 10 µM de MG132 trois heures avant d'être analysées. Les images enregistrées montrent la section de l'axe des z des noyaux cellulaires et ont été obtenues avant et après le photoblanchiment à un intervalle de 393 ms. L'intensité du laser est de 0,1% avant et après le photoblanchiment pour la collecte des images alors que l'intensité atteint 100% lors du photoblanchiment. La région photoblanchie correspond à environ 20% de la surface du noyau normalement obtenue à la suite d'un photoblanchiment d'environ 5 secondes. Le laser utilisé a une longueur d'onde de 514 nm, l'ouverture est à 500 µm et les données recueillies correspondent à 100 itérations. L'échelle représentée sur les images correspond à 10 µm. Les courbes de récupération de fluorescence ont été effectuées à partir du programme informatique EXCEL et les intensités de fluorescence obtenues dans le temps correspondent à une moyenne de 10 noyaux analysés.

3. RÉSULTATS

L'observation que l'activation de ER α et ER β causée par la liaison aux estrogènes soit concomitante avec leur habilité à stimuler la transcription de gènes cibles soulève la question de l'importance que la dégradation de ER α et ER β occupe dans la stimulation de la transcription par les récepteurs. Tout d'abord, pour tenter de comprendre l'impact de la dégradation de ER α et ER β sur leur activité transcriptionnelle, nous avons utilisé des inhibiteurs du protéasome 26S sur des cellules HEK 293-T cotransfectées avec le gène rapporteur de la luciférase ERE-bluc et les vecteurs d'expression de ER α et ER β . Suite à une stimulation des cellules durant 20 heures avec 10 nM de 17 β -estradiol (E2), l'activité transcriptionnelle a été mesurée avec ou sans les inhibiteurs du protéasome MG132 (1 et 5 μ M) ou Clasto-Lactacystine- β -Lactone (1 et 5 μ M). Ainsi, comme le démontre la **Figure 2A**, l'inhibition du protéasome avec le MG132 abolit l'expression du gène rapporteur de la luciférase engendrée par ER α et ER β sous l'influence du ligand. Cette diminution suggère que la dégradation des ERs par la voie ubiquitine-protéasome est requise pour obtenir une activation maximale de la transcription des gènes par ER α et ER β en réponse au ligand. Pour vérifier la spécificité de l'inhibiteur MG132, le traitement des cellules HEK 293-T avec un autre inhibiteur du protéasome 26S, le Clasto-Lactacystine- β -Lactone, a été réalisé. Cet inhibiteur produit un effet similaire au MG132, mais moins important, sur la réponse de l'activité transcriptionnelle de ER α et ER β en présence de E2, c'est-à-dire qu'il provoque une diminution de la réponse transcriptionnelle dépendante du protéasome en présence d'estrogènes. Pour s'assurer que ces effets n'étaient pas spécifiques au type cellulaire, le rôle du protéasome 26S sur l'activation ligand-dépendante de ER α et ER β a également été étudié dans un autre contexte cellulaire. Selon la **Figure 2B**, des cellules COS-1 révèlent donc aussi la nécessité de la présence fonctionnelle du protéasome dans l'activation ligand-dépendante de ER α et ER β .

A.



B.

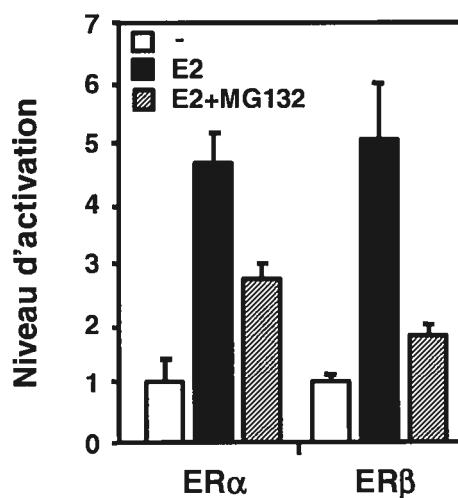


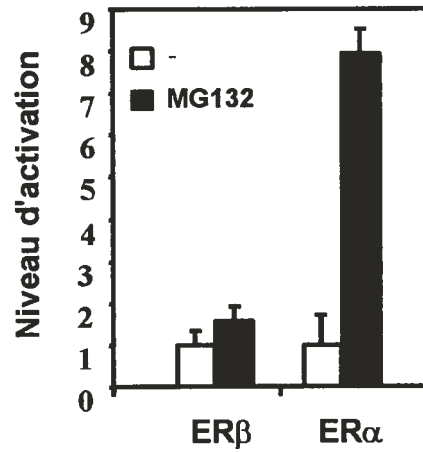
Figure 2. Effet du protéasome sur l'activation ligand-dépendante de ER α et ER β .

Des cellules HEK 293-T (A) et des cellules COS-1 (B) ont été cotransfectées avec le gène rapporteur de la luciférase ERE-bluc et les vecteurs d'expression de ER α et ER β . Les plasmides d'expression de ER α et ER β ont été produits par l'introduction des fragments de ER α et ER β dans le site de clonage *Sall-EcoRI* du vecteur d'expression pCMX. L'activité transcriptionnelle a été mesurée suite à une stimulation des cellules avec 10 nM de 17 β -estradiol (E2) avec ou sans les inhibiteurs du protéasome MG132 (1 et 5 μ M) ou Clasto-

lactacystine (1 et 5 μM). Les valeurs de luciférase ont été normalisées à partir de l'activité de la β -galactosidase, puis exprimées en niveau d'activation.

Les récepteurs des estrogènes α et β sont des phosphoprotéines qui ont un degré d'homologie très grand (**Figure 1**). Cependant, leur fonction d'activation 1 (AF-1) est le domaine le plus divergent entre les deux récepteurs nucléaires. Ainsi, des évidences d'une activité différentielle provoquée par l'AF-1 de ER α et ER β ont été montrées lorsque les récepteurs ne sont pas sous l'influence de leur ligand et par conséquent, où la fonction d'activation 2 (AF-2) de ER α et ER β n'est pas stimulée (240). Nous avons voulu déterminer l'effet du protéasome 26S, dans des cellules HEK 293-T transfectées avec un gène rapporteur de la luciférase ERE-bluc et des plasmides d'expression encodant ER α et ER β , sur l'activation ligand-indépendante de ER α et ER β . Les résultats de la **Figure 3A** nous montrent un niveau d'activation de la transcription de 7.9 fois pour ER α en présence de MG132 comparativement à 1.6 fois pour ER β . La différence d'activation transcriptionnelle de ER α et ER β lors de l'inhibition de la dégradation par le protéasome suggère une régulation différente des deux récepteurs dans la cellule dépendante du protéasome. Par la suite, une courbe de concentration de l'inhibiteur MG132 a été réalisée sur l'activité ligand-indépendante de ER α et ER β . Les cellules HEK 293-T ont été traitées en présence de quantités croissantes de MG132 (0 μM , 0.5 μM , 0.75 μM , 1 μM , 2.5 μM et 5 μM) et l'activité de la transcription a été mesurée. Comme illustré à la **Figure 3B**, ER α et ER β répondent différemment à l'inhibition du protéasome. En effet, nous observons une activité transcriptionnelle beaucoup plus élevée pour ER α jusqu'à une concentration de 1 μM . Par la suite, une chute de l'activité de ER α pour des concentrations de 2.5 μM et 5 μM survient. Pour être en mesure de mieux cerner les différences de comportement entre ER α et ER β , la concentration de MG132 adoptée pour les expériences ultérieures est donc de 1 μM .

A.



B.

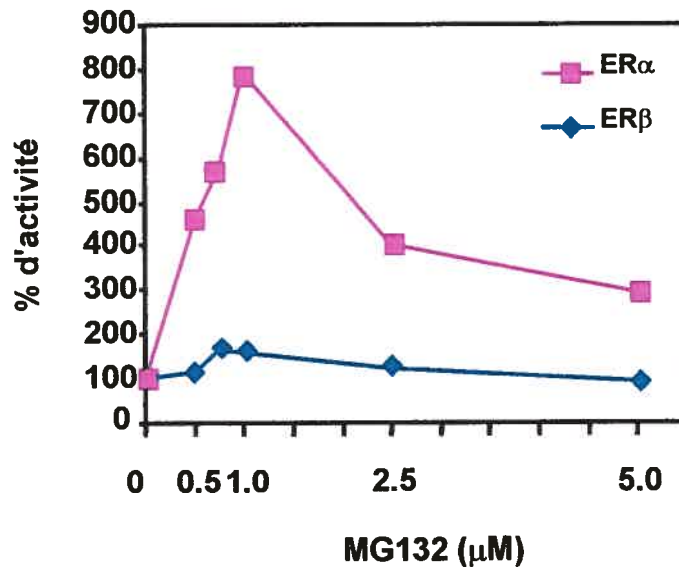


Figure 3. Effet du protéasome sur l'activation ligand-indépendante de ERα ou ERβ.

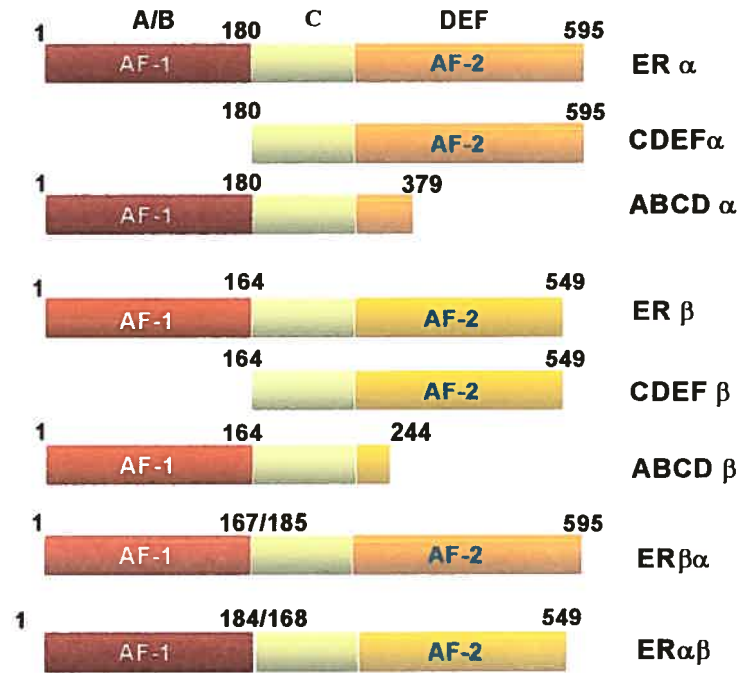
A. Les cellules HEK 293-T ont été transfectées tel que décrit dans la Figure 2 et ont été testées pour mesurer l'activité de la luciférase suite à un traitement avec 1 μM de MG132 ou non en absence d'estrogènes. B. Des cellules HEK 293-T ont été cotransfectées avec le rapporteur ERE-bluc et les vecteurs d'expression de ERα ou ERβ. Les cellules ont ensuite

été incubées avec des concentrations croissantes de MG132, puis la réponse transcriptionnelle a été mesurée par l'activité de la luciférase et une courbe de concentration de MG132 a été établie. L'activité de ER α et ER β mesurée en absence de MG132 a été fixée à 100%.

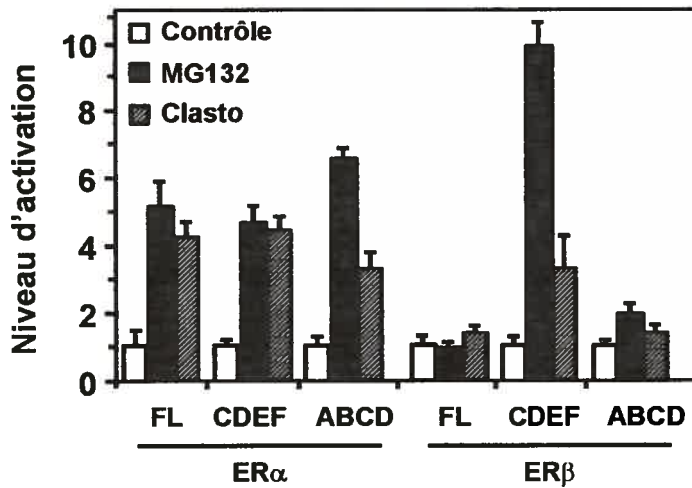
Dans le but de déterminer le rôle des domaines fonctionnels dans la régulation protéasome-dépendante de ER α et ER β , des gènes d'expression exprimant des mutants tronqués de ER α et ER β ont été construits. La **Figure 4A** schématise les différentes constructions effectuées telles que la délétion de l'AF-1 des ERs, nommée CDEF, et la délétion de l'AF-2, nommée ABCD. Par la suite, les plasmides exprimant ces mutants de délétion ainsi que les récepteurs sauvages ont été cotransfectés avec un gène rapporteur de la luciférase dans des cellules HEK 293-T et le niveau d'activation de la transcription a été mesuré. Les résultats illustrés dans la **Figure 4B** nous indiquent une régulation de ER α et ER β dépendante de l'activité du protéasome qui diffère selon les domaines et fonctions d'activation des deux récepteurs. En effet, pour ER α (FL), le traitement des cellules au MG132 et au Clasto-Lactacystine- β -Lactone provoque une activation transcriptionnelle qui ne dépend pas des fonctions d'activation AF-1 et AF-2. Le mutant CDEF α et le mutant ABCD α ne provoquent pas de différences dans l'activité transcriptionnelle protéasome-dépendante générée en absence d'estrogènes comparativement à la réponse de ER α . Par contre, pour ER β (FL), nous observons sur la **Figure 4B** une nette augmentation de la réponse transcriptionnelle dépendante de l'activité du protéasome 26S lorsque le récepteur comporte une délétion au niveau du domaine A/B qui contient l'AF-1 (CDEF β). De plus, nous remarquons que le mutant ABCD β génère un niveau de la transcription similaire à celui du gène d'expression ER β sauvage. Ces résultats suggèrent que le niveau de l'activité transcriptionnelle de ER β obtenu lors de l'inhibition du protéasome dépend de son domaine A/B contenant l'AF-1. De plus, nous observons que les mutants CDEF α et CDEF β produisent tous deux une augmentation de l'activité transcriptionnelle qui dépend du protéasome alors que la réponse obtenue par les mutants ABCD α et ABCD β diverge en

présence de MG132. ABCD α engendre une hausse de l'activité de la transcription en présence d'inhibiteurs du protéasome, tandis que la réponse transcriptionnelle de ABCD β n'est pas modifiée en présence de MG132 ou de Clasto. Ce résultat suggère que l'activité différentielle de ER α et ER β dépendante du protéasome repose sur l'AF-1 pour ER β et non pas sur l'AF-2. Ainsi, d'après la **Figure 4B**, la présence de l'AF-1 ne modifie pas significativement l'activité basale de la transcription de ER β lorsque le protéasome est inhibé, mais en son absence, le récepteur subit une dérégulation protéasome-dépendante et modifie alors l'activité transcriptionnelle. Ces résultats se justifient également par l'utilisation de gènes d'expression de ER α et ER β sous formes chimériques. Pour se faire, nous avons transposé la portion N-terminale de ER α et ER β dans des vecteurs d'expression contenant la portion C-terminale de ER β et ER α respectivement, puis des cellules HEK 293-T ont été transfectées avec ces plasmides ainsi qu'avec les plasmides encodant ER α et ER β sauvage. Comme nous pouvons le constater sur la **Figure 4C**, la chimère ER $\alpha\beta$, produit une augmentation de l'activité transcriptionnelle dépendante de l'inhibition du protéasome. Cette hausse de l'activité rappelle la hausse du niveau d'activation de la transcription observée sous l'influence des deux inhibiteurs du protéasome pour ER α et pour CDEF β à la **Figure 4B**. Par contre, la chimère ER $\beta\alpha$ génère une réponse de l'activité de la transcription similaire à celle provoquée par ER β et ABCD β lorsque le protéasome est inhibé dans la cellule. Par conséquent, nous constatons que la présence de l'AF-1 de ER β n'engendre pas une régulation protéasome-dépendante significative de ER β dans un état non-stimulé et que ces effets sont transposables dans le contexte de ER α . Par contre, lors de la délétion de son AF-1, nous observons que l'activité transcriptionnelle de ER β en absence de ligand est dépendante du protéasome.

A.



B.



C.

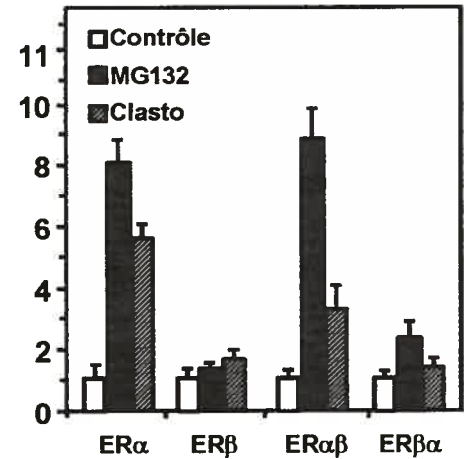


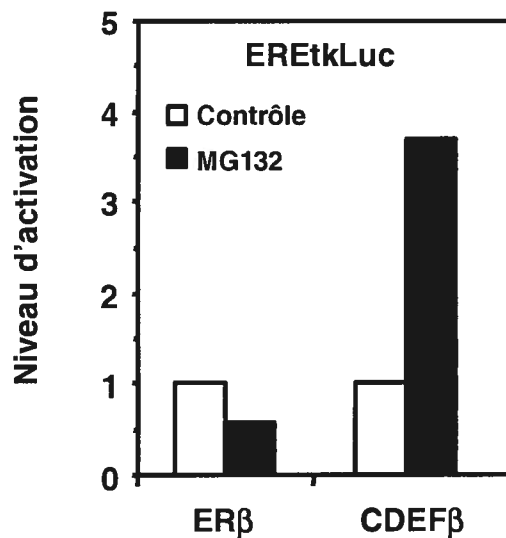
Figure 4. Rôle des domaines fonctionnels de ER α et ER β dans la réponse transcriptionnelle ligand-indépendante. A. Les constructions ABCD α et ABCD β sont des formes tronquées de ER α et ER β qui ont été produites par une digestion du vecteur

sauvage avec des enzymes de restriction appropriées suivie d'une auto-ligation du vecteur digéré. Les vecteurs d'expression de CDEF α , CDEF β , ER $\beta\alpha$ et ER $\alpha\beta$ sont des formes tronquées et chimériques de ER α et ER β obtenues par la génération de fragments par PCR. Les cellules HEK 293-T ont été cotransfectées de façon transitoire avec un gène rapporteur ERE-bluc, avec ER α ou ER β et avec les formes tronquées de ER α et ER β (**B**) puis avec les vecteurs d'expression encodant les formes chimériques de ER α et ER β , ER $\beta\alpha$ et ER $\alpha\beta$ (**C**). Après la transfection, les cellules ont été traitées avec 1 μ M de MG132 ou avec 5 μ M de Clasto-Lactacystine- β -Lactone durant 20 heures ou n'ont pas été traitées, puis ont été recueillies pour mesurer, par luminométrie, l'activité de la luciférase.

Afin d'étudier la régulation protéasome-dépendante de la transcription de ER β dans un système de gène rapporteur différent en absence d'estrogènes, nous avons transfecté des vecteurs d'expression de ER β et d'un mutant de délétion de l'AF-1 de ER β , CDEF β , dans des cellules HEK 293-T dans deux contextes de gènes rapporteurs de la luciférase. Suite ou non au traitement des cellules avec MG132 (1 μ M), nous avons mesuré le niveau d'activation de la transcription produit par les différentes formes de ER β . D'abord, nous avons étudié la régulation de ER β lors de l'inhibition de l'activité fonctionnelle du protéasome en utilisant le gène rapporteur de la luciférase EREtkluc, rapporteur comprenant un promoteur minimal de la thymidine kinase (tk) sous le contrôle d'un ERE (**Figure 5A**). Nous observons que la réponse de l'activité transcriptionnelle générée par ER β en présence de MG132 est fortement relevée lorsque le domaine AF-1 est retranché du récepteur. De même, pour le deuxième contexte de gène rapporteur, où le système rapporteur Gal5bluc a été utilisé pour étudier la régulation ligand-indépendante des protéines de fusion de ER β lors de l'inhibition du protéasome dans la cellule, nous observons également, d'après la **Figure 5B**, une différence de l'activité de la transcription entre ER β et CDEF β . En effet, dans ce système, l'activité transcriptionnelle provoquée par ER β est fortement augmentée une fois la délétion de l'AF-1 effectuée. Par conséquent, d'après la **Figure 5**, la régulation ligand-indépendante de ER β par le protéasome s'effectue

plus significativement lors de la délétion du domaine A/B de ER β contenant la fonction d'activation AF-1 quelque soit le gène rapporteur utilisé.

A.



B.

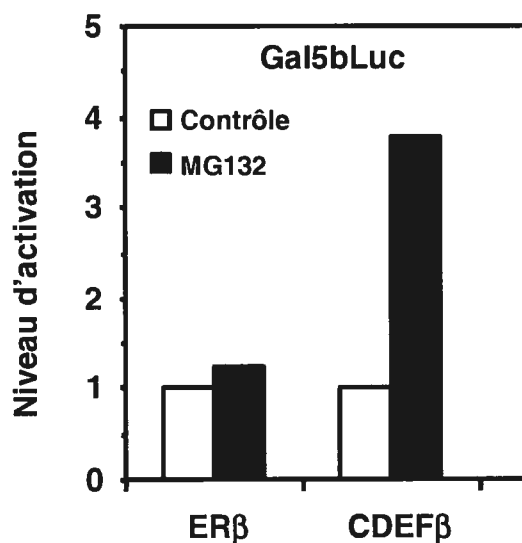


Figure 5. La régulation protéasome-dépendante de l'activité de ER β n'est pas dépendante du contexte du gène rapporteur. **A.** Les cellules HEK 293-T ont été transfectées avec les plasmides d'expression encodant ER β et CDEF β , puis l'activité transcriptionnelle a été mesurée à partir du gène rapporteur EREtkluc. **B.** L'activité de la

luciférase a été mesurée avec le gène rapporteur Gal5bluc suite à la transfection de cellules HEK 293-T avec les vecteurs d'expression encodant les protéines de fusion Gal4-ER β et Gal4-CDEF β . Avant de les recueillir, les cellules ont été traitées ou non avec MG132 (1 μ M).

L'effet du protéasome sur l'activation ligand-indépendante de ER β a également été étudié dans un contexte cellulaire exprimant ER β de façon endogène. En effet, les cellules de la lignée cancéreuse du sein HS5 78-T sont connues comme étant ER β -positive alors que l'expression de ER α reste indétectable (241). Pour s'assurer de maintenir des niveaux d'expression de ER β adéquat, nous avons cotransfecté les cellules avec un vecteur d'expression de ER β . Ainsi, à la **Figure 6**, nous observons que la réponse de l'activité transcriptionnelle de ER β au MG132 dans ces cellules est très basse et reste comparable à la réponse de la transcription obtenue dans les cellules HEK 293-T (Figure 4B).

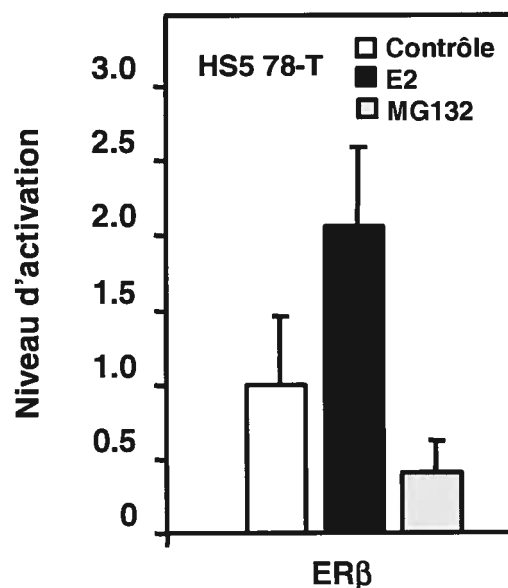


Figure 6. La régulation protéasome-dépendante de l'activité de ER β n'est pas dépendante du contexte cellulaire. Les cellules de la lignée cancéreuse du sein HS5 78-T

ont été cotransfectées par la méthode décrite dans la Figure 2 et ont été testées pour mesurer l'activité de la luciférase. Les résultats sont exprimés comme à la Figure 2.

Les inhibiteurs de protéasome tels que le MG132 sont des composés chimiques qui viennent bloquer la dégradation des protéines et qui, par le fait même, induisent l'expression de protéines de choc thermique (HSP) et de chaperones du réticulum endoplasmique permettant ainsi aux cellules de résister à de plus hautes températures et à certains agents toxiques (158). Cependant, dans certaines conditions, ces inhibiteurs de l'activité catalytique du protéasome 26S peuvent induire l'apoptose des cellules cancéreuses accompagnée d'une activation de certaines caspases telles que les caspase-3 et 7 (242;243). Par conséquent, pour déterminer si l'effet du MG132 à 1 μ M sur la transcription de ER β en absence de ligand est dû à l'initiation des mécanismes apoptotiques dans les cellules par l'utilisation de MG132, nous avons mesuré la réponse de ER β et de ABCD β en présence d'un inhibiteur général des caspases le Z-VAD-fmk. Dans la **Figure 7**, nous observons que le niveau de transcription obtenu pour ER β en présence de MG132 ne varie pas suite à l'ajout du Z-VAD-fmk. De façon similaire, lorsque la forme tronquée de ER β , ABCD β , est en présence de l'inhibiteur du protéasome et du Z-VAD-fmk, celle-ci ne provoque pas une réponse transcriptionnelle différente de celle obtenue en absence de l'inhibiteur des caspases. Par conséquent, l'effet du MG132 sur le niveau d'activation de la transcription généré par ER β et ABCD β ne semble pas être un effet conséquent au déclenchement de l'activité apoptotique de la cellule.

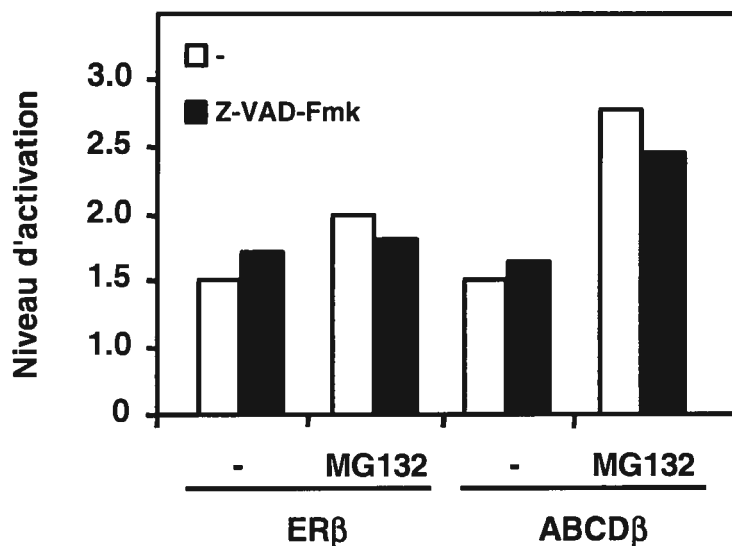


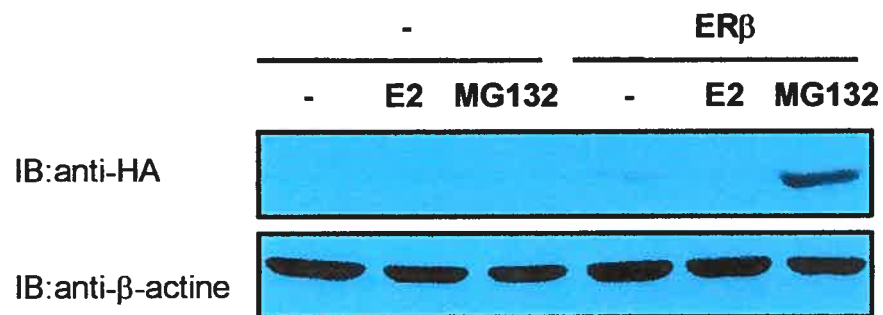
Figure 7. La réponse transcriptionnelle de ERβ ne dépend pas des effets de l'apoptose dans la cellule. Les cellules HEK 293-T ont été transfectées avec le gène rapporteur de la luciférase ERE-bluc en combinaison avec les vecteurs d'expression de ERβ et ABCDβ. Les cellules ont été traitées avec 40 μM de Z-VAD-fmk durant 30 min ou non, puis avec 1 μM de MG132 en absence d'estrogènes tel qu'indiqué. Les cellules ont été recueillies pour effectuer un essai luciférase et les valeurs ont été exprimées comme décrit dans la Figure 2.

La voie ubiquitine-protéasome cible une grande variété de protéines régulatrices pour leur dégradation (165). L'observation que les récepteurs nucléaires sont dégradés par la voie ubiquitine-protéasome de façon hormono-dépendante et l'identification d'enzymes de la voie ubiquitine-protéasome 26S impliquées dans la coactivation transcriptionnelle des récepteurs nucléaires suggèrent un lien entre cette voie et la transcription de gènes ciblés par les récepteurs nucléaires (168;225;244;245). Afin de mieux comprendre l'impact de la perturbation du système de dégradation ubiquitine-protéasome par le MG132 sur la transcription produite par ERβ, la susceptibilité relative du récepteur et de ses formes tronquées à la dégradation par le protéasome a été mesurée. Ainsi, les différences de niveau protéique de ERβ ont été comparées. Tout d'abord, le niveau protéique du récepteur

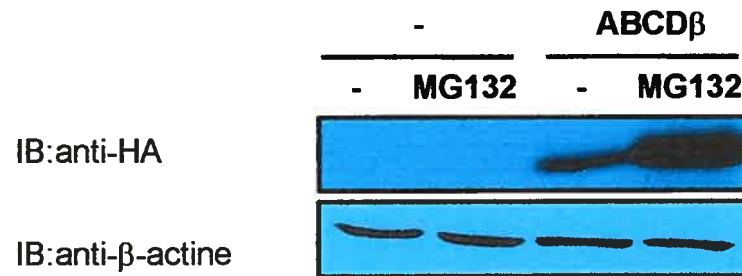
ER β sauvage dans la **Figure 8A** est plus faible en présence de E2 que lorsque les cellules ne sont pas traitées. Cette régulation hormonale des quantités protéiques a déjà été démontrée pour ER α (168). De plus, le traitement au MG132 sur des cellules transfectées avec le vecteur d'expression de ER β résulte en une augmentation de la quantité de protéines du récepteur. Cette accumulation de ER β survient grâce à l'action du MG132 sur le blocage de la dégradation des protéines dans la cellule. ER β semble donc être une cible de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome 26S. L'analyse de la séquence primaire de ER β en utilisant un programme de recherche de séquence PEST a permis l'identification d'un motif PEST candidat situé entre les acides aminés 23 et 46 du récepteur de souris. La région PEST identifiée a un pointage de $-2,16$ sur une échelle de potentiel des séquences PEST allant de -50 à $+50$. Le domaine A/B de ER β contient donc une séquence PEST, c'est-à-dire une séquence impliquée dans la dégradation rapide des protéines par la voie ubiquitine-protéasome et par la voie de la calpaine (227). Ce même domaine A/B contient également plusieurs sites consensus de phosphorylation par les MAPK. Ces sites de phosphorylation, que possèdent un grand nombre de récepteurs nucléaires, peuvent agir de différentes façons dans la régulation de ER β ou de d'autres récepteurs nucléaires telles que provoquer l'interaction avec des coactivateurs (82) et constituer un signal de dégradation pour la voie ubiquitine-protéasome (235). Dans les essais luciférase présentés dans la **Figure 3B**, l'activité transcriptionnelle obtenue avec la forme de ER β contenant la séquence PEST candidate et les sites MAPK dans la région AF-1, mais pour laquelle la région de l'AF-2 a été déléetée, est similaire à l'activité générée par la forme sauvage de ER β . De plus, dans la **Figure 8B**, la régulation ligand-indépendante de cette forme de ER β , soit ABCD β , semble pouvoir être bloquée par l'inhibition du protéasome, c'est-à-dire que nous observons une accumulation de la protéine lorsque les cellules sont traitées au MG132. Cependant, l'analyse de buvardage Western réalisée sur une forme tronquée de ER β où la région de l'AF-1, contenant la séquence candidate PEST et les sites MAPK, est absente, soit CDEF β , nous montre une altération du patron de la stabilité du récepteur en absence du ligand (**Figure 8C**). En effet, il n'y a pas d'accumulation de CDEF β au moment où les cellules sont traitées au MG132. L'analyse d'immunobuvardage de type Western

détermine donc les quantités protéiques du récepteur et suggère alors fortement que CDEF β est stabilisé de façon ligand-indépendante avec ou sans le traitement au MG132. Fonctionnellement, le récepteur CDEF β est transcriptionnellement beaucoup plus actif lors de l'inhibition de l'activité cellulaire protéasomale que ER β sauvage et que le mutant ABCD β tel que déterminé précédemment (Figure 4A). Étant donné que le CDEF β ne contient pas la région AF-1 ceci suggère que cette région du récepteur contribue à réguler, en absence d'estrogènes, les niveaux protéiques de ER β et à maintenir des niveaux basals d'activité transcriptionnelle de ER β lors de l'inhibition du protéasome. En effet, lors de la délétion de l'AF-1, la régulation de l'activité transcriptionnelle de ER β en absence de son ligand est dépendante du protéasome tandis que l'activité transcriptionnelle de ER β sauvage n'est pas significativement protéasome-dépendante.

A.



B.



C.

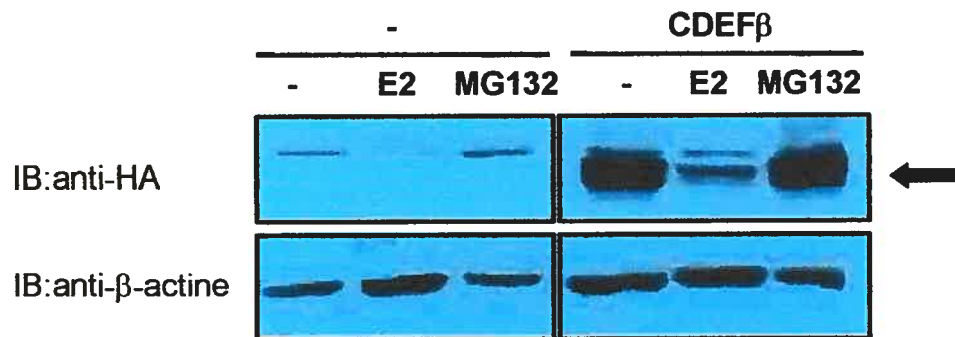


Figure 8. MG132 provoque l'accumulation de ER β dans les cellules.

Les cellules HEK 293-T ont été transfectées avec les vecteurs d'expression de (A) ER β , de (B) ABCD β et de (C) CDEF β . En présence ou non de MG132 (1 μ M) ou de 10 nM de E2, des extraits totaux ont été réalisés, puis analysés par immunobuvardage de type Western pour les niveaux d'expression des diverses formes de ER β et pour la β -actine, contrôle de la quantité de protéines par puits.

Pour cibler des substrats protéiques vers le protéasome 26S, la cellule doit permettre une modification post-traductionnelle qui consiste à leur lier, de façon covalente, une chaîne

contenant plusieurs molécules d'ubiquitine (116). Afin de mieux comprendre le rôle et l'importance de l'ubiquitination sur la régulation protéasome-dépendante de ER β de façon ligand-indépendante, nous avons alors étudié l'état d'ubiquitination du récepteur. Ainsi, pour établir le rôle de la région A/B dans la régulation protéasome-dépendante de ER β en absence de ligand, nous avons étudié l'état d'ubiquitination de ER β et de ABCD β . Des cellules HEK 293-T ont été transitoirement transfectées avec des vecteurs d'expression de ER β et de ABCD β , et avec un plasmide d'expression de l'ubiquitine étiqueté avec l'épitope HA. Comme nous pouvons le constater sur la **Figure 9A** l'ubiquitination de ER β n'est pas détectée pour des extraits cellulaires stimulés avec 10 nM de E2 ou non-stimulés. Cependant, un très fort signal d'ubiquitination apparaît pour la forme ubiquitinée de ER β à partir de cellules HEK 293-T transfectées avec HA-ubiquitine et traitées avec 1 μ M de MG132. Étant donné que l'ubiquitine se conjugue habituellement à certains résidus lysines de protéines ciblées pour la dégradation, résidus faisant partie de séquences spécifiques appelée D-Box, et que des chaînes de polyubiquitines s'y forment, les protéines ubiquitinées sont souvent visualisées comme une échelle de hauts poids moléculaires par des immunobuvardages de type Western. Le très fort signal que nous observons dans la **Figure 9A et B**, suite à des traitements au MG132, représente l'hétérogénéité des formes polyubiquitinées de ER β et de ABCD β . Le MG132 semble donc provoquer une accumulation de ER β ubiquitiné suggérant la stabilisation du récepteur. Pour la forme de ER β composée de la région AF-1, ABCD β , l'état d'ubiquitination du récepteur semble similaire à celui de ER β ce qui suggère que l'AF-1 est ciblée par la voie ubiquitine-protéasome dans la régulation de ER β . Quoiqu'il s'avère difficile de comparer l'ubiquitination de ER β dans ce type d'expérience, les réponses observées pour ER β et ABCD β en présence de MG132 proposent des niveaux d'ubiquitination similaires. Ceci suggère la participation de la région AF-1 de ER β dans la régulation ligand-indépendante de ER β et que cette régulation, qui est protéasome-dépendante, requiert l'ubiquitination du récepteur.

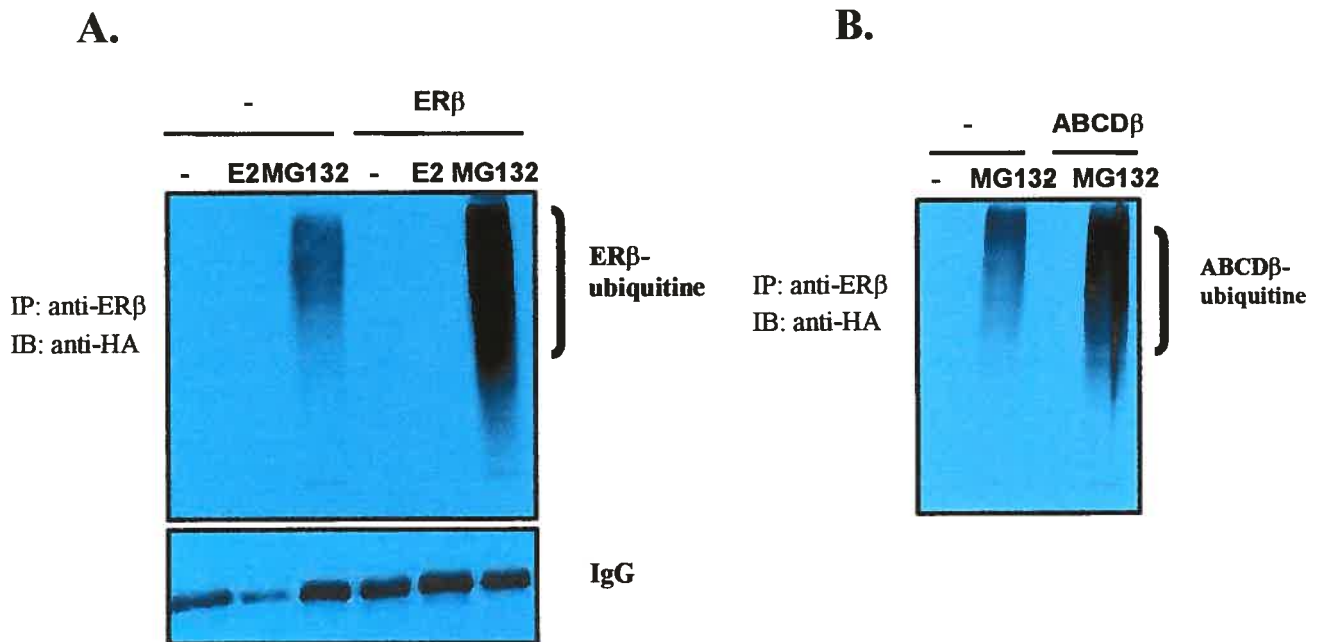


Figure 9. MG132 provoque l'accumulation des formes ubiquitinées de ER β .

Des cellules HEK 293-T ont été cotransfectées avec les vecteurs d'expression de l'ubiquitine (HA-Ub), de ER β (A) et de ABCD β (B), puis traitées au 17 β -estradiol (10 nM) avec ou sans MG132 (1 μ M) durant 20 heures. Les extraits cellulaires ont ensuite été immunoprécipités avec un anticorps anti-ER β , puis analysés par immunobuvardage de type Western avec un anticorps anti-HA. Les quantités en protéines sont normalisées en fonction du contenu en IgG.

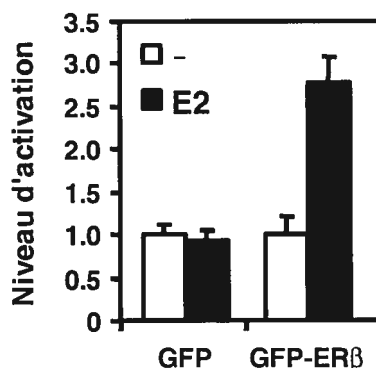
Le protéasome est un élément régulateur très important dans la cellule. Nous avons démontré que pour obtenir un niveau de transcription maximale en réponse à l'hormone, le protéasome est indispensable à une activation ligand-dépendante de ER α et ER β (Figure 2). Également, d'après la Figure 3A, le protéasome joue un rôle primordial dans la régulation de la transcription par ER β en absence de ligand, mais cette régulation est dépendante de la délétion de l'AF-1 de ER β . En effet, dans un état non-stimulé et lors de l'inhibition du protéasome, le cycle de transcription maintenant une activité basale de ER β est dérégulé lors

de la délétion de son AF-1. Puisqu'il ne semble pas exister de corrélation entre l'activité transcriptionnelle de ER β et une augmentation des niveaux protéiques totaux en absence de son AF-1 dans la régulation protéasome-dépendante du récepteur, nous nous sommes alors demandés par quels moyens, autres que par le contrôle de la quantité de protéines, le protéasome peut-il réguler l'activité de ER β dans la cellule. Nous avons alors effectué l'analyse par 3 approches différentes, soient l'étude de la distribution cellulaire de ER β , l'analyse de la compartimentalisation cellulaire de ER β et l'étude de la mobilité nucléaire de ER β .

Premièrement, nous avons fait l'étude de la distribution cellulaire de ER β dans des cellules fixées. Pour déterminer le rôle du protéasome dans le comportement de la distribution cellulaire de ER β , nous avons sous-cloné la région codante de ER β et d'une forme tronquée de ER β , ABCD β , dans un vecteur pEGFP, soit un vecteur encodant la protéine fluorescente GFP. Pour s'assurer que la portion GFP de notre construction GFP-ER β n'empêchait pas ER β de répondre à son ligand, des cellules HEK 293-T ont été cotransfectées avec les plasmides d'expression de GFP-ER β et de GFP avec un gène rapporteur de la luciférase contenant un élément de réponse au récepteur des estrogènes ERE-bluc. Comme illustré dans la **Figure 10A**, l'activité transcriptionnelle générée par GFP-ER β augmente en présence de 17 β -estradiol démontrant que le plasmide GFP-ER β répond au ligand malgré la présence de la portion GFP. L'effet du MG132 sur la distribution de GFP-ER β et de GFP-ABCD β a été mesuré par microscopie de fluorescence en utilisant des cellules HEK 293-T transfectées avec les vecteurs d'intérêt. Dans la **Figure 10B**, nous constatons que la distribution de la protéine GFP seule est diffuse et uniformément répartie dans le cytoplasme et le noyau. Cependant, la protéine chimérique GFP-ER β présente une distribution beaucoup plus spécifique. En effet, en absence de stimulation au ligand, GFP-ER β se retrouve majoritairement dans le noyau de la cellule avec une légère distribution au niveau du cytoplasme. Toutefois, GFP-ER β , avant l'ajout de l'hormone, semble avoir une distribution nucléoplasmique diffuse, mais ne semble pas se retrouver dans les nucléoles. La distribution de GFP-ER β suite à la stimulation avec 10 nM de E2 est entièrement

nucléaire et suggère une activation transcriptionnelle en réponse au ligand. D'ailleurs, on remarque l'apparition de foyers ponctuels suggérant la stimulation de l'activité de transcription par GFP-ER β . Ce patron dans la distribution nucléaire suite à la réponse au ligand a été également décrit (229). On remarque également que GFP-ER β semble être principalement toujours à l'extérieur des nucléoles. Suite au traitement au MG132, le GFP-ER β est à nouveau distribué majoritairement dans la région nucléoplasmique, mais semble être réparti de façon plus diffuse dans cette région que lors de la présence de l'hormone dans la cellule pouvant laisser présager une réponse transcriptionnelle modérée en réponse au MG132 comparativement à la réponse provoquée par E2. Bref, la distribution de GFP-ER β ne semble pas être affectée par l'inhibition du protéasome dans la cellule par comparaison à la distribution observée pour GFP-ER β en absence de ligand. De plus, nous observons une répartition similaire du récepteur lorsque la protéine de fusion GFP-ABCD β (**Figure 10B**) est en présence ou non de MG132. Le GFP-ABCD β en présence ou non de MG132 reste nucléaire, est distribué de façon diffuse, mais demeure à l'extérieur des nucléoles. Il est cependant difficile de faire des corrélations claires entre la transcription et la sub-localisation, mais ces résultats suggèrent des différences subtiles dans la distribution sub-nucléaire de ER β en réponse au MG132.

A.



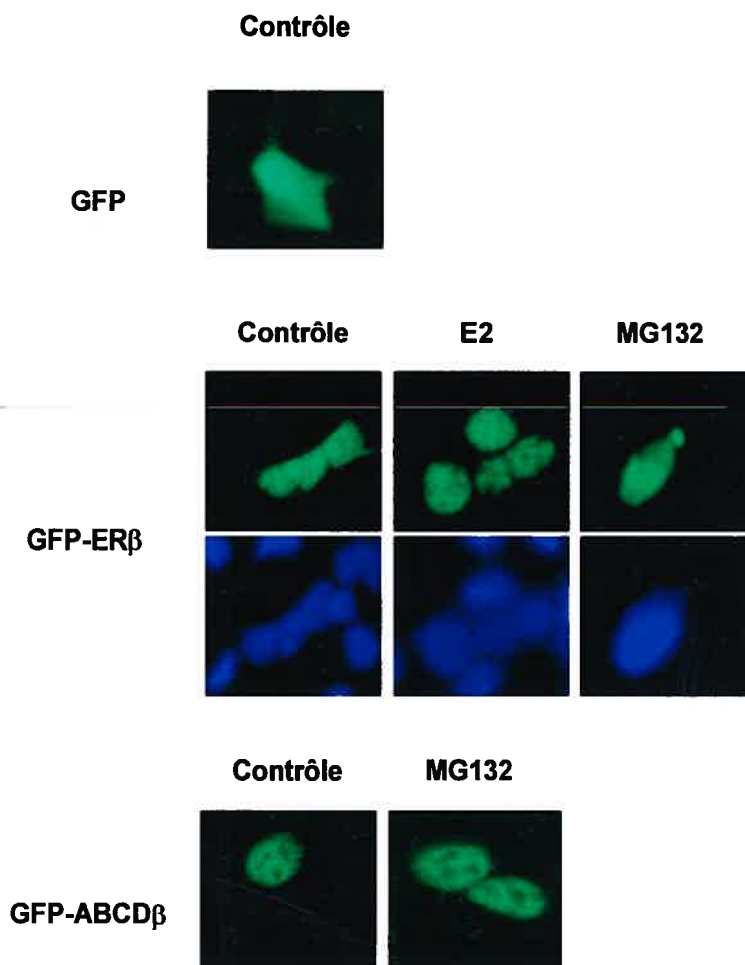
B.

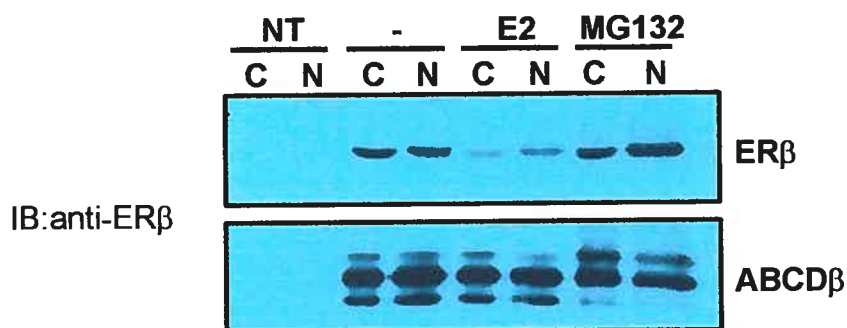
Figure 10. Effet du protéasome sur la distribution cellulaire.

A. Validation de la construction GFP-ER β en réponse à E2 par essai de luciférase sur des cellules HEK 293-T transfectées avec ERE-bluc. **B.** Analyse de la distribution cellulaire de GFP, GFP-ER β et GFP-ABCD β par microscopie de fluorescence de cellules transfectées. Les cellules HEK 293-T ont été traitées avec 10 nM de E2 et avec 1 μ M de MG132 tel qu'indiqué. Les cellules ont été fixées, puis la distribution cellulaire ainsi que le DAPI ont été analysés. Le vert représente la distribution de GFP, de GFP-ER β ou de GFP-ABCD β dans la cellule tandis que le bleu illustre les noyaux des cellules.

Deuxièmement, nous avons déterminé la localisation intracellulaire de ER β et de ABCD β dans la cellule sous l'influence du MG132. Pour être en mesure de déterminer le rôle du protéasome sur la localisation cellulaire, les cellules HEK 293-T ont été transfectées avec les vecteurs exprimant ER β ou ABCD β . Une analyse de compartimentalisation cellulaire des formes de fusion de HA-ER β et HA-ABCD β par immunobuvardage de type Western a ensuite été réalisée. Les résultats présentés à la **Figure 11A** montrent que le traitement à l'hormone (E2) augmente la distribution protéique de ER β dans le noyau comparativement à la quantité protéique du récepteur qui se trouve dans le cytoplasme. La microscopie de fluorescence (Figure 10B) nous a également révélé une distribution plus importante du récepteur dans le noyau suite à une stimulation des cellules à E2. Une corrélation entre la distribution cellulaire (Figure 10) et l'analyse de compartimentalisation (Figure 11) de ER β est alors observée. Le traitement des cellules au MG132 (1 μ M) provoque une augmentation de la quantité de protéines de ER β dans le noyau. De plus, cette augmentation de ER β dans le noyau en présence de MG132 peut être visualisée en observant la distribution cellulaire du récepteur dans la Figure 10. Cependant, contrairement à ER β , nous observons une diminution des niveaux protéiques de ABCD β dans le noyau avec le MG132, mais une augmentation de la protéine dans la fraction cytosolique. Ce comportement n'est toutefois pas en mesure d'être visualisé avec l'étude de la distribution cellulaire de ABCD β par microscopie de fluorescence représentée à la Figure 10B. Malgré les comportements observés dans les divers compartiments cellulaires, la méthode est limitée par la contamination possible de la protéine du noyau vers le cytoplasme lors du fractionnement. En effet, pour la contamination, nous avons observé que la fraction cytosolique pouvait avoir été contaminée par une lyse prématurée de la fraction nucléaire lors du fractionnement sub-cellulaire tel que déterminé par une analyse Western des fractions avec un marqueur spécifique au noyau, soit le PARP (poly-ADP-ribose-polymérase) (**Figure 11B**). Cette contamination peut laisser présager une surévaluation du signal de ER au cytoplasme comparativement aux expériences décrites en fluorescence (Figure 10). En somme, il semble que le protéasome joue un rôle dans la localisation et la distribution intracellulaire de ER β . ER β sauvage ubiquitiné et stabilisé

par l'inhibition du protéasome semble être séquestré dans le noyau, tandis que ABCD β ubiquitiné et stabilisé est dirigé vers le cytosol. Par conséquent, les résultats de la **Figure 11** appuyés des résultats de la Figure 10 démontrent un effet du protéasome dans la distribution cellulaire de ER β en absence de l'hormone.

A.



B.



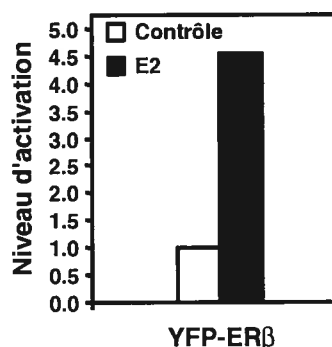
Figure 11. Compartimentalisation cellulaire de ER β .

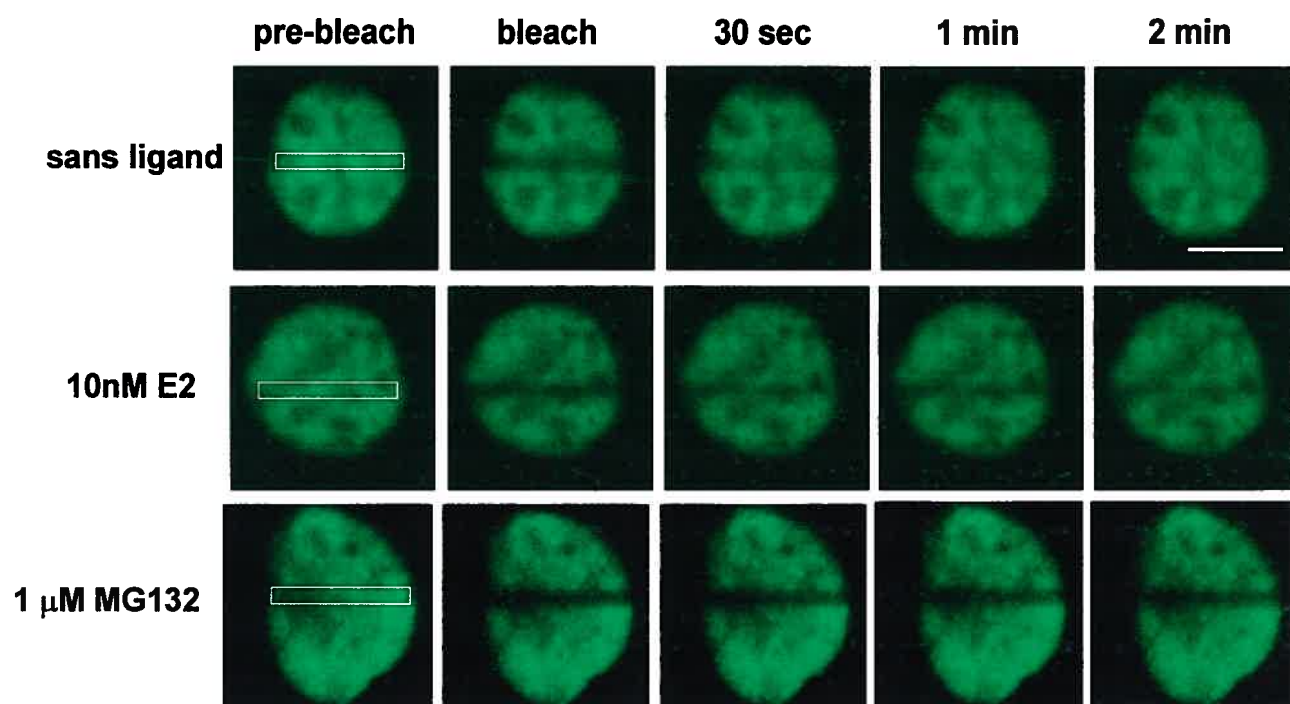
Des cellules HEK 293-T non-transfectées (NT) ou transfectées avec les vecteurs d'expression de ER β ou de ABCD β ont été recueillies et les fractions cytosoliques (C) et nucléaires (N) ont été séparées. Tel qu'indiqué, les cellules ont été traitées avec 10 nM de E2 ou avec 1 μ M de MG132. Les extraits cellulaires ont été analysés par immunobuvardage de type Western avec un anticorps anti-HA (**A**) et avec un anticorps anti-PARP (**B**).

Troisièmement, pour tenter de comprendre le rôle que peut jouer le protéasome dans la régulation ligand-indépendante de l'activation transcriptionnelle de ER β , nous avons étudié la mobilité intranucléaire en temps réel du récepteur ER β sur des cellules vivantes. Pour se faire, nous avons généré une protéine de fusion où la région codante de ER β a été sous-clonée dans le plasmide pEYFP. La protéine fluorescente jaune chimérique ainsi formée est composée d'une étiquette YFP (yellow fluorescent protein) en N-terminal de mER β qui n'altère pas l'activité luciférase du clone en réponse à l'hormone tel que déterminé par essai de luciférase (**Figure 12A**). Par la suite, la mobilité intranucléaire de ER β a été évaluée par analyse FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). La mesure consiste à mesurer la récupération de fluorescence de cellules HEK 293-T transfectées avec le vecteur d'expression de YFP-ER β ayant subi un photoblanchiment (bleach) sur une zone précise du noyau. La **Figure 12B** montre l'analyse FRAP réalisée sur les cellules. Une région rectangulaire d'aire fixe dans le noyau a été photoblanchie (bleach) en appliquant la puissance maximale du laser d'un microscope confocal pendant ~5sec et les images du noyau ont été recueillies à toutes les 393 ms. Les images de la **Figure 12B**, représentant une section de l'axe des Z du noyau entier d'une cellule, ont été obtenues avant le photoblanchiment (pre-bleach), immédiatement après le photoblanchiment (post-bleach) et à des temps indiqués après le photoblanchiment. Entre les temps 0 et 5 sec, les cellules ont été photoblanchies puis, la fluorescence a diminué dans la région encadrée. La récupération du signal de fluorescence qui suivra reflète directement la mobilité intrinsèque de ER β dans diverses conditions. En effet, si le temps de récupération est long, la mobilité du récepteur sera donc restreinte et lente. Tout d'abord, nous observons une récupération plus rapide de la fluorescence dans la **Figure 12B**, où YFP-ER β est en absence de ligand, comparativement à YFP-ER β en présence de ligand suggérant un ralentissement de la mobilité de ER β en réponse au ligand. Comme il a été démontré pour ER α , ce ralentissement est vraisemblablement associé à une activation de la transcription. De plus, nous remarquons que la récupération de la fluorescence après le photoblanchiment s'avère extrêmement lente lorsque les cellules transfectées avec YFP-ER β subissent un traitement au MG132 (1 μ M) par comparaison avec la récupération de la fluorescence des cellules en

absence de ligand. L'intensité de fluorescence dans les régions blanches normalisée en fonction d'une région non-blanchie sur un total d'au moins 10 noyaux a été quantifiée et les courbes de récupération des signaux de fluorescence des cellules en fonction des traitements sont illustrées dans la **Figure 12C**. Le temps de demi-récupération ($t_{1/2}$), c'est-à-dire le temps correspondant à 50% de l'intensité de fluorescence récupérée, a été calculé. En effet, comme nous le constatons dans la **Figure 12B**, le $t_{1/2}$ de YFP-ER β en absence de ligand (27 ± 3 sec) est beaucoup plus rapide que le $t_{1/2}$ de YFP-ER β influencé par le ligand (162 ± 18 sec). De plus, l'inhibition du protéasome 26S semble limiter, de façon encore plus significative, la mobilité de YFP-ER β . Effectivement, le $t_{1/2}$ est de plus de 300 secondes lorsque YFP-ER β est en présence de MG132. Ainsi, la mobilité intranucléaire de ER β semble être ligand- et protéasome-dépendante. Par conséquent, nous suggérons que l'inhibition de la régulation protéasome-dépendante du récepteur réduit grandement la mobilité de ER β en l'immobilisant dans le noyau, ce qui se traduit par une accumulation accrue de ER β nucléaire (voir Figure 11).

A.



B.

C.

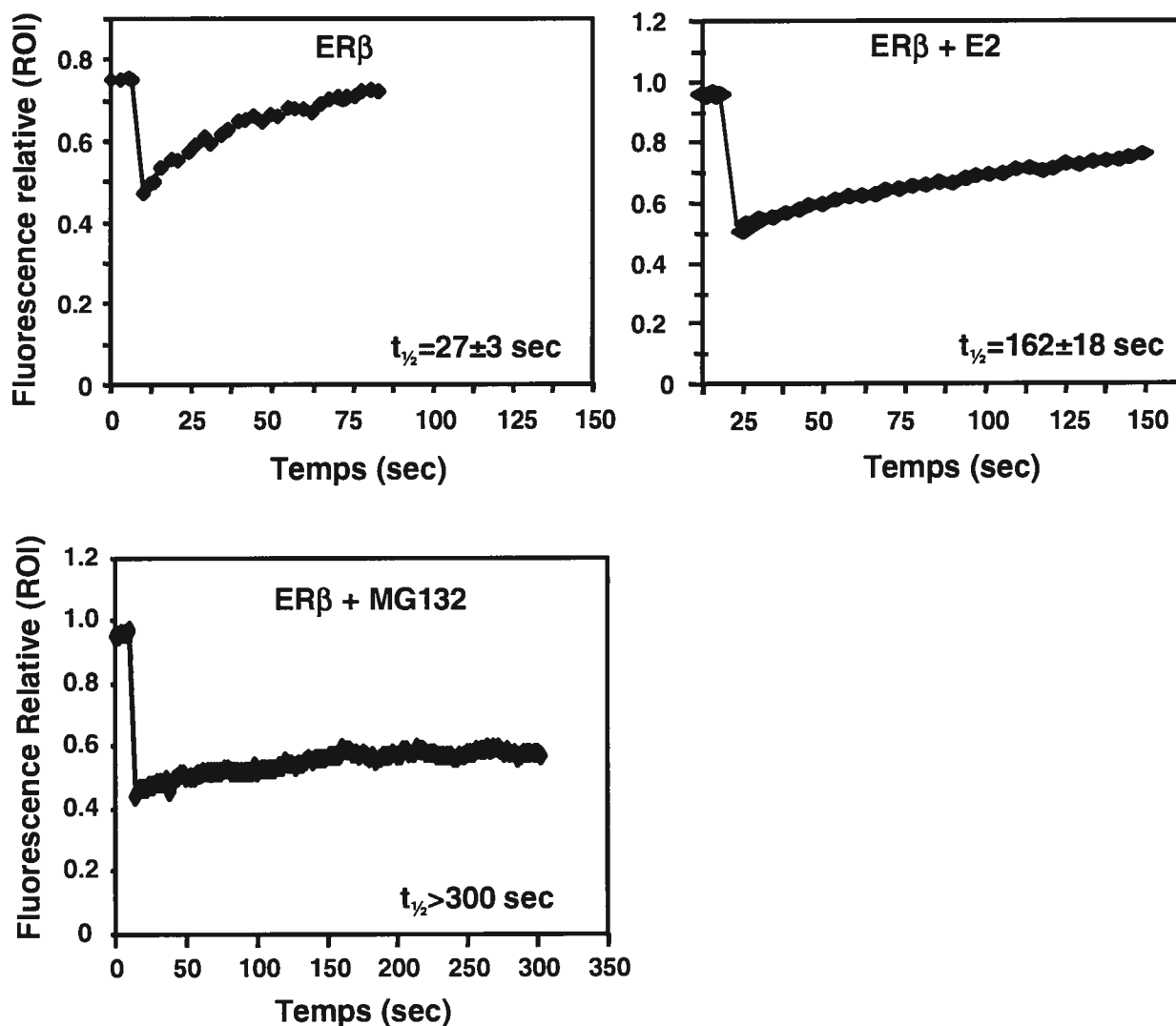


Figure 12. Effet du protéasome sur la mobilité intranucléaire de ERβ.

A. Validation de la construction YFP-ERβ en réponse à E2 par essai de luciférase sur des cellules HEK 293-T transfectées avec ERE-bluc. **B.** Une analyse FRAP a été réalisée sur des cellules HEK 293-T transfectées avec le vecteur d'expression YFP-ERβ traitées ou non avec E2 ou MG132. Les images représentent une section de l'axe des Z du noyau de la cellule obtenue avant le photoblanchiment (bleach) des cellules de la zone encadrée et pendant la récupération aux temps indiqués. La barre d'échelle représente 10 μm. **C.** Les

courbes de récupération des signaux de fluorescence dans les cellules sont illustrées pour des traitements avec le ligand ou avec le MG132. Les valeurs de l'intensité de fluorescence, c'est-à-dire la fluorescence relative de la région d'intérêt (ROI), représentent une moyenne d'au moins 10 noyaux et sont représentées en fonction du temps. Le temps correspondant à 50% de récupération des niveaux de fluorescence est indiqué ($t_{1/2}$).

Le protéasome semble donc être en mesure de réguler ER β en agissant sur sa distribution cellulaire, sur sa localisation intracellulaire et sur sa mobilité nucléaire. Ces mécanismes de régulation de ER β par le protéasome pourraient expliquer les effets de l'inhibition du protéasome sur la transcription des gènes causée par ER β , mais également étroitement contrôlée par le domaine A/B contenant l'AF-1.

Jusqu'à maintenant, nous nous sommes interrogés sur le rôle du protéasome dans la régulation ligand-indépendante de ER β et sur les mécanismes permettant cette régulation par le protéasome. Il est connu que l'activité ligand-indépendante de plusieurs récepteurs nucléaires dont ER β est contrôlée par l'activité AF-1. Cette régulation est souvent dépendante d'une phosphorylation directe au niveau du domaine AF-1 permettant de moduler l'activité transcriptionnelle. Par conséquent, nous allons maintenant tenter de comprendre comment l'AF-1 de ER β peut contribuer à la régulation protéasome-dépendante du récepteur et ce, en absence de son ligand.

Dans un premier temps, nous nous sommes penchés sur les différentes caractéristiques fonctionnelles de l'AF-1 de ER β . Dans la région A/B de ER β , plusieurs sites consensus de phosphorylation par les MAPK ayant une séquence riche en proline PXX-S/T-P sont présents (**Tableau II**).

Tableau II. Cibles de phosphorylation de ER α et ER β et activité transcriptionnelle

Sites de phosphorylation	Voies de phosphorylation impliquées	Activité transcriptionnelle	Références
ERα			
S104	CDK2	↑	(95)
S106	CDK2	↑	(95)
S118	CDK7, MAPK, PKC	↑	(64;65;81;99-101)
S167	AKT, pp90 ^{rsk1}	↑	(83;92)
S236	PKA	↓	(79)
T311	MAPK (p38)	↑	(66)
ERβ			
S25	ND*	ND*	ND*
S31	ND*	ND*	ND*
S69	ND*	ND*	ND*
S94	ND*	ND*	ND*
S106	MAPK	↑	(82)
S124	MAPK	↑	(82)
S154	ND*	ND*	ND*
S158	ND*	ND*	ND*

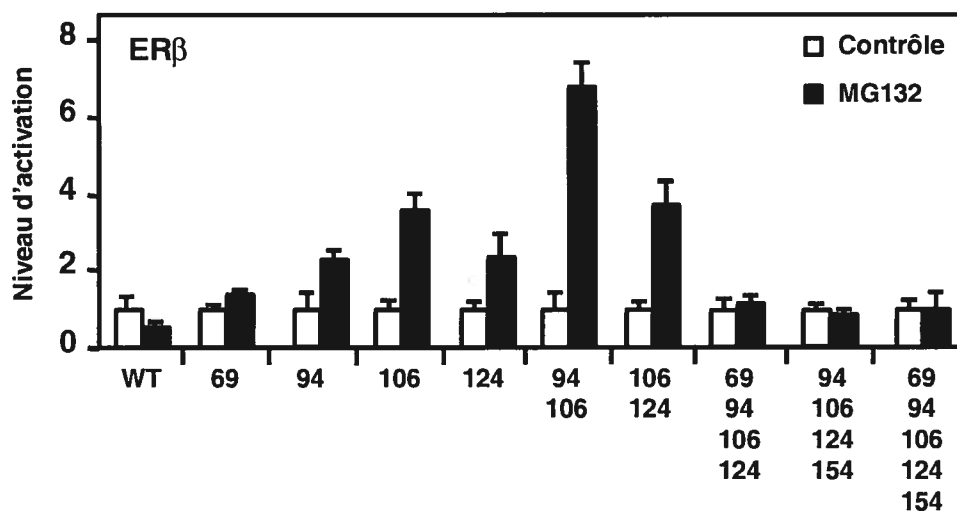
ND* : Non-Déterminée

Bien que le rôle fonctionnel de la plupart de ces sites reste inconnu, certains sites de ER β , comme les serines 106 et 124, reconnus pour intervenir dans le recrutement de coactivateurs lors de l'activation de la transcription, pourraient intervenir dans la régulation du récepteur par le protéasome. De multiples mutations ponctuelles des sites MAPK visant à remplacer les résidus serines en alanines ont alors été réalisées afin d'en mesurer les effets. Pour se faire des cellules HEK 293-T ont été cotransfectées avec un gène rapporteur de la luciférase ERE-bluc et avec les mutants de ER β et testés en comparaison avec ER β non muté en réponse au MG132 par essai luciférase. L'activité transcriptionnelle observée avec ces formes mutées de ER β est représentée dans la **Figure 13A**. Nous remarquons que lorsque l'activité fonctionnelle du protéasome 26S est inhibée dans la cellule, le niveau d'activité de la transcription de certaines formes ponctuellement mutées de ER β est beaucoup plus élevé que le niveau mesuré pour ER β sauvage (WT) en absence de ligand.

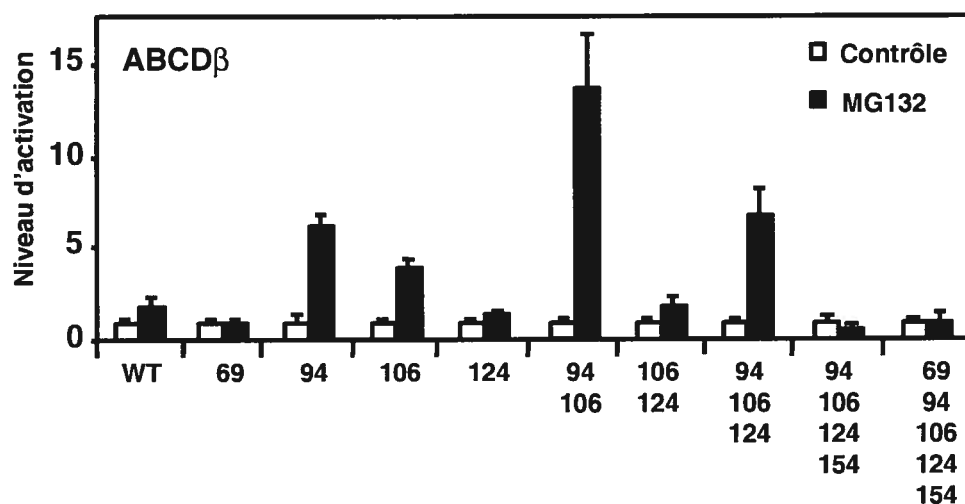
Ainsi, particulièrement, l'activité transcriptionnelle des mutants ponctuels S94A, S106A et S124A semblent être régulée par le protéasome. En effet, la serine 106 seule ainsi que la serine 124 seule, bien connues pour recruter en duo le coactivateur SRC-1 (82) lors de l'activation de la transcription par ER β , semblent être d'une grande importance dans la régulation du récepteur par le protéasome 26S. De même, lorsque ces 3 serines sont mutées individuellement lors de l'inhibition du protéasome, les sites MAPK auxquels elles appartiennent ne semblent plus être en mesure de maintenir l'activité transcriptionnelle basale de ER β et ainsi, le niveau de la transcription de ces formes de ER β est plus élevé que pour ER β sauvage. Il semble, cependant, qu'un mutant de ER β soit à l'origine d'une régulation plus étroite du récepteur par ces sites MAPK. Effectivement, la double mutation S94A et S106A génère une activation de la transcription très élevée en présence de MG132, signe d'une dérégulation de ce récepteur dépendante du protéasome. Surprenamment, nous observons un niveau d'activité transcriptionnelle similaire au niveau de ER β sauvage (WT) lorsque la serine 69 ou la serine 154 en plus des 2 serines régulatrices 94 et 106 et de la serine 124 sont ponctuellement mutées. Néanmoins, ce résultat suggère que les sites de phosphorylation MAPK contenant les serines 94 et 106 participent à la régulation protéasome-dépendante de ER β en absence de ligand. Dans la **Figure 13B**, nous avons reproduit la même expérience en mutant de façon ponctuelle les sites de phosphorylation MAPK de la forme tronquée de ER β , soit ABCD β , où le domaine de liaison au ligand et l'AF-2 sont absents. Somme toute, nous observons les mêmes comportements transcriptionnels pour ABCD β comportant la double mutation S94,106A, mais il semble que la serine 124 soit moins indispensable que pour ER β dans la modulation du récepteur. Pour ABCD β , il est donc clair que le maintien d'une activité transcriptionnelle basale par le récepteur lors de l'inhibition du protéasome requiert les sites MAPK contenant les serines 94 et 106. Bref, la **Figure 13A,B** illustre que les sites MAPK des serines 94 et 106 participent à la régulation protéasome-dépendante de ER β en absence de ligand et que leur intégrité est promordiale dans le maintien d'un cycle basal de la transcription. Il a été démontré qu'un motif appelé PEST, riche en proline, en acide glutamique, en serine et en thréonine, peut agir en tant que signal de dégradation rapide des substrats par la voie

ubiquitine-protéasome (227). Nous avons identifié une séquence candidate, située dans la région 23 à 46 acides aminés de ER β se rapprochant du motif PEST. Pour tenter d'évaluer l'impact de ce signal sur la régulation protéasome-dépendante de ER β , nous avons étudié les effets transcriptionnels d'une forme de ER β , soit ER β -485, où les 64 premiers acides aminés sont absents. De cette façon, dans des cellules HEK 293-T cotransfectées avec ERE-bluc et avec ER β ou ER β -485, nous avons étudié le niveau d'activité de la transcription générée dans les cellules après les avoir traitées ou non au MG132. La **Figure 13C** illustre les résultats de luciférase obtenus. Comme nous pouvons le constater, la forme ER β -485 provoque une forte augmentation du niveau de l'activité de la transcription en présence de MG132 comparativement à celui de ER β . Par conséquent, à première vue, il semble que cette séquence PEST puisse participer à la régulation protéasome-dépendante de ER β , mais toutefois, il est à noter que cette séquence de ER β (23-46a.a) contient 2 sites consensus de phosphorylation par les MAPK (S25 et S31) qui pourraient également intervenir dans la modulation de ER β en présence de MG132. Ainsi, la présence de cette séquence contribue à garder des taux basaux de la transcription lors de l'inhibition du protéasome.

A.



B.



C.

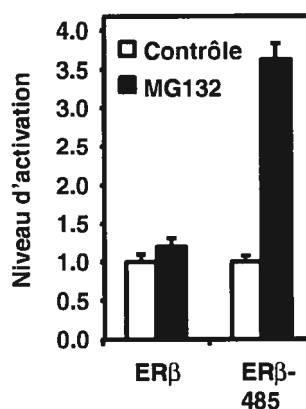
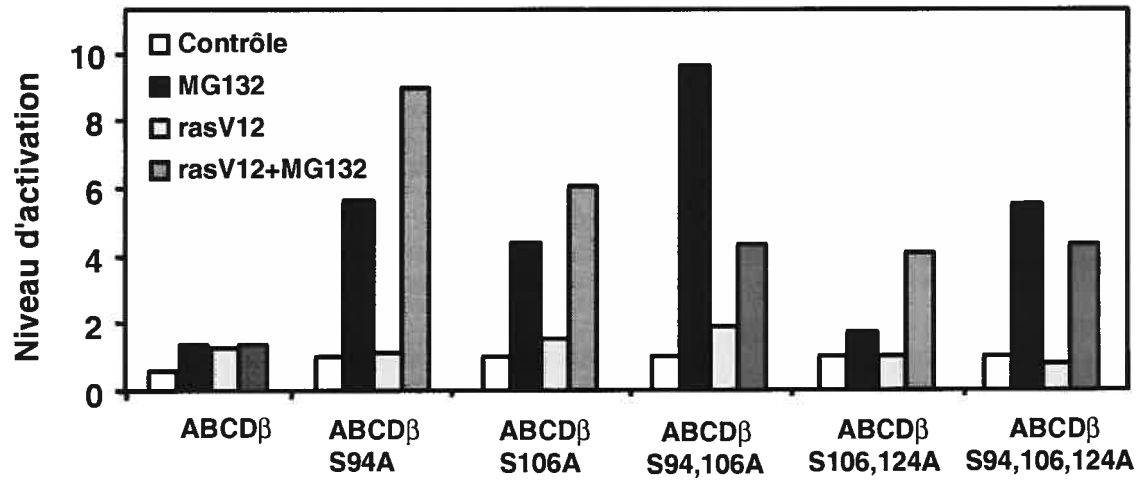


Figure 13. Rôle des sites consensus de phosphorylation sur la régulation protéasome-dépendante de ERβ. Les cellules HEK-293-T ont été cotransfectées avec un gène rapporteur ERE-bluc et avec des vecteurs exprimant des mutants ponctuels des serines, sites consensus MAPK, de l'AF-1 de ERβ (A) et de ABCDβ (B) ou avec une forme de ERβ, ERβ-485, contenant une délétion de 64 acides aminés dans la région N-terminale (C). Un traitement au MG132 (1 μM) a été effectué ou non sur les cellules, puis le niveau d'activation de la transcription a été mesuré par l'activité de la luciférase. Les chiffres correspondent aux positions des résidus serines de l'AF-1 de ERβ qui ont été substitués par des résidus alanines.

Dans un deuxième temps, pour tenter de mieux comprendre les mécanismes de régulation protéasome-dépendante de ER β par les sites MAPK de la région AF-1 en absence de ligand, nous avons évalué la contribution de l'activation de la cascade MAPK par l'expression d'un mutant constitutif de l'oncogène ras (rasV12) sur cette régulation. Des études précédentes ont permis de démontrer que l'expression de l'oncogène ras, qui est un facteur d'échange GDP/GTP ayant une activité GTPase menant à l'activation de la kinase Raf, puis des MAPK, permettait la phosphorylation directe de ER β et l'augmentation de son activité transcriptionnelle (43). Ainsi, nous avons étudié l'impact d'un récepteur activé sur les niveaux d'activation de la transcription générés en présence du MG132 (**Figure 14**). Des cellules HEK 293-T ont été cotransfectées un gène rapporteur ERE-bluc, un vecteur d'expression de la GTPase constitutive rasV12 et des plasmides d'expression des mutants serines de l'AF-1 de ABCD β (**A**) et de ER β (**B**). Comme nous pouvons le constater sur la **Figure 14A**, le niveau de transcription provoqué par le double mutant ABCD β S94,106A en présence du MG132, chute de 55% avec l'activation de la cascade MAPK. De façon similaire, nous observons que l'activation de la cascade MAPK avec l'expression de rasV12 contribue à diminuer la réponse de la transcription provoquée par ER β S94,106A lors de l'inhibition de l'activité du protéasome 26S dans la **Figure 14B**. De plus, la diminution de l'activité transcriptionnelle du mutant S94,106A par rasV12 n'est pas remarquée pour les mutants S94A, S106A, S106,124A et S94,106,124A (**Figure 14A**). Ainsi, la serine 124 semble contribuer à la régulation de ABCD β muté aux serines 94 et 106 en favorisant la diminution de l'activité transcriptionnelle du récepteur en présence de MG132 et de rasV12. D'après la **Figure 14A**, nous constatons que seule la phosphorylation du récepteur ABCD β S94,106A engendre une diminution significative du niveau de l'activité transcriptionnelle en présence du MG132. Par conséquent, les résultats de la **Figure 14** suggèrent que la régulation protéasome-dépendante de ER β nécessite la participation des sites MAPK contenant les serines 94, 106, mais également que l'activation de la cascade des MAPK dans la cellule contribue à la régulation de ER β de façon ligand-indépendante et protéasome-dépendante.

A.



B.

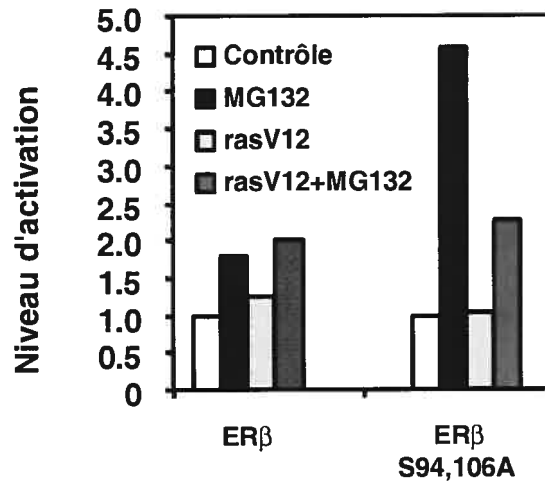


Figure 14. Effet de l'activation de l'oncogène ras sur la régulation protéasome-dépendante de ERβ. Cotransfection de HEK 293-T avec le rapporteur ERE-bluc, le dominant-positif de l'oncogène ras, rasV12, et des vecteurs d'expression des mutants serines de l'AF-1 de ABCDβ (A) et de ERβ (B). Par la suite, des cellules stimulées ou non durant 20 h avec 1 μM de MG132 ont été récupérées et lysées pour un essai luciférase.

Durant la dernière décennie, un très fort intérêt scientifique s'est fait ressentir concernant l'importance du premier oncogène identifié, soit la protéine RAS. De nombreuses études biochimiques et génétiques ont été réalisées sur la signalisation en amont et en aval de cette petite molécule GTPase menant au modèle de la signalisation des récepteurs tyrosine kinase (RTKs) vers les MAPK en passant par RAS (246). Ainsi, trois grandes voies de signalisation d'activation des MAPK initiées par RAS ont été établies. Il existe donc la voie des p42/p44 conduisant à l'activation des kinases Erk1/Erk2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase), la voie d'activation du proto-oncogène facteur de transcription c-jun par la kinase JNK (c-jun N-terminal kinase) et enfin, la voie d'activation de p38 par les kinases Mkk3/6. De cette façon, pour tenter de déterminer par quelles voies d'activation des MAPK le récepteur ER β est régulé par le protéasome 26S en absence de ligand, nous avons utilisé des inhibiteurs chimiques de chacune des voies des MAPK sur la réponse transcriptionnelle générée par le mutant S94,106A de ER β en présence de MG132. Ainsi, à la **Figure 15**, les cellules HEK 293-T ont été cotransfectées avec le gène rapporteur ERE-bluc, le vecteur d'expression de la GTPase rasV12 et le mutant S94,106A de ABCD β . En utilisant le mutant ABCD β qui répond de façon similaire à ER β et qui contient la fonction AF-1 responsable du maintien d'une activité transcriptionnelle de base en absence de ligand, nous constatons que la diminution de l'activité transcriptionnelle de ABCD β S94,106A provoquée par l'activation de la cascade des MAPK initiée par rasV12 est partiellement récupérée par l'ajout de SB dans la **Figure 15**. En effet, l'inhibiteur de la voie de la MAPK p38, SB 203580, permet la récupération des niveaux d'activation de la transcription tandis que les inhibiteurs de JNK et de MEK, SP 600125 et PD 98059 respectivement, ne le permettent pas. Par conséquent, ces résultats suggèrent que la voie p38 participe à la régulation dépendante du protéasome de ER β et ce, en absence de ligand et possiblement par la phosphorylation de l'AF-1 de ER β .

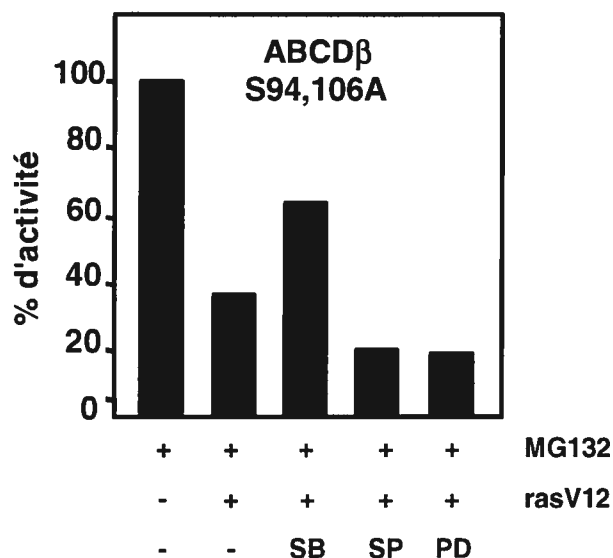


Figure 15. Contribution des MAPKs sur l'effet de l'inhibition de la phosphorylation.

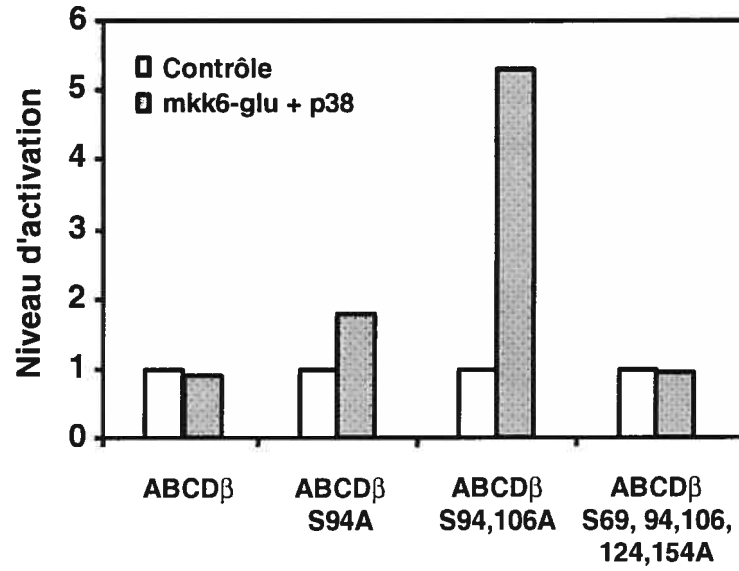
Cotransfection de HEK 293-T avec le rapporteur ERE-bluc, rasV12 et le vecteur d'expression du mutant S94,106A de ABCD β . Des cellules traitées ou non durant 20 h avec 1 μ M de MG132 et/ou avec 10 μ M d'inhibiteur de p38, SB203580 (SB), 50 μ M d'inhibiteur de MEK, PD 98059 (PD), 10 μ M d'inhibiteur de JNK, SP600125 (SP) ont ensuite été recueillies et l'activité transcriptionnelle a été mesurée par un essai luciférase. L'induction maximale de la transcription en présence de MG132 a été définie à 100%.

En présence de MG132, il semble donc que l'activité transcriptionnelle de ABCD β S94,106A diminue en présence de rasV12, mais que cette activité soit partiellement restaurée par l'inhibition de la voie de signalisation de p38. Par conséquent, nous voulions déterminer le rôle de la voie de signalisation de la MAPK p38 dans la régulation protéasome-dépendante de ER β . Pour se faire, nous avons induit la stimulation intracellulaire de la voie de phosphorylation en utilisant un mutant constitutif de mkk6 (mkk6-glu), la kinase responsable de l'activation de la protéine p38. Des cellules HEK

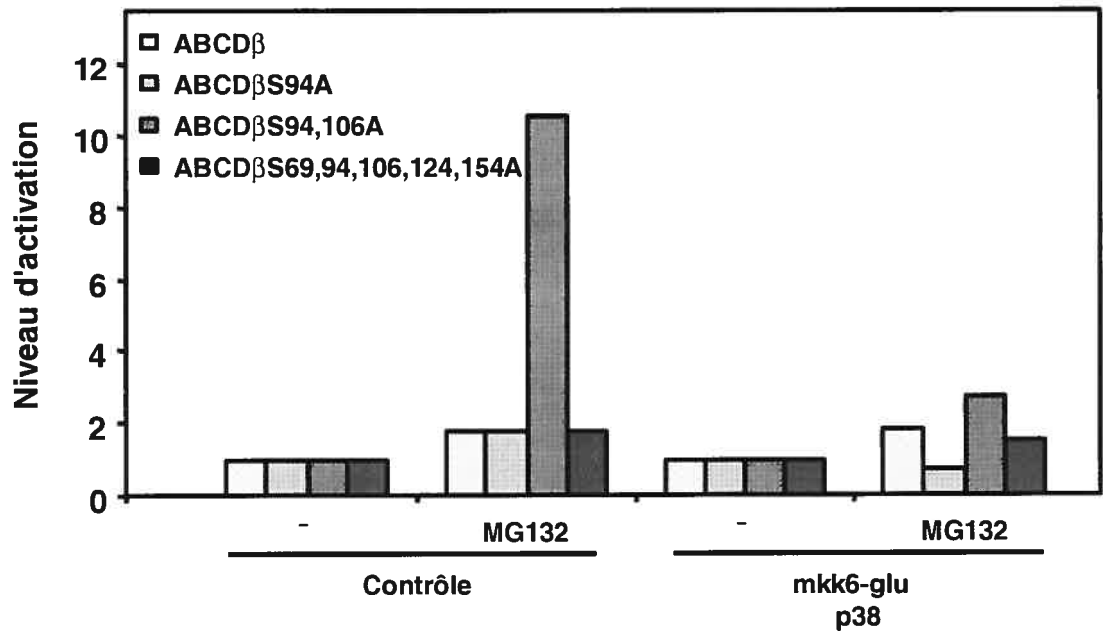
293-T ont alors été cotransfectées avec le rapporteur ERE-bluc, les vecteurs d'expression exprimant ABCD β ou des mutants serines de l'AF-1 de ABCD β ainsi que les kinases mkk6-glu et p38. D'après la **Figure 16A**, nous pouvons noter une activation de la transcription par le mutant S94,106A de ABCD β lors la stimulation de la voie de la kinase p38 avec mkk6-glu en présence de l'activité fonctionnelle du protéasome 26S. En effet, nous constatons que ABCD β S94,106A provoque une augmentation des niveaux de l'activité de transcription de plus de 5 fois par comparaison avec ABCD β non-muté en absence de ligand et de MG132. Cette observation laisse suggérer que les serines 94 et 106 de ER β sont indispensables à la modulation de ER β pour que celui-ci ne soit pas dérégulé dans la cellule suite à l'activation des MAPK par, entres autres, les facteurs de croissance. De plus, ce résultat laisse supposer que les serines résiduelles 69, 124 et 154 participent également à la régulation de ER β , mais cette fois, pour obtenir une activation contrôlée et suffisante du récepteur lorsque celui-ci est stimulé par son ligand ou par les MAPK. D'ailleurs, nous pouvons noter que le mutant ABCD β S69,94,106,124,154A ne provoque plus une hausse de l'activité transcriptionnelle en absence du ligand et du MG132 par comparaison au niveau de la transcription observé pour ABCD β non-muté. Ces résultats suggèrent un effet de coopération entre les divers sites MAPK de l'AF-1 de ER β afin de favoriser une régulation étroite de son activité dans la transcription des gènes cibles. Nous avons également testé l'effet du MG132 sur le niveau de l'activité transcriptionnelle provoqué par ABCD β S94,106A en présence des kinases mkk6-glu et p38. D'après la **Figure 16B**, nous remarquons que l'activité de la transcription protéasome-dépendante produite par ER β est largement diminuée, soit de plus de 70%, lorsque la voie de signalisation de p38 est activée. Il semble alors que l'activation de p38 joue un rôle de régulation sur l'activité de ER β . De plus, lors de l'activation de la MAPK p38, les serines 69, 124 et 154 semblent participer à la régulation du récepteur ABCD β S94,106A puisque la présence des ces serines contribue à diminuer la réponse transcriptionnelle du mutant. D'ailleurs, les niveaux de transcription observés avec le mutant S94,106A de ABCD β par l'activation de p38 reviennent à des niveaux semblables aux récepteurs ABCD β non-muté et ABCD β S69,94,106,124,154A. En effet, lorsque les serines 69, 94, 106, 124 et 154 sont

mutées, le récepteur ABCD β ne semble pas outre mesure être dérégulé en présence de MG132. Ceci suggère que d'autres motifs ou signaux de ABCD β peuvent participer à la régulation ligand-indépendante du récepteur par le protéasome 26S, citons, par exemple, les 2 sites consensus MAPK de l'AF-1 de ER β (S25 et S31) et la séquence PEST candidate (23-46 a.a). Bref, les résultats de la **Figure 16A,B** suggèrent que la phosphorylation en général et possiblement de l'AF-1 de ER β par la voie de signalisation des MAPK de p38 participe à la régulation protéasome-dépendante de l'activité transcriptionnelle de ER β , mais qu'elle agit probablement aussi de signal dans la dégradation. Afin de vérifier que la régulation de la transcription de ER β par la phosphorylation est bien dépendante de l'activation de p38 et non pas des effets du MG132 sur la cellule, la quantité protéique ainsi que l'activation de p38 ont été évaluées par immunobuvardage de type Western. Des cellules HEK 293-T ont été transfectées avec les vecteurs d'expression du mutant constitutif mkk6-glu, et/ou avec la MAPK p38. Comme le montre la **Figure 16C**, les niveaux protéiques de p38 ne fluctuent pas lors du traitement des cellules avec le MG132. Il n'y a pas d'accumulation ou même de diminution de la quantité de p38. Dans un même ordre d'idées, nous observons que l'ajout de MG132 dans les cellules n'empêche pas l'activation de la voie de signalisation de p38. En effet, en comparant les taux de phosphorylation de p38 dans des cellules contrôles où mkk6-glu n'a pas été transfecté, avec les taux de phosphorylation de p38 pour des cellules où mkk6-glu et/ou p38 a été transfecté, nous remarquons une hausse du taux de phosphorylation de p38 (P-p38) dans ces cellules, en présence de MG132. Bref, les effets de diminution de la transcription de ABCD β S94,106A en présence de MG132 observés dans la **Figure 16B** après avoir activé la signalisation de la MAPK p38 proviennent de la réelle activation de cette voie et non pas des effets du MG132 sur les cellules.

A.



B.



C.

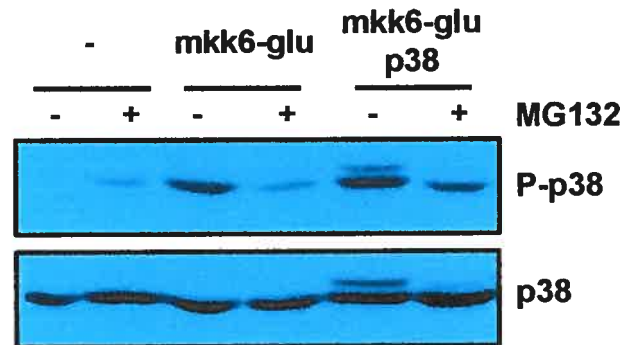


Figure 16. Le rôle de la voie de signalisation de p38 dans la régulation protéasome-dépendante de ER β . Les cellules HEK 293-T ont été transfectées avec le rapporteur ERE-bluc et les vecteurs exprimant ABCD β muté et non-muté. En présence ou non des vecteurs de la kinase constitutive mkk6-glu et de la kinase p38 (A) et suite à des traitements avec le MG132 (1 μ M) durant 20 heures tel qu'indiqués (B), un essai luciférase a été réalisé. Une analyse d'immunobuvardage de type Western sur la phosphorylation de la protéine p38 a été effectuée sur des cellules HEK 293-T transfectées avec les vecteurs d'expression codant pour le mutant constitutif mkk6-glu et/ou avec la MAPK p38 (C). Les quantités en p38 sont normalisées avec un anticorps anti-p38.

4. DISCUSSION

Dans ce projet, nous voulions évaluer le rôle de l'activité protéasomale sur la signalisation génomique des récepteurs des estrogènes α et β dans leur fonction d'activateurs transcriptionnels. L'altération de l'activité de cette voie de dégradation appelée ubiquitine-protéasome ou encore le dysfonctionnement de la signalisation menant à l'activation de ER α et ER β pourrait avoir un impact important au niveau du développement de certaines maladies comme le cancer des tissus gynécologiques.

De récentes découvertes dans le domaine des récepteurs nucléaires indiquent que l'activation de la transcription par les récepteurs des stéroïdes est régulée par des modifications post-traductionnelles telles que la méthylation, la phosphorylation et l'acétylation (247;248). Dans cette étude, nous avons démontré que le protéasome 26S peut, de façon assez dramatique, moduler l'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes.

Tout d'abord, les niveaux protéiques de plusieurs récepteurs des stéroïdes sont régulés par la dégradation gouvernée par l'ubiquitine via le protéasome 26S (168;235;238). Il a en effet été montré que ER α est dégradé dans un processus hormono-dépendant et que l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome, comme le MG132, promouvoit l'accumulation *in vivo* du récepteur et bloque la dégradation du récepteur induite par l'hormone. Ainsi, d'après la **Figure 8A**, nous avons montré que les niveaux protéiques de ER β en présence de E2 chutaient en comparaison avec les niveaux protéiques de ER β en absence de ligand et donc que ER β est également dégradé dans un processus hormono-dépendant. De plus, en absence de l'hormone, tout comme pour ER α (168) et GR (237), le traitement avec un inhibiteur du protéasome augmente significativement le niveau protéique de ER β (**Figure 8A,B**) en plus d'augmenter les niveaux d'ubiquitination de ER β (**Figure 9A,B**), ce qui suggère premièrement que ER β est bien une cible de la dégradation par le protéasome 26S et que deuxièmement, il existe une régulation protéasome-dépendante de ER β en absence de ligand.

La façon dont la dégradation influence la transcription est très mal comprise. Cependant, il semble que le processus varie d'un récepteur des stéroïdes à un autre (227). Il a déjà été montré que la régulation des niveaux protéiques de ER α se faisait par des mécanismes transcriptionnels et traductionnels, démontrant ainsi l'importance de la régulation des réponses biologiques provoquées par les estrogènes. Il a aussi déjà été démontré que le traitement de cellules Hela au MG132 altère l'activité de la transcription de ER α . Dans cette étude, nous avons d'abord tenté de déterminer une relation entre la participation de ER β dans la transcription et sa dégradation ligand-dépendante dans des cellules HEK 293-T et COS-1. Nous avons donc montré, dans la **Figure 2A,B** que le traitement des cellules au MG132 abroge l'activation ligand-dépendante de la transcription engendrée par ER β , mais également par ER α , dans ces lignées cellulaires. La fonction du protéasome 26S apparaît comme étant requise pour que ER α et ER β puissent activer la transcription ligand-dépendante de façon maximale. Le MG132 est également en mesure d'altérer l'activation ligand-dépendante de la transcription de TR (227), en plus de celle de AR (233) et de PR (236). Cependant, le MG132 stimule la transcription provoquée par certains autres facteurs de transcription comme GR (237;249), Sp1, E2F, p53 (227) ce qui suggère que le protéasome 26S n'est pas toujours un élément général requis pour obtenir une transcription maximale en particulier à l'intérieur même de la famille des récepteurs nucléaires.

L'inhibition du protéasome interfère donc avec l'activité maximale, en présence de ligand, de ER α et ER β . Avec des domaines LBD des deux récepteurs présentant une forte similitude, il est facile de penser que cette régulation protéasome-dépendante de la transcription s'effectue selon un même mécanisme. Cependant, les modes d'activation des récepteurs semblent être assez différents et une explication de ces divergences se trouve dans une région du récepteur des estrogènes qui comporte des différences. Cette région, constituée du domaine A/B, est responsable de l'activation transcriptionnelle ligand-indépendante des récepteurs ER α et ER β (43;81;82;250). Par conséquent, pour ce type d'activation transcriptionnelle, nous voulions comprendre les mécanismes de régulation de la transcription impliquant le protéasome 26S étant donné que nous avons montré (**Figure 8 et 9**) qu'il existe une régulation de la dégradation de ER β en absence de l'hormone et que

Lonard et al. l'avait également montrée pour ER α (227). Nous avons alors démontré, dans la **Figure 3**, que l'activité transcriptionnelle de ER α et ER β est régulée différemment par le protéasome en absence de leur ligand ce qui suggère que le protéasome 26S n'interagit pas de la même façon avec les deux récepteurs, ou encore avec les cofacteurs qui les modulent.

Il a donc été possible, par la suite, d'identifier les éléments de ER α et ER β modulant l'activité transcriptionnelle dépendante des ERs qui sont impliqués dans la régulation ligand-indépendante de la dégradation des ERs par le protéasome. En effet, dans la **Figure 4B**, nous avons comparé les niveaux d'activité transcriptionnelle obtenus pour ER α et ER β en absence de ligand et lors de l'inhibition du protéasome. Appuyé par les résultats obtenus avec les protéines chimériques dans la **Figure 4C**, nous avons constaté que le protéasome 26S ne semble pas réguler, en absence d'hormones, les deux récepteurs selon un même processus. Nous avons donc montré que la délétion de l'AF-1 de ER β provoque une régulation protéasome-dépendante du récepteur, contrairement à ER α , où l'absence de l'AF-1 ou même de l'AF-2 ne semble pas affecter l'activité ligand-indépendante par la voie du protéasome 26S. Par contre, il a été montré que l'AF-2 de ER α et/ou son domaine de liaison aux coactivateurs, c'est-à-dire la région comportant l'hélice- α 12, contribue à la dégradation ligand-dépendante du récepteur (227). D'ailleurs, nous savons qu'un mutant de ER α dénué entièrement de son domaine de liaison au ligand, comportant l'AF-2 et l'hélice- α 12, est transcriptionnellement inactif. De ce dernier fait, il semble donc que la régulation protéasome-dépendante de ER α s'effectue différemment de celle de ER β selon le mode d'activation du récepteur. Nos résultats suggèrent également qu'une région située dans le domaine D de ER α pourrait aussi être à l'origine de la régulation de la transcription dépendante du protéasome en absence de ligand. Cette région, qui contient la séquence de localisation nucléaire (NLS), pourrait interagir avec le protéasome 26S ou avec la machinerie de dégradation menant à la liaison de l'ubiquitine sur le récepteur. De cette façon, ce signal permettrait la régulation de l'activité transcriptionnelle ligand-indépendante du récepteur de façon protéasome-dépendante par le déplacement de ER α entre le

cytoplasme et le noyau. Cette hypothèse a d'ailleurs été soulevée pour tenter d'expliquer la régulation protéasome- et ligand-dépendante de AR (233).

Nos études ultérieures permettant de mieux comprendre la régulation protéasome-dépendante de l'activité transcriptionnelle des ERs se sont donc concentrées sur ER β étant donné que nous avons rapporté, précédemment, un lien entre une fonction d'activation transcriptionnelle, soit l'AF-1 de ER β , et une régulation de l'activité du récepteur par le protéasome 26S. Nous avons alors déterminé (**Figure 5 et 6**) que l'activité transcriptionnelle de ER β en absence d'estrogènes n'est pas significativement régulée par le protéasome indépendamment du contexte cellulaire ou du système gène rapporteur utilisé et que l'AF-1 est impliquée dans le maintien de l'activité transcriptionnelle basale lors de l'inhibition du protéasome. De plus, l'immunobuvardage de type Western fait avec des extraits cellulaires totaux et illustré à la **Figure 8** a montré que l'accumulation protéique observée en absence de ligand pour ER β et pour la forme de ER β déléetée de son AF-2, ABCD β en réponse au MG132 n'est plus observée pour la forme de ER β déléetée de la région AF-1, CDEF β . La portion CDEF β semble donc stabilisée dans la cellule indépendamment du fait que les cellules soient traitées ou non avec le MG132. Un comportement semblable dans la stabilisation des niveaux protéiques en présence de MG132 a été observé pour un autre récepteur nucléaire des stéroïdes, soit GR, mais dans un processus ligand-dépendant (238). En effet, il a été montré que le résidu lysine 426 de GR est un site potentiel d'ubiquitination du récepteur inclu dans la région de séquence PEST identifiée pour GR et que la mutation de ce résidu en alanine altère la régulation de la dégradation ligand-dépendante du récepteur. Ainsi, le mutant GR K426A n'est plus dégradé en présence de ligand et le niveau protéique de GR K426A en présence de MG132 et de dexaméthasone ou non demeure inchangé comparativement au niveau observé en absence de ligand et d'inhibiteur du protéasome. Par contre, bien que GR sauvage provoque des augmentations des niveaux d'activité transcriptionnelle lors de l'inhibition du protéasome, le mutant GR K426A, contrairement à CDEF β , n'est pas en mesure d'activer la transcription en présence de MG132. Dans le même ordre d'idées, une analyse d'immunobuvardage de type Western a révélé que la stimulation par E2 du mutant ER α

dépourvu entièrement de son domaine de liaison au ligand ne diminue pas les niveaux protéiques contrairement à ER α sauvage. Pour ER α , il semble donc que la dégradation ligand-dépendante soit causée via l'AF-2 et que le fait de retrancher cette région d'activation du récepteur altère la dégradation et l'activité transcriptionnelle du récepteur. Ainsi, il semble que les récepteurs nucléaires ne soient pas régulés selon un même mécanisme. Par contre, la convergence entre les activités de transcription et de dégradation est évidente même si l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de ER β sans AF-1 ne corrèle pas avec une augmentation de la dégradation du récepteur. En effet, comme pour ER β lié à son ligand, nous nous serions attendus à ce que les niveaux protéiques de CDEF β varient en présence de MG132.

Jusqu'à maintenant, nous avons montré que la transcription ligand-dépendante des gènes cibles de ER β est clairement régulée par l'activité du protéasome. De plus, nous avons été en mesure de mettre en évidence l'importance de l'AF-1 de ER β dans la régulation ligand-indépendante de la transcription via le protéasome 26S. En effet, l'AF-1 est nécessaire pour maintenir des niveaux de transcription basals de ER β et une fois délétée, elle entraîne une régulation protéasome-dépendante du récepteur. Ainsi, pour tenter d'établir le rôle de l'AF-1 dans la régulation de la dégradation des récepteurs des estrogènes β , l'état d'ubiquitination du récepteur a été déterminé. Nous avons ainsi observé une augmentation ligand-indépendante de ER β polyubiquitiné seulement lorsque le protéasome est inhibé (**Figure 9**). Par la suite, nous avons constaté que les niveaux de récepteurs ABCD β polyubiquitinés augmentaient également en présence de MG132 et qu'ils semblaient être similaires aux niveaux d'ubiquitination mesurés pour ER β . Bref, la région de l'AF-1 de ER β joue un rôle important dans l'ubiquitination ligand-indépendante du récepteur lui permettant sans doute d'en réguler l'activité de la transcription de concert avec le protéasome 26S. Récemment, il a été montré que hER α en absence ou en présence de son ligand est ubiquitiné et que hER α non-lié par son ligand est également sujet à une dégradation dynamique par le protéasome 26S (231). Par conséquent, pour ER α et ER β ,

même si le mécanisme d'action semble différent, il reste que la modification post-traductionnelle de la polyubiquitination est indispensable à la régulation de la transcription du récepteur. En effet, il a été montré, pour ER α , que le signal qui enclenche la progression du complexe d'activation transcriptionnelle hER α -cofacteurs vers un état inactif de la transcription implique des modifications post-traductionnelles du récepteur telles que la phosphorylation et l'acétylation, en plus du recrutement direct des enzymes ubiquitine ligases (231). Il existe plusieurs modifications post-traductionnelles du récepteur qui dépendent du recrutement de cofacteurs ou d'éléments de la machinerie transcriptionnelle basale. Par exemple, la sous-unité Cdk7 du facteur TFIIH phosphoryle le résidu serine 118 de hER α (251) et le complexe de coactivateur CBP/p300 acétyle la région charnière de hER α (252). L'implication de TFIIH et de CBP dans le recrutement des E3 ligases et de certaines sous-unités ATPases du protéasome a donc mis l'emphase sur le rôle que ces modifications post-traductionnelles ont dans le recrutement dynamique, l'ubiquitination et la désassemblage de complexes formés aux promoteurs durant les cycles de transcription (251;253). De cette façon, il est fort envisageable que l'AF-1 de ER β , qui est une cible de polyubiquitination, subisse certaines modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation afin d'être en mesure de réguler la transcription protéasome-dépendante du récepteur en absence de ligand d'autant plus que l'AF-1 de ER β , contenant plusieurs sites de phosphorylation, est ciblée par des kinases qui modifient l'activité transcriptionnelle du récepteur (**Tableau II**).

Les mécanismes permettant d'expliquer la régulation de la transcription par la voie ubiquitine-protéasome sont très mal connus à ce jour. Cependant, de plus en plus d'évidences supposent que le protéasome 26S est impliqué dans le transport nucléocytoplasmique des récepteurs nucléaires et dans leur localisation et mobilité intracellulaire. Il a d'ailleurs été montré, pour le récepteur des stéroïdes AR, que le protéasome joue un rôle non-protéolytique au niveau du transport de la protéine entre le noyau et le cytoplasme (233). L'inhibition de l'activité fonctionnelle du protéasome par le MG132 atténue considérablement la relocalisation de AR du cytoplasme vers le noyau en présence des androgènes. Une explication possible, selon les auteurs, implique la séquence

PEST de AR qui se situe dans le domaine D ou dans la région charnière du récepteur. Cette séquence PEST se superpose à la séquence de localisation nucléaire NLS. Il serait donc possible que l'ubiquitination de AR dans cette région agisse en tant que site de reconnaissance pour l'association du protéasome, résultant en une modulation de la localisation nucléaire et de la distribution cellulaire du récepteur par celui-ci. Un rôle du protéasome et de la protéolyse dans la distribution de ER α a également été établi. Cependant, contrairement à GR, TR, AR, VDR et MR qui sont des récepteurs nucléaires pour lesquels la localisation nucléaire dépend de la liaison à leur ligand, ER α est majoritairement présent dans le noyau indépendamment de la présence du ligand (229). Ainsi, un rôle du protéasome a été établi dans la dynamique de ER α et plus spécifiquement concernant la mobilité intranucléaire du récepteur. En effet, il a été montré que ER α est immobilisé dans le noyau lorsque la dégradation est inhibée par l'ajout d'inhibiteurs du protéasome (230). Une hypothèse émise pour tenter d'expliquer cette observation est que la protéolyse du récepteur ER α ou de d'autres éléments est nécessaire pour maintenir la dynamique de ER α . D'ailleurs, le traitement de cellules au MG132 inhibe spécifiquement la transcription ligand-dépendante de ER α (227) soulevant la possibilité que la protéolyse engendrée par le protéasome soit essentielle au fonctionnement d'un cycle de la transcription. Cependant, jusqu'à maintenant, il n'a pas été possible de déterminer si le protéasome est requis pour l'initiation de la transcription ou pour la libération du complexe ER α -coactivateurs du promoteur.

Dans ce travail, nous voulions tenter d'élucider le mécanisme de régulation de la transcription de ER β par le protéasome en étudiant l'influence du protéasome sur la distribution cellulaire, la compartimentalisation cellulaire et sur la mobilité intranucléaire de ER β . Premièrement, nous avons démontré, d'après la **Figure 10**, que le protéasome n'influençait pas significativement la distribution cellulaire de ER β . En effet, le comportement ligand-indépendant de la distribution de ER β et de ABCD β en présence de MG132 est similaire à celui observé en absence de MG132. De plus, comme la distribution de ABCD β est identique à la distribution de ER β , nous pouvons suggérer, une fois de plus,

que la régulation ligand-indépendante du récepteur par le protéasome requiert la région AF-1 de ER β .

Par la suite, nous avons étudié la compartimentalisation cellulaire (**Figure 11**) de ER β et de ABCD β . Nous voulions donc déterminer si le maintien de la régulation transcriptionnelle ligand-indépendante de ER β et de ABCD β lors de l'inhibition du protéasome pouvait être attribué à une modulation du transport du récepteur entre le noyau et le cytoplasme. Pour se faire, nous avons mesuré les niveaux protéiques de ER β et de ABCD β en absence de ligand, mais avec ou sans MG132 dans les fractions cellulaires cytoplasmique et nucléaire. Pour l'étude de la dynamique du transport nucléocytoplasmique de ER β dans un contexte dépendant du protéasome, une hypothèse a été rapportée voulant que le protéasome soit en mesure d'interagir directement avec des facteurs de transcription pour en maintenir les niveaux protéiques en présence et en absence de ligand (254;255). En effet, cette hypothèse fut supportée par de récentes découvertes qui ont montré une interaction directe entre certains récepteurs stéroïdiens ou protéines d'interaction avec les récepteurs stéroïdiens et des composantes du protéasome 26S (254-256). Ainsi, nos expériences de fractionnement cellulaire ont, en effet, démontré un impact du protéasome 26S dans la modulation du transport de ER β entre le noyau et le cytoplasme. Lors de l'inhibition du protéasome, ER β est davantage confiné dans le noyau, tandis qu'ABCD β semble se retrouver dans le cytoplasme. Même si jusqu'ici les résultats sur ER β et ABCD β ont laissé entendre que la régulation dépendante du protéasome en absence de ligand se faisait via l'AF-1, il est tout à fait possible que l'AF-2 joue un rôle dans le transport nucléocytoplasmique du récepteur et donc dans sa régulation. D'ailleurs, il est reconnu qu'en présence d'hormones, l'AF-2 de ER permet une relocalisation intra-nucléaire associée à des domaines de transcription active (Figure 10 et (230;257)). Bref, nous pensons que la régulation de ER β en absence de ligand pourrait se faire par la liaison d'éléments du protéasome 26S au récepteur et probablement par une liaison impliquant l'AF-1. D'ailleurs la région AF-1 a, jusqu'ici, permis le couplage de la transcription avec l'activité de dégradation du protéasome.

La mobilité intranucléaire de ER β en absence et en présence de ligand et sous l'influence ou non du protéasome a par la suite été analysée par la méthode FRAP. Cette analyse a été faite pour nous permettre de mieux comprendre le mécanisme de régulation dynamique de ER β . Selon la **Figure 12**, nous avons donc déterminé que la mobilité intranucléaire de ER β est fortement diminuée lors de l'inhibition du protéasome 26S ($t_{1/2}=27 \pm 3$ sec vs >300 sec). Le protéasome jouerait ainsi un rôle dans la mobilité de ER β . D'ailleurs, la mobilité intranucléaire de ER α est également significativement altérée par l'inhibition du protéasome (230). Le rôle du protéasome dans la modulation de la mobilité de ER α et ER β repose sur une hypothèse émise précédemment qui stipule que le protéasome interagit directement avec les récepteurs pour en réguler les niveaux protéiques. Par conséquent, il semble que l'inhibition de la fonction du protéasome provoquerait l'accumulation d'un complexe ER-protéasomes insoluble qui interagirait solidement avec des éléments immobilisés de la structure nucléaire. En effet, il a récemment déjà été montré que des composantes protéasomales sont naturellement et fortement associées à des éléments du noyau (258;259). Ce comportement des ERs en présence de MG132 serait complètement différent des ERs en présence du ligand. En effet, même si la liaison de E2 à ER α et ER β provoque également une diminution de la mobilité intranucléaire du récepteur (ER α (230) et ER β Figure 12), cette réduction serait plutôt dépendante de la liaison de ER avec la chromatine active permettant l'activation de la transcription (231). Ainsi, nous pouvons envisager que ER β soit régulé de façon ligand-indépendante lors de l'inhibition du protéasome par sa propre liaison au protéasome et donc à la structure immobile du compartiment nucléoplasmique. Ceci expliquerait que malgré l'augmentation des niveaux protéiques et la localisation davantage nucléaire de ER β , aucune augmentation significative de la transcription n'est observée lors de l'inhibition du protéasome. Par contre, nous pourrions penser que l'AF-1 de ER β , qui semble réguler, conjointement avec le protéasome 26S, les niveaux protéiques et l'activité transcriptionnelle du récepteur, une fois délétée du récepteur, provoquerait une libération de ER β de la structure immobile nucléaire vers la matrice nucléaire ou chromatine active. D'ailleurs, il a déjà été montré, pour GR, que lors

de l'inhibition du protéasome, le récepteur s'immobilise dans la cellule et que cette immobilisation se produit au niveau de la matrice nucléaire ou chromatine active (237). Ainsi, comme l'activité transcriptionnelle générée par GR en présence de MG132 est augmentée, ceci suggère que tous les récepteurs nucléaires ne sont pas régulés de la même façon par le protéasome. Bref, bien que l'activité de la transcription causée par ER α se trouve affectée par l'inhibition du protéasome, il est possible que ER β , tout comme GR, soit influencé différemment par le protéasome 26S et par son ligand.

Nous nous sommes alors demandés quels sont les éléments internes de l'AF-1 de ER β et par quel(s) mécanisme(s) cette fonction d'activation permettrait la régulation ligand-indépendante et protéasome-dépendante du récepteur. Nous avons alors été en mesure de constater, tout d'abord, que certains sites consensus de phosphorylation par les MAPK, tels que les résidus 94 et 106, participent à la régulation du récepteur en absence du ligand et de l'activité protéasomale (**Figure 13A,B**). En effet, pour ABCD β et pour ER β , la double mutation de ces sites en alanine provoque une augmentation significative de la transcription en présence de MG132. Par contre, cette augmentation de l'activité transcriptionnelle est abolie lorsque les mutations supplémentaires aux sites serines 69, 124 ou 154 sont présentes. De plus, nous avons aussi pu observer que la séquence candidate PEST, identifiée pour ER β , semble également participer à la régulation du récepteur (**Figure 13C**). Lors de la délétion des 64 premiers acides aminés du récepteur (ER β -485), région contenant la séquence PEST, mais également 2 autres sites consensus de phosphorylation par les MAPK (S25 et S31), l'activité de la transcription s'en trouve fortement augmentée par comparaison avec l'activité transcriptionnelle générée pour un récepteur sauvage en présence de MG132. Plusieurs explications pourraient être possibles pour tenter d'expliquer la contribution de ces domaines dans la régulation ligand-indépendante de ER β . En effet, nous suggérons que la séquence PEST et la phosphorylation des serines 94 et 106 consisteraient en la présence de deux signaux sur l'AF-1 de ER β , lui permettant d'être reconnu par différents éléments de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome et ensuite d'être dégradé. De cette façon, en mutant ses diverses régions du récepteur, nous pourrions nous attendre à une stabilisation du récepteur sur le promoteur de gènes cibles à ER β étant

donné que la mutation de ses signaux génère une activité de la transcription accrue par le récepteur. Le seul indice qui nous laisse penser que lors de la mutation de ces sites, il se produit une stabilisation du récepteur caractérisée par un arrêt de sa dégradation se retrouve à la **Figure 8**, où nous avons mesuré les niveaux protéiques d'une forme de ER β pour laquelle l'AF-1 est tronquée. D'ailleurs, nous avons constaté que les niveaux protéiques de CDEF β demeuraient inchangés indépendamment du fait que les cellules subissent ou non un traitement avec l'inhibiteur du protéasome.

Il semble que PR_B, qui représente la forme longue du récepteur de la progestérone, soit également stabilisé par la mutation de la serine 294 en alanine. Le site fait partie de la séquence D-Box responsable de la dégradation du récepteur (235;236) en présence de son ligand, la progestine. De plus, l'activité transcriptionnelle générée par le mutant PR_B S294A en présence de ligand et de la kinase MEKK1 est abrogée par comparaison avec PR non-muté suggérant que ce site puisse être requis pour la dégradation du récepteur par la voie ubiquitine-protéasome et la transcription. De cette façon, la serine 294 de PR_B et les serines 94 et 106 de ER β pourraient servir de site de liaison pour une enzyme ubiquitine ligase (E3) spécifique ou pour une protéine d'association. Il est également possible que la phosphorylation de la serine 294, qui est également un site consensus de phosphorylation par les MAPK, induise un changement de conformation de PR rendant le récepteur transcriptionnellement actif via une exposition plus efficace de ses fonctions d'activation. Pour ER β , cependant, malgré la stabilisation de la forme CDEF β en présence de MG132 et en absence de ligand, il semble que le processus de régulation protéasome-dépendante ne s'effectue pas de la même façon que pour PR_B puisque son activité transcriptionnelle ne s'en trouve pas diminuée, mais plutôt augmentée. Ainsi, comme il a déjà été proposé pour tenter d'expliquer la régulation protéasome-dépendante en présence de ligand de ER α (227) et de AR (233), il serait possible que la régulation ligand-indépendante de ER β par le protéasome 26S s'effectue par une modulation dans la liaison de certains cofacteurs à son AF-1. En effet, soit en supprimant l'AF-1 de ER β , soit en délétant la séquence PEST, ou en mutant les serines 94 et 106 lors de l'inhibition du protéasome, il serait possible d'envisager que la liaison de certains régulateurs, comme par exemple des corépresseurs ou

des protéines HDAC, ne soit plus possible sur ER β et que ceci engendre un dysfonctionnement dans la régulation ligand-indépendante de ER β . D'ailleurs, les corépresseurs N-CoR et SMRT lient ER β sauvage même en présence de E2 et il semble que ces corépresseurs restreignent l'activité de ER β (260). Dans un tel contexte, il serait alors fort possible que la délétion de l'AF-1 ou de certains éléments de l'AF-1 comme les serines 94 et 106 abolisse la liaison des corépresseurs à ER β . De plus, les serines 69, 124 et 154, quant à elle, pourraient aussi être des sites de liaison pour certains cofacteurs tels que les coactivateurs. De cette façon, lors de la mutation des serines 94 et 106 et lors de l'inhibition du protéasome, nous pourrions expliquer l'augmentation de l'activité transcriptionnelle du récepteur par une augmentation de la liaison et de l'activité des coactivateurs sur le récepteur. D'ailleurs, les coactivateurs sont eux-mêmes stabilisés par l'inhibition fonctionnelle du protéasome, mais semblent conserver leur activité intrinsèque d'activateur de la transcription (227;261). Il semble donc qu'il existe un rôle fonctionnel des sites consensus de l'AF-1 de ER β dans le contrôle activation-répression de la transcription.

Enfin, comme nous venions de déterminer que les sites de phosphorylation par les MAPK contribuent à la régulation protéasome-dépendante en absence de ligand de ER β , nous voulions donc mesurer l'impact direct de la phosphorylation sur cette régulation (**Figure 14**). Après avoir mesuré l'activation transcriptionnelle de ER β et ABCD β muté ou non en présence de MG132, nous avons constaté, tout d'abord, que la phosphorylation du récepteur par l'expression de rasV12 contribue à diminuer l'activation des mutants ER β S94,106A et ABCD β S94,106A suite à l'inhibition du protéasome. En utilisant des inhibiteurs chimiques des voies de phosphorylation par les MAPK, il s'est, par la suite, avéré que la voie de signalisation intracellulaire de phosphorylation responsable de la diminution de l'activité de la transcription d'un récepteur muté aux positions 94 et 106 en présence de MG132 est la voie de la MAPK p38 (**Figure 15**).

De récentes découvertes ont suggéré que l'activation de la voie de signalisation des MAPK p38 peut jouer un rôle dans les processus de différenciation cellulaire. D'ailleurs, il a été montré que la proto-oncoprotéine Brx (breast cancer nuclear hormone receptor auxiliary factor), qui interagit avec ER α et qui fonctionne comme les GEFs (guanine nucleotide exchange factors) impliqués dans la transduction des signaux cellulaires menant à la croissance et à la transformation morphogénique, active ER β par l'activation de la voie de signalisation de la MAPK p38 (262). De cette façon, il semble que la MAPK p38 soit en mesure de réguler les récepteurs des estrogènes, qui à leur tour, sont des éléments clés dans la régulation de la croissance et de la différenciation des tissus reproducteurs.

En démontrant que l'activité protéasome-indépendante du récepteur ABCD β S94,106A est plus importante en réponse à l'activation de la voie de phosphorylation Mkk6-p38 que celle de ABCD β sauvage (**Figure 16A**), nous pouvons suggérer que les serines 94 et 106 participent à la modulation du récepteur en l'empêchant d'être suractivé. Par contre, les serines 69, 124 et 154 semblent être responsables de l'activation maximale du récepteur puisque les mutations ponctuelles de ces serines sur le mutant ABCD β S94,106A provoquent une chute de l'activité transcriptionnelle. Ces résultats proposent donc l'existence d'un phénomène de coopérativité entre les différents domaines de phosphorylation par les MAPK dans la région AF-1 de ER β dans un processus protéasome- et ligand-indépendant, mais également dans un processus protéasome-dépendant. En effet, lors de l'inhibition du protéasome dans la cellule, nous avons constaté (**Figure 13**) que l'activation transcriptionnelle générée par la forme ER β S94,106A ou ABCD β S94,106A chute drastiquement lorsque des mutations additionnelles aux positions 69, 124 et 154 sont générées. La coopération entre les divers sites de phosphorylation de l'AF-1 n'a pas encore été documentée pour ER β , cependant, il serait tout à fait possible que la coopération entre les domaines soit due aux différentes voie de signalisation qui peuvent activer ou moduler le récepteur sur différents sites en absence de ligand. Cette diversité se retrouve pour ER α au niveau des sites consensus de phosphorylation de l'AF-1 de ER α qui ne semblent pas être phosphorylés par les mêmes kinases (**Tableau II**). Avec les nombreux sites potentiels

de phosphorylation dans l'AF-1 de ER β (**Tableau II**) et la réponse transcriptionnelle du récepteur à la signalisation des facteurs de croissance, il est possible d'envisager que selon les différentes voies de signalisation venant phosphoryler l'AF-1 de ER β , une régulation du récepteur survienne empêchant toute activation démesurée à la hausse ou à la baisse de son activité transcriptionnelle.

Par la suite, nous avons remarqué que la voie de phosphorylation par la MAPK p38, tout comme le provoquait l'activation par rasV12 dans la **Figure 14**, diminue l'activité transcriptionnelle de ABCD β S94,106A en présence de MG132 (**Figure 16B**). Ceci suggère que l'action de la MAPK p38 sur la modulation protéasome-dépendante de l'activité transcriptionnelle de ER β en est une de régulation étroite du récepteur aux divers stimuli dans la cellule l'empêchant d'être démesurément actif. Il s'avère alors que la voie de signalisation de p38 est requise à la régulation protéasome-dépendante de ER β en absence de ligand.

En somme, la phosphorylation de ABCD β S94,106A a un effet différent sur l'activité de la transcription du récepteur qu'il soit dans un processus protéasome-dépendant ou – indépendant. Ainsi, dans la régulation protéasome-indépendante de ER β , une augmentation de l'activité de la transcription se produit après la phosphorylation par la MAPK p38 du récepteur muté. Par conséquent, nous pourrions suggérer que la phosphorylation, survenue dans la cellule soit au niveau de ABCD β S94,106A, soit au niveau des protéines coactivatrices, cause le rapprochement entre ces protéines et l'augmentation de la transcription. Par contre, lors de la régulation protéasome-dépendante du récepteur, ABCD β S94,106A provoque une diminution de la transcription suite à l'activation de la voie de la MAPK p38. Nous pourrions alors suggérer que la phosphorylation du récepteur ou de différents corépresseurs ou encore de protéines HDAC lors de l'inhibition du protéasome accentue l'interaction entre ces protéines et le récepteur provoquant une baisse de l'activité transcriptionnelle de ER β . Bref, la régulation

protéasome-dépendante en absence d'estrogènes de l'activité transcriptionnelle de ER β requiert l'activation de la voie de signalisation de la MAPK p38.

La phosphorylation intracellulaire de ER β semble ainsi contrôler la signalisation de ce récepteur. En fait, nos résultats suggèrent que la kinase p38 phosphoryle ER β , ce qui le ciblerait vers les étapes d'ubiquitination le menant, ultimement, vers la dégradation par le protéasome 26S. De cette façon, ER β phosphorylé ne provoquerait pas une activation transcriptionnelle démesurément élevée dans un contexte protéasome-dépendant, ce que nous observons dans le présent travail.

Selon le système de classification des activateurs transcriptionnels proposé par Lipford et al. (226) qui permet de catégoriser la réponse transcriptionnelle en fonction de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome, nous pourrions suggérer que ER β appartienne à la classe C des activateurs. La classe C comprend, en fait, les activateurs qui, par leur dégradation, stimulent la transcription en favorisant l'exécution d'étapes cruciales dans le cycle de la transcription. Il a déjà été montré que le complexe de pré-initiation de la transcription s'assemble grâce à plusieurs interactions entre les protéines qui le composent (263). Il pourrait alors être nécessaire que la dissociation de ce complexe survienne pour permettre à l'ARN Pol II d'être libérée du promoteur et de transcrire le gène en aval. Ceci pourrait se produire par différents mécanismes incluant la dégradation de l'activateur. Parmi les autres possibilités permettant le couplage de l'initiation de la transcription avec l'activation de la dégradation, les éléments du complexe de pré-initiation pourraient être libérés du promoteur par leur dégradation, puis réassemblés au promoteur après l'initiation de chaque produit de transcription. Par contre, étant donné qu'il semble que le protéasome 26S ne soit pas requis pour la transcription de tous les gènes, il serait possible que l'architecture et les propriétés du promoteur aient aussi un rôle à jouer dans l'activation de la transcription (263). Selon ce raisonnement, l'initiation d'un cycle de la transcription nécessiterait obligatoirement un nouvel activateur pour chaque produit de transcription. Ce mécanisme rappelle le contrôle de l'initiation de la réplication de l'ADN qui s'effectue par la formation d'un nouveau complexe de pré-initiation de la réplication à l'origine de

réplication après chaque initiation d'un complexe et aussi le processus d'activation de la transcription de GR, qui lie la chromatine après l'activation par son ligand, recrute des facteurs de remodelage de la chromatine facilitant la liaison des facteurs de transcription et est simultanément libéré de l'ADN après l'initiation de la transcription (264). Également, il a été montré que ER α possède des fonctions bien distinctes autant dans l'initiation que dans la réinitiation du complexe de pré-initiation de la transcription (265). Bien que ce mécanisme de régulation de la transcription par la dégradation n'ait pas été réellement décrit, des évidences suggèrent qu'il existe. En effet, il a récemment été montré que l'inhibition de l'activité fonctionnelle du protéasome bloque les cycles répétitifs d'initiation de la transcription de ER α sur les gènes cibles (231). Ainsi, nous pouvons mieux comprendre le mécanisme qui entraîne la diminution de l'activité de la transcription de ER α lié par son ligand en présence de MG132 (227). Comme nous obtenons les mêmes résultats de diminution de la transcription en présence de E2 et de MG132 (**Figure 2**), nous pourrions supposer que ER β est sujet à la même régulation et suggérer que l'initiation répétitive des cycles d'initiation transcriptionnelle est également bloquée dans ce cas. De la même façon, nous pourrions penser que la régulation transcriptionnelle ligand-indépendante de ER β puisse aussi se produire de la sorte, puisque lors de l'inhibition de l'activité du protéasome, l'activité de la transcription de ER β se trouve à un niveau basal sinon diminué. Considérant les résultats obtenus avec ceux de la littérature, nous suggérons que le protéasome 26S ou certaines de ses composantes soient liés à l'AF-1 du récepteur ER β en réponse à la phosphorylation et qu'il relocalise le récepteur du compartiment nucléoplasmique vers la chromatine active. Ces éléments du protéasome pourraient aussi favoriser l'initiation des cycles de transcription du récepteur en dégradant certaines protéines du complexe de pré-initiation, comme l'activateur, et donc en permettant la libération et la dissociation puis, ensuite le réassemblage du complexe de pré-initiation. Par contre, il est plus difficile d'expliquer, selon ce mécanisme, que la mutation de certaines régions ou la délétion de l'AF-1 de ER β puisse provoquer une augmentation protéasome-dépendante de l'activité transcriptionnelle en absence de ligand selon le fait que, théoriquement, le protéasome 26S ne lierait plus ER β et qu'il ne provoquerait plus l'initiation répétitive de la transcription par ER β .

Pour tenter d'expliquer ce résultat, nous pourrions, à nouveau, nous référer au système de classification des activateurs transcriptionnels de Lipford et al. (226) qui pourrait nous permettre d'expliquer le mécanisme d'activation de la transcription de ER β lorsque celui-ci comporte des mutations au niveau de l'AF-1. En effet, nous pourrions supposer que ER β puisse faire partie des activateurs de classe B qui eux, sont dégradés seulement après avoir liés l'ADN. L'ubiquitination et la dégradation de ces activateurs se produisent suite à l'étape de formation ou d'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription et semblent plutôt servir à limiter le temps de résidence des facteurs de transcription sur le promoteur. Bref, si un activateur de cette classe permet les interactions nécessaires à la formation d'un complexe de pré-initiation, il pourra alors déclencher de multiples cycles d'initiation de la transcription sans être libéré du promoteur avant d'être finalement dégradé. De cette façon, nous pourrions penser que ER β , lors de l'inhibition du protéasome puisse provoquer une activation démesurée et continue de l'activité transcription. Or, il n'en est pas le cas selon les résultats obtenus pour ER β non-muté dans ce travail. Ainsi, si ER β appartient à cette classe, nous pourrions suggérer que le mécanisme de régulation transcriptionnelle ligand-indépendante s'effectue comme suit. ER β , lié par des éléments du protéasome 26S au niveau de son AF-1, possiblement au niveau des serines 94 et 106, demeurerait sur le promoteur des gènes cibles pour initier de multiples cycles de transcription avant d'être dégradé. Ainsi, il se pourrait que différents signaux présents sur l'AF-1 de ER β dont la phosphorylation par la MAPK p38 et la séquence PEST candidate permettent l'ubiquitination du récepteur, puis que le protéasome 26S cible, ensuite, le récepteur vers la dégradation. Par contre, lors de l'inhibition du protéasome, comme nous n'observons pas d'activation de la transcription par ER β , nous pourrions penser que le complexe ER β -protéasome ne soit plus lié à la matrice nucléaire ou chromatine active au niveau du promoteur, mais plutôt à la structure nucléaire dans le compartiment nucléoplasmique. De cette façon, nous pourrions mieux comprendre l'absence d'une augmentation de la transcription par ER β . De plus, selon cette classification de ER β , nous serions également en mesure d'expliquer l'augmentation de

l'activité transcriptionnelle en absence de ligand causée par ABCD β S94,106A, ER β S94,106A et CDEF β lors de l'inhibition du protéasome. En effet, selon ce qui a été dit plus haut, la mutation des serines 94 et 106 ou la délétion de l'AF-1 pourrait empêcher la liaison directe des éléments du protéasome sur le récepteur et ainsi laisser le récepteur sur le promoteur des gènes cibles même en présence de MG132 pour résulter en une activation de leur transcription. En somme, la liaison des éléments du protéasome 26S sur l'AF-1 de ER β semble cruciale à la régulation ligand-indépendante de ER β . Cet argument est, de plus, appuyé par les résultats obtenus suite à l'analyse des niveaux protéiques de CDEF β qui restent inchangés par la délétion de l'AF-1.

Bien que le rôle fonctionnel des sites MAPK composés des serines 94 et 106, de ceux contenus dans la séquence PEST située en N-terminal de ER β ainsi que de la réponse à l'activation de la voie p38 reste encore peu caractérisé sur les fonctions de ER β , nos résultats suggèrent que ces signaux ont un impact important sur la régulation de ER β par la voie de dégradation ubiquitine-protéasome en absence de ligand. Nos résultats démontrent également un rôle fonctionnel pour le domaine AF-1 dans le processus du cycle transcription/dégradation du récepteur en réponse à la transduction d'un signal par les protéines kinases. Nous proposons donc un modèle de la régulation de l'activité transcriptionnelle de ER β par la voie ubiquitine-protéasome 26S (**Figure17**).

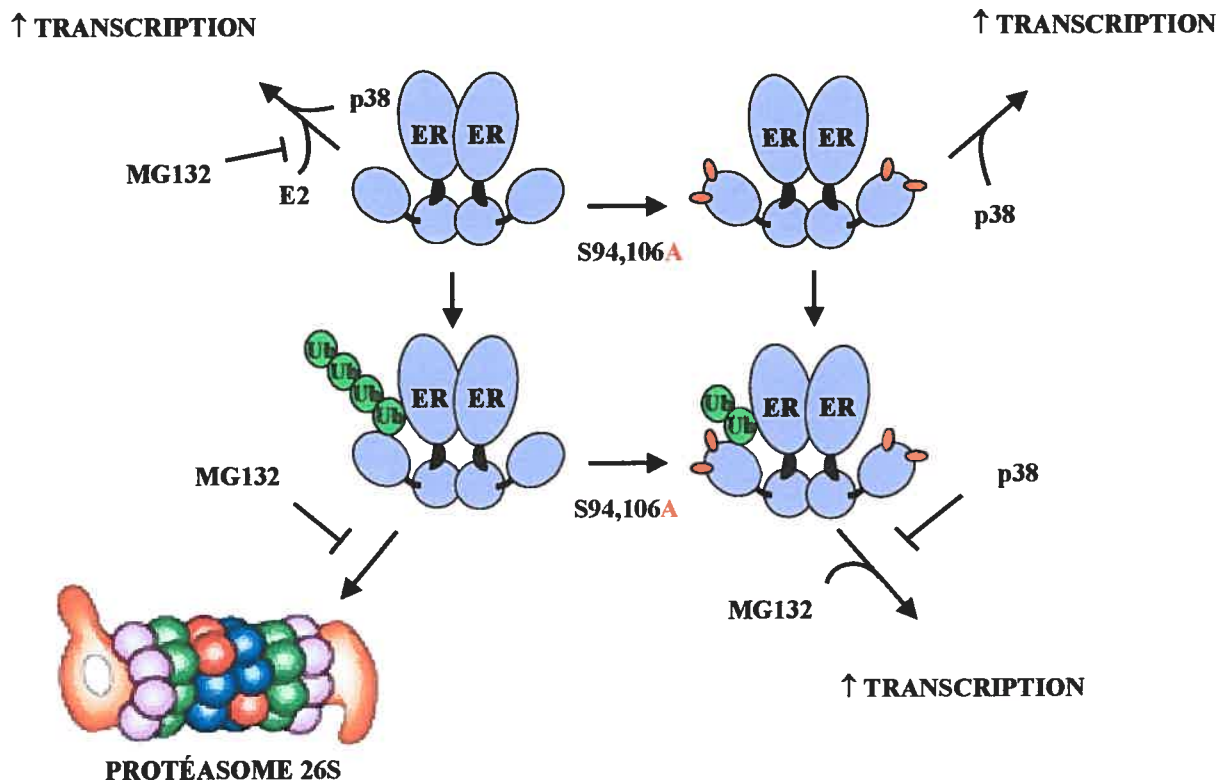


Figure 17. Modèle proposé de la régulation transcriptionnelle de ERβ.

L'activité transcriptionnelle de ERβ est régulée de façon ligand-dépendante (E2) et ligand-indépendante par le protéasome 26S et par la voie de signalisation de la MAPK p38. L'ubiquitination du récepteur est identifiée par Ub.

Bien entendu, des expériences additionnelles seraient nécessaires pour parvenir à mieux comprendre les mécanismes de cette régulation. Des expériences d'analyse des niveaux protéiques, de l'état d'ubiquitination et de la mobilité intranucléaire des diverses formes mutées de ERβ et de ABCDβ doivent impérativement être effectuées pour compléter ce travail. De plus, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) permettraient de mieux saisir l'ordre des événements qui se produisent lors de l'initiation de la transcription au promoteur en présence de MG132. Afin de comprendre l'impact de l'activation des voies MAPK sur le récepteur, la réalisation d'essais kinases et d'essais de

phosphorylation *in vivo* sur ER β constitueraient une étape majeure dans la compréhension de la régulation du récepteur. Il pourrait aussi être intéressant d'étudier le rôle de la corégulation transcriptionnelle sur la modulation de l'AF-1 de ER β dans un contexte protéasome-dépendant. Nous savons d'ailleurs que l'activité des récepteurs nucléaires, incluant ER β , est modulée par l'équilibre entre coactivateurs (SRC-1, CBP) et corépresseurs (NCoR, SMRT) responsables des interactions nécessaires avec la chromatine. Finalement, afin de mieux comprendre l'impact du protéasome sur la régulation ligand-indépendante de la transcription provoquée par ER β et dans le but de mieux comprendre cette régulation dans un contexte physiologique, il serait approprié d'étudier les niveaux d'expression des gènes cibles de ER β en mesurant leur niveaux d'ARNm en réponse au MG132.

En conclusion, la voie ubiquitine-protéasome 26S cible les récepteurs des estrogènes α et β pour leur dégradation. Elle intervient également dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de ces deux récepteurs qu'ils soient ou non en présence de leur ligand. L'impact du protéasome 26S sur l'activité de la transcription ligand-dépendante de ER α et ER β est sensiblement le même. Cependant, la régulation ligand-indépendante de ER α et ER β sur leur fonction d'activateur de la transcription est très différente. En effet, l'AF-1 de ER β semble jouer un rôle très important dans la régulation protéasome-dépendante de la transcription en absence des estrogènes contrairement à ER α où, dans un contexte ligand-indépendant, la régulation transcriptionnelle protéasome-dépendante ne semble pas dépendre de l'AF-1. La convergence entre les processus de transcription ligand-indépendante et de dégradation de ER β par le protéasome 26S semble faire intervenir la présence de certains éléments de l'AF-1 de ER β et l'action des voies de signalisation des kinases dans la cellule. En effet, l'activité transcriptionnelle de ER β en absence de ligand semble être régulée par le protéasome 26S par l'entremise et l'intégrité des serines de l'AF-1 faisant partie de sites consensus de phosphorylation par les MAPK et d'une séquence de 64 acides aminés en N-terminal du récepteur, qui contient une séquence PEST candidate. Selon nos résultats, la modulation de la signalisation cellulaire par la voie de

phosphorylation de la MAPK p38 semble également intervenir dans la régulation protéasome-dépendante de la transcription de ER β en absence de ligand, directement sur ER β , en affectant, par exemple, sa dégradation, sa localisation ou sa mobilité, ou soit par l'entremise de la phosphorylation de certains cofacteurs dans la cellule. Plusieurs éléments de la voie ubiquitine-protéasome 26S pourraient participer à la régulation de la transcription de ER α et de ER β . Un des éléments qui semble jouer un rôle dans la signalisation cellulaire en général, et qui pourrait provoquer la régulation de la transcription des récepteurs des estrogènes est l'ensemble des enzymes ubiquitine ligases (E3). En effet, ces enzymes E3 sont responsables d'une grande variété de cancers sous-entendant une régulation très étroite de leur part sur le cycle cellulaire et sur la biologie du développement. Par conséquent, il n'est pas surprenant de constater, suite à ce travail, que l'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes, acteurs très importants dans la régulation du cycle cellulaire et dans le développement, mais aussi dans certaines pathologies comme la tumorigénèse des tissus gynécologiques, est régulée par la voie ubiquitine-protéasome 26S dans un contexte ligand-dépendant et -indépendant.

5. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 2001; 81(3):1269-1304.
- (2) Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 2001; 276(40):36869-36872.
- (3) Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1(1):35.
- (4) Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 2002; 346(5):340-352.
- (5) Adeoya-Osiguwa SA, Markoulaki S, Pocock V, Milligan SR, Fraser LR. 17beta-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. *Hum Reprod* 2003; 18(1):100-107.
- (6) Samuel CS, Butkus A, Coghlan JP, Bateman JF. The effect of relaxin on collagen metabolism in the nonpregnant rat pubic symphysis: the influence of estrogen and progesterone in regulating relaxin activity. *Endocrinology* 1996; 137(9):3884-3890.
- (7) Porter JC. Proceedings: Hormonal regulation of breast development and activity. *J Invest Dermatol* 1974; 63(1):85-92.
- (8) Naftolin F, Garcia-Segura LM, Keefe D, Leranath C, MacLusky NJ, Brawer JR. Estrogen effects on the synaptology and neural membranes of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Biol Reprod* 1990; 42(1):21-28.
- (9) Garcia-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, Azcoitia I, Chowen JA. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol* 1999; 40(4):574-584.
- (10) Woolley CS, Weiland NG, McEwen BS, Schwartzkroin PA. Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *J Neurosci* 1997; 17(5):1848-1859.
- (11) Xu H, Gouras GK, Greenfield JP, Vincent B, Naslund J, Mazarrelli L et al. Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Nat Med* 1998; 4(4):447-451.
- (12) Henderson VW. The epidemiology of estrogen replacement therapy and Alzheimer's disease. *Neurology* 1997; 48(5 Suppl 7):S27-S35.

- (13) Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK, Jo I. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263(1):257-262.
- (14) Clarkson TB, Anthony MS, Klein KP. Hormone replacement therapy and coronary artery atherosclerosis: the monkey model. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103 Suppl 13:53-57.
- (15) Paganini-Hill A, Dworsky R, Krauss RM. Hormone replacement therapy, hormone levels, and lipoprotein cholesterol concentrations in elderly women. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174(3):897-902.
- (16) Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988; 241(4861):84-86.
- (17) Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC. Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(15):6613-6617.
- (18) Jilka RL. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone* 1998; 23(2):75-81.
- (19) Ralston SH. Analysis of gene expression in human bone biopsies by polymerase chain reaction: evidence for enhanced cytokine expression in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994; 9(6):883-890.
- (20) Giguère V, Tremblay A, Tremblay GB. Estrogen receptor β : re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids* 1998; 63(5-6):335-339.
- (21) Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 2000; 65(5):227-251.
- (22) Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 1998; 19(4):253-286.
- (23) Rosenfeld MG, Glass CK. Coregulator Codes of Transcriptional Regulation by Nuclear Receptors. *J Biol Chem* 2001; 276(40):36865-36868.
- (24) Laudet V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *Journal of Molecular Endocrinology* 1997; 19:207-226.
- (25) Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83:835-839.

- (26) Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G et al. Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1997; 82:4258-4265.
- (27) Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornet JM, Argos P et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erbA. *Nature (London)* 1986; 320:134-139.
- (28) Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986; 231:1150-1154.
- (29) Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-Å. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93:5925-5930.
- (30) Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *Federation of European Biological Societies Letters* 1996; 392:49-53.
- (31) Giguère V, Hollenberg SH, Rosenfeld MG, Evans RM. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 1986; 46:645-652.
- (32) Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 1987; 51:941-951.
- (33) Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, Gronemeyer H, Chambon P. Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J* 1992; 11(10):3681-3694.
- (34) Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T et al. The complete primary structure of human estrogen receptor β (Her- β) and its heterodimerization with ER α in vivo and in vitro. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1998; 243(1):122-126.
- (35) Bai W, Rowan BG, Allgood VE, O'Malley BW, Weigel NL. Differential phosphorylation of chicken progesterone receptor in hormone-dependent and ligand-independent activation. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(16):10457-10463.
- (36) Warnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson JA. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 2003; 17(10):1901-1909.

- (37) Metzger D, Ali S, Bornert JM, Chambon P. Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270(16):9535-9542.
- (38) Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E et al. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 1989; 59:477-487.
- (39) Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER- α) and estrogen receptor- β (ER- β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER- α -knockout mouse. *Endocrinology* 1997; 138(11):4613-4621.
- (40) Gustafsson JA. Estrogen receptor b. *J Endocrinol* 1999; 163(3):379-383.
- (41) Htun H, Holth LT, Walker D, Davie JR, Hager GL. Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol Biol Cell* 1999; 10(2):471-486.
- (42) Welshons WV, Lieberman ME, Gorski J. Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature* 1984; 307(5953):747-749.
- (43) Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F et al. Cloning, chromosomal localization and functional analysis of the murine estrogen receptor β . *Molecular Endocrinology* 1997; 11:353-365.
- (44) Weigel NL. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochemical Journal* 1996; 319:657-667.
- (45) McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews* 1999; 20(3):321-344.
- (46) Brzozowski AM, Pike ACW, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström L et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature (London)* 1997; 389:753-758.
- (47) Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Molecular Endocrinology* 1997; 11(6):657-666.
- (48) Heery DM, Hoare S, Hussain S, Parker MG, Sheppard HM. Core LXXLL motif sequences in CBP, SRC1 and RIP140 define affinity and selectivity for steroid and retinoid receptors. *J Biol Chem* 2000.

- (49) Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan X-Y et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 1997; 277:965-968.
- (50) Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK et al. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature (London)* 1997; 387:677-684.
- (51) Smith CL, Oñate SA, Tsai M-J, O'Malley BW. CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93:8884-8888.
- (52) Graham JD, Bain DL, Richer JK, Jackson TA, Tung L, Horwitz KB. Nuclear receptor conformation, coregulators, and tamoxifen-resistant breast cancer. *Steroids* 2000; 65(10-11):579-584.
- (53) Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 2000; 14(2):121-141.
- (54) Cosma MP. Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell* 2002; 10(2):227-236.
- (55) Krebs JE, Kuo MH, Allis CD, Peterson CL. Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene. *Genes Dev* 1999; 13(11):1412-1421.
- (56) Sil A, Herskowitz I. Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* 1996; 84(5):711-722.
- (57) Sterner DE, Grant PA, Roberts SM, Duggan LJ, Belotserkovskaya R, Pacella LA et al. Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. *Mol Cell Biol* 1999; 19(1):86-98.
- (58) Chen H, Lin RJ, Xie W, Wilpitz D, Evans RM. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* 1999; 98(5):675-686.
- (59) Reinberg D, Orphanides G, Ebright R, Akoulitchev S, Carcamo J, Cho H et al. The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1998; 63:83-103.
- (60) Roeder RG. Nuclear RNA polymerases: role of general initiation factors and cofactors in eukaryotic transcription. *Methods Enzymol* 1996; 273:165-171.

- (61) Rochette-Egly C, Adam S, Rossignol M, Egly J-M, Chambon P. Stimulation of RAR α activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* 1997; 90:97-107.
- (62) Ito M, Yuan CX, Malik S, Gu W, Fondell JD, Yamamura S et al. Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Molecular Cell* 1999; 3(3):361-370.
- (63) Rachez C, Lemon BD, Suldan Z, Bromleigh V, Gamble M, Naar AM et al. Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature (London)* 1999; 398(6730):824-828.
- (64) Ali S, Metzger D, Bornert J-M, Chambon P. Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *European Molecular Biology Organization Journal* 1993; 12:1153-1160.
- (65) Chen D, Riedl T, Washbrook E, Pace PE, Coombes RC, Egly JM et al. Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIID and participation of CDK7. *Mol Cell* 2000; 6(1):127-137.
- (66) Lee H, Bai W. Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2002; 22(16):5835-5845.
- (67) Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzl T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R et al. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(6):2920-2925.
- (68) Zhang X, Jeyakumar M, Petukhov S, Baghi MK. A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor. *Molecular Endocrinology* 1998; 12:513-524.
- (69) Robyr D, Wolffe AP, Wahli W. Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol* 2000; 14(3):329-347.
- (70) Baniahmad A, Ha I, Reinberg D, Tsai S, Tsai MJ, O'Malley BW. Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(19):8832-8836.

- (71) Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature (London)* 1995; 377(6548):397-404.
- (72) National Cancer Institute of Canada. *Canadian Cancer Statistics 2003*. Toronto, Canada 2003.
- (73) Jordan VC, Morrow M. Tamoxifen, raloxifene, and the prevention of breast cancer. *Endocrine Reviews* 1999; 20(3):253-278.
- (74) McInerney EM, Katzenellenbogen BS. Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271:24172-24178.
- (75) Smith CL, Conneely OM, O'Malley BW. Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90:6120-6124.
- (76) Smith CL. Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol Reprod* 1998; 58(3):627-632.
- (77) Arnold SF, Vorojeikkina DP, Notides AC. Phosphorylation of tyrosine 537 on the human estrogen receptor is required for binding to an estrogen response element. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270:30205-30212.
- (78) Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC. Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine-537 *in vivo* by *Src* family tyrosine kinases *in vitro*. *Molecular Endocrinology* 1995; 9:24-33.
- (79) Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Molecular & Cellular Biology* 1999; 19(2):1002-1015.
- (80) Coleman KM, Smith CL. Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. *Front Biosci* 2001; 6:D1379-D1391.
- (81) Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995; 270(5241):1491-1494.
- (82) Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor β through phosphorylation of activation function AF-1. *Molecular Cell* 1999; 3:513-519.

- (83) Joel PB, Smith J, Sturgill TW, Fisher TL, Blenis J, Lannigan DA. pp90^{rsk1} regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Molecular & Cellular Biology* 1998; 18(4):1978-1984.
- (84) Font de Mora J, Brown M. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 2000; 20(14):5041-5047.
- (85) Lopez GN, Turck CW, Schaufele F, Stallcup MR, Kushner PJ. Growth factors signal to steroid receptors through mitogen-activated protein kinase regulation of p160 coactivator activity. *J Biol Chem* 2001; 276(25):22177-22182.
- (86) Denner LA, Weigel NL, Maxwell BL, Schrader WT, O'Malley BW. Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science* 1990; 250:1740-1743.
- (87) Power RF, Mani SK, Codina J, Conneely OM, O'Malley BW. Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science* 1991; 254:1636-1639.
- (88) El-Tanani MKK, Green CD. Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. *Molecular Endocrinology* 1997; 11:928-937.
- (89) Rowan BG, Garrison N, Weigel NL, O'Malley BW. 8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol Cell Biol* 2000; 20(23):8720-8730.
- (90) Coleman KM, Dutertre M, El Gharbawy A, Rowan BG, Weigel NL, Smith CL. Mechanistic differences in the activation of estrogen receptor-alpha (ER alpha)- and ER beta-dependent gene expression by cAMP signaling pathway(s). *J Biol Chem* 2003; 278(15):12834-12845.
- (91) Johnston SR. Acquired tamoxifen resistance in human breast cancer--potential mechanisms and clinical implications. *Anticancer Drugs* 1997; 8(10):911-930.
- (92) Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 2001; 276(13):9817-9824.
- (93) Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D et al. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 1998; 17(3):313-325.

- (94) Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999; 13(22):2905-2927.
- (95) Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem* 1999; 274(32):22296-22302.
- (96) Yam CH, Fung TK, Poon RY. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(8):1317-1326.
- (97) Webb P, Nguyen P, Shinsako J, Anderson C, Feng W, Nguyen MP et al. Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Molecular Endocrinology* 1998; 12:1605-1618.
- (98) Demay F, De Monti M, Tiffocche C, Vaillant C, Thieulant ML. Steroid-independent activation of ER by GnRH in gonadotrope pituitary cells. *Endocrinology* 2001; 142(8):3340-3347.
- (99) Joel PB, Traish AM, Lannigan DA. Estradiol and phorbol ester cause phosphorylation of serine 118 in the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1995; 9(8):1041-1052.
- (100) Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS. Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269(6):4458-4466.
- (101) Joel PB, Traish AM, Lannigan DA. Estradiol-induced phosphorylation of serine 118 in the estrogen receptor is independent of p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:13317-13323.
- (102) Neuman E, Ladha MH, Lin N, Upton TM, Miller SJ, DiRenzo J et al. Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Molecular & Cellular Biology* 1997; 17:5338-5347.
- (103) Zwijssen RM, Wientjens E, Klompmaker R, van der Sman J, Bernards R, Michalides RJAM. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 1997; 88:405-415.
- (104) Zwijssen RML, Buckle RS, Hijmans EM, Loomans CJM, Bernards R. Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1. *Genes & Development* 1998; 12(22):3488-3498.
- (105) McMahon C, Suthiphongchai T, DiRenzo J, Ewen ME. P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America 1999; 96(10):5382-5387.

- (106) Paech K, Webb P, Kuiper GGJM, Nilsson S, Gustafsson J-Å, Kushner PJ et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science* 1997; 277:1508-1510.
- (107) Kushner PJ, Agard D, Feng WJ, Lopez G, Schiau A, Uht R et al. Oestrogen receptor function at classical and alternative response elements. *Novartis Found Symp* 2000; 230:20-26.
- (108) Safe S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm* 2001; 62:231-252.
- (109) Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M et al. Activation of the Src/p21^{ras}/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *European Molecular Biology Organization Journal* 1998; 17(7):2008-2018.
- (110) Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E et al. Tyrosine kinase/p21^{ras}/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *European Molecular Biology Organization Journal* 1996; 15:1292-1300.
- (111) Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M et al. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J* 2000; 19(20):5406-5417.
- (112) Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 2000; 407(6803):538-541.
- (113) Simoncini T, Fornari L, Mannella P, Varone G, Caruso A, Liao JK et al. Novel non-transcriptional mechanisms for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor alpha with phosphatidylinositol 3-OH kinase. *Steroids* 2002; 67(12):935-939.
- (114) Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000; 19(21):2628-2637.
- (115) Bjornstrom L, Sjoberg M. Signal transducers and activators of transcription as downstream targets of nongenomic estrogen receptor actions. *Mol Endocrinol* 2002; 16(10):2202-2214.
- (116) Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:425-479.

- (117) Pariat M, Carillo S, Molinari M, Salvat C, Debussche L, Bracco L et al. Proteolysis by calpains: a possible contribution to degradation of p53. *Mol Cell Biol* 1997; 17(5):2806-2815.
- (118) Cuervo AM, Dice JF, Knecht E. A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. *J Biol Chem* 1997; 272(9):5606-5615.
- (119) Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 2001; 8(8):739-758.
- (120) Matthews W, Driscoll J, Tanaka K, Ichihara A, Goldberg AL. Involvement of the proteasome in various degradative processes in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(8):2597-2601.
- (121) Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994; 79(1):13-21.
- (122) Craiu A, Gaczynska M, Akopian T, Gramm CF, Fenteany G, Goldberg AL et al. Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J Biol Chem* 1997; 272(20):13437-13445.
- (123) Harris KF, Shoji I, Cooper EM, Kumar S, Oda H, Howley PM. Ubiquitin-mediated degradation of active Src tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(24):13738-13743.
- (124) Koepp DM, Harper JW, Elledge SJ. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle
22. *Cell* 1999; 97(4):431-434.
- (125) Lu Z, Liu D, Hornia A, Devonish W, Pagano M, Foster DA. Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 1998; 18(2):839-845.
- (126) Chiarle R, Budel LM, Skolnik J, Frizzera G, Chilosi M, Corato A et al. Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* 2000; 95(2):619-626.
- (127) Chiarle R, Pagano M, Inghirami G. The cyclin dependent kinase inhibitor p27 and its prognostic role in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001; 3(2):91-94.

- (128) Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC et al. p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 1999; 154(2):313-323.
- (129) Cusack JC, Jr., Liu R, Houston M, Abendroth K, Elliott PJ, Adams J et al. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Res* 2001; 61(9):3535-3540.
- (130) Patel NM, Nozaki S, Shortle NH, Bhat-Nakshatri P, Newton TR, Rice S et al. Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-kappaB is enhanced by IkappaBalpha super-repressor and parthenolide. *Oncogene* 2000; 19(36):4159-4169.
- (131) Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001; 61(7):3071-3076.
- (132) Shah SA, Potter MW, McDade TP, Ricciardi R, Perugini RA, Elliott PJ et al. 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *J Cell Biochem* 2001; 82(1):110-122.
- (133) Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev* 2003; 29 Suppl 1:3-9.
- (134) Chen C, Edelstein LC, Gelinas C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol* 2000; 20(8):2687-2695.
- (135) Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999; 19(9):5923-5929.
- (136) Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Sin N, Crews CM. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(18):10403-10408.
- (137) Palombella VJ, Conner EM, Fuseler JW, Destree A, Davis JM, Laroux FS et al. Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(26):15671-15676.
- (138) Chain DG, Schwartz JH, Hegde AN. Ubiquitin-mediated proteolysis in learning and memory. *Mol Neurobiol* 1999; 20(2-3):125-142.

- (139) Turner GC, Du F, Varshavsky A. Peptides accelerate their uptake by activating a ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *Nature* 2000; 405(6786):579-583.
- (140) Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:739-779.
- (141) Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med* 1996; 335(25):1897-1905.
- (142) Lecker SH, Solomon V, Price SR, Kwon YT, Mitch WE, Goldberg AL. Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats. *J Clin Invest* 1999; 104(10):1411-1420.
- (143) Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 2000; 404(6779):770-774.
- (144) Tarcsa E, Szymanska G, Lecker S, O'Connor CM, Goldberg AL. Ca²⁺-free calmodulin and calmodulin damaged by in vitro aging are selectively degraded by 26 S proteasomes without ubiquitination. *J Biol Chem* 2000; 275(27):20295-20301.
- (145) Naidoo N, Song W, Hunter-Ensor M, Sehgal A. A role for the proteasome in the light response of the timeless clock protein. *Science* 1999; 285(5434):1737-1741.
- (146) Hellmann H, Estelle M. Plant development: regulation by protein degradation. *Science* 2002; 297(5582):793-797.
- (147) Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng XW. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* 2000; 405(6785):462-466.
- (148) Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 1998; 92(3):367-380.
- (149) Adams J. Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy. *Trends Mol Med* 2002; 8(4 Suppl):S49-S54.
- (150) Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD et al. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 1997; 386(6624):463-471.
- (151) Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications

for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* 1999; 274(6):3363-3371.

- (152) Kisselev AF, Garcia-Calvo M, Overkleeft HS, Peterson E, Pennington MW, Ploegh HL et al. The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J Biol Chem* 2003; 278(38):35869-35877.
- (153) Adams J. Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Drug Discov Today* 2003; 8(7):307-315.
- (154) Lenz HJ. Clinical update: proteasome inhibitors in solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2003; 29 Suppl 1:41-48.
- (155) Omura S, Matsuzaki K, Fujimoto T, Kosuge K, Furuya T, Fujita S et al. Structure of lactacystin, a new microbial metabolite which induces differentiation of neuroblastoma cells. *J Antibiot (Tokyo)* 1991; 44(1):117-118.
- (156) Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 1995; 268(5211):726-731.
- (157) Dick LR, Cruikshank AA, Grenier L, Melandri FD, Nunes SL, Stein RL. Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J Biol Chem* 1996; 271(13):7273-7276.
- (158) Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1998; 18(1):30-38.
- (159) Drexler HC. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(3):855-860.
- (160) Drexler HC, Risau W, Konerding MA. Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. *FASEB J* 2000; 14(1):65-77.
- (161) Oikawa T, Sasaki T, Nakamura M, Shimamura M, Tanahashi N, Omura S et al. The proteasome is involved in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246(1):243-248.
- (162) Jesenberger V, Jentsch S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(2):112-121.
- (163) Vogt VM. Ubiquitin in retrovirus assembly: actor or bystander? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(24):12945-12947.

- (164) Pickart CM. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell* 2001; 8(3):499-504.
- (165) Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001; 70:503-533.
- (166) Hicke L. Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* 1999; 9(3):107-112.
- (167) Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 1998; 17(24):7151-7160.
- (168) Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP, Smith CL, O'Malley BW. Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96(5):1858-1862.
- (169) Nalepa G, Wade HJ. Therapeutic anti-cancer targets upstream of the proteasome. *Cancer Treat Rev* 2003; 29 Suppl 1:49-57.
- (170) Pray TR, Parlati F, Huang J, Wong BR, Payan DG, Bennett MK et al. Cell cycle regulatory E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. *Drug Resist Updat* 2002; 5(6):249-258.
- (171) Koepp DM, Schaefer LK, Ye X, Keyomarsi K, Chu C, Harper JW et al. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFF^{bw7} ubiquitin ligase. *Science* 2001; 294(5540):173-177.
- (172) Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Won KA, Sangfelt O, Reed SI. Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature* 2001; 413(6853):316-322.
- (173) Moberg KH, Bell DW, Wahrer DC, Haber DA, Hariharan IK. Archipelago regulates Cyclin E levels in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Nature* 2001; 413(6853):311-316.
- (174) Kumar S, Talis AL, Howley PM. Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination. *J Biol Chem* 1999; 274(26):18785-18792.
- (175) Huang L, Kinnucan E, Wang G, Beaudenon S, Howley PM, Huibregtse JM et al. Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science* 1999; 286(5443):1321-1326.
- (176) Kumar S, Kao WH, Howley PM. Physical interaction between specific E2 and Hect E3 enzymes determines functional cooperativity. *J Biol Chem* 1997; 272(21):13548-13554.

- (177) Nuber U, Schwarz S, Kaiser P, Schneider R, Scheffner M. Cloning of human ubiquitin-conjugating enzymes UbcH6 and UbcH7 (E2-F1) and characterization of their interaction with E6-AP and RSP5. *J Biol Chem* 1996; 271(5):2795-2800.
- (178) Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; 387(6630):296-299.
- (179) Boyd SD, Tsai KY, Jacks T. An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nat Cell Biol* 2000; 2(9):563-568.
- (180) Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(15):3453-3459.
- (181) Salghetti SE, Muratani M, Wijnen H, Futcher B, Tansey WP. Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(7):3118-3123.
- (182) Salghetti SE, Caudy AA, Chenoweth JG, Tansey WP. Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* 2001; 293(5535):1651-1653.
- (183) Yamano H, Tsurumi C, Gannon J, Hunt T. The role of the destruction box and its neighbouring lysine residues in cyclin B for anaphase ubiquitin-dependent proteolysis in fission yeast: defining the D-box receptor. *EMBO J* 1998; 17(19):5670-5678.
- (184) Lahav-Baratz S, Sudakin V, Ruderman JV, Hershko A. Reversible phosphorylation controls the activity of cyclosome-associated cyclin-ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(20):9303-9307.
- (185) Rajapurohitam V, Morales CR, El Alfy M, Lefrancois S, Bedard N, Wing SS. Activation of a UBC4-dependent pathway of ubiquitin conjugation during postnatal development of the rat testis. *Dev Biol* 1999; 212(1):217-228.
- (186) Feldman RM, Correll CC, Kaplan KB, Deshaies RJ. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* 1997; 91(2):221-230.
- (187) Skowyra D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Harper JW. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 1997; 91(2):209-219.
- (188) Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning AM et al. Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature* 1998; 396(6711):590-594.

- (189) Lu Z, Xu S, Joazeiro C, Cobb MH, Hunter T. The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Mol Cell* 2002; 9(5):945-956.
- (190) Bignell GR, Warren W, Seal S, Takahashi M, Rapley E, Barfoot R et al. Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet* 2000; 25(2):160-165.
- (191) Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Levenson JD, Hunter T, Liu YC. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 1999; 286(5438):309-312.
- (192) Hata A, Shi Y, Massague J. TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today* 1998; 4(6):257-262.
- (193) Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 1999; 400(6745):687-693.
- (194) Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(3):974-979.
- (195) Xu J, Attisano L. Mutations in the tumor suppressors Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor beta signaling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(9):4820-4825.
- (196) Hashizume R, Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, Yabuki Y et al. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem* 2001; 276(18):14537-14540.
- (197) Baer R, Ludwig T. The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12(1):86-91.
- (198) Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1999; 1(4):193-199.
- (199) Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J et al. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(9):5043-5048.

- (200) Signoretti S, Di Marcotullio L, Richardson A, Ramaswamy S, Isaac B, Rue M et al. Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer. *J Clin Invest* 2002; 110(5):633-641.
- (201) Chiarle R, Fan Y, Piva R, Boggino H, Skolnik J, Novero D et al. S-phase kinase-associated protein 2 expression in non-Hodgkin's lymphoma inversely correlates with p27 expression and defines cells in S phase. *Am J Pathol* 2002; 160(4):1457-1466.
- (202) Hershko D, Bornstein G, Ben Izhak O, Carrano A, Pagano M, Krausz MM et al. Inverse relation between levels of p27(Kip1) and of its ubiquitin ligase subunit Skp2 in colorectal carcinomas. *Cancer* 2001; 91(9):1745-1751.
- (203) Lim MS, Adamson A, Lin Z, Perez-Ordenez B, Jordan RC, Tripp S et al. Expression of Skp2, a p27(Kip1) ubiquitin ligase, in malignant lymphoma: correlation with p27(Kip1) and proliferation index. *Blood* 2002; 100(8):2950-2956.
- (204) Yang G, Ayala G, Marzo AD, Tian W, Frolov A, Wheeler TM et al. Elevated Skp2 protein expression in human prostate cancer: association with loss of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and PTEN and with reduced recurrence-free survival. *Clin Cancer Res* 2002; 8(11):3419-3426.
- (205) Kaelin WG, Jr. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(9):673-682.
- (206) Bindra RS, Vasselli JR, Stearman R, Linehan WM, Klausner RD. VHL-mediated hypoxia regulation of cyclin D1 in renal carcinoma cells. *Cancer Res* 2002; 62(11):3014-3019.
- (207) Kim W, Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13(1):55-60.
- (208) Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M et al. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* 2002; 417(6891):871-875.
- (209) Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Kondo S, Toyoshima H, Kondo T et al. Genomic binding-site cloning reveals an estrogen-responsive gene that encodes a RING finger protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(23):11117-11121.
- (210) Terrell J, Shih S, Dunn R, Hicke L. A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol Cell* 1998; 1(2):193-202.

- (211) Spence J, Gali RR, Dittmar G, Sherman F, Karin M, Finley D. Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* 2000; 102(1):67-76.
- (212) Russell SJ, Reed SH, Huang W, Friedberg EC, Johnston SA. The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Mol Cell* 1999; 3(6):687-695.
- (213) Muratani M, Tansey WP. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(3):192-201.
- (214) Huang SY, Barnard MB, Xu M, Matsui S, Rose SM, Garrard WT. The active immunoglobulin kappa chain gene is packaged by non-ubiquitin-conjugated nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(11):3738-3742.
- (215) Briggs SD, Xiao T, Sun ZW, Caldwell JA, Shabanowitz J, Hunt DF et al. Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* 2002; 418(6897):498.
- (216) Sun ZW, Allis CD. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 2002; 418(6893):104-108.
- (217) Rice JC, Allis CD. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13(3):263-273.
- (218) Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403(6765):41-45.
- (219) Gonzalez F, Delahodde A, Kodadek T, Johnston SA. Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science* 2002; 296(5567):548-550.
- (220) Ottosen S, Herrera FJ, Triezenberg SJ. Transcription. Proteasome parts at gene promoters. *Science* 2002; 296(5567):479-481.
- (221) Ferdous A, Gonzalez F, Sun L, Kodadek T, Johnston SA. The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* 2001; 7(5):981-991.
- (222) Svejstrup JQ. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(1):21-29.
- (223) McKenna NJ, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Distinct steady-state nuclear receptor coregulator complexes exist in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(20):11697-11702.

- (224) Smith CL, DeVera DG, Lamb DJ, Nawaz Z, Jiang YH, Beaudet AL et al. Genetic ablation of the steroid receptor coactivator-ubiquitin ligase, E6-AP, results in tissue-selective steroid hormone resistance and defects in reproduction. *Mol Cell Biol* 2002; 22(2):525-535.
- (225) Nawaz Z, Lonard DM, Smith CL, Lev-Lehman E, Tsai SY, Tsai MJ et al. The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* 1999; 19(2):1182-1189.
- (226) Lipford JR, Deshaies RJ. Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation. *Nat Cell Biol* 2003; 5(10):845-850.
- (227) Lonard DM, Nawaz Z, Smith CL, O'Malley BW. The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol Cell* 2000; 5(6):939-948.
- (228) Reid G, Denger S, Kos M, Gannon F. Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(5):821-831.
- (229) Stenoien DL, Mancini MG, Patel K, Allegretto EA, Smith CL, Mancini MA. Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1. *Mol Endocrinol* 2000; 14(4):518-534.
- (230) Stenoien DL, Patel K, Mancini MG, Dutertre M, Smith CL, O'Malley BW et al. FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. *Nat Cell Biol* 2001; 3(1):15-23.
- (231) Reid G, Hubner MR, Metivier R, Brand H, Denger S, Manu D et al. Cyclic, Proteasome-Mediated Turnover of Unliganded and Liganded ERalpha on Responsive Promoters Is an Integral Feature of Estrogen Signaling. *Mol Cell* 2003; 11(3):695-707.
- (232) Kang Z, Pirskanen A, Janne OA, Palvimo JJ. Involvement of proteasome in the dynamic assembly of the androgen receptor transcription complex. *J Biol Chem* 2002; 277(50):48366-48371.
- (233) Lin HK, Altuwajiri S, Lin WJ, Kan PY, Collins LL, Chang C. Proteasome activity is required for androgen receptor transcriptional activity via regulation of androgen receptor nuclear translocation and interaction with coregulators in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277(39):36570-36576.
- (234) Lin HK, Wang L, Hu YC, Altuwajiri S, Chang C. Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J* 2002; 21(15):4037-4048.

- (235) Lange CA, Shen T, Horwitz KB. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(3):1032-1037.
- (236) Shen T, Horwitz KB, Lange CA. Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol Cell Biol* 2001; 21(18):6122-6131.
- (237) Deroo BJ, Rentsch C, Sampath S, Young J, DeFranco DB, Archer TK. Proteasomal inhibition enhances glucocorticoid receptor transactivation and alters its subnuclear trafficking. *Mol Cell Biol* 2002; 22(12):4113-4123.
- (238) Wallace AD, Cidlowski JA. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem* 2001; 276(46):42714-42721.
- (239) Giguère V, Shago M, Zirngibl R, Tate P, Rossant J, Varmuza S. Identification of a novel isoform of the retinoic acid receptor γ expressed in the mouse embryo. *Molecular & Cellular Biology* 1990; 10:2335-2340.
- (240) Cowley SM, Parker MG. A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 69(1-6):165-175.
- (241) Jang ER, Lim SJ, Lee ES, Jeong G, Kim TY, Bang YJ et al. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A sensitizes estrogen receptor alpha-negative breast cancer cells to tamoxifen. *Oncogene* 2003.
- (242) Qiu JH, Asai A, Chi S, Saito N, Hamada H, Kirino T. Proteasome inhibitors induce cytochrome c-caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 2000; 20(1):259-265.
- (243) Wagenknecht B, Hermisson M, Groscurth P, Liston P, Krammer PH, Weller M. Proteasome inhibitor-induced apoptosis of glioma cells involves the processing of multiple caspases and cytochrome c release. *J Neurochem* 2000; 75(6):2288-2297.
- (244) Dennis AP, Haq RU, Nawaz Z. Importance of the regulation of nuclear receptor degradation. *Front Biosci* 2001; 6:D954-D959.
- (245) Poukka H, Aarnisalo P, Karvonen U, Palvimo JJ, Janne OA. Ubc9 interacts with the androgen receptor and activates receptor-dependent transcription. *J Biol Chem* 1999; 274(27):19441-19446.

- (246) Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal* 2001; 13(11):777-785.
- (247) Fu M, Wang C, Reutens AT, Wang J, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L et al. p300 and p300/cAMP-response Element-binding Protein-associated Factor Acetylate the Androgen Receptor at Sites Governing Hormone-dependent Transactivation. *J Biol Chem* 2000; 275(27):20853-20860.
- (248) Yeh S, Lin HK, Kang HY, Thin TH, Lin MF, Chang C. From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: A novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96(10):5458-5463.
- (249) Wang X, Pongrac JL, DeFranco DB. Glucocorticoid receptors in hippocampal neurons that do not engage proteasomes escape from hormone-dependent down-regulation but maintain transactivation activity. *Mol Endocrinol* 2002; 16(9):1987-1998.
- (250) Bunone G, Briand P-A, Miksicek RJ, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *European Molecular Biology Organization Journal* 1996; 15:2174-2183.
- (251) Sun L, Johnston SA, Kodadek T. Physical association of the APIS complex and general transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296(4):991-999.
- (252) Wang C, Fu M, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Reutens AT, Albanese C et al. Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem* 2001.
- (253) Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, O'Connor MJ. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol* 1999; 73(8):6209-6219.
- (254) Lee JW, Ryan F, Swaffield JC, Johnston SA, Moore DD. Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature (London)* 1995; 374:91-94.
- (255) Rubin DM, Coux O, Wefes I, Hengartner C, Young RA, Goldberg AL et al. Identification of the gal4 suppressor Sug1 as a subunit of the yeast 26S proteasome. *Nature* 1996; 379(6566):655-657.

- (256) Baumann CT, Ma H, Wolford R, Reyes JC, Maruvada P, Lim C et al. The Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1 (GRIP1) Localizes in Discrete Nuclear Foci That Associate with ND10 Bodies and Are Enriched in Components of the 26S Proteasome. *Mol Endocrinol* 2001; 15(4):485-500.
- (257) Stenoien DL, Nye AC, Mancini MG, Patel K, Dutertre M, O'Malley BW et al. Ligand-mediated assembly and real-time cellular dynamics of estrogen receptor alpha-coactivator complexes in living cells. *Mol Cell Biol* 2001; 21(13):4404-4412.
- (258) De Conto F, Pilotti E, Razin SV, Ferraglia F, Geraud G, Arcangeletti C et al. In mouse myoblasts nuclear prosomes are associated with the nuclear matrix and accumulate preferentially in the perinucleolar areas. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 13):2399-2407.
- (259) Tokumoto M, Yamaguchi A, Nagahama Y, Tokumoto T. Identification of the goldfish 20S proteasome beta6 subunit bound to nuclear matrix. *FEBS Lett* 2000; 472(1):62-66.
- (260) Webb P, Valentine C, Nguyen P, Price RH, Jr., Marimuthu A, West BL et al. ERbeta Binds N-CoR in the Presence of Estrogens via an LXXLL-like Motif in the N-CoR C-terminus. *Nucl Recept* 2003; 1(1):4.
- (261) Yan F, Gao X, Lonard DM, Nawaz Z. Specific ubiquitin-conjugating enzymes promote degradation of specific nuclear receptor coactivators. *Mol Endocrinol* 2003; 17(7):1315-1331.
- (262) Driggers PH, Segars JH, Rubino DM. The proto-oncoprotein Brx activates estrogen receptor beta by a p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2001; 276(50):46792-46797.
- (263) Freeman BC, Yamamoto KR. Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science* 2002; 296(5576):2232-2235.
- (264) Fletcher TM, Xiao N, Mautino G, Baumann CT, Wolford R, Warren BS et al. ATP-dependent mobilization of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling. *Mol Cell Biol* 2002; 22(10):3255-3263.
- (265) Kraus WL, Kadonaga JT. p300 and estrogen receptor cooperatively activate transcription via differential enhancement of initiation and reinitiation. *Genes & Development* 1998; 12:331-342.

