

2m11.3332.10

Université de Montréal

**Mécanisme de l'action agoniste des antioestrogènes: Rôle de l'hélice 12 du récepteur des oestrogènes alpha**

par

Élise Hébert

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de maître ès science (M.Sc.) en Biochimie

Août 2005

(c) Élise Hébert, 2005

Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures



W  
4  
U58  
2006  
v.008

**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.

Ce mémoire intitulé:

Mécanisme de l'action agoniste des antioestrogènes: Rôle de l'hélice 12 du récepteur des oestrogènes alpha

Présenté par

Élise Hébert

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président rapporteur: Dr. Gerardo Ferbeyre

Directrice de recherche: Dr. Sylvie Mader

Membre du jury: Dr. Alain Moreau

## RÉSUMÉ

La croissance de tumeurs mammaires est stimulée par les oestrogènes, dont l'action est transmise par les récepteurs des oestrogènes (ER). La liaison du 17- $\beta$ -estradiol permet de stabiliser l'hélice 12 (H12) du domaine de liaison au ligand dans une position agoniste essentielle à l'activation hormonodépendante du récepteur. Cette activation transactivationnelle du récepteur est couplée à sa dégradation par le protéasome. À l'opposé, les antioestrogènes (AE), par leur chaîne latérale protubérante, provoquent un positionnement différent de H12 et perturbent la dégradation et la distribution du récepteur, ce qui modifie sa capacité transactivationnelle.

Certaines mutations de H12 (L536A, L539A et L540A) permettent à ER $\alpha$  d'afficher une activité agoniste partielle en présence d'AE. Un modèle cellulaire permettant d'étudier ces mutations a été développé, soit des lignées dérivées des MDA-MB-231 exprimant de façon stable les mutants. Leur activité est décelée autant sur des promoteurs synthétiques (ERE3-TAT-Luc) qu'endogènes, tels TFF1 et GREB.

**Mots clés:** Récepteur des oestrogènes, cancer du sein, MDA-MB-231, hélice 12, antioestrogènes.

## ABSTRACT

Mammary tumor growth is stimulated by estrogens. Their actions are transmitted through the estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ). Agonist binding stabilizes the helix 12 (H12) of the ligand binding domain of ER $\alpha$  in an agonist position, essential for the hormone-dependant activation of ER $\alpha$ . Its activation is coupled with its degradation by the 26S proteasome. At the opposite, antiestrogens (AE), with their side chain, displace H12 and disrupt the degradation and the distribution of ER $\alpha$ . In this case, ER $\alpha$ 's transactivation capability is reduced.

Certain mutations in ER $\alpha$ 's H12 (L536A, L539A and L540A) reveal an agonist activity for full AE. In order to establish the function of these mutations, we have developed cellular models. They consist of stably expressing MDA-MB-231 derived cell lines. Our results reveal that these mutants maintain their capacity to induce expression of exogenous (ERE3-TATA-Luc) as well as endogenous (TFF1, GREB) target genes in presence of full AEs.

**Key words:** Estrogen receptor, breast cancer, MDA-MB-231, helix 12, antiestrogen.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Résumé</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iv</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>v</b>
<b>Table des illustrations</b> .....	<b>x</b>
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	<b>xii</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xvi</b>
<b>Chapitre I: Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1-Le cancer du sein</b> .....	<b>2</b>
<b>2- Les hormones oestrogéniques</b> .....	<b>2</b>
2.1-Récepteurs des oestrogènes .....	<b>3</b>
<b>3- Les récepteurs nucléaires</b> .....	<b>4</b>
3.1- Les régions et domaines des récepteurs nucléaires .....	<b>5</b>
3.1.1- La fonction 1 d'activation de la transcription (AF-1) .....	<b>6</b>
3.1.2- Le domaine liaison au ligand et la fonction 2 d'activation de la transcription (AF-2) .....	<b>7</b>
3.1.2.1- La structure du domaine de liaison au ligand (LBD).....	<b>10</b>
3.1.3- Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) .....	<b>11</b>
3.2- Le rôle de la dégradation des NR dans leur capacité transactivationnelle .....	<b>14</b>
3.3- Les actions non-génomiques du ER $\alpha$ .....	<b>15</b>
<b>4- Les cofacteurs transcriptionnels</b> .....	<b>16</b>
4.1- Le motif LXXLL et les interactions protéine-protéine .....	<b>16</b>
4.2- La famille des p160 .....	<b>17</b>
4.2.1- La structure et la fonction des protéines de la famille des p160 .....	<b>18</b>
4.2.2- La modulation de l'activité des protéines de la famille des p160.....	<b>20</b>
4.3- Les rôles p300 et CBP dans l'activation transcriptionnelle .....	<b>20</b>
4.4- Le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base .....	<b>21</b>
4.5- Les corépresseurs transcriptionnels.....	<b>21</b>

4.6- Les mécanismes d'initiation de la transcription par la machinerie transcriptionnelle générale.....	23
<b>5- Le ciblage du récepteur des oestrogènes <math>\alpha</math> dans le traitement du cancer du sein .....</b>	<b>25</b>
5.1- Les antioestrogènes .....	25
5.1.1- Le mécanisme d'action des antioestrogènes .....	27
<b>6- Variations génétiques et mutagenèse du récepteur des oestrogènes <math>\alpha</math> ....</b>	<b>27</b>
6.1- La mutagenèse du récepteur des oestrogènes $\alpha$ .....	28
6.1.1- La mutagenèse du récepteur des oestrogènes $\alpha$ menant à une activité agoniste des antioestrogènes.....	29
<b>7- Synthèse de ER<math>\alpha</math> chez l'humain .....</b>	<b>34</b>
<b>CHAPITRE II: OBJECTIFS.....</b>	<b>35</b>
<b>Chapitre III : Matériel et méthodes .....</b>	<b>38</b>
<b>1-Culture cellulaire.....</b>	<b>39</b>
1.1- Culture des cellules MDA-MB-231 .....	39
1.2-Génération des lignées MDA-MB-231 exprimant ER $\alpha$ de type sauvage ou mutant .....	39
<b>2- Essais luciférase .....</b>	<b>40</b>
2.1- Transfection transitoire pour la détermination des clones MDA-MB-231 positif pour leur expression du ER $\alpha$ de type sauvage ou mutant.....	40
2.2 Transfection transitoire pour essai de transactivation .....	40
2.3- Extraction et réaction enzymatique de la luciférase .....	41
<b>3- Essais <math>\beta</math>-galactosidase.....</b>	<b>41</b>
<b>4- Immunobuvardage de type western .....</b>	<b>42</b>
4.1- Extraction protéiques au tampon à haute teneur en sel (HSB).....	42
4.2- Extraction protéiques au tampon Laemmli .....	42
4.3- Électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide.....	42
4.4- Transfert des protéines sur membranes de polyvylidène .....	43
4.5- Immunobuvardage de type western.....	43
<b>5- PCR en temps réel sur ADNc .....</b>	<b>44</b>
5.1- Traitement des cellules pour PCR en temps réel.....	44

5.2- Extraction de l'ADN .....	44
5.3- Réaction de transcriptase reverse .....	44
5.4 PCR en temps réel .....	45
5.4.1- Amorces de PCR en temps réel.....	45
5.4.2- Mélange réactionnel pour le PCR en temps réel .....	45
5.4.3- Cycles de PCR et détection pour le PCR en temps réel .....	46
<b>Chapitre IV : Résultats .....</b>	<b>47</b>
<b>1- Modèles cellulaires de carcinomes mammaires exprimant des versions mutées du ER<math>\alpha</math> stimulées par les antioestrogènes .....</b>	<b>48</b>
1.1- Évaluation de l'expression stable de ER $\alpha$ ou de ces mutants dans les cellules MDA-MB-231 par transfection transitoire de vecteurs rapporteurs .	48
1.2- Détermination des niveaux en ARNm de ER $\alpha$ ou de ses mutants dans les cellules MDA-MB-231 transfectées de façon stable par PCR en temps réel .	49
1.3- Détermination des niveaux d'expression stable de ER $\alpha$ ou de ses mutants dans les cellules MDA-MB-231 par immunobuvardage de type western.....	52
1.4- Capacité transactivationnelle des ER $\alpha$ sauvage ou mutants dans les lignées MDA-MB-231 transfectées de façon stable sur un promoteur synthétique de type ERE3.....	55
1.4.1- Capacité transactivationnelle de ER $\alpha$ de type sauvage dans la lignée MDA-MB-231-HEG0 sur un promoteur synthétique de type ERE3 .....	56
1.4.2- Capacité transactivationnelle du mutant L536A de ER $\alpha$ dans la lignée MDA-MB-231-L536A sur un promoteur synthétique de type ERE3	56
1.4.3- Capacité transactivationnelle du mutant L539A de ER $\alpha$ dans la lignée MDA-MB-231-L539A sur un promoteur synthétique de type ERE3	57
1.4.4- Capacité transactivationnelle du mutant L540A de ER $\alpha$ dans la lignée MDA-MB-231-L540A sur un promoteur synthétique de type ERE3	57

1.5- Capacité transactivationnelle des ER $\alpha$ sauvage ou mutants dans les lignées MDA-MB-231 transfectées de façon stable sur des promoteurs endogènes .....	59
1.5.1- Capacité transactivationnelle des ER $\alpha$ sauvage ou mutants dans les lignées MDA-MB-231 transfectées de façon stable sur le promoteur du gène TFF1 .....	60
1.5.1.1- Capacité transactivationnelle de ER $\alpha$ sauvage dans la lignée MDA-MB-231-HEG0 sur le promoteur du gène TFF1 .....	60
1.5.1.2- Capacité transactivationnelle du mutant L536A dans la lignée MDA-MB-231-L536A sur le promoteur du gène TFF1 .....	61
1.5.1.3- Capacité transactivationnelle du mutant L539A dans la lignée MDA-MB-231-L539A sur le promoteur du gène TFF1 .....	61
1.5.1.4- Capacité transactivationnelle du mutant L540A dans la lignée MDA-MB-231-L540A sur le promoteur du gène TFF1 .....	61
1.5.2- Capacité transactivationnelle des ER $\alpha$ sauvage ou mutants dans les lignées MDA-MB-231 transfectées de façon stable sur le promoteur du gène GREB .....	64
1.5.2.1- Capacité transactivationnelle de ER $\alpha$ sauvage dans la lignée MDA-MB-231-HEG0 sur le promoteur du gène GREB .....	64
1.5.2.2- Capacité transactivationnelle du mutant L536A dans la lignée MDA-MB-231-L536A sur le promoteur du gène GREB .....	64
1.5.2.3- Capacité transactivationnelle du mutant L539A dans la lignée MDA-MB-231-L539A sur le promoteur du gène GREB .....	65
1.5.2.4- Capacité transactivationnelle du mutant L540A dans la lignée MDA-MB-231-L540A sur le promoteur du gène GREB .....	65
1.6- Disponibilité de ER $\alpha$ sauvage ou mutant suite au traitement par E2, OHT, ICI ou Ral .....	68
<b>Chapitre V: Discussion .....</b>	<b>70</b>
<b>1- Modèle d'étude des mutations L536A, L539A et L540A de ER<math>\alpha</math> .....</b>	<b>71</b>
1.1- Validation des modèles cellulaires générés .....	72

1.1.1-	Niveau d'expression de ER $\alpha$ dans les nouvelles lignées MDA-MB-231-HEG0, MDA-MB-231-L536A, MDA-MB-231-L539A, MDA-MB-231-L540A .....	72
1.1.2-	Le contexte cellulaire des MDA-MB-231 permet l'activité agoniste des antioestrogènes.....	74
<b>2-</b>	<b>L'activité agoniste partielle des antioestrogènes est observable de façon endogène .....</b>	<b>75</b>
2.1-	L'activité agoniste partielle des antioestrogènes est observable sur le gène cible TFF1 grâce à la technique de RT-PCR en temps réel .....	75
2.2-	L'activité agoniste partielles des antioestrogènes est gène spécifique....	76
<b>3-</b>	<b>La disponibilité sous traitement aux antioestrogènes totaux des récepteurs sauvage ou mutants corrèle avec leur capacité transactivationnelle.....</b>	<b>77</b>
<b>4-</b>	<b>Analyses futures.....</b>	<b>77</b>
<b>5-</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>79</b>
<b>Chapitre VI :</b>	<b>Références.....</b>	<b>80</b>
<b>Chapitre VII :</b>	<b>Annexes .....</b>	<b>98</b>
<b>Document 1 :</b>	<b>Représentation schématique du vecteur pcDNA3.1-hygro(+)</b>	<b>99</b>
<b>Document 2 :</b>	<b>Exemple de courbes d'amplification résultant du PCR en temps réel.....</b>	<b>100</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Domaines fonctionnels et d'homologie de séquences des récepteurs nucléaires .....	6
Figure 2 : Représentation de type ruban du domaine de liaison au ligand du récepteur des oestrogène $\alpha$ .....	9
Figure 3 : Positionnement variable de l'hélice 12 du récepteur des oestrogènes alpha en fonction du ligand.....	12
Figure 4 : Domaine de liaison à l'ADN (DBD) des récepteurs nucléaires (NR) ....	14
Figure 5 : Mécanisme général d'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires .....	24
Figure 6 : Antioestrogènes partiels (SERM) et totaux du récepteur des oestrogènes $\alpha$ .....	26
Figure 7 : Essai de transactivation sur un rapporteur de type ERE3-tata-luc dans les cellules HepG2 transfectées de façon transitoire .....	31
Figure 8 : Essai de dégradation de diverses formes de ER $\alpha$ dans les cellules HepG2.....	33
Figure 9 : Comparaison des niveaux d'expression de l'ARNm de ER $\alpha$ de type sauvage ou mutant dans les cellules MDA-MB-231 transfectées de façon stable.....	51
Figure 10 : Niveau d'expression de ER $\alpha$ de type sauvage ou mutant dans les cellules MDA-MB-231 transfectées de façon stable.....	54
Figure 11 : Essai de transactivation sur un rapporteur de type ERE3-tata-luc dans les cellules MDA-MB-231 transfectées de façon stable.....	58
Figure 12 : Activation de la transcription du gène TFF1 par ER $\alpha$ sauvage ou mutant dans les cellules MDA-MB-231 transfectées de façon stable suivie par RT-PCR en temps réel .....	63
Figure 13 : Activation de la transcription du gène GREB par ER $\alpha$ sauvage ou mutant dans les cellules MDA-MB-231 transfectées de façon stable suivie par RT-PCR en temps réel .....	67

Figure 14 : Stabilité de ER $\alpha$  sauvage ou mutant suite au traitement par E2, OHT, ICI et Ral dans les MDA-MB 231 transfectées de façon stable .....69

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A	Alanine
AD1	Domaine 1 d'activation
AD2	Domaine 2 d'activation
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique
AF-1	Fonction 1 d'activation
AF-2	Fonction 2 d'activation
AIB1	<i>Amplified in breast cancer 1</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
AR	Récepteur des androgènes
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BAF57	<i>Brg-1 associated factor 57</i>
bHLH	Hélice-boucle-hélice basique
BSA	Albumine de sérum bovin
C-	Carboxy-terminal
CARM1	<i>coactivator-associated arginine</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
Cdk	<i>Cyclin dependent kinase</i>
COUP-	<i>chicken ovalbumin upstream promoter</i>
CTD	Domaine carboxy-terminal
D	Acide aspartique
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
E	Acide glutamique
E2	17- $\beta$ -oestradiol
E6-AP	<i>E6 associated protein</i>
EGF	<i>Epithelial growth factor</i>
ER	Récepteur des oestrogènes

ERE	Élément de réponse aux oestrogènes
F	Phénylalanine
FBS	Sérum fœtal de bovins
FBST	Sérum fœtal de bovins traité
G	Glycine
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
GRIP-1	<i>Glucocorticoid receptor interacting</i>
GST	Glutathion-S-transférase
H	Hélice
HAT	Histone acétyl-transférase
HDAC	Histone déacétylase
HEG0	Récepteur des oestrogènes alpha
HSB	Tampon à haute teneur en sel
I	Isoleucine
ICI	ICI 182,780
JNK	<i>Jun amino-terminal kinase</i>
K	Lysine
L	Leucine
LBD	Domaine de liaison au ligand
LCoR	<i>Ligand-dependent corepressor</i>
M	Méthionine
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MNAR	<i>modulator of nongenomic activity of</i>
N	Asparagine
N-term	Amino-terminal
NCoA	<i>Nuclear receptor coactivator</i>
NCoR	<i>Nuclear receptor corepressor</i>
NID	Domaine d'interaction avec les récepteurs
NR	Récepteur nucléaire
NRIP-1	<i>Nuclear receptor interacting protein 1</i>
OHT	4-hydroxy-tamoxifène

P/CAF	<i>p300/CBP associated factor</i>
PBS	Tampon salin de phosphate
PCR	<i>Polycloning chain reaction</i>
PIP3	Phosphatidylinositol triphosphate
PolII	ADN polymérase II
PR	Récepteur à la progestérone
Pu	Purine
Py	Pyrimidine
Q	Glutamine
R	Arginine
RAC3	<i>Receptor-associated coactivator 3</i>
Ral	Raloxifène
RIP140	<i>Receptor interacting protein 140</i>
RPF1	<i>RNA processing factor 1</i>
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
S	Sérine
SAFB1	<i>scaffold attachment factor B 1</i>
SERM	<i>Selective estrogen receptor modulator</i>
SHARP	<i>Enhancer-of-split and hairy-related</i>
SMRT	Silencing mediator of retinoic acid and
SRC-1	<i>Steroid receptor coactivator 1</i>
SRC-2	<i>Steroid receptor coactivator 2</i>
SRC-3	<i>Steroid receptor coactivator 3</i>
TAF	<i>TBP associated factor</i>
TBP	<i>TATA binding protein</i>
TFII	<i>Transcription factor II</i>
TIF-2	<i>Transcription intermediary factor 2</i>
TRAP220	<i>Thyroid hormone receptor-associated</i>
TRIP1	<i>thyroid receptor interacting protein 1</i>
UBC9	<i>ubiquitin conjugating enzyme 9</i>
V	Valine
W	Tryptophane

X  
Y

Acide aminé quelconque  
Tyrosine

## REMERCIEMENTS

Je ne pourrais avoir réalisé tout le travail présenté ici si le Dr Sylvie Mader n'avait pas accepté de m'ouvrir les portes de son laboratoire. Je me souviendrai de ces grandes connaissances scientifiques, de sa rigueur expérimentale et surtout, de son désir de les transmettre.

Tous les membres du laboratoire sont pour moi des modèles et des sources d'inspirations constantes, chacun à leur façon. Leurs implications, commentaires et encouragements n'ont pas de prix. Plus particulièrement, j'aimerais remercier Mathieu Lupien pour son aplomb et sans qui je n'aurais pu réaliser autant sur ce projet. Merci à Walter Rocha pour ses idées et commentaires sans pareils. À Julie Deschênes pour toutes les discussions qui m'ont faits constater que nous sommes tous dans la même incertitude. À Véronique Bourdeau pour son aide appréciée. À Anick Auger pour ses expressions qui m'ont fait rire. À Gisèle Marguier pour sa compréhension. À Grégoire Hervouet-Zeiber pour son courage de faire autrement. À Samuel Chagnon pour avoir été un pilier et à Martine Bail pour avoir su maintenir les fondations. À David Ferlant-McCollough pour sa fière différence.

J'ai la chance de pouvoir partager ma vie avec un homme merveilleux qui comprend mon cheminement scientifique et m'appuie sans condition. J'aurais été plus d'une fois perdue sans lui.

Mes parents ont été une source inconditionnelle d'encouragements. Merci papa pour avoir été le premier à m'enseigner la démarche scientifique. Merci maman de m'avoir enseigné qu'il est important de faire preuve de sensibilité.

Je ne pourrais être honnête sans remercier les membres du Jazz Daniel's Big Band. Ils savent m'accueillir religieusement chaque semaine, dans l'état où je me présente et m'ont toujours permis de faire de la pratique de la musique un exutoire sans lequel je ne serais pas celle que je suis.

## **CHAPITRE I: INTRODUCTION**

## **1-Le cancer du sein**

Au Canada, une femme sur neuf développera une tumeur mammaire au cours de sa vie. De ce fait, le cancer du sein est le type de cancer le plus diagnostiqué chez les femmes. Il en résulte qu'une femme sur vingt-sept mourra des suites de ce cancer.

Le cancer du sein atteint aussi les hommes, qui représentent près d'un pour cent des nouveaux cas diagnostiqués en 2004 au Canada. Les chances de survie sont moindres pour les hommes que pour les femmes atteintes. Heureusement, les statistiques tendent à démontrer que la mortalité associée au cancer du sein est en diminution ([www.cancer.ca](http://www.cancer.ca)).

Le cancer du sein est caractérisé par une perte de fonction et une prolifération incontrôlée des cellules épithéliales mammaires. La morphologie et l'agressivité des tumeurs sont très variables; correspondant à des potentiels métastatiques et des pronostics de survie variables (Colozza, et al. 2005).

## **2- Les hormones oestrogéniques**

Les oestrogènes sont des hormones stéroïdiennes lipophiles produites en majorité par les ovaires jusqu'à la ménopause, mais aussi par les tissus adipeux, la peau et les os (Nelson and Bulun 2001). Ces hormones ont plusieurs rôles physiologiques, incluant la régulation des systèmes reproducteurs mâles et femelles, au niveau de leur développement et au niveau fonctionnel, ainsi que la différenciation et le développement des glandes mammaires (Carreau 2002; Klinge 2000). Ces hormones ont aussi un rôle protecteur au niveau des systèmes nerveux, cardiaque et osseux. Les oestrogènes jouent un rôle important dans la protection contre l'ostéoporose (Lindsay 2004) et les maladies neurodégénératives (Birge 2003). De plus, les femmes sont mieux protégées que les hommes contre les maladies cardiaques jusqu'à la ménopause, moment où les ovaires cessent leur production d'oestrogènes (Rackley 2004).

Par contre, le rôle des oestrogènes sur la croissance et le maintien de différents types cellulaires devient problématique lorsqu'il s'agit de cellules

cancéreuses. En effet, la croissance de la plupart des tumeurs mammaires est stimulée par la présence d'oestrogènes (Lippman, et al. 1986). La croissance des cancers de l'endomètre est aussi stimulée par les oestrogènes (Henderson and Feigelson 2000).

## 2.1-Récepteurs des oestrogènes

Par leur capacité à lier les oestrogènes, les récepteurs des oestrogènes alpha et beta ( $ER\alpha$  et  $ER\beta$ ) médient les fonctions cellulaires de ces hormones. Ces récepteurs sont des facteurs de transcription et des médiateurs des voies de signalisation issus des produits de deux gènes différents. Bien que de structure similaire, la distribution et les rôles des deux récepteurs sont différents (McDonnell 2004).

Le récepteur des oestrogènes  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) qui est le premier à avoir été identifié, est exprimé, entre autres, dans les glandes mammaires, les os, le système cardiovasculaire, le système nerveux central et l'utérus (Nilsson and Gustafsson 2000). Chez la souris, l'ablation génique de ce gène entraîne l'infertilité, autant mâle que femelle. Ces souris développent des niveaux hormonaux stéroïdiens et oestrogéniques anormalement élevés, mais le développement du système mammaire et du tractus urogénital ne survient plus à la puberté. Leur densité osseuse est réduite. Chez les mâles, la prostate s'atrophie (Couse and Korach 1999).

Une expression abérante de  $ER\alpha$  est notée lors de tumeurs mammaires. Dans un système mammaire sain, 15 à 30% des cellules de l'épithélium luminal expriment  $ER\alpha$  et aucun autre type cellulaire de ce système ne le fait. Par contre, la plupart des cellules mammaires tumorales expriment le récepteur, et ce, dès les stades précoces de la maladie (Anderson 2002).  $ER\alpha$  étant nécessaire à la prolifération des cellules mammaires, sa surexpression favorise le nombre de tumeurs (Lippman, et al. 1986).

Le récepteur des oestrogènes  $\beta$  ( $ER\beta$ ) présente une distribution tissulaire différente de celle du  $ER\alpha$ ; sa distribution est plus large. Il est principalement

retrouvé dans la prostate et les ovaires, les systèmes cardiovasculaires, nerveux central, pulmonaire, rénal, mammaire, reproducteur, urogénital et immunitaire (Nilsson and Gustafsson 2000). Contrairement à ce qui est observé chez les souris déficientes en ER $\alpha$ , l'ablation génique de ER $\beta$  n'entraîne pas de trouble du développement. Cependant, on observe une diminution de l'activité ovulatoire chez les femelles déficientes par rapport aux femelles de type sauvage (Couse and Korach 1999). ER $\beta$  ne montre donc pas de contribution au développement de tumeurs mammaires, au contraire, il a été suggéré que l'expression de ER $\beta$  pouvait avoir un effet antagoniste sur l'activité du ER $\alpha$  (Hayashi, et al. 2003).

### 3- Les récepteurs nucléaires

Les récepteurs des oestrogènes font partie de la super-famille des récepteurs nucléaires (NR). Les NR sont des facteurs de transcription ligand-dépendants médiant l'action de petites molécules lipophiles, comme les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. La grande famille des NR peut être divisée en trois sous-parties. La classe I est celle des récepteurs liant les hormones stéroïdiennes et inclut le récepteur des glucocorticoïdes (GR), le récepteur de la progestérone (PR), des androgènes (AR), des minéralocorticoïdes et finalement des œstrogènes. La classe II est celle des récepteurs non stéroïdiens et finalement, une troisième classe, les récepteurs orphelins, inclut les récepteurs pour lesquels aucun ligand n'a été caractérisé.

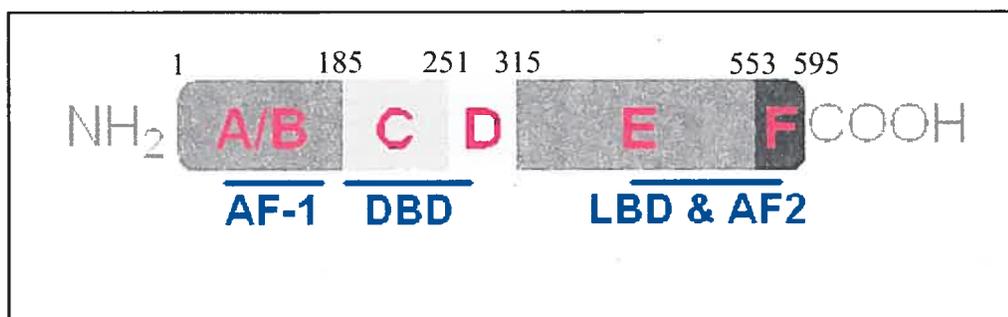
Le caractère lipophile des ligands leur permet de traverser les membranes cellulaire et nucléaire afin d'entrer dans le noyau des cellules, par simple diffusion. Une fois liés à leur ligand, les NR de classe I ont la capacité à homo- et hétérodimériser. Cette dimérisation provoque la dissociation de molécules chaperonnes entraînant une nouvelle conformation des récepteurs leur permettant de lier l'ADN. Cependant, les NR de type II ont la capacité à lier l'ADN autant en présence qu'en absence de ligand et se retrouvent toujours sous forme d'hétérodimère avec leur partenaire obligatoire, le récepteur du rétinol X (RXR).

Les NR reconnaissent des séquences spécifiques d'ADN nommées éléments de réponse. Ils sont composés de deux demi-sites identiques, chacun

étant reconnu par un monomère de récepteur, pouvant être arrangés de deux façons : une répétition palindromique de demi-site séparée par une ou trois bases, cas retrouvé pour tous les récepteurs de la classe I, ou bien une répétition directe des demi-sites séparée par un nombre variable de bases (1 à 5) (Aranda and Pascual 2001). Ainsi, la liaison d'un NR à l'ADN peut influencer la transcription des gènes à proximité d'un élément de réponse (Bourdeau, et al. 2004).

### **3.1- Les régions et domaines des récepteurs nucléaires**

Les NR présentent six régions d'homologie, caractérisées d'après les degrés de conservation des séquences d'un NR à un autre. Les six régions sont nommées de A à F à partir de leur extrémité amino-terminale. (Figure 1) Les régions A et B, les plus N-terminales, représentent une section de séquences variables entre les NR. Vient ensuite la région C, la région la plus conservée à travers la super-famille, suivie de la région charnière D. Les régions E et F sont plutôt conservées. Ces régions englobent trois domaines fonctionnels principaux et structurellement autonomes. La fonction 1 d'activation de la transcription (AF-1), hormono-indépendante tissu et promoteur spécifique, est comprise dans les régions A/B tandis que la fonction 2 d'activation de la transcription (AF-2) est plutôt retrouvée dans les régions E/F et est caractérisée par son activation hormono-dépendante. AF-2 comporte ainsi le domaine de liaison au ligand (LBD). Quant à lui, le domaine de liaison à l'ADN (DBD) est compris dans la région la plus conservée, soit la région C, ainsi que dans la portion N-terminale de la région D (Mader, et al. 1993).



**Figure 1: Domaines fonctionnels et d'homologie de séquences des récepteurs nucléaires**

Les régions d'homologie de séquences sont montrées en rose tandis que les domaines fonctionnels sont indiqués en bleu. La numérotation correspond aux positions dans la séquence en acides aminés de ER $\alpha$ . La partie N-terminale des récepteurs nucléaires, soient les régions A et B, comprend la fonction 1 d'activation de la transcription (AF-1). Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) comprend la région C et une petite partie de la région D. Le domaine de liaison au ligand (LBD) ainsi que la fonction 2 d'activation de la transcription (AF-2), sont compris dans la région E (Mader, et al. 1993; Ruff, et al. 2000).

### 3.1.1- La fonction 1 d'activation de la transcription (AF-1)

La fonction 1 d'activation de la transcription (AF-1) est comprise dans la région A/B, région la moins conservée entre les récepteurs nucléaires. Pour certains récepteurs, en particulier ceux ne faisant pas partie de la famille des récepteurs stéroïdiens, cette région peut être très courte et ne montrer aucune activité transcriptionnelle importante. Par contre, chez les récepteurs stéroïdiens, cette fonction hormono-indépendante est promoteur- et tissu-spécifique, c'est-à-dire que son activité dépend du contexte cellulaire et du gène ciblé. Souvent considéré à tort comme secondaire, l'activité transcriptionnelle amenée par AF-1 peut être régulée par différentes kinases, comme les MAPK (Kato 2001) et JNK (Feng, et al. 2001), et agir soit indépendamment de AF-2, soit en coopération avec celle-ci. La phosphorylation de cette région favorise le recrutement de coactivateurs transcriptionnels capables de remodeler la chromatine et d'augmenter l'efficacité de l'initiation de la transcription des gènes ciblés

(Rochette-Egly 2003). Cette fonction apporte ainsi un certain degré d'intégration entre les différentes voies de signalisation cellulaires.

Pour ce qui est de ER $\alpha$ , l'activation de sa fonction AF-1 passe par une série de phosphorylations sur des résidus sérines contenus dans cette région. Cette activation est notable en absence de ligand, mais peut aussi synergiser avec l'activité de la fonction AF-2 (Metivier, et al. 2001). Ces résidus de la région A/B sont les sérines 104, 106, 118 et sont plutôt conservées (Lannigan 2003). Deux types de phosphorylation sont observés; un premier survenant suite à l'activation de AF-2 par un ligand et un second indépendant de l'activité de AF-2.

Suite à l'activation de AF-2, diverses protéines montrant des activités kinases pourront être recrutées au récepteur. C'est la sérine 118 qui est la cible la plus importante de ces kinases, bien que les sérines 104 et 106 soient également modifiées (Joel, et al. 1995). Il semble que la phosphorylation de la sérine 118 suite à l'activation par l'estradiol (ligand oestrogénique, E2) pourrait être médiée par la kinase cycline-dépendante TFIIH recrutée par AF-2 (Chen, Riedl, et al. 2000). De leur côté, les sérines 104 et 106 sont plutôt la cible du complexe cyclin A/cdk2 et ce de façon hormono-indépendante (Rogatsky, et al. 1999).

La voie des MAPK est aussi en grande partie responsable de la phosphorylation des sérines de la région A/B du ER $\alpha$ . Par des essais de phosphorylation sur gel et de mutagénèse dirigée, il a été démontré que les sérines 118 et 167 sont la cible des MAPK suite à l'activation par EGF (Joel, et al. 1998; Kato, et al. 1995). La sérine 167 de ER $\alpha$  peut aussi être la cible de la kinase Akt, un effecteur de la voie des PIP3 kinases (Campbell, et al. 2001).

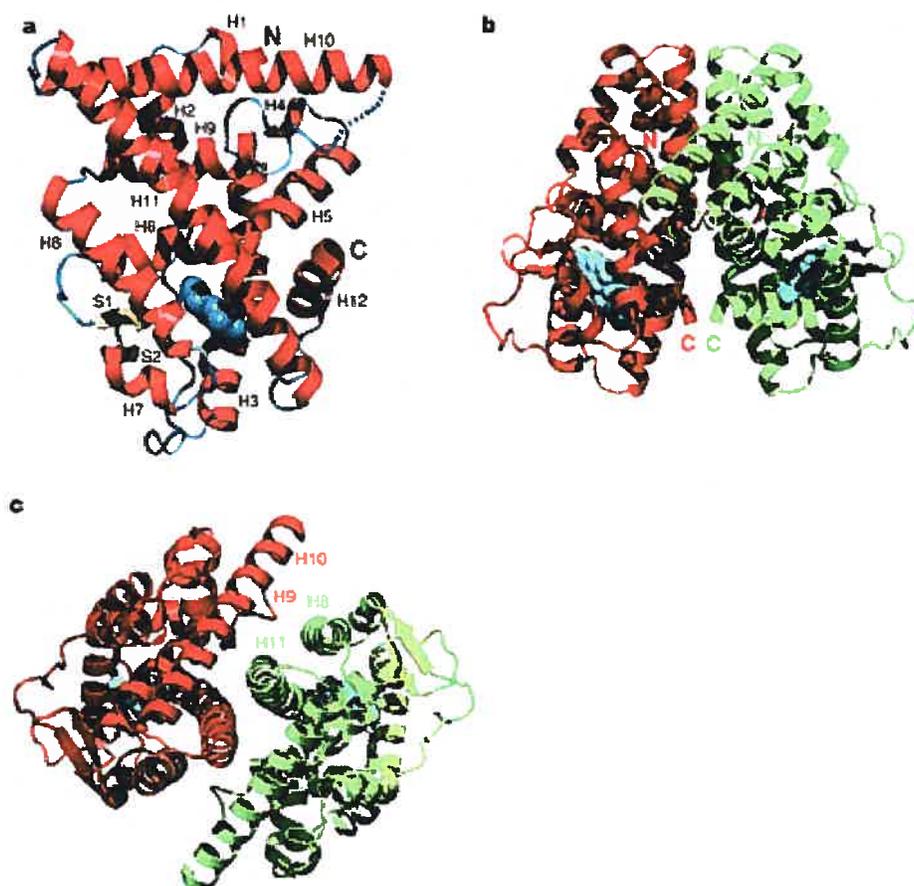
### **3.1.2- Le domaine liaison au ligand et la fonction 2 d'activation de la transcription (AF-2)**

La fonction 2 d'activation de la transcription (AF-2) est comprise dans les régions E/F des NR. Elle est hormono-dépendante, c'est-à-dire que son activation dépend de la liaison du ligand au récepteur au niveau du domaine de liaison au

ligand, domaine aussi présent dans la région E. Ainsi, ces deux domaines fonctionnels sont strictement reliés.

Le domaine de liaison au ligand (LBD) est responsable de la transmission du signal hormonal. Contenu dans la région E des NR, il reconnaît et lie un ou plusieurs ligands. Cette liaison entraîne la dimérisation des récepteurs, favorise leur localisation nucléaire et enfin active AF-2 (Scherrer, et al. 1993).

C'est aussi par ce domaine que ER $\alpha$  transmet les effets cellulaires des oestrogènes. Moléculairement, cette région est composée de douze hélices amphipatiques  $\alpha$  positionnées en sandwich, les hélices 1 à 4 formant le premier étage, les hélices 5, 6, 9 et 10, l'étage du milieu et finalement, les hélices 7, 8 et 11, le dernier étage. L'hélice 12 a une fonction particulière, celle de se repositionner de façon à recouvrir la poche de liaison au ligand en présence d'un ligand oestrogénique. En plus des 12 hélices, ce domaine compte aussi deux feuillets  $\beta$ . Positionnés dans la région de la poche de liaison au ligand, ils recouvrent les trois couches d'hélices  $\alpha$  à ce niveau (Figure 2a) (Brzozowski, et al. 1997). La poche de liaison au ligand se retrouve complètement cachée à l'intérieur de la structure, à l'une des deux extrémités de la molécule. Elle est plus précisément formée d'une partie des hélices 3, 6, 8, 11 et 12 de même que de la boucle entre les hélices 7 et 8 et de trois résidus des feuillets  $\beta$ . Ces résidus sont capables de liaisons hydrogènes avec le ligand (Brzozowski, et al. 1997).



**Figure 2 : Représentation de type ruban du domaine de liaison au ligand du récepteur des oestrogène  $\alpha$**

**a** Structure d'un monomère du LBD de ER $\alpha$ . En rouge sont représentées les hélices  $\alpha$  de ER $\alpha$ , en bleu, les boucles, en jaune, les feuillets  $\beta$  et les sphères bleues représentent le ligand oestrogénique 17- $\beta$ -oestradiol. Les régions en lignes pointillées n'ont pas été cristallographiées. La prise de vue est faite à partir de la surface de dimérisation. **b-c** Structures d'un dimère de LBD de ER $\alpha$ . Chacun des dimères sont colorés d'une différente couleur, soient rouge et vert. Le ligand oestrogénique 17- $\beta$ -oestradiol est en bleu. Une prise de vue est faite perpendiculairement à la surface de dimérisation (**a**) et l'autre, dans le même axe que cette surface (**b**) Figure adaptée d'une publication (Brzozowski, et al. 1997).

Le LBD des NR contient aussi une sous-région responsable de leur dimérisation suite à leur liaison par un ligand et ce indépendamment de la liaison à l'ADN. Pour les récepteurs de la classe I, comme ER $\alpha$ , la dimérisation survient lors d'un changement conformationnel amené par la liaison d'un ligand au LBD. Ce changement de conformation libère le récepteur de complexes protéiques inactivateurs contenant les protéines de choc thermique et des immunophilines (Ylikomi, et al. 1998). Cette libération permet au récepteur de dimériser. D'après des résultats de cristallisation de ER $\alpha$ , les hélices faisant contacts lors de la dimérisation sont les hélices 8 et 11 d'un monomère avec les hélices 9 et 10 de l'autre monomère (Figure 2b et 2c) (Brzozowski, et al. 1997). Dans le modèle classique de transactivation, ce n'est qu'une fois sous forme de dimère que ER $\alpha$  lie son élément de réponse et peut activer la transcription hormono-dépendante via AF-2.

### **3.1.2.1- La structure du domaine de liaison au ligand (LBD)**

C'est la structure particulière de cette région qui confère la capacité au LBD à reconnaître son ligand. Bien que cette région soit peu conservée au point de vue des séquences primaires en acides aminés entre les NR, sa structure tridimensionnelle et, par conséquent sa fonction, sont très conservées. Cette région contient des déterminants essentiels à son interaction avec différentes protéines, comme les protéines de choc thermiques et les immunophilines, qui maintiennent la fonction AF-2 inactive en absence de ligand, et à la dimérisation des NR en absence d'ADN. Constituée de 10 à 12 hélices  $\alpha$  amphipatiques selon les récepteurs (Edwards 2000), la région E adoptent une conformation dite en «sandwich d'hélices  $\alpha$ » laissant une cavité hydrophobe vide pour le ligand dans son tier inférieur. En présence de ligand agoniste, l'hélice 12 est stabilisée de façon à refermer la poche de liaison au ligand (Egner, et al. 2001; Wurtz, et al. 1996). Cette position de l'hélice expose une surface hydrophobe, appelée cavité de liaison aux coactivateurs, permettant des interactions avec les coactivateurs

transcriptionnels dans le but d'activer la transcription (Figure 3a, pour ER $\alpha$ ) (Brzozowski, et al. 1997; Nolte, et al. 1998).

Par contre, en présence d'un ligand antagoniste, comme les antioestrogènes raloxifène ou tamoxifène, l'hélice 12 de ER $\alpha$  est déplacée par la chaîne latérale du ligand qui ressort de la poche de liaison formant une protubérance. Elle ira plutôt se positionner au-dessus de la cavité de liaison au coactivateur empêchant ainsi le recrutement des cofacteurs essentiels à l'activation transcriptionnelle par le récepteur (Figure 3b) (Brzozowski, et al. 1997; Shiau, et al. 1998).

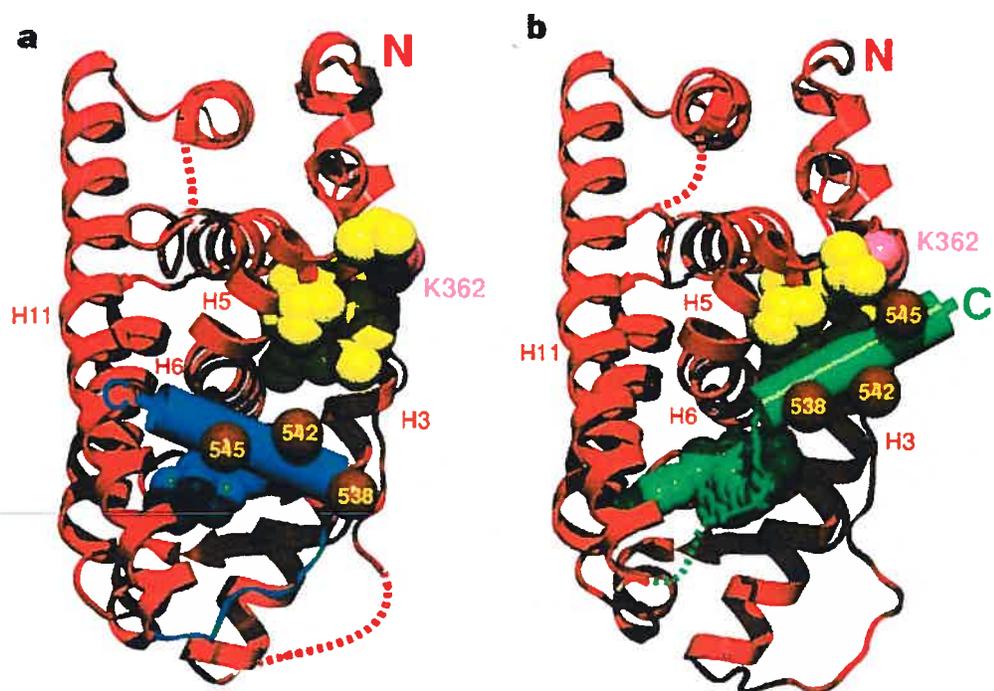
L'hélice 12 joue ainsi un rôle essentiel dans l'activation transcriptionnelle ligand-dépendante des NR. En effet, certaines mutations dans sa séquence de même que son ablation mènent à une perte de réponse au ligand (Danielian, et al. 1992).

Pour tous les NR, la cristallisation du LBD avec l'hélice 12 s'avère difficile. La raison est que cette hélice est très flexible et par conséquent difficile à stabiliser dans une position donnée en absence de ligand. Pour certains cristaux réalisés en présence de ligands, il a été possible de déterminer une position de l'hélice 12 (Edwards 2000; Shiau, et al. 1998).

### 3.1.3- Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) comprend la région C, la région la mieux conservée, ainsi qu'une petite partie de la région D, du côté N-terminal. La partie du DBD contenu dans la région D a été montrée comme nécessaire à la dimérisation et à la liaison du ER $\alpha$  à l'ADN (Mader, et al. 1993). La capacité du DBD à lier l'ADN dépend de sa structure tridimensionnelle. Riche en cystéines, il est formé de deux doigts de zinc de type C4 et de deux hélices  $\alpha$ . Il a été montré que ces composantes forment un domaine fonctionnel essentiel à la liaison des NR sur leur élément de réponse (Schwabe, et al. 1993).

Ce ne sont pas les doigts de zinc qui lient directement l'ADN, mais ils confèrent plutôt une structure permettant à l'hélice située entre les deux doigts de zinc d'établir des contacts spécifiques avec les bases dans le sillon majeur de l'ADN au niveau de l'élément de réponse (Edwards 2000). Cependant, trois acides



**Figure 3 : Positionnement variable de l'hélice 12 du récepteur des oestrogènes alpha en fonction du ligand**

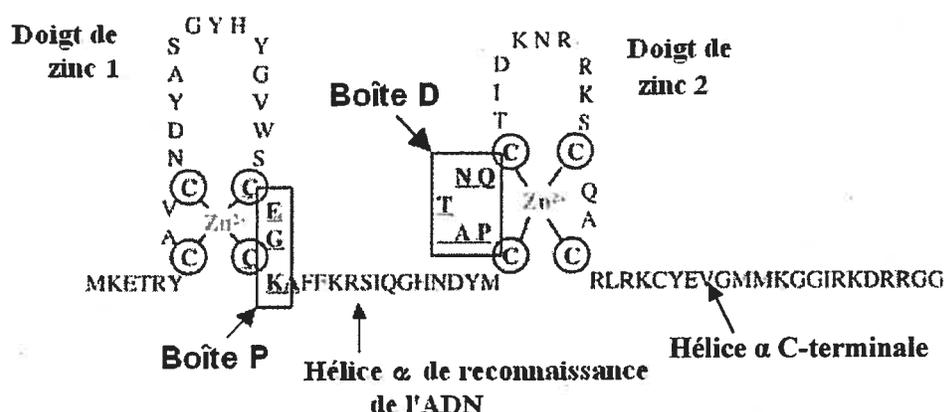
**a** Structure d'un monomère du LBD de ER $\alpha$  complexé au 17- $\beta$ -oestradiol (sphères bleues). La structure du LBD est représentée en rouge à l'exception de l'hélice 12 qui est en bleu. En plus, les acides aminés de la cavité hydrophobe sont en jaune tandis que la lysine 362 est en rose. Les régions en lignes pointillées n'ont pas été cristallographiées. **b** Structure d'un monomère du LBD de ER $\alpha$  complexé au raloxifène (sphères vertes) La structure du LBD est représentée en rouge à l'exception de l'hélice 12 qui est en vert. En plus, les acides aminés de la cavité hydrophobe sont en jaune tandis que la lysine 362 est en rose. Les régions en lignes pointillées n'ont pas été cristallographiées (Brzozowski, et al. 1997).

aminés compris dans le premier doigt de zinc confèrent une spécificité de reconnaissance. Ces trois acides aminés forment ce qui est appelé la boîte P (Sanchez, et al. 2002).

Une deuxième boîte, la boîte D, est comprise dans le deuxième doigt de zinc et joue un rôle dans la dimérisation des récepteurs stéroïdiens. Cette dimérisation stabilise les monomères de NR qui lient chacun un demi-élément de réponse et dicte la distance tolérée entre les deux demi-éléments (Figure 4)(Freedman 1992; Zilliacus, et al. 1995).

Les récepteurs de la classe I reconnaissent des demi-sites répétés de façon palindromique tandis que ceux de la classe II reconnaissent plutôt une répétition directe de demi-sites. De plus, la boîte P permet à chacun des NR une reconnaissance préférentielle quant à la séquence de l'élément de réponse sur l'ADN. Par exemple, dans le modèle classique de transactivation par ER $\alpha$ , ce dernier reconnaît une séquence spécifique d'ADN dans la région promotrice des gènes ciblés, appelée élément de réponse au oestrogènes (ERE), composée d'une répétition palindromique de deux motifs séparés par trois nucléotides quelconques. La séquence consensus d'un motif est Pu-GGTCA, il en résulte donc l'ERE suivant : Pu-GGTCANNNTGACC-Py où N équivaut à n'importe quel des quatre nucléotides (Sanchez, et al. 2002). Très peu d'ERE consensus sont retrouvés dans le génome humain, mais quelques changements à la séquence peuvent être tolérés, même si cela affecte l'affinité du récepteur pour ces ERE (Bourdeau, et al. 2004).

ER $\alpha$  peut aussi activer la transcription de façon dite non-classique, c'est-à-dire en ne liant pas d'ERE. Pour ce faire, il interagit avec d'autres facteurs de transcription. Par exemple, il peut interagir avec SP1. Ce complexe reconnaît les



**Figure 4 : Domaine de liaison à l'ADN (DBD) des récepteurs nucléaires (NR)**

Le DBD des NR est composé de deux motifs à doigt de zinc et de deux hélices  $\alpha$  reconnaissant l'ADN avec 2 degrés de spécificité. La Boîte P donne une spécificité de reconnaissance pour certains motifs d'ADN tandis que la Boîte D dicte la distance tolérée entre les deux demi-sites sur l'ADN (Ruff, et al. 2000).

demi-sites contenus dans des régions riches en GC, ces régions étant liées par SP1. Aussi, ER $\alpha$  peut servir de coactivateur au facteur de transcription AP-1, c'est-à-dire qu'il ne liera pas lui-même l'ADN, laissant cette tâche à AP-1. De cette façon, les oestrogènes influencent la transcription de gènes ne contenant pas d'ERE dans leur séquence promotrice (Sanchez, et al. 2002).

### 3.2- Le rôle de la dégradation des NR dans leur capacité transactivationnelle

Le protéasome joue un rôle central dans la dégradation rapide des protéines. Les protéines à dégrader par cette voie sont marquées par l'attachement covalent d'une ubiquitine sur un résidu lysine de la protéine cible. Cette ubiquitination est accomplie par une ubiquitine-ligase qui transfère l'ubiquitine d'une des multiples enzymes ubiquitine-conjuguées à la protéine ciblée pour la dégradation. Ensuite, plusieurs ubiquitines peuvent être rajoutées à la précédente afin de former une chaîne. Les protéines poly-ubiquitinées sont reconnues par le complexe 26S du protéasome qui les dégrade (Wilkinson 1999).

La dégradation de ER $\alpha$  par ce mécanisme est modulée par ses différents ligands, dont E2 qui la favorise. Sa dégradation peut être inhibée par le MG132 et la lactocystine, deux inhibiteurs du protéasome (Nawaz, et al. 1999). De plus, l'inhibition de l'ubiquitination de ER $\alpha$  semble empêcher sa capacité à transactiver, ce qui suggère un rôle essentiel de la dégradation dans le mécanisme d'activation de ER $\alpha$  (Lonard, et al. 2000). Aussi, ER $\alpha$  a la capacité d'interagir avec plusieurs composantes de la machinerie du protéasome, comme TRIP1, RPF1, E6-AP et UBC9 (Reid, et al. 2002). Deux mécanismes ont été suggérés pour expliquer cette dépendance. Il est possible que l'ubiquitination du récepteur permette le recrutement de co-activateurs essentiels à sa transactivation ou encore qu'à l'opposé son ubiquitination le rende inactif et que sa dégradation soit nécessaire à son retrait du promoteur. Le blocage du protéasome provoquerait donc une congestion des promoteurs des gènes cibles par des récepteurs inactifs. Cette dernière explication est corroborée par des expériences qui montrent que le récepteur est immobilisé suite au co-traitement par E2 et un inhibiteur du protéasome (Reid, et al. 2002; Stenoien, et al. 2001).

### **3.3- Les actions non-génomiques du ER $\alpha$**

L'action classique du ER $\alpha$  passe par la transcription. Avant de voir un effet sur la cellule, les gènes dont la transcription est activée par ER $\alpha$  doivent aussi être traduits. Par contre, certains effets des oestrogènes sont trop rapides pour passer par ce mécanisme. C'est le cas de la production d'oxide nitrique (Prevot, et al. 1999), de phosphatidylinositotriphosphate (PIP<sub>3</sub>) (Vasudevan, et al. 2005), de l'activation de la voie des MAP kinases (Migliaccio, et al. 2002) et de l'augmentation de la concentration cellulaire en calcium (Wu 2003). Ces actions non-génomiques du ER $\alpha$  passent par deux voies, soit celle des MAP kinases, grâce à l'interaction avec deux protéines impliquée dans ces voie, soit Shc et MNAR (Song, et al. 2002; Wong, et al. 2002), et celle des PIP<sub>3</sub> kinases, le complexe ER $\alpha$ /estradiol ayant la possibilité d'interagir directement avec une sous-unité de la PIP<sub>3</sub> kinase (Simoncini, et al. 2000).

#### 4- Les cofacteurs transcriptionnels

N'ayant pas eux-même la capacité à lier directement l'ADN, les coactivateurs transcriptionnels font le pont entre les NR positionnés sur les promoteurs de gènes cibles et la machinerie transcriptionnelle de base qui assurera l'expression des gènes. Les NR recrutent ces coactivateurs par interactions protéine-protéine impliquant leurs régions AF-1 et AF-2. Pour promouvoir la transcription des gènes cibles, les coactivateurs agissent principalement de deux façons. Ils peuvent recruter ou stabiliser la machinerie transcriptionnelle de base par interaction directe ou indirecte avec différents facteurs généraux de la transcription associés à l'ARN polymérase II ou encore ils peuvent faciliter l'accès de cette machinerie à la chromatine en favorisant son ouverture (Edwards 2000).

##### 4.1- Le motif LXXLL et les interactions protéine-protéine

Le motif protéique LXXLL (L : résidu leucine, X : acide aminé quelconque) est souvent retrouvé dans les coactivateurs transcriptionnels des NR et joue un rôle clé dans l'interaction avec ces récepteurs. Ce motif adopte une structure en hélice  $\alpha$  qui place les trois résidus leucine du même côté de cette hélice. Ainsi positionnés, les trois leucines, et potentiellement d'autres résidus flanquants, forment une surface hydrophobe (Edwards 2000; Heery, et al. 1997).

Suite à la liaison d'un ligand agoniste, l'hélice 12 des NR vient se positionner par-dessus la poche de liaison au ligand (Figure 3a, pour ER $\alpha$ ). Ce changement de conformation expose aussi une cavité hydrophobe. Dans le cas de ER $\alpha$ , les résidus compris dans les hélices 3 (L354, V355, I358 A361 et K362), 4 (F367, V368 et L372), 5 (Q375, V376, L379 et E380) et 12 (D538, L539, E542 et M543) forment la cavité de liaison aux coactivateurs, dont le fond est fortement hydrophobe et les rebords chargés. Cela permet aux chaînes latérales hydrophobes des résidus leucine des motifs LXXLL des coactivateurs d'interagir avec le fond de la cavité. De plus, des résidus chargés formant le rebord de la cavité, soient la lysine 362 contenue dans l'hélice 3 et l'acide glutamique 542 dans l'hélice 12, tous

deux fortement conservés, font des ponts hydrogènes avec le squelette des résidus du motif LXXLL des coactivateurs, ce qui permet le bon positionnement du motif au niveau de la cavité hydrophobe de ER $\alpha$  (Savkur and Burris 2004).

La formation de cette cavité hydrophobe est essentielle au recrutement des coactivateurs et par conséquent, essentielle à l'activation de AF-2. Cependant, en présence d'antioestrogènes, l'hélice 12 de ER $\alpha$  est déplacée de sa position agoniste. En plus, la séquence incorporée dans la portion  $\alpha$ -hélicale change, passant des acides aminés 538 à 546 en position agoniste aux acides aminés 536 à 544 en position antagoniste. Dans cette position, c'est le motif LXXML (540 à 544) situé dans l'hélice 12 même qui, tel le motif LXXLL des coactivateurs, occupe la cavité de liaison aux coactivateurs (Figure 3b) (Shiau, et al. 1998).

#### 4.2- La famille des p160

Identifiés sur la base de leur interaction hormono-dépendante avec la fonction AF-2 des NR par des méthodes de double-hybride ou par «GST pull-down», les coactivateurs de la famille des p160 possèdent plusieurs particularités propres aux coactivateurs transcriptionnels. Cette famille compte trois membres; SRC-1 aussi connu sous le nom de NCoA, SRC-2 ou TIF-2, GRIP-1, NCoA2 et finalement SRC-3 aussi appelé ACTR, AIB1 et RAC3. Ce sont les cofacteurs transcriptionnels des NR les plus étudiés. L'abolition de leur liaison aux NR empêche l'activation par AF-2, tandis que leur surexpression augmente les activités basales et ligand dépendante (Anghel, et al. 2000; Edwards 2000).

Le premier identifié fut SRC-1 à cause de son interaction avec la fonction AF-2 du récepteur à la progestérone. De son côté, SRC-2 fut identifié à cause de son interaction avec le récepteur aux glucocorticoïdes. D'ailleurs un autre nom pour ce cofacteur est GRIP-1 ou «glucocorticoid receptor interacting protein 1». Finalement, SRC-3 a été isolé d'une séquence contenue dans une région chromosomale amplifiée dans une tumeur mammaire, d'où son autre nom de AIB1 ou «amplified in breast cancer 1». Les trois membres interagissent avec ER $\alpha$ . D'ailleurs, les mutations dans AF-2 qui diminuent la liaison des p160 diminuent

aussi l'activité de AF-2, suggérant un rôle primordial de cette famille de coactivateurs dans l'activation transcriptionnelle hormono-dépendante de ER $\alpha$ . De même, les antagonistes du ER $\alpha$  inactivent AF-2 en empêchant la liaison de p160. De plus, lors de l'ablation génique de SRC-1 chez la souris, les spécimens montrent une résistance partielle aux oestrogènes (Edwards 2000).

Les p160 ont aussi été démontrés comme pouvant lier AF-1. C'est par leur région riche en glutamine qu'ils y parviennent. Par contre, contrairement aux autres coactivateurs de AF-1, leur liaison n'est pas stimulée par la phosphorylation de résidus sérine (Sathya, et al. 2002).

#### **4.2.1- La structure et la fonction des protéines de la famille des p160**

N'ayant qu'un degré d'identité de séquence réduit, les p160 ont tout de même des structures et fonctions similaires. La région la plus conservée est dans la partie N-terminale et contient un domaine bHLH (basic helix-loop-helix) et un domaine PAS (period protein self association domain). La présence d'un domaine bHLH au sein d'une protéine signifie habituellement qu'elle a la possibilité de lier l'ADN directement, toutefois cette démonstration n'a toujours pas été faite pour les p160. De même, le domaine de dimérisation PAS ne s'est pas encore révélé fonctionnel chez les p160. Ces faits corroborent l'idée que cette région n'est pas essentielle au rôle des p160 dans l'activation transcriptionnelle menée par les NR (Xu, et al. 1999).

Trois motifs LXXLL sont retrouvés au centre de la séquence des p160 et forment le domaine d'interaction avec les NR (NID). Comme expliqué précédemment, ces motifs sont reconnus par une cavité hydrophobe à la surface des NR, formée lorsque leur hélice 12 recouvre le LBD. Chez les p160, ces motifs sont essentiels pour médier l'activité de AF-2, mais leurs régions flanquantes sont aussi nécessaires pour l'affirmation de leur plein potentiel. Ces séquences flanquantes sont responsables d'interactions préférentielles démontrées par certains NR des membres de la famille des p160 (McInerney, et al. 1998). Comme les récepteurs sont actifs en dimère, il peut y avoir deux molécules de p160

recrutées, ce qui est le cas pour ER $\alpha$  (McInerney, et al. 1998). Cependant des études cristallographiques ont montrée qu'une seule molécule de p160 avait aussi la capacité à lier un dimère de NR, ce qui est plutôt le cas pour les hétérodimères comprenant RXR et pour les homodimères de PR, via deux différents motifs LXXLL de leur NID (Westin, et al. 1998). Les p160 ont aussi la possibilité d'interagir avec les fonctions AF-1 des NR (Oate, et al. 1998). Une deuxième région des p160 a été démontrée comme pouvant lier les NR. Cette région ne contient pas de motif LXXLL. L'interaction serait plutôt due à la présence d'une région riche en glutamine, mais ne serait reconnue que par AF-1, AF-2 préférant les liaisons avec les motifs LXXLL (Oate, et al. 1998).

Suite au recrutement des p160 sur les NR, ces derniers utilisent deux domaines d'activation transcriptionnelle localisés dans la région C-terminale pour médier leurs effets, nommés AD1 et AD2. AD1 est responsable du recrutement du co-activateur CBP ou de son homologue p300. CBP/p300 sont deux co-activateurs de grande taille contenant de nombreux motifs d'interaction avec divers activateurs transcriptionnels, ce qui leur a valu le surnom d'intégrateurs transcriptionnels. Ils possèdent une activité acétyl-transférase avec comme substrat les histones (HAT). L'ajout de groupements acétyles aux histones par les p160 a pour conséquence la décompaction de la chromatine à proximité de site de reconnaissance de facteur de transcription recrutant CBP/p300 (Chen, Huang, et al. 2000; Huang and Cheng 2004).

De son côté, le domaine AD2 des p160 permet le recrutement de CARM1, une méthyltransférase agissant sur les histones H3 et H4, ce qui permet aussi une meilleure accessibilité à la chromatine de la machinerie transcriptionnelle (Daujat, et al. 2002). Les p160 auraient aussi la possibilité d'interagir avec un autre complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant, le complexe SWI/SNF, par l'interaction avec sa sous-unité BAF57. Cette sous-unité est aussi capable d'interactions directes avec les NR. Tandis que les protéines à activité HAT modifient les histones de manière covalente, le complexe SWI/SNF catalyse la relâche des interactions ADN-histone de type ionique (Belandia, et al. 2002).

SRC-1 et SRC-3 possèdent une autre particularité importante. Ils montrent une activité HAT intrinsèque. Cependant, SRC-2 n'a jamais montré une telle activité. Il faut tout de même spécifier que cette activité est beaucoup moindre que celle de CBP/p300 (Spencer, et al. 1997).

#### **4.2.2- La modulation de l'activité des protéines de la famille des p160**

L'activité des p160 peut être la régulée par des modifications post-traductionnelles, soient des phosphorylations ou des acétylations.

Il a été démontré que la phosphorylation de SRC-1 menait à une augmentation de l'activité ligand-dépendante du récepteur de la progestérone. Il a ainsi été suggéré que ces phosphorylations pouvaient être amenées par Erk 1, Erk 2 et EGF qui sont des MAPK (démontré *in vitro*) (Rowan, et al. 2000). De même, il a été démontré que SRC-2 pouvait être phosphorylé par EGF via les MAPK et que cela menait à une augmentation de l'activité du récepteur des androgènes (Gregory, et al. 2004). La phosphorylation des p160 apporte donc une régulation positive de leur activité. Quelques mécanismes expliquant ces observations ont été suggérés. Ces phosphorylations pourraient faciliter le recrutement de CBP/p300 et favoriser l'activité HAT de SRC-1 et SRC-3 (Font de Mora and Brown 2000).

Par contre, l'acétylation des p160 amène une régulation négative de leur activité. L'acétylation de SRC-3 par CBP/p300 inhibe son association avec ER $\alpha$ . Il semblerait que l'acétylation des résidus entourant les motifs LXXLL perturberait l'interaction entre les p160 et les NR, limitant dans le temps la formation du complexe ternaire NR-p160-CBP/p300 (Chen, et al. 1999).

#### **4.3- Les rôles p300 et CBP dans l'activation transcriptionnelle**

Depuis longtemps, l'activation transcriptionnelle a été corrélée avec une hyperacétylation des histones. Cet état favorise la décompaction de l'ADN enroulé autour des histones, ce qui permet une meilleure accessibilité à l'ADN pour tous les facteurs de transcription et la machinerie transcriptionnelle de base (Leo and Chen 2000). CBP et son homologue p300 (CBP/p300), de même qu'un de leur co-

activateur, P/CAF, possèdent l'activité HAT nécessaire à la décompaction de l'ADN (Bannister and Kouzarides 1996; Ogryzko, et al. 1996). Leur interaction avec les NR se fait directement par recrutement, au niveau du LBD, d'un motif LXXLL situé en N-terminal (Nilsson, et al. 2001). Par contre, il est souvent admis que leur recrutement aux NR positionnés sur l'ADN se fait par l'intermédiaire des p160. CBP/p300 peut aussi recruter la ARN polymérase II (Nakajima, et al. 1997).

#### **4.4- Le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base**

Une étape essentielle de l'activation transcriptionnelle apportée par les NR est le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base au promoteur du gène ciblé. Cela se fait via le complexe médiateur, identifié chez l'humain parce qu'il interagissait de façon hormono-dépendante avec le récepteur thyroïdien (Fondell, et al. 1996). En fait, tous les NR ont la capacité à interagir directement avec le complexe médiateur, par l'entremise de la sous-unité TRAP220 qui contient deux motifs LXXLL. Il a été démontré que cette interaction favorisait l'activité transcriptionnelle des NR (Roeder 2005). Le médiateur est constitué de 25 à 30 protéines différentes qui ont la possibilité d'établir des liens avec différentes parties de la machinerie transcriptionnelle de base, dont les TAF (Sato, et al. 2004). Bien que le médiateur ne soit pas essentiel à l'activité basale de la Pol II, il stabilise cette dernière au promoteur et favorise ainsi l'activation de la transcription (Struhl 2005).

#### **4.5- Les corépresseurs transcriptionnels**

Les NR de type II sont liés sur l'ADN de façon intrinsèque, mais ce n'est que suite à une stimulation par un ligand que ces récepteurs adoptent une conformation active leur permettant de recruter les coactivateurs transcriptionnels. En absence de ligand par contre, ces NR sont maintenus inactifs par la présence de corépresseurs transcriptionnels. Les NR de type I peuvent aussi recruter des corépresseurs. C'est le cas lorsque ces récepteurs sont liés par des ligands synthétiques antagonistes développés pour neutraliser l'action des différents NR.

Un corépresseur transcriptionnel est capable, de par sa définition, de diminuer le taux de transcription des NR. Plusieurs mécanismes peuvent être utilisés pour y arriver. Il y a tout d'abord les corépresseurs classiques, qui comportent eux-mêmes un domaine de répression transcriptionnelle. Les plus étudiés parmi les corépresseurs sont certainement NCoR et SMRT, deux protéines structurellement similaires (Ratajczak 2001). Ces corépresseurs font partie de complexes ayant des activités de déacétylation des histones. Ils ont donc un rôle opposé à celui des coactivateurs à activité HAT, compactant la structure de la chromatine par élimination des groupements acétyles des histones (Taunton, et al. 1996). D'autres corépresseurs montrent aussi une activité HDAC, c'est le cas de SHARP, SAFB1 et RIP140, qui entrent aussi dans la catégorie des corépresseurs classiques des NR (Dobrzycka, et al. 2003).

Les corépresseurs des NR utilisent aussi d'autres mécanismes d'inhibition de la transcription. Premièrement, la rétention dans le cytoplasme des NR par différentes protéines qui leur sont complexées peut être considérée comme un mécanisme d'inhibition. Certains corépresseurs ont la capacité de déstabiliser l'interaction entre les NR et leurs coactivateurs. Par exemple, REA compétitionne avec les coactivateurs pour la liaison au LBD de ER $\alpha$  et COUP-TF inhibe la liaison de ER $\alpha$  sur son élément de réponse (Dobrzycka, et al. 2003). Bien sûr, les répresseurs de la machinerie transcriptionnelle, située en aval dans le processus de transactivation, auront aussi un effet négatif sur l'activation par les NR. Finalement, certains NR pourraient être structurellement déstabilisés par la présence de corépresseurs spécifiques (Ratajczak 2001; Wang, et al. 2005).

Une nouvelle classe de corépresseurs liant les NR lorsqu'ils sont liés à un ligand agoniste a été caractérisée. Ce type de corépresseurs ligand-dépendants, qui inclut NRIP-1 et LCoR, pourrait faire partie d'une boucle de rétroaction négative suite à l'activation des NR (White, et al. 2004).

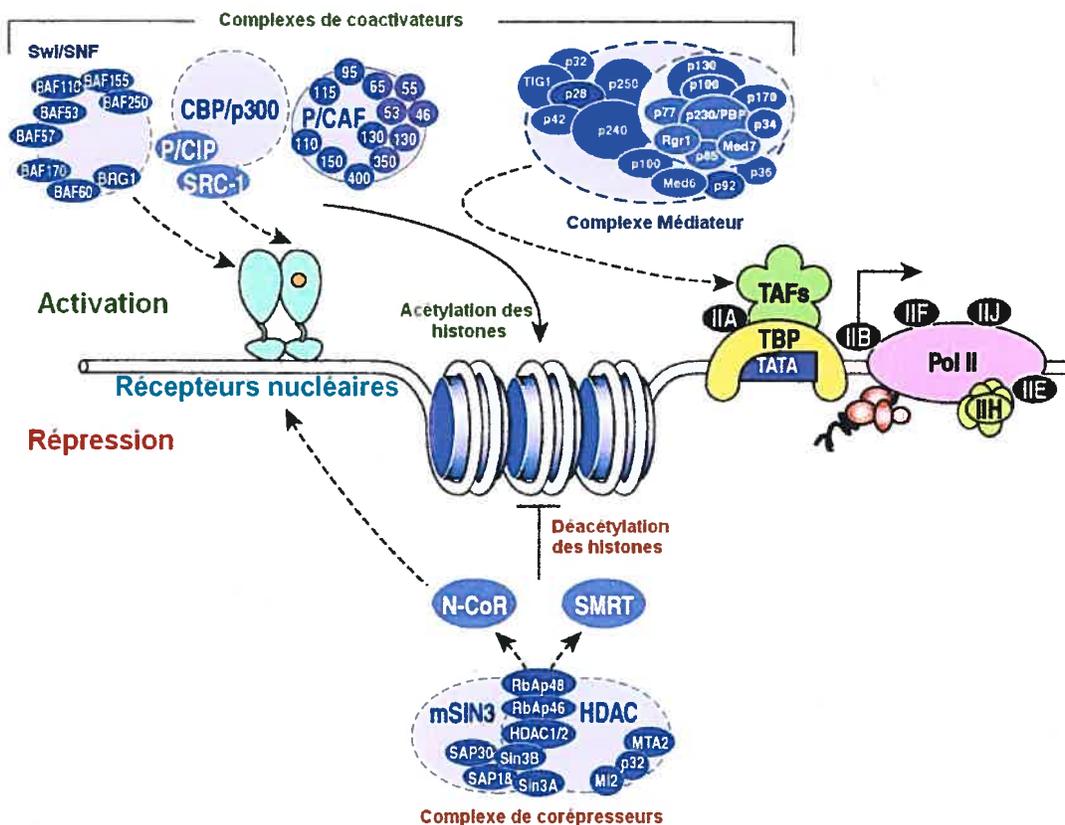
#### 4.6- Les mécanismes d'initiation de la transcription par la machinerie transcriptionnelle générale

Les mécanismes d'activation transcriptionnelle n'ont qu'un seul but : recruter l'ARN polymérase II (Pol II) au promoteur pour initier la transcription du gène cible (Figure 5).

Pour qu'un gène puisse être transcrit, son promoteur doit contenir certains éléments essentiels. Un des éléments les mieux caractérisés des promoteurs est la boîte TATA, de séquence TATAAA, généralement située entre 25 à 30 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. La boîte GC, habituellement située en -80 à -110, est le site de liaison du facteur de transcription Sp1. L'élément initiateur (Inr), qui comme son nom l'indique comprend le site d'initiation de la transcription, est également important pour le recrutement de la machinerie de transcription de base.

La boîte TATA est reconnue par la protéine TBP (TATA binding protein) qui interagit avec les TAF. Ce complexe recrute TFIIB qui a pour rôle de stabiliser le tout et de recruter la Pol II aidé par TFIIF. De son côté, TFIIE recrute et active TFIIH. Ce dernier est une hélicase ATP-dépendante, qui va permettre l'ouverture des doubles brins d'ADN essentielle à la transcription par la Pol II.

La Pol II est composée de 12 sous-unités nommées RPB1 à 12. La plus grande sous-unité a une particularité unique : la répétition d'un hexapeptide en carboxy terminale, nommée CTD. Bien que le nombre de répétition varie, ce motif est très conservé chez les eucaryotes. C'est TFIIH qui en phosphorylant le CTD va favoriser le passage de l'initiation à l'élongation (Hampsey 1998).



**Figure 5 : Mécanisme général d'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires**

Trois complexes différents de coactivateurs transcriptionnels entrent en jeu dans l'activation transcriptionnelle par les NR. Le complexe SWI/SNF possède une activité de remodelage de la chromatine ATP-dépendante. Les complexes CBP/p300 et p/CAF possèdent quant à eux des activités acétyltransférases sur les histones. Ces trois complexes agissent de pair pour relâcher la structure compacte de la chromatine. Le complexe médiateur, quant à lui, est recruté sur les NR dans le but de faire le pont avec la machinerie transcriptionnelle de base. Le complexe de corépresseurs inclut des déacétylases d'histones (HDAC) recrutée via SMRT et NCoR, deux corépresseurs des NR (Glass and Rosenfeld 2000).

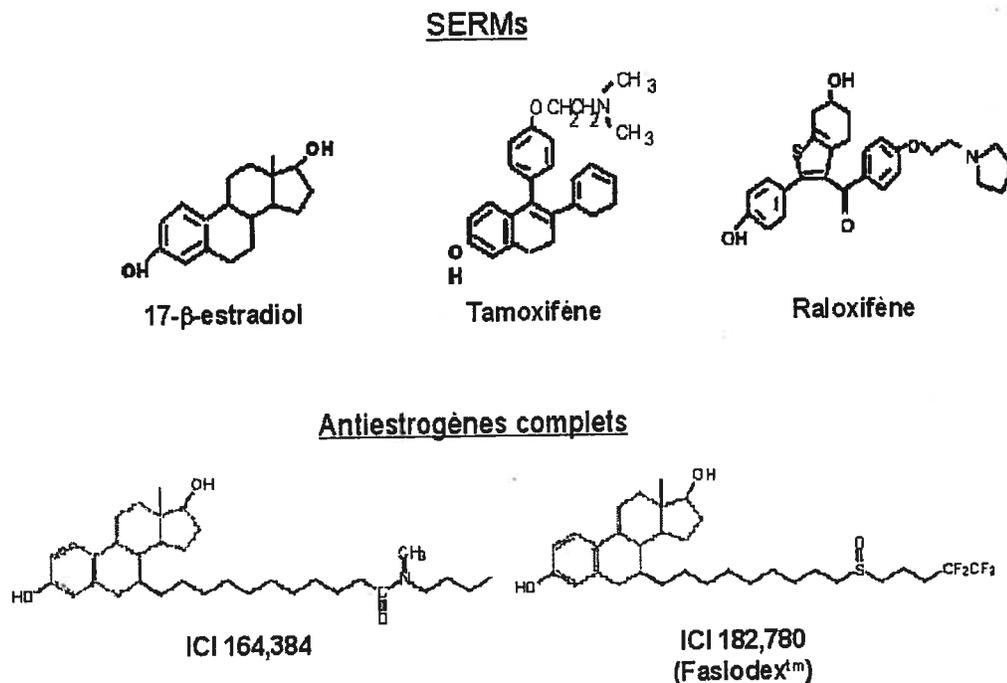
## **5- Le ciblage du récepteur des oestrogènes $\alpha$ dans le traitement du cancer du sein**

Étant donné que les oestrogènes augmentent la croissance cellulaire des tumeurs mammaires et que cet effet est médié via ER $\alpha$  qui est exprimé ou surexprimé dans le deux tiers des tumeurs mammaires, cette voie de signalisation cellulaire a été ciblée pour le développement d'approches thérapeutiques du cancer du sein par l'industrie pharmaceutique (Dickson and Lippman 1988; Kushner, et al. 2000).

Deux grandes catégories d'inhibiteurs ont vu le jour. Tout d'abord les antioestrogènes, ligands synthétiques du ER $\alpha$  qui inhibent ses propriétés d'activation transcriptionnelle. D'un autre côté, les inhibiteurs d'aromatase bloquent une étape essentielle de la synthèse des oestrogènes. L'aromatase catalyse la dernière étape de la synthèse de oestrogènes, soit la conversion d'un androgène, l'androsteredione, en estradiol. En inhibant cette dernière, les inhibiteurs d'aromatase créent un environnement cellulaire dépourvu d'oestrogènes. ER $\alpha$  ne peut donc plus être activé via sa fonction AF-2 (Campos 2004; Jordan 2004). Il est à noter que les deux types d'inhibiteurs ici décrits ciblent la fonction AF-2 du récepteur, laissant une fonction AF-1 possiblement active. Comme les deux types d'inhibiteurs n'utilisent pas du tout le même approche, l'un peut se substituer à l'autre lorsqu'il y a développement de résistance à un des deux traitements (Campos 2004; Jordan 2004).

### **5.1- Les antioestrogènes**

Les antioestrogènes sont des molécules de structures diversifiées qui lient le ER $\alpha$  dans la poche de liaison au ligand et compétitionnent donc avec les ligands agonistes (Figure 6). Le premier antioestrogène développé a été le tamoxifène, dont le métabolite actif est le 4-hydroxy-tamoxifène (OHT). Le tamoxifène est dit antagoniste partiel, c'est-à-dire que dépendamment du contexte cellulaire, il peut aussi parfois agir comme agoniste de ER $\alpha$ . Ce type d'antioestrogène est appelé



**Figure 6 : Antioestrogènes partiels (SERM) et totaux du récepteur des oestrogènes  $\alpha$**

«selective estrogen receptor modulator» (SERM). Le tamoxifène est antagoniste de ER $\alpha$  dans les tissus mammaires, d'où son utilisation en clinique pour traiter le cancer du sein, mais il est aussi agoniste dans d'autres tissus, comme les os et l'endomètre utérin. Son effet agoniste est bénéfique pour le système osseux, préservant contre l'ostéoporose les femmes en post-ménopause. Par contre il semble moins souhaitable au niveau endométrial où il aurait la possibilité d'augmenter le risque de cancer utérin dû à son influence agoniste sur la croissance cellulaire (Jordan 2004).

Un autre antagoniste partiel, le raloxifène, a fait son apparition plus récemment. Efficace dans le traitement des tumeurs mammaires (Cummings, et al. 1999), ce SERM semble dépourvu d'activité agoniste au niveau utérin, lui conférant un avantage par rapport au tamoxifène. De plus, il possède une activité agoniste dans le tissu osseux, ce qui est bénéfique pour le traitement de

l'ostéoporose. Cependant, il aurait une plus faible biodisponibilité que le tamoxifène (Katzenellenbogen and Frasor 2004).

Il existe aussi des antagonistes complets, ou totaux, du ER $\alpha$ . Deux de ces composés, ICI 164,384 et ICI 182,780, représentent les prototypes de cette famille. Bien que tous deux de structure stéroïdienne, ils ne démontrent pas d'activité agoniste. ICI 182,780, aussi nommé Fulvestrant ou Faslodex, est maintenant utilisé comme traitement de dernière ligne contre le cancer du sein (Clarke, et al. 2001).

### **5.1.1- Le mécanisme d'action des antioestrogènes**

Les deux types d'antioestrogènes ont des mécanismes d'actions semblables, mais diffèrent au niveau de leur impact sur certaines propriétés fonctionnelles des récepteurs. Les SERMS vont lier ER $\alpha$  dans sa poche de liaison au ligand, comme le fait E2, à la seule différence que leur chaîne latérale proéminente crée un encombrement stérique empêchant l'hélice 12 du ER $\alpha$  de se replier dans sa position agoniste. Ainsi, l'hélice 12 compétitionnera plutôt pour l'occupation de la cavité de liaison aux coactivateurs via son propre motif LXXML (Brzozowski, et al. 1997). De plus, dans cet état, le récepteur recrutera des corépresseurs transcriptionnels (Smith, et al. 1997).

De leur côté, les antagonistes totaux utilisent une stratégie plus drastique. Une fois liés à ER $\alpha$  au niveau de la poche de liaison au ligand, leur longue chaîne latérale provoquent un changement conformationnel tel qu'ils causent une dégradation accélérée du récepteur, via une augmentation de son ubiquitination (Dauvois, et al. 1993; Parker 1993; Peekhaus, et al. 2004; Van Den Bemd, et al. 1999).

## **6- Variations génétiques et mutagenèse du récepteur des oestrogènes $\alpha$**

Depuis longtemps, une signalisation aberrante par les oestrogènes est associée avec plusieurs maladies, comme la schizophrénie, la maladie de Parkinson, l'ostéoporose et les cancers du sein, du colon et des ovaires. Ces pathologies pourraient être dues à l'expression de formes anormales d'un ER.

Plusieurs variants d'épissage du ER $\alpha$  ont été décrits, mais, dans la plupart des cas, il est difficile de savoir si leur niveau d'expression est assez élevé pour contribuer au dérèglement de la signalisation oestrogénique. Des mutations ponctuelles de ER $\alpha$  ont aussi été décrites, mais ne sont retrouvées que dans environ 1% des tumeurs primaires. Cependant, elles pourraient être plus élevées dans les tumeurs métastatiques. (Herynk and Fuqua 2004) Certaines des ces mutations ne semblent pas affecter le comportement du récepteur. Par contre, plusieurs ont des effets physiologiques notables. Par exemple, la mutation A86V dans la région A/B du récepteur est présente chez des femmes significativement plus grandes que la normale et ayant un risque élevé d'avortement. (Herynk and Fuqua 2004) Les tumeurs mammaires exprimeraient un taux plus faible de ce récepteur muté qu'une tumeur exprimant ER $\alpha$  de type sauvage. La mutation K303R, située près du LBD, est retrouvée uniquement dans des tumeurs mammaires, non dans le tissu sain. Cette mutation caractérise un pourcentage significatif de tumeurs mammaires de patientes américaines, mais est indétectable chez les patientes asiatiques. Elle n'affecte pas la liaison de l'oestradiol (E2) ou du tamoxifène au ER $\alpha$ , mais rend pourtant le récepteur hypersensible transcriptionnellement aux œstrogènes. Ceci serait l'effet d'une plus grande affinité de ce dernier pour SRC-2. Une mutation introduisant un codon d'arrêt en position 437 a été retrouvée chez certaines patientes résistantes au traitement par le tamoxifène. Un des sites de mutations expérimentales le plus étudié, Y537, pourrait être un site de phosphorylation du récepteur. Une mutation à cette position, Y537N, a été retrouvée dans une tumeur mammaire. Ce récepteur mutant démontre une activité transcriptionnelle constitutive en absence d'hormone (Herynk and Fuqua 2004; Nichols and McCarty 2002).

### **6.1- La mutagenèse du récepteur des oestrogènes $\alpha$**

La mutagenèse dirigée expérimentale a pour but de déterminer les acides aminés fonctionnellement importants du ER $\alpha$  sans se limiter aux résidus jusqu'à

maintenant retrouvés comme naturellement mutés. Une panoplie de sites du ER $\alpha$  ont été ciblés par la mutagenèse dirigée.

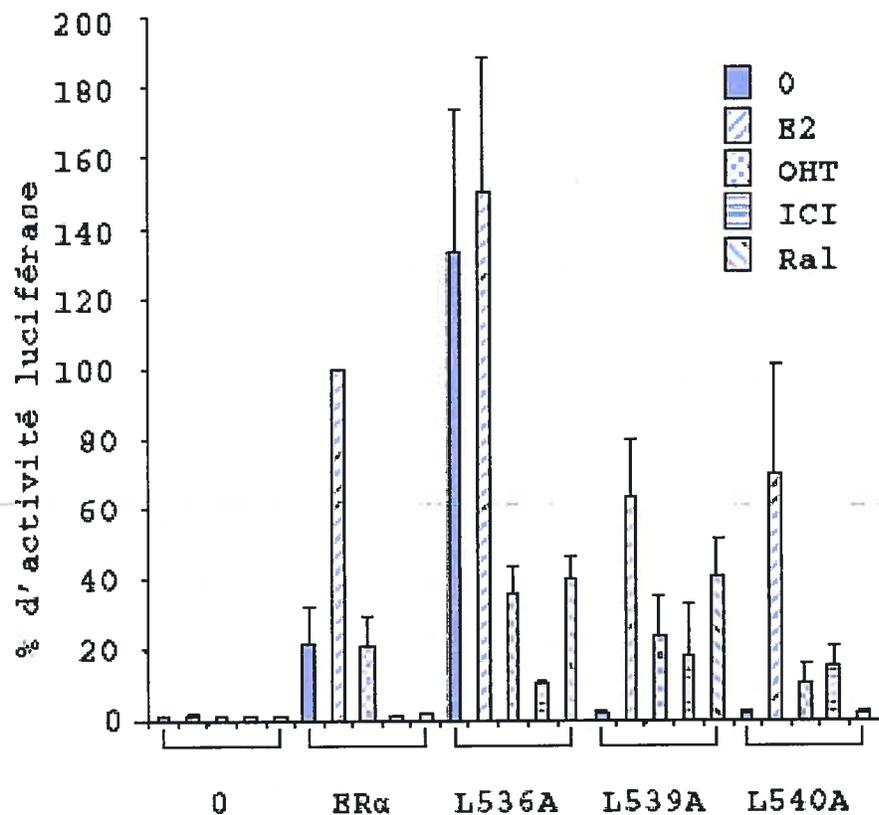
Un rôle important de certains résidus dans la fonction de ER $\alpha$  a pu être ainsi démontré. La sérine en position 118 est un site important de phosphorylation du récepteur et son intégrité est essentielle à sa transactivation maximale. Plusieurs autres résidus sérine ont été identifiés par mutagenèse comme étant la cible de phosphorylations régulatrices, soient S104, S106, S167 et S305. Ces études ont aussi montré l'importance de certains résidus, comme S236, dans la dimérisation du récepteur. Plusieurs mutations, réparties principalement dans les régions D et E du récepteur, mènent à un récepteur ayant une moins grande capacité à transactiver, soient S305A, I358Q, K362D, V376D, W383R, G388V, F425S et D426Y, et certaines le font à cause d'une diminution dans leur capacité à interagir avec les coactivateurs (T311A). D'autres montrent des phénotypes encore plus particuliers. E353Q, située dans le LBD, modifie la spécificité du récepteur en lui faisant préférer les androgènes aux oestrogènes et G400V, aussi dans le LBD, diminue l'activité basale du récepteur. De même, certaines mutations, comme K362A, V376R et E380Q, acquièrent une activité transcriptionnelle élevée en absence de ligand. Y537N est aussi une mutation identifiée comme survenant naturellement. Cela donne un récepteur constitutivement actif avec une affinité réduite pour E2. Situé au bout de hélice 12, ce résidu est impliqué dans le recrutement des coactivateurs et est un site important de phosphorylation. Il aurait aussi un rôle à jouer dans la dimérisation et la liaison à l'ADN du récepteur. (Herynk and Fuqua 2004).

#### **6.1.1- La mutagenèse du récepteur des oestrogènes $\alpha$ menant à une activité agoniste des antioestrogènes**

L'étude de mutations de ER $\alpha$  augmentant l'activité transcriptionnelle du récepteur lorsque ce dernier est complexé aux antioestrogènes devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces derniers. La mutation de l'acide aspartique 351 pour d'autres acides aminés peut survenir naturellement, elle a été

retrouvée chez des tumeurs résistantes au tamoxifène (Herynk and Fuqua 2004). Sa mutation en tyrosine diminue le niveau basal de transactivation du récepteur et augmente l'activité en présence d'antioestrogènes partiels (Anghel, et al. 2000). Cette particularité dépend de l'intégrité de AF-1, suggérant un rôle essentiel de ce domaine. D'un autre côté, la mutation de ce résidu entraîne une interaction réduite avec NCoR et SMRT, ce qui pourrait expliquer, en partie, la mécanisme d'action agoniste du récepteur sous les antioestrogènes partiels. L540Q, situé dans l'hélice 12, est un autre exemple d'une mutation amenant une réduction du niveau basal de transactivation de même qu'une perte de réponse à E2, qui n'est pas due à une perte d'affinité, tout en montrant une activité agoniste des antioestrogènes (Herynk and Fuqua 2004).

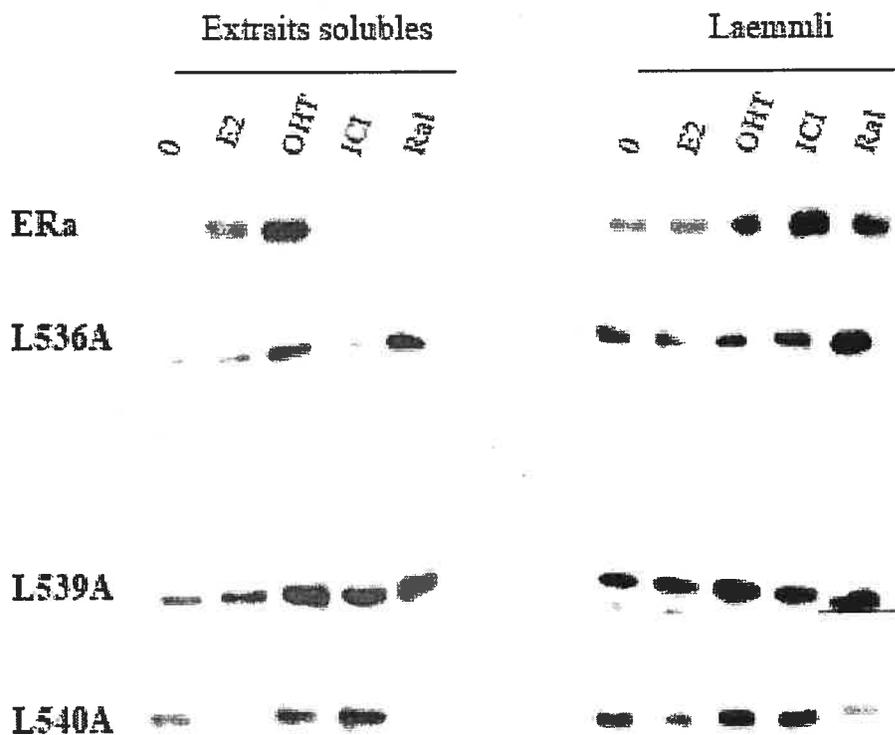
D'autres mutations situées dans la région de l'hélice 12 diminuent le caractère agoniste inverse des différents antioestrogènes. C'est le cas des mutants L536A, L539A et L540A. En test rapporteur sur un promoteur synthétique de type ERE3 dans les cellules HepG2, cellules où l'activité agoniste partielle d'OHT est observable (Figure 7), le mutant L536A démontre non seulement une activité basale accrue, semblable à celle observé sous E2, mais affiche aussi une activité accrue sous OHT, ICI et Ral par rapport au récepteur de type sauvage. La mutation L539A amène aussi une réponse accrue sous traitement à ICI et à Ral, tandis que pour L540A, une activité accrue est observée sous traitement à ICI, mais non sous traitement à Ral. Tout gain d'activité sous traitement aux antioestrogènes de ces mutants est dépendant de l'intégrité de AF-1 (Lupien, et al. 2005).



**Figure 7 : Essai de transactivation sur un rapporteur de type ERE3-tata-luc dans les cellules HepG2 transfectées de façon transitoire**

Des cellules HepG2, des vecteurs d'expression de ER $\alpha$  de type sauvage et des mutants L536A, L539A et L540A ont été transfectées par électroporation de manière transitoire avec le vecteur rapporteur ERE3-TATA-Luc. Un vecteur servant de contrôle interne de transfection, pCMV- $\beta$ Gal, a aussi été co-transfecté. Les cellules ont été traitées avec E2 ( $2,5 \times 10^{-8}$  M) ou avec les antioestrogènes OHT, ICI ou Ral ( $1 \times 10^{-7}$  M). Les données brutes de luminescence ont été normalisées par le niveau d'activité  $\beta$ -galactosidase et le niveau retrouvé sous traitement à E2 pour le récepteur de type sauvage a été ramené à 100% (Lupien, et al. 2005).

De plus, chaque fois que le récepteur démontre une activité accrue suite au traitement par un antioestrogène par rapport à la réponse obtenue avec le récepteur de type sauvage, la fraction de récepteur disponible dans une fraction soluble (extraction protéique avec un tampon à haute teneur en sel) est augmentée par rapport à ce qui se retrouve dans un extrait total (extraction protéique au tampon Laemmli) comparativement à la situation observée avec le récepteur de type sauvage. (Figure 8) Par contre, une stabilisation du récepteur dans la fraction soluble n'est pas garante d'un plus grand niveau de transactivation dans cette condition. Ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle l'activité agoniste inverse des antioestrogènes est dépendante d'une inhibition stérique entre la chaîne latérale des antioestrogènes et les résidus hydrophobes de l'hélice 12 du récepteur, ce qui résulte en une perte de solubilité du récepteur et ainsi une incapacité à transactiver (Lupien, et al. 2005)



**Figure 8 : Essai de dégradation de diverses formes de ER $\alpha$  dans les cellules HepG2**

Suite à la transfection de vecteurs d'expression de ER $\alpha$  de type sauvage et des mutants L536A, L539A et L540A, les cellules HepG2 ont été traitées pour 16h avec E2 ( $2,5 \times 10^{-8}$  M) ou avec les antioestrogènes OHT, ICI ou Ral ( $1 \times 10^{-7}$  M). Des extraits protéiques récoltés dans les tampons d'extraction HSB (50ug) et Laemmli ont été analysés par SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western avec un anticorps ciblant ER $\alpha$  (B10) (Lupien, et al. 2005).

## 7- Synthèse de ER $\alpha$ chez l'humain

L'unité génétique à la base de l'expression de ER $\alpha$  est répartie sur plus de 300 kilobases du chromosome 6 chez l'humain. ER $\alpha$  peut être transcrit à partir d'au moins sept promoteurs différents, ce qui conduit à des transcrits possédant des régions 5'UTR variables. (Kos, et al. 2001) Les différents promoteurs de ce gène sont utilisés différemment selon les tissus. (Reid, et al. 2002; Rocha, et al. 2005) Bien que chacun des promoteurs peut être utilisé pour donner un récepteur de pleine longueur, certains épissages alternatifs ont été rapportés. Par exemple, l'exon encodé par le promoteur F a été démontré comme étant épissé directement au deuxième exon de la protéine dans 10% des cas dans les cellules de carcinomes mammaires MCF7. Cela donne un récepteur tronqué auquel il manque la fonction AF-1. (Flouriot, et al. 2000)

La régulation de l'expression de ER $\alpha$  dans les cellules saines est très peu établie. Contrairement dans les tumeurs mammaires, l'expression de ER $\alpha$  est connue pour être modulée par une région de 35 paires de bases en position -3.7 kilobases. Cette région peut être liée entre autres par le facteur AP-1. De plus, ER $\alpha$  serait impliqué dans un processus d'auto-régulation de son expression et ce de manière hormono-dépendante. (Reid, et al. 2002)

Différents polymorphismes de ce gène ont été rapportés. Ils sont associés avec plusieurs pathologies comme les cancers du sein et de la prostate, l'ostéoporose, la maladie d'Alzheimer et des troubles cardiovasculaire. De plus, certains polymorphismes sont associés avec une augmentation des cas d'obésité du haut du corps et un retard de la puberté chez les jeunes filles. (Gennari, et al. 2005)

## **CHAPITRE II: OBJECTIFS**

La liaison de E2 permet de stabiliser l'hélice 12 (H12) du LBD sur la poche de liaison au ligand. Dans cette position, H12 ainsi que d'autres acides aminés du LBD forment le sillon hydrophobe de liaison aux coactivateurs et participent au recrutement des coactivateurs possédant un motif LXXLL. De plus, la capacité transactivationnelle du récepteur est couplée à sa dégradation par le protéasome. À l'opposé, les antioestrogènes, par leur chaîne latérale protubérante, provoquent un positionnement différent de H12. Cette dernière va plutôt occuper le site de liaison aux coactivateurs, par son motif LXXML, lorsque ER $\alpha$  est complexé aux antiestrogènes partiels, tandis qu'elle ne s'associera pas du tout au reste du LBD lorsque le récepteur est complexé aux antiestrogènes totaux. En plus, les antioestrogènes perturbent la dégradation et la distribution du récepteur, ce qui modifie sa capacité transactivationnelle.

Dans des expériences de transfections transitoires dans les cellules HepG2 des mutations ponctuelles de ER $\alpha$  dans H12, soient L536A, L539A et L540A, génèrent une activité transcriptionnelle accrue du récepteur sur un promoteur minimal en présence de l'antiestrogène total ICI 182,780 (ICI) et/ou de l'antiestrogène raloxifène (Ral). Normalement, Ral et ICI agissent comme des antagonistes totaux sur le récepteur sauvage dans ce système. Ces résultats suggèrent qu'une inhibition stérique entre la chaîne latérale des antioestrogènes et les résidus longs hydrophobes de H12 (leucines) entraîne à la fois une perte d'activité transcriptionnelle sur un vecteur rapporteur synthétique et une perte de solubilité du récepteur, car la mutation de ces long résidus hydrophobes en résidus beaucoup plus petits, soit en alanines, entraîne une transactivation accrue du récepteur en présence d'ICI et/ou de Ral sur un promoteur minimal de même qu'une plus grande disponibilité du récepteur dans une fraction cellulaire soluble.

Notre but dans cette étude était de vérifier que les gains d'activité observés en transfection transitoire sur un vecteur rapporteur synthétique sont observables également sur des gènes cibles naturels. Également, nous désirions vérifier s'il y a toujours une relation entre les niveaux de récepteurs solubles et l'activité de ces récepteurs en présence d'antioestrogènes.

Pour ce faire, nous avons généré des lignées exprimant ER $\alpha$  sauvage ou muté dans une lignée mammaire n'exprimant pas ER $\alpha$  (MDA-MB-231), mais dans laquelle il est possible de réintroduire le récepteur par transfection stable. Nous avons tout d'abord vérifié que le profil transcriptionnel endogène des différents mutants est comparable à celui observé dans les cellules HepG2 avec un promoteur minimal. Enfin, nous avons mesuré les profils d'activité transcriptionnelle des récepteurs mutés sur deux gènes cibles contenant des éléments de réponse aux oestrogènes, GREB et TFF1, en présence d'oestrogènes et d'antioestrogènes.

---

Ainsi, l'activité agoniste sous ICI et Ral des mutants L536A, L539A et L540A de ER $\alpha$  peut être observée sur des gènes endogènes dans les lignées nouvellement dérivées des MDA-MB-231 en utilisant la technique de PCR en temps réel. Par des essais de dégradation dans ces mêmes lignées, il sera possible de vérifier la corrélation observée entre la disponibilité du récepteur dans la fraction soluble et sa capacité transactivationnelle en présence d'antioestrogènes.

## **CHAPITRE III : MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## **1-Culture cellulaire**

### **1.1- Culture des cellules MDA-MB-231**

Les cellules MDA-MB-231 sont des cellules de carcinomes mammaires n'exprimant pas ER $\alpha$  de façon endogène. Elles ont été cultivées dans le milieu DMEM complété avec 5% de sérum fœtal bovin (FBS), 1% d'un mélange de pénicilline et de streptomycine (respectivement 10 000IU et 10mg/mL, Multicell) et de 1% de sodium pyruvate (100mM, Multicell) dans un atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C. Les cellules sont passées deux fois par semaine avec une dilution de 1 :3.

Préalablement à chacun des traitement hormonaux, les cellules ont été maintenant pendant 48 à 72h dans un milieu DMEM dépourvu en rouge de phénol (milieu blanc), complété avec 5% de FBS traité au charbon actif (FBST) 1% d'un mélange de pénicilline et de streptomycine (respectivement 10 000IU et 10mg/mL, Multicell), 1% de sodium pyruvate (100mM, Multicell) et 1% de L-glutamine (200mM, Multicell) dans un atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C. Le sérum est traité au charbon actif afin d'éliminer une bonne partie des stéroïdes qui y sont présents. De cette façon, les niveaux sans traitement hormonaux sont moins élevés. De même, on évite d'ajouter du rouge de phénol au milieu, car ce dernier possède une forte activité oestrogénique, ce qui apporte un bruit de fond très élevé.

### **1.2-Génération des lignées MDA-MB-231 exprimant ER $\alpha$ de type sauvage ou mutant**

Des cellules MDA-MB-231 ont été électroporées avec les vecteurs pCDNA3-hygro, pCDNA3-hygro-HEG0, pCDNA3-hygro-L536A, pCDNA3-hygro-L539A et pCDNA3-hygro-L540A. Ce vecteur confère le gène de résistance à l'hygromycine dont l'expression est sous contrôle d'un promoteur différent de celui utilisé pour l'expression des différents formes du récepteur (pour la carte de

vecteur, voir Annexes, document 1). 300 000 cellules par condition ont été électroporées en présence de 50 µl d'un mélange contenant 5 µg de plasmide, 210 mM NaCl et 35 µg d'ADN de sperme de saumon (Invitrogen) à 250V et 975µF à l'aide d'un électroporateur Gene Pulser de BioRad et plaquées dans des pétris de 10cm de diamètre. 300 000 cellules non transfectées ont servies de contrôle. 48h après la transfection, les cellules ont été divisées avec des dilutions de 1 :5, 1 :50 et 1 :500 et mis sous sélection avec 0,25 mg/mL d'hygromycine (50mg/mL, Invitrogen) dans le milieu. Après 10 jours, les cellules non transfectées étant toutes mortes, les colonies monoclonales formées sur les pétris ont été repiquées dans des plaques à 24 puits à l'aide d'anneaux de clonage.

## **2- Essais luciférase**

### **2.1- Transfection transitoire pour la détermination des clones MDA-MB-231 positif pour leur expression du ERα de type sauvage ou mutant**

Après 48 à 72h passé dans un milieu sans rouge de phénol, chacun des clones a été transfecté de façon transitoire par le vecteur ERE3-tata-luc. 500 000 cellules par condition ont été électroporées en présence de 50 µl d'un mélange contenant 2 µg de chacun des plasmides (ERE3-tata-luc et pCMV-βgal), 210 mM NaCl et 16 µg d'ADN de sperme de saumon (Invitrogen) à 250V et 975µF à l'aide d'un électroporateur Gene Pulser de BioRad puis divisées pour être plaquées dans deux puits de plaque à 6 puits. Un des puits a été traité à l'éthanol (véhicule), l'autre avec  $2,5 \cdot 10^{-8}$  M d'oestradiol (E2) dilué dans l'éthanol pour 48h.

### **2.2 Transfection transitoire pour essai de transactivation**

Après 48 à 72h passé dans un milieu sans rouge de phénol, les cellules MDA-MB-231 vecteur (clone 10A), HEG0 (clone 22A), L536A (clone 1B), L539A ( clone 4A) et L540A (clone 6B) ont été transfectées de façon transitoire par le vecteur ERE3-tata-luc. 5 000 000 de cellules par condition ont été

électroporées en présence de 100  $\mu$ l d'un mélange contenant 2  $\mu$ g de chacun des plasmides (ERE3-tata-luc et pCMV- $\beta$ gal), 210 mM NaCl et 36  $\mu$ g d'ADN de sperme de saumon (Invitrogen) à 250V et 975 $\mu$ F à l'aide d'un électroporateur Gene Pulser de Biorad, puis divisées pour être plaquées dans cinq puits de plaque à 6 puits. Un des puits a été traité à l'éthanol (véhicule), un deuxième avec  $2,5 \cdot 10^{-8}$  M d'oestradiol (E2) dilué dans l'éthanol, les 3<sup>e</sup>, 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> avec  $1 \cdot 10^{-7}$  M de, respectivement OHT, ICI et Ral dilués dans l'éthanol pour 48h.

### 2.3- Extraction et réaction enzymatique de la luciférase

Le surnageant des cellules est aspiré et les cellules sont rincées 2 fois au PBS 1X. Les protéines sont extraites en ajoutant 200 $\mu$ L de tampon de lyse (TRIS 200 mM pH 7,9, 1% NP-40), par puits et en incubant 5 minutes à température de la pièce. 10 à 100  $\mu$ L d'extrait cellulaire sont ajoutés à 100 $\mu$ l de tampon luciférine (1 mM D-luciférine, 4 mM ATP, 0,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM coenzyme A dans le tampon Tris 100 mM pH 7,9) dans des plaques de plastique opaque à 96 puits. La luminescence a été mesurée en utilisant l'appareil Fusion  $\alpha$ -FP de Packard.

### 3- Essais $\beta$ -galactosidase

L'efficacité de transfection est standardisée grâce au contrôle interne d'expression de la  $\beta$ -galactosidase amené par le vecteur pCMV- $\beta$ gal. Les niveaux d'activité sont normalisés à partir de ce test. 40  $\mu$ L d'extraits cellulaires obtenus avec le tampon de lyse des essais luciférase sont ajoutés à 128  $\mu$ L de tampon Z (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM b-mercaptoéthanol) et 32  $\mu$ L d'une solution de 4 g/L  $\beta$  D-galacto-pyranoside (ONPG) dilué dans le tampon Z. L'activité  $\beta$ -galactosidase est mesurée par dosage colorimétrique à 420nm à l'aide de l'appareil SpectroMax 160 de Molecular Devices.

## **4- Immunobuvardage de type western**

### **4.1- Extraction protéiques au tampon à haute teneur en sel (HSB)**

Le surnageant des cellules MDA-MB-231 vecteur (clone 10A), HEG0 (clone 22A), L536A (clone 1B), L539A (clone 4A) et L540A (clone 6B) est aspiré et les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS 1X froid. Les cellules sont récoltées à l'aide d'un patin de caoutchouc, puis centrifugées à 3500 RPM pour 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et 100 µL de tampon de lyse HSB est ajouté (400 mM KCl, Tris 20 mM pH 7,5, 2 mM DTT, 20% glycérol, 0,18 µg/ml PMSF, 1 µg/ml pepstatine, 2 µg/ml aprotinine, 2 µg/ml leupeptine). Les extraits sont soumis à 3 cycles de gels sur glace carbonique pendant 5 minutes et dégel sur glace. Les extraits sont ensuite centrifugés à 10 000 RPM pendant 15 minutes à 4°C. 2 µL de surnageant est dosé par méthode Bradford (BioRad) pour déterminer la quantité de protéines dans chaque extraits.

### **4.2- Extraction protéiques au tampon Laemmli**

Les cellules récoltées à l'aide d'un patin de caoutchouc, tel que présenté à la section 4.1, sont divisées en deux tubes. Le premier est extrait avec 50 uL de tampon HSB (voir section 4.1) et le surnageant est dosé par la méthode de Bradford (BioRad) pour déterminer le volume à passer sur gel pour obtenir 100 µg de protéines totales. 200 µL de tampon Laemmli 4X (200mM Tris pH6.8, 20% glycérol, 2% SDS, 5% beta-mercaptoéthanol, 0,015% bleu de bromophénol) est ajouté directement au deuxième tube de cellules. Comme les cellules ont été resuspendues dans 4 fois plus de tampon Laemmli que de tampon HSB, 4 fois le volume nécessaire pour l'extrait HSB d'extrait Laemmli est passé sur gel.

### **4.3- Électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide**

50 µg ou 100µg de protéines extraites au HSB sont resuspendus dans un volume approprié de tampon de chargement (Tris 200mM pH 6,8, 1,5 M b-mercaptoéthanol, 2% SDS (sodium dodécyl sulfate), 20% glycérol, 0,015% bleu

de bromophénol). Les extraits HSB et/ou Laemmli sont dénaturés à 85°C pendant 5 minutes et ensuite chargés sur un gel de polyacrylamide 8% dénaturant. La migration des protéines est effectuée à 100V en utilisant un appareil électrophorétique Mini-Protean II de BioRad. Les protéines restent en migration jusqu'à la sortie du bleu de bromophénol.

#### **4.4- Transfert des protéines sur membranes de polyvylidène**

Une membrane Hybond-P (Amersham) de PVDF (polyvylidène difluoride) de 10,5 x 6,5 cm est immergée 20 secondes dans 10 mL de méthanol, rincée 1 minutes dans 10 ml de solution de transfert (25 mM Tris, 150mM glycine, 20% méthanol). Le transfert est effectué en milieu humide dans une cuve électrophorétique BioRad utilisant le tampon de transfert décrit précédemment. Le gel de protéines est déposé sur la membrane préalablement équilibrée se retrouvant du côté de la cathode. Le transfert est effectué à 100V pendant 60 minutes.

#### **4.5- Immunobuvardage de type western**

La membrane est mise du PBS 1X contenant 0,2% de tween (PBST) pendant 5 minutes. La membrane est ensuite bloquée dans une solution de 5% de lait déshydraté solubilisé dans du PBST pendant une nuit à 4°C. La membrane bloquée est rincée 2 fois avec 10 mL de PBST pendant 10 minutes et incubées 2 heures à température de la pièce avec l'anticorps primaires, soient un anti-ER $\alpha$  B10 (anticorps monoclonal de souris, don du Dr Pierre Chambon) ou un anti- $\beta$ -Actine (anticorps monoclonal de souris, Sigma). Les concentrations d'anticorps utilisées sont celles recommandées par le manufacturier.

La membrane est ensuite rincée 3 fois pendant 10 minutes avec 15 mL de PBST à la température de la pièce. Le second marquage s'effectue avec un anticorps secondaire (anti lapin ou souris, CellSignal, 3 dans 10 000 dilué dans PBST 3% d'albumine de sérum bovin (BSA)) ajouté à la membrane qui est incubée 20 minutes à température de la pièce. La membrane est ensuite rincée 3 fois pendant 10 minutes avec 15 mL de PBST à la température de la pièce. Le

marquage est ensuite révélé par luminescence en utilisant la trousse de réactifs ECL (Perkin Elmer) et en exposant sur un film « hyperfilm » de Amersham Biosciences.

Les anticorps liés à la membrane peuvent être élués en utilisant un tampon Re-Blot Plus (Chemicon) et ensuite être re-bloquées et re-marquées.

## **5- PCR en temps réel sur ADNc**

### **5.1- Traitement des cellules pour PCR en temps réel**

Les cellules MDA-MB-231 vecteur (clone 10A), HEG0 (clone 22A), L536A (clone 1B), L539A ( clone 4A) et L540A (clone 6B) ont été cultivées dans du milieu DMEM blanc complété avec 5% de FBST pendant 72h. 5 000 000 de cellules ont été plaquées dans chacun des pétris de 10 cm de diamètre nécessaires. 24h plus tard, les cellules ont été traitées avec de l'éthanol (véhicule),  $2,5 \cdot 10^{-8} \text{M}$  de E2,  $1 \cdot 10^{-7} \text{M}$  de OHT,  $1 \cdot 10^{-7} \text{M}$  d'ICI ou  $1 \cdot 10^{-7} \text{M}$  de Ral pour 48h

### **5.2- Extraction de l'ADN**

Les cellules sont lysées en utilisant 1 ml de TRIzol<sup>™</sup> (Gibco) et l'ARN est extrait en suivant le protocole "TRIzol RNA extraction protocol" de la compagnie GIBCO. L'ARN extrait est resuspendu dans 30  $\mu\text{L}$  d'eau millipore sans RNase et est ensuite dosé par densité optique à 260nm à l'aide de l'appareil SpectroMax 160 de Molecular Devices.

### **5.3- Réaction de transcriptase réverse**

La génération d'ADNc à partir d'extraits d'ARN totaux est effectuée en utilisant la trousse de réaction de transcription réverse "RevertAid H minus direct strand cDNA synthesis kit" de MBI Fermentas utilisant la reverse transcriptase M-MuLV. 2  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux sont utilisés dans chaque réactions avec des oligo(dT)<sub>18</sub>

comme amorces. La réaction finale de 20  $\mu$ L est diluée 10 fois dans l'eau millipore pour faire une solution stock de 200  $\mu$ L.

## 5.4 PCR en temps réel

### 5.4.1- Amorces de PCR en temps réel

Les gènes TFF1 (Trefoil Factor 1), GREB et p36B4 sont ciblés par le PCR.

Voici les séquences des amorces utilisées pour ce faire :

TFF1 sens :	ACCATGGAGAACAAGGTGAT
TFF1 antisens :	AAATTCACACTCCTCTTCTG
GREBcommun sens :	CCACAAAGGGTGGTCTCCAGAA
GREBcommun antisens :	CACTGGCTTGGCCTTGCATATT
P36B4 sens :	TGAAGTCACTGTGCCAGCCCA
p36B4 antisens :	AGAAGGGGGAGATGTTGAGCA

Chaque pair d'amorce amplifie un fragment couvrant une jonction exon-exon de manière à éviter les contaminations par l'ADN génomique. Elles ont été dessinées à l'aide du programme Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)).

### 5.4.2- Mélange réactionnel pour le PCR en temps réel

2 $\mu$ L de la réaction de transcription reverse diluée sont utilisés par réactions de PCR. L'ADN est amplifié avec l'enzyme "Jump Start Taq DNA polymerase" de Sigma. Le mélange réactionnel contient le tampon "Jump Start", la polymérase d'ADN Taq, 0,625X de la solution stock 10'000 X de SybrGreen (Molecular Probe), 0,4mM d'ATP, de CTP, de GTP et de TTP, 250 nM d'amorces et entre 3,5 et 4,5mM de MgCl<sub>2</sub> selon le gène amplifié. Le volume final de réaction est de 25  $\mu$ L et est complété avec de l'eau millipore.

Les conditions optimales pour chacun des gènes en MgCl<sub>2</sub> est de 4 mM pour TFF1 et GREBcommun et 4,5 mM pour p36B4.

### 5.4.3- Cycles de PCR et détection pour le PCR en temps réel

Le programme de PCR effectue une étape d'amorce de la réaction suivie de 50 cycles d'amplification et d'une étape de validation des produits d'amplification. À la première étape, la température est maintenue à 95°C pendant 10 minutes afin de dénaturer des dimères d'ADN pouvant avoir été formés et en permettre l'activation de la polymérase Taq. Chaque cycles d'amplification est ensuite constitués d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 20 secondes, d'une étape d'hybridation des amorces sur l'ADN à 57°C pendant 20 secondes, d'une étape d'élongation de 30 secondes à 72°C et d'une étape de lecture de la fluorescence de 10 secondes à 80°C. Une lecture à cette température permet d'éliminer le bruit de fond généré par des dimères d'amorces ou par l'hybridation d'ADN non spécifique. La dernière étape consiste à faire augmenter graduellement la température du milieu réactionnel tout en lisant la fluorescence générée. Cette étape permet de déterminer si des produits non spécifiques ont été générés lors de l'amplification.

## **CHAPITRE IV : RÉSULTATS**

## **1- Modèles cellulaires de carcinomes mammaires exprimant des versions mutées du ER $\alpha$ stimulées par les antioestrogènes**

Afin d'étudier les mécanismes d'action de mutations du ER $\alpha$  favorisant l'activité agoniste du récepteur lors du traitement aux antioestrogènes, il a fallu développer un modèle cellulaire exprimant de façon stable chacun des ER $\alpha$  mutants en absence de ER $\alpha$  de type sauvage. Cela a mené au choix de la lignée MDA-MB-231, une lignée de carcinome mammaire n'exprimant pas ER $\alpha$  de façon endogène. Ainsi, il est possible d'y transfecter de façon stable les mutants voulus sans bruit de fond provenant du ER $\alpha$  endogène. De plus, cette lignée a précédemment été employée pour générer des lignées stables de ER $\alpha$ . Ainsi on s'assure de l'une uniformité des populations de cellules étudiées afin d'étudier adéquatement les profils d'expressions des gènes en utilisant les techniques de PCR en temps réel et éventuellement de micropuce d'ADN.

### **1.1- Évaluation de l'expression stable de ER $\alpha$ ou de ces mutants dans les cellules MDA-MB-231 par transfection transitoire de vecteurs rapporteurs**

Lors de la transfection transitoire d'un vecteur, un très faible pourcentage des cellules va incorporer ce dernier à leur génome, ce qui peut permettre à une cellule d'acquérir un nouveau bagage génétique. Pour sélectionner ces événements, l'utilisation de gènes de résistance contre des antibiotiques est très utile; seules les cellules ayant subi un événement de recombinaison, et par conséquent exprimant les nouveaux gènes, vont survivre.

Ainsi, les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées de façon stable par le vecteur pCDNA3-hygro contenant ou non l'ADNc codant pour ER $\alpha$  ou les mutants L536A, L539A, L540A, trois mutations contenues dans ou près de l'hélice 12 de ER $\alpha$ . La lignée transfectée par le vecteur ne contenant aucun insert agit comme contrôle négatif, tandis que la lignée transfectée par pCDNA3-hygro-HEG0 (HEG0=ER $\alpha$ ) sert de contrôle positif de référence. Grâce à la résistance contre l'hygromycine conférée par le vecteur, il a été possible d'isoler des colonies

cellulaires monoclonales. Les clones sélectionnés doivent être testés afin de déterminer leur niveau d'expression en récepteur.

Même s'il y a un événement d'intégration du gène de résistance, cela n'implique pas nécessairement l'intégration du gène souhaité sans problème, surtout à cause de la linéarisation du vecteur. En effet, comme ce vecteur exprime le gène de résistance sous contrôle d'un promoteur différent de celui exprimant le récepteur, la linéarisation du vecteur peut mener à l'abolition de l'expression du récepteur sans empêcher celle du gène de résistance. Cela conduit à de nombreux clones faux-positifs et empêche l'utilisation de lignées polyclonales. De plus, le site d'intégration dans le génome aura une influence certaine sur le taux de transcription des gènes. C'est pourquoi il faut déterminer le niveau d'expression du gène voulu après avoir sélectionné plusieurs clones résistants à l'antibiotique. Dans ce cas-ci, une cinquantaine de clones par lignée ont été testés.

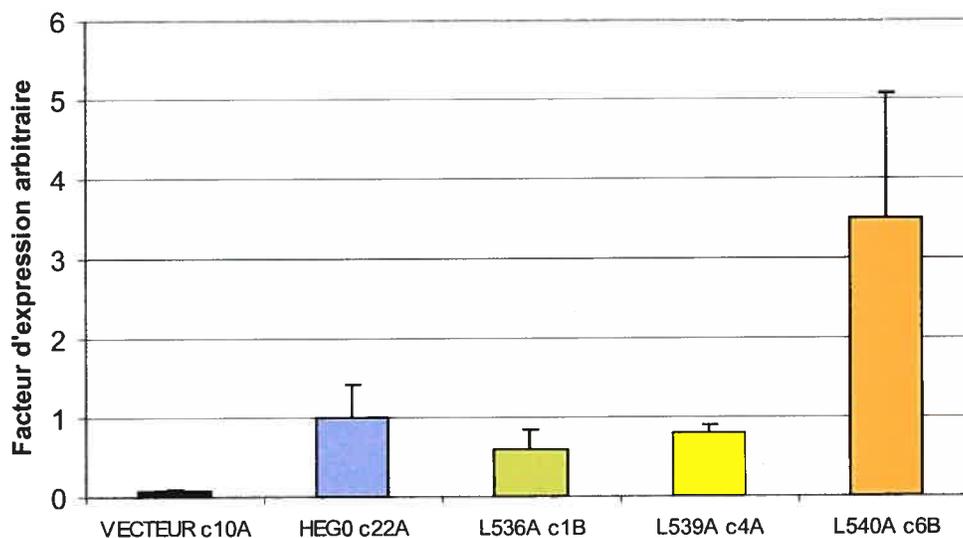
Pour ce faire, les clones obtenus ont été transfectés par le gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'un promoteur de type ERE3, consistant en la répétition de trois ERE consensus. Sous traitement à E2, les clones exprimant une forme de récepteur devraient montrer une activité luciférase accrue comparativement aux cellules ayant intégré le vecteur vide. Ainsi, un premier niveau de sélection de clones positifs a pu être réalisé rapidement (résultats non montrés). Les ratios de clones positifs sur faux positifs obtenus varient entre un clone sur 25 et un clone sur 50.

### **1.2- Détermination des niveaux en ARNm de ER $\alpha$ ou de ses mutants dans les cellules MDA-MB-231 transfectées de façon stable par PCR en temps réel**

La technique de PCR en temps réel permet de comparer les niveaux d'ARNm de manière quantitative entre les différentes lignées. Le gène p36B4 est utilisé comme contrôle interne. Il a été choisi car son expression ne varie pas avec les différents traitements hormonaux appliqués ultérieurement dans les cellules MDA-MB-231 (résultats non montrés). Ce gène encode pour une protéine de de la sous-unité 60S du ribosome. Comme les niveaux en ARNm sont ici quantifiés à

titre comparatif seulement, le niveau de détection observé avec le clone HEG0 c22A a été arbitrairement fixé à 1. Il faut noter que les ARN utilisés pour réaliser cette expérience proviennent de cellules qui ont été traitées par le véhicule utilisé pour les traitements hormonaux (éthanol, EtOH), car il s'agit là des mêmes extraits que ceux utilisés pour les expériences ultérieures.

Comme montré à la figure 9, les niveaux en ARNm de ER $\alpha$  et des mutants ne sont pas tous égaux d'une lignée à l'autre. HEG0 c22A, L536A c1B et L539A c4A donnent des niveaux relativement comparables, tandis que L540A c6B donne un niveau environ 3,5 fois plus élevé que les autres. Cette différence de niveau en ARNm ne peut pas s'expliquer par l'introduction de la mutation en position 540, car il y a très peu de chance que la substitution de deux nucléotides entraîne un changement dans la stabilité de l'ARNm. Elle peut plutôt être expliquée par le site d'intégration dans le génome du vecteur ou par le nombre de copies s'étant intégrées.



**Figure 9 : Comparaison des niveaux d'expression de l'ARNm de ER $\alpha$  de type sauvage ou mutant dans les cellules MDA-MB-231 transfectées de façon stable**

Un demi à un million de cellules MDA-MB-231 HEG0, L536A, L539A, L540A et Vecteur ont été cultivées dans du milieu DMEM sans rouge de phénol contenant 5% FBS filtré au charbon actif (FBST) dans des pétris de 10cm pour 72 heures, puis traitées pour 48 heures avec 10  $\mu$ L d'éthanol (EtOH). Deux  $\mu$ g d'ARN totaux extrait par Trizol ont ensuite été utilisés pour faire une transcription inverse afin de générer des ADNc. Le PCR en temps réel a été réalisé en utilisant le SYBRgreen comme marqueur. Le niveau d'expression du gène de ménage p36B4 est utilisé comme contrôle interne et le niveau d'amplification du messenger de ER $\alpha$  retrouvé dans les MDA-MB-231-Vecteur a été fixé à 1. Les expériences sont réalisées en triplicata et reproduites 2 fois (n=2). Les résultats représentent la moyenne de deux expériences.

### 1.3- Détermination des niveaux d'expression stable de ER $\alpha$ ou de ses mutants dans les cellules MDA-MB-231 par immunobuvardage de type western

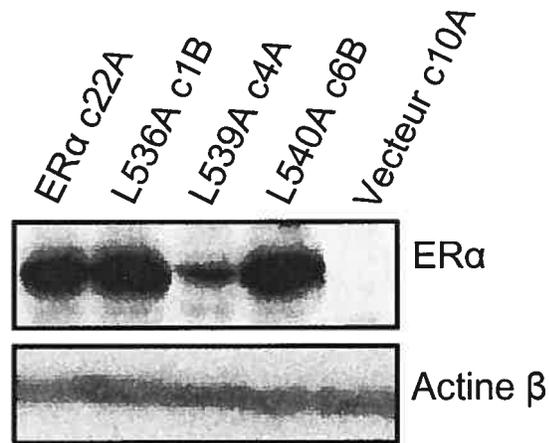
Afin de confirmer l'expression des différentes formes voulues de récepteurs et de comparer les niveaux en protéines, des immunobuvardages de type western ont aussi été réalisés sur des extraits protéiques dans un tampon à haute teneur en sel (HSB) permettant d'extraire les protéines nucléaires. Comme les récepteurs mutants sont aussi bien détectés par l'anticorps anti-ER $\alpha$  que le récepteur de type sauvage, il est possible de comparer les niveaux d'expression des récepteurs entre les lignées.

Le clone 10A transfecté par le vecteur vide ne donne aucun signal en immunobuvardage à la figure 10 (aucune transactivation sur un rapporteur de type ERE3 n'a été détectée), ce qui confirme que le récepteur n'est pas exprimé dans cette lignée. Cela en fait donc une excellente lignée contrôle. Les lignées MDA-MB-231-HEG0 clone 22A, L536A clone 1B et L540A clone 6B montrent des niveaux semblables du récepteur de type sauvage ou de ses versions mutées (figure 10). Par contre, le clone transfecté par le vecteur pCDNA3-hygro-L539A exprime le récepteur correspondant, mais à un niveau moindre que ceux obtenus dans les trois autres lignées générées. Cette expérience prise de façon isolée ne peut indiquer s'il s'agit d'un taux de dégradation plus élevé du mutant L539A à cause de la mutation ou d'un taux de production plus faible de la protéine.

Cependant, les niveaux protéiques de ER $\alpha$  extraits par HSB varient différemment d'une lignée à l'autre comparativement aux niveaux d'ARNm. En effet, il a été déterminé que des niveaux semblables d'ARNm de ER $\alpha$  sont obtenus pour le clone exprimant le récepteur de type sauvage (HEG0) et les mutants L536A et L539A (figure 8), tandis que les niveaux de protéines détectés sont semblables pour le récepteur sauvage et le mutant L536A, mais plus faible pour le mutant L539A. Étant donné que les niveaux de protéines ER $\alpha$  détectés par immunobuvardage dépendent autant du taux de synthèse de la protéine que de son taux de dégradation et que des résultats obtenus dans les cellules HepG2 indiquent les mutations apportées au récepteur affectent sa dégradation (Figure 8), on peut

suggérer que la mutation L539A entraîne une dégradation accrue du récepteur en absence de ligand ou que ce récepteur mutant se retrouve dans une fraction insoluble dans le tampon HSB, car pour un même niveau en ARNm que deux autres clones, il y a moins de protéines du récepteur présentes de ce type de fraction.

De même, on peut conclure que la mutation L536A ne semble pas entraînée une dégradation accrue du récepteur ou ciblé le récepteur dans une autre fraction, puisqu'avec un niveau d'expression en ARNm semblable à celle de la lignée exprimant le récepteur sauvage, il y a aussi un niveau protéique semblable de récepteur. Par contre, pour le mutant L540A, le clone exprime 3,5 fois plus d'ARNm pour donner un niveau protéique de récepteur semblable à celui obtenu pour le récepteur sauvage et le mutant L536A. Ainsi, il est difficile de conclure quoi que se soit sur la stabilité du récepteur en fraction soluble pour le mutant L540A suite aux résultats de cette expérience.



**Figure 10 : Niveau d'expression de ER $\alpha$  de type sauvage ou mutant dans les cellules MDA-MB-231 transfectées de façon stable**

Quatre à cinq millions de cellules MDA-MB-231 HEG0 (ER $\alpha$ ), L536A, L539A, L540A et Vecteur ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 5% FBS dans des pétris de 10 cm. Cinquante  $\mu$ g des extraits protéiques (tampon de lyse HSB) ont été chargés sur gel dénaturant de polyacrylamide 8%. Après migration et transfert sur membrane de PVDF, des immunobuvardages de type western ont été exécutés afin de détecter ER $\alpha$  ou actine  $\beta$ , cette dernière servant de contrôle interne pour la quantité de protéines dans chaque puits. Cette expérience a été reproduite 3 fois (n=2).

#### **1.4- Capacité transactivationnelle des ER $\alpha$ sauvage ou mutants dans les lignées MDA-MB-231 transfectées de façon stable sur un promoteur synthétique de type ERE3**

Il a été démontré que l'activité transcriptionnelle des mutants L536A, L539A et L540A en présence d'antioestrogènes est accrue sur un promoteur synthétique de type ERE3-TATA en transfection transitoire dans les cellules hépatiques HepG2 (Figure 7). Avant d'examiner l'activation des gènes cibles endogènes, nous avons vérifié que les lignées dérivées des cellules MDA-MB-231 montrent des profils d'activité comparables à ceux observés dans les cellules HepG2 en transfection transitoire.

Le même vecteur rapporteur que celui utilisé dans les cellules HepG2, soit un vecteur constitué d'une répétition de trois ERE consensus contrôlant l'expression du gène rapporteur de la luciférase de luciole, a été utilisé dans les nouvelles lignées dérivées des MDA-MB-231 en transfection transitoire (Figure 11). Les cellules ont aussi été traitées avec l'agoniste E2 et les antagonistes OHT, ICI et Ral. Les activités luciférase obtenues sous les divers traitements ont été standardisées par rapport à l'activité de la  $\beta$ -galactosidase, dosée par essai colorimétrique, servant de contrôle interne d'efficacité de transfection. Par contre, les niveaux très variables d'activité de la  $\beta$ -galactosidase détectés entre les différentes lignées ne permettent pas une normalisation suffisante pour permettre de comparer les différentes lignées directement entre elles. Les activités en présence d'E2 pour chacune des lignées ont donc été fixées à 100%, afin de faciliter la comparaison des patrons d'activation plutôt que des niveaux absolus. Ces niveaux variables de  $\beta$ -galactosidase sont possiblement dus à la présence de mycoplasmes dans les cellules au moment des expériences. Ces contaminants, découverts à la fin des expériences, peuvent avoir influencés l'efficacité de transfection et/ou les essais colorimétriques dans les différents clones. Comme l'objectif est de tester l'influence des différents mutants sur l'expression de cible endogène, cette expérience transitoire n'a pas été refaite avec les cellules

décontaminées. Par contre, les expériences ultérieures ont été validées avec des cellules non contaminées.

#### **1.4.1- Capacité transactivationnelle de ER $\alpha$ de type sauvage dans la lignée MDA-MB-231-HEG0 sur un promoteur synthétique de type ERE3**

Comme attendu, à la figure 11, le ER $\alpha$  de type sauvage montre une activité agoniste partielle en présence d'OHT lorsque comparé au traitement par le véhicule (niveau basal) (valeurs équivalentes lorsque comparées par un test de Student avec  $t_{w/2}$  de 0,05) et aussi bien ICI que Ral se comportent comme des antagonistes totaux (les valeurs en absence ou en présence de OHT, ICI et Ral sont significativement différentes d'après un test ANOVA avec un  $F\alpha$  de 0,05), réprimant le niveau de transactivation basal de manière quasi complète. Le patron de transactivation observé dans cette lignée correspond en tout point à ce qui est observé sur le même type de promoteur dans la lignée HepG2 (Figure7).

#### **1.4.2- Capacité transactivationnelle du mutant L536A de ER $\alpha$ dans la lignée MDA-MB-231-L536A sur un promoteur synthétique de type ERE3**

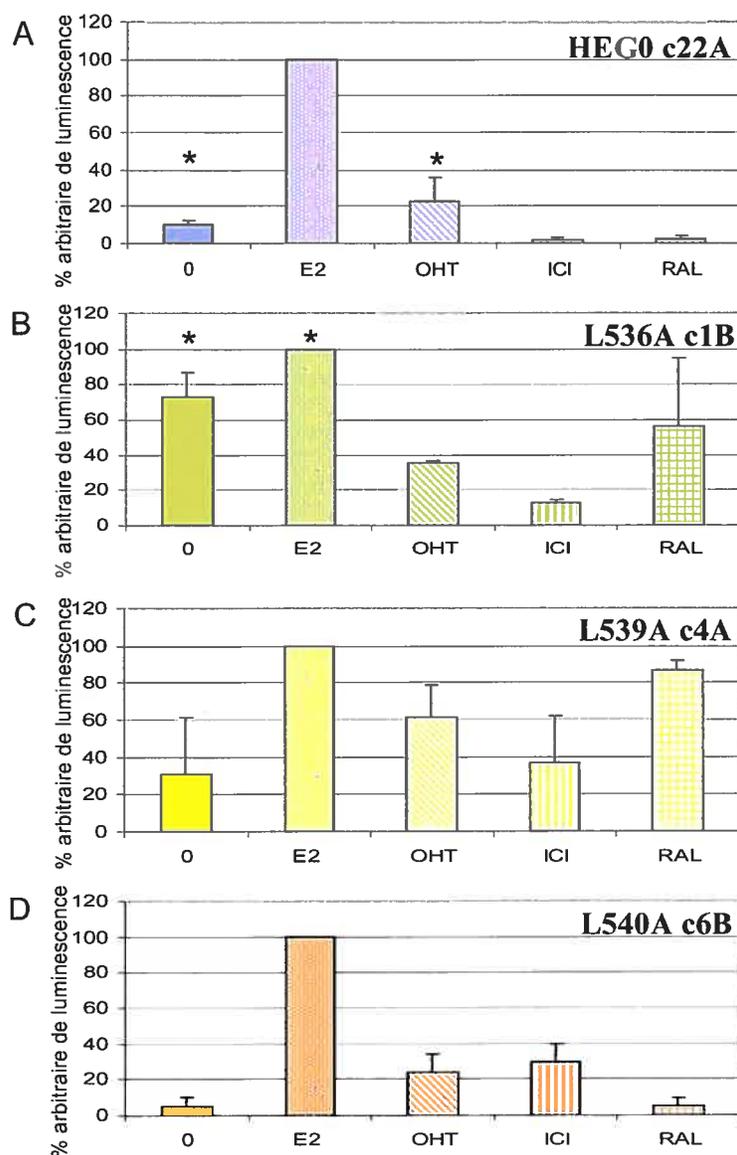
Dans la lignée HepG2, il avait été observé que le mutant L536A possédait une activité transcriptionnelle constitutive en plus de démontrer une activité agoniste partielle en présence d'OHT, d'ICI et de RAL (Figure 7). Dans la lignée MDA-MB-231 exprimant ce même mutant, l'activité basale du récepteur est presque égale à celle observée en présence d'hormone comme montré à la figure 11 (les valeurs sont comparable d'après un test de Student avec un  $t_{w/2}$  de 0,05). Avec un récepteur de type sauvage, les antioestrogènes répriment partiellement l'activité basale. Cependant, comme observé dans les cellules HepG2, les niveaux de transactivation observés en présence de Ral sont maintenant comparables à ceux observés avec OHT. De plus, ICI affiche aussi une augmentation de l'activité transcriptionnelle, bien qu'elle reste moins élevée que celle d'OHT ou Ral. Le caractère antagoniste total de Ral et ICI est donc partiellement perdu avec cette mutation.

#### **1.4.3- Capacité transactivationnelle du mutant L539A de ER $\alpha$ dans la lignée MDA-MB-231-L539A sur un promoteur synthétique de type ERE3**

La mutation en alanine en position 539 apporte une activité accrue sous tous les antioestrogènes, même si ICI reste l'antioestrogène qui réprime la transcription le plus efficacement, ramenant l'activité au niveau observé sans traitement (figure 11). C'est aussi ce qui a été observé dans la lignée HepG2, mais dans cet essai, il a été possible de remarquer que le mutant avait un moins bon pouvoir de transactivation sous E2 que le récepteur sauvage, à cause de l'utilisation d'une méthode de normalisation qui ne peut être utilisée ici. En effet, dans les cellules HepG2, le niveau de transactivation obtenu sous E2 avec le récepteur sauvage a été fixé à 100%. Ainsi l'activité de chacun des mutants est exprimée en pourcentage de celle du récepteur sauvage. L539A pourrait aussi être moins actif dans la lignée MDA-MB-231, mais on ne peut en être certain, dû à la méthode de normalisation utilisée. Dans ces essais, les activités obtenues sous traitement à E2 ont été fixées arbitrairement à 100% pour chacun des clones, car il s'agit de lignées cellulaires différentes, comparativement aux essais faits dans les HepG2.

#### **1.4.4- Capacité transactivationnelle du mutant L540A de ER $\alpha$ dans la lignée MDA-MB-231-L540A sur un promoteur synthétique de type ERE3**

La mutation en position 540 augmente l'activité transcriptionnelle en présence d'ICI mais pas de Ral (Figure 11). En effet, pendant qu'ICI montre une activité agoniste partielle semblable à celle d'OHT, Ral conserve le rôle d'antagoniste total observé avec le récepteur de type sauvage. C'est aussi exactement ce qui avait été observé dans la lignée HepG2 (Figure 7).



**Figure 11 : Essai de transactivation sur un rapporteur de type ERE3-tata-luc dans les cellules MDA-MB-231 transfectées de façon stable**

Des cellules MDA-MB-231 HEG0 (A), L536A (B), L539A (C) et L540A (D) ont été transfectées par électroporation dans des plaques à 6 puits de manière transitoire avec le rapporteur ERE3-TATA-Luc. Un vecteur servant de contrôle interne de transfection, pCMV- $\beta$ Gal, a été co-transfecté. Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM sans rouge de phénol complété avec 5% FBST 72h avant de les transfecter et de les traiter avec E2 ( $2,5 \times 10^{-8}$ M) ou avec les antioestrogènes OHT, ICI ou Ral ( $1 \times 10^{-7}$ M). Les données brutes de luminescence ont été normalisées par le niveau d'activité  $\beta$ -galactosidase et les niveaux retrouvés sous traitement à E2 ont été fixés à 100% pour chacun des clones. Les expériences sont réalisées en duplicata et reproduites 2 fois, la moyenne des deux expériences étant représentée. Les niveaux marqués d'une étoile (\*) sont semblables d'après un test de Student avec un  $t_{\alpha/2}$  de 0,05.

### **1.5- Capacité transactivationnelle des ER $\alpha$ sauvage ou mutants dans les lignées MDA-MB-231 transfectées de façon stable sur des promoteurs endogènes**

Un des buts de la génération de nouvelles lignées dérivées des MDA-MB-231 est d'étudier le profil d'expression des gènes cibles endogènes de ER $\alpha$  en présence des différentes mutations et des différents ligands, afin de s'assurer que ce qui est vu sur le rapporteur ERE3 n'est pas spécifique à ce rapporteur synthétique. Cette étude est réalisée grâce à la technique de RT-PCR en temps réel.

Pour la normalisation des résultats, il faudra tenir compte des niveaux d'expression de ER $\alpha$ . Comme l'expression des différentes formes de récepteurs se fait dans toutes les lignées à partir du même vecteur d'expression, la normalisation sera effectuée par rapport au niveau d'expression de l'ARNm. Ceci permet de ne pas biaiser les résultats si une mutation affecte la stabilité du récepteur à l'état non stimulé. Il est aussi à noter que les niveaux d'ARNm de ER $\alpha$  ne varient pas suivant les traitements hormonaux, contrairement aux niveaux protéiques. De plus, les niveaux en ARNm de ER $\alpha$  ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel, qui est une technique beaucoup plus sensible et quantitative que la technique d'immunobuvardage et qui produit des résultats beaucoup plus précis. Cependant, il faut noter qu'un niveau d'ARNm, et dans ce cas-ci, qu'un niveau de production de protéines, deux fois plus élevé n'est pas garant d'une capacité transactivationnelle exactement deux fois plus élevée sur tous les gènes cibles. Pour cette raison, les résultats de RT-PCR en temps réel seront présentés sous deux formes, soient une avec pour seule normalisation le gène p36B4 et l'autre prenant en plus en compte l'expression en ARNm de ER $\alpha$ . Une partie des résultats présentés ici ont été obtenus avec des cellules qui étaient potentiellement contaminées aux mycoplasmes. Des résultats très semblables ont été obtenus avec les cellules après décontamination ce qui confirme que cela est sans influence sur les résultats obtenus précédemment.

### **1.5.1- Capacité transactivationnelle des ER $\alpha$ sauvage ou mutants dans les lignées MDA-MB-231 transfectées de façon stable sur le promoteur du gène TFF1**

Le gène TFF1 (trefoil factor 1, ou pS2) code pour une protéine de fonction mal connue sécrétée dans la muqueuse gastro-intestinale. La protéine correspondante contient un motif en trèfle qui est un domaine de 40 acides aminés contenant trois ponts disulfures. TFF1 est également exprimé dans les tumeurs humaines, dont des cas de cancers du sein positifs pour les récepteurs des oestrogènes. Dans ces cellules, son expression est inductible par les oestrogènes grâce à la présence d'un ERE imparfait en position -400 paires de bases par rapport au site d'initiation de la transcription (Barkhem, et al. 2002b; Bossenmeyer-Pourie, et al. 2002; Bourdeau, et al. 2004; Metivier, et al. 2003; Sanchez, et al. 2002).

#### **1.5.1.1- Capacité transactivationnelle de ER $\alpha$ sauvage dans la lignée MDA-MB-231-HEG0 sur le promoteur du gène TFF1**

N'exprimant aucune forme de ER $\alpha$ , la transcription du gène TFF1 n'est pas induite par les oestrogènes dans la lignée contrôle (MDA-MB-231-Vecteur). Ces conditions font rôle de contrôle négatif (Figure 12A). Ce clone n'apparaît pas dans la figure 12B, où la normalisation est faite sur le niveau d'ARNm de ER $\alpha$  en plus de celui de p36B4, son niveau d'expression de l'ARNm de ER $\alpha$  étant indétectable.

Dans la lignée MDA-MB-231-HEG0, TFF1 se comporte comme un gène cible des oestrogènes (Figure 12). En effet, sa transcription est augmentée d'environ huit fois suite au traitement par l'estradiol. OHT n'y démontre pas d'activité agoniste partielle comme sur un rapporteur de type ERE3 (Figure 11), mais il n'est pas non plus agoniste inverse sur ce gène, puisqu'il permet un niveau basal de transcription semblable à ce qui est retrouvé en absence d'hormone d'après un test de student (degré de liberté de 0,05). Comme attendu, ICI et Ral jouent des rôles d'agonistes inverses dans ces conditions (Figure 12B), c'est-à-dire

que dans ces conditions, le niveau de transcription est inférieur à ce qui est observé sans traitement (confirmé par des tests de student au degré de liberté de 0,05).

#### **1.5.1.2- Capacité transactivationnelle du mutant L536A dans la lignée MDA-MB-231-L536A sur le promoteur du gène TFF1**

Le mutant L536A est caractérisé par son activité basale, en absence de ligand sur un promoteur de type ERE3 (Figure 11). Ce mutant est le seul à ne démontrer aucune induction de l'expression de TFF1, les niveaux détectés sous tous les traitements étant toujours semblables à ceux rencontrés avec le récepteur sauvage sans hormone (Figure 12), ce qui est confirmé par un test d'ANOVA avec une valeur de  $F\alpha$  de 0,05.

#### **1.5.1.3- Capacité transactivationnelle du mutant L539A dans la lignée MDA-MB-231-L539A sur le promoteur du gène TFF1**

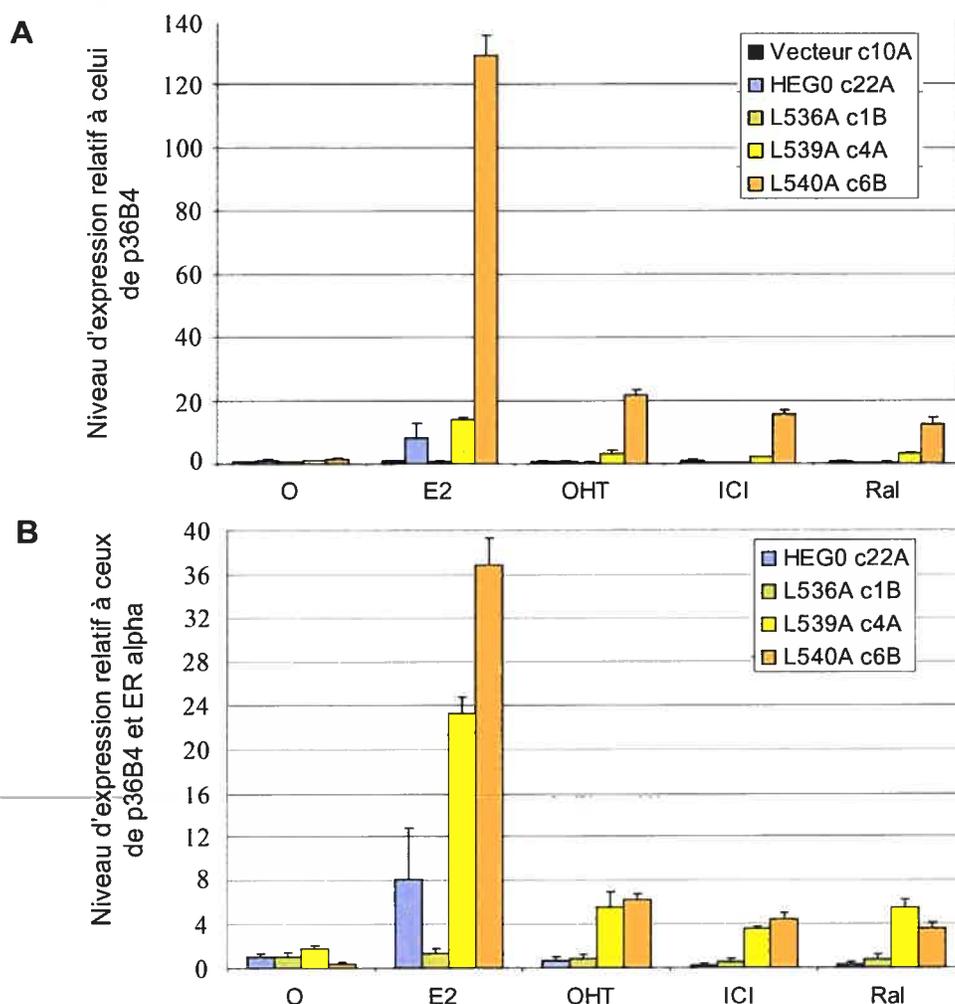
Sur un vecteur rapporteur de type ERE3, le mutant L539A donne une activité agoniste sous traitement à OHT, ICI et Ral, ces activités étant toutes les trois supérieures à celle observée en absence de ligand (Figure 11). C'est aussi ce qui est observé sur le promoteur endogène de TFF1 (Figure 12, en jaune), tel que confirmé par un test ANOVA avec un  $F\alpha$  de 0,05.

#### **1.5.1.4- Capacité transactivationnelle du mutant L540A dans la lignée MDA-MB-231-L540A sur le promoteur du gène TFF1**

Sur un vecteur rapporteur de type ERE3, le mutant L540A affiche une particularité, soit le changement de rôle entre ICI et Ral par rapport au récepteur de type sauvage. Pendant qu'ICI démontre une activité agoniste non habituelle, Ral joue plutôt le rôle d'antagoniste total normalement réservé à ICI (Figure 11). Cette particularité n'est pas retrouvée sur le promoteur endogène de TFF1 (Figure 12, en orange). OHT, ICI et Ral y montrent plutôt des niveaux semblables de

transactivation, qui sont tous trois supérieurs au niveau observé en absence de ligand.

De manière générale sur ce promoteur, pour un mutant donné, tous les antioestrogènes donnent un niveau semblable de transactivation. Ce n'est pas ce qui est observé sur un rapporteur synthétique de type ERE3. Ceci peut être dû à une spécificité de promoteur. Tout d'abord, le rapporteur synthétique contient trois ERE consensus rapprochés comparativement à un ERE imparfait pour TFF1. En plus, le contexte plasmidique du vecteur rapporteur est très différent de celui retrouvé pour le promoteur de TFF1, compacté dans la chromatine, où plusieurs facteurs de régulation supplémentaires entrent en jeu.



**Figure 12 : Activation de la transcription du gène TFF1 par ER $\alpha$  sauvage ou mutant dans les cellules MDA-MB-231 transfectées de façon stable suivie par RT-PCR en temps réel**

Les cellules ont cultivées pendant 72h dans un milieu dépourvu en rouge de phénol complétement avec 5% FBST avant d'être stimulées pour 48h par E2 ( $2,5 \times 10^{-8}M$ ), OHT, ICI ou Ral ( $1 \times 10^{-7}M$ ) dilué dans l'éthanol (véhicule). Pour chaque condition, 2  $\mu g$  d'ARN totaux ont été utilisés pour effectuer une réaction de transcription inverse. Les ADNc générés ont été soumis au PCR en temps réel en utilisant le SYBRgreen comme marqueur. (A) Les données brutes sont rapportées par rapport à l'expression du gène P36B4 ou (B) les données brutes sont rapportées par rapport à l'expression du gène P36B4 et normalisées sur le niveau d'expression de ER $\alpha$  en ARNm sans traitement pour chacun des récepteurs (Figure 9). Dans les deux cas, les niveaux obtenus sans traitement avec le récepteur sauvage ont été fixés à 1 afin de faciliter la lecture des résultats. Les expériences ont été réalisées en triplicata et reproduites deux fois ( $n=2$ ), sauf pour le vecteur et L540A, où l'expérience n'a été faite qu'une seule fois ( $n=1$ ). La moyenne des expériences est présentée, sauf pour le vecteur et L540A, où la moyenne du triplicata est présentée. Les barres d'erreurs représentent la somme des écarts types de chacune des expériences ou l'écart type à l'intérieur d'un triplicata.

### **1.5.2- Capacité transactivationnelle des ER $\alpha$ sauvage ou mutants dans les lignées MDA-MB-231 transfectées de façon stable sur le promoteur du gène GREB**

GREB est un gène cible de ER $\alpha$  récemment découvert, contenant trois ERE parfait dans son promoteur (Bourdeau, et al. 2004). Sa seule fonction connue est celle de participer à l'hormono-dépendance de la croissance de tumeurs mammaires (Rae, et al. 2005). Il démontre un niveau d'induction élevée suite au traitement par E2 et un niveau basal très faible, ce qui en fait un bon modèle pour l'étude en cours.

#### **1.5.2.1- Capacité transactivationnelle de ER $\alpha$ sauvage dans la lignée MDA-MB-231-HEG0 sur le promoteur du gène GREB**

Aucune stimulation de GREB par E2 n'est observée dans la lignée MDA-MB-231-Vecteur (Figure 13A). Les variations de niveaux de transcription avec les différents traitements sont dues au très faible niveau de transcrits retrouvé en absence d'activation de la transcription de ce gène ce qui rend l'amplification difficile et ne sont pas significatif d'après un test d'ANOVA avec une valeur de  $F_{\alpha}$  de 0,05.

Dans la lignée MDA-MB-231-HEG0, GREB se comporte comme un gène cible des oestrogènes (Figure 13), mais montre un niveau inférieur d'activation par E2 comparativement à TFF1 (Figure 12), soit 5 plutôt que 8. Sur ce promoteur, OHT ne stimule pas la transcription par rapport à l'activité basale, à peine plus qu'ICI ou Ral, comme observé sur TFF1.

#### **1.5.2.2- Capacité transactivationnelle du mutant L536A dans la lignée MDA-MB-231-L536A sur le promoteur du gène GREB**

Le mutant L536A, caractérisé par son activité basale en absence de ligand, montre aussi cette particularité sur le promoteur du gène GREB (Figure 13, en vert)(écart entre les niveau non significatif d'après un test de Student avec un  $t_{\alpha/2}$  de

0,05). L'activité du récepteur en présence des antioestrogènes n'est pas aussi élevée par rapport à celle retrouvée sur le rapporteur synthétique, mais demeure plus élevée que celle retrouvée pour le récepteur sauvage. Cependant, contrairement au cas de TFF1, ce mutant est actif sur ce promoteur endogène, ce qui vient encore souligner l'aspect promoteur dépendant des activités de ER $\alpha$ . GREB est très peu exprimé de façon basale et il montre un bon niveau de transactivation sous traitement hormonal. De plus, il contient trois ERE consensus, ce qui ressemble plus au cas du promoteur synthétique qu'au cas du promoteur de TFF1 (Bourdeau, et al. 2004). Cela pourrait donc expliquer la capacité de ce mutant à activer ce gène contrairement à TFF1, qui est connu pour être régulé par plusieurs facteurs de transcription (Barkhem, et al. 2002a).

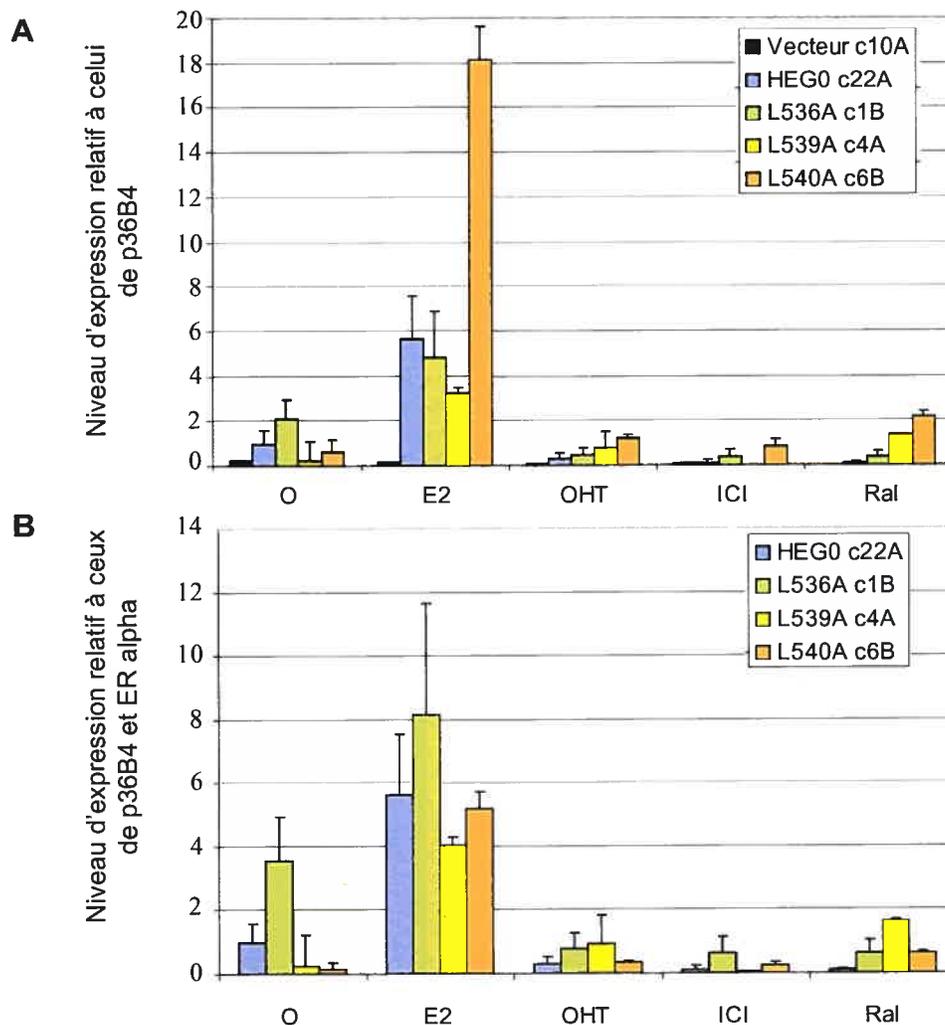
#### **1.5.2.3- Capacité transactivationnelle du mutant L539A dans la lignée MDA-MB-231-L539A sur le promoteur du gène GREB**

La capacité de transactivation du mutant L539A sur le promoteur de GREB est semblable à ce qui est observé sur le rapporteur de type ERE3. En effet, OHT et Ral ne montrent pas d'activité agoniste inverse, se comportant plutôt comme des agonistes partiels (Figure 13B). Cependant, une différence notable comparativement à ce qui est observé sur les promoteurs de TFF1 et de type ERE3 est qu'ICI est ici agoniste inverse. Une fois de plus, cela peut être dû au contexte spécifique de ce promoteur. Cependant, il faut noter que la détection de l'ARNm de GREB est très difficile dans cette condition, car les niveaux sont très faibles. Cela pourrait expliquer ce qui y est observé.

#### **1.5.2.4- Capacité transactivationnelle du mutant L540A dans la lignée MDA-MB-231-L540A sur le promoteur du gène GREB**

Comme observé pour les autres mutants sur le promoteur GREB, la mutation L540A démontre une activité agoniste partielle des antioestrogènes moins élevée (Figure 13) que sur le promoteur de TFF1 (Figure 12). En effet, sur ce promoteur, les niveaux observés sous OHT, ICI et Ral sont beaucoup plus près du niveau basal que sur le promoteur de TFF1, mais demeurent agonistes partiels.

En général sur ce promoteur, les niveaux retrouvés pour chacun des antioestrogènes avec un mutant donné sont plus faibles et plus variables que sur le promoteur de TFF1. Encore une fois, cela indique que chacun des promoteurs étudiés possède ses propres particularités.



**Figure 13: Activation de la transcription du gène GREB par ER $\alpha$  sauvage ou mutant dans les cellules MDA-MB-231 transfectées de façon stable suivie par RT-PCR en temps réel**

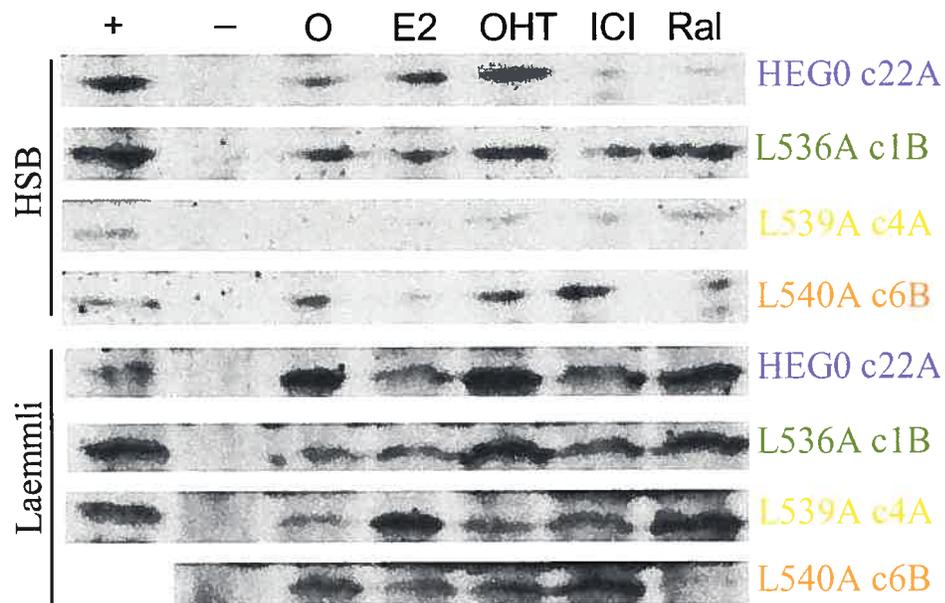
Les cellules ont été cultivées pendant 72h dans un milieu dépourvu en rouge de phénol complété avec 5% FBST avant d'être stimulé pour 48h par E2 ( $2,5 \times 10^{-8}M$ ), OHT, ICI ou Ral ( $1 \times 10^{-7}M$ ) dilué dans l'éthanol (véhicule). Pour chaque condition, 2  $\mu g$  d'ARN totaux ont été utilisés pour effectuer une réaction de transcription reverse. Les ADNc générés ont été soumis au PCR en temps réel en utilisant le SYBRgreen comme marqueur. A) Les données brutes sont rapportées par rapport à l'expression du gène P36B4 ou (B) les données brutes sont rapportées par rapport à l'expression du gène P36B4 et normalisées sur le niveau d'expression de ER $\alpha$  en ARNm sans traitement pour chacun des récepteurs (Figure 9). Dans les deux cas, les niveaux obtenus sans traitement avec le récepteur sauvage ont été fixés à 1 afin de faciliter la lecture des résultats. Les expériences ont été réalisées en triplicata et reproduites deux fois ( $n=2$ ), sauf pour les mutants L540A et L539A ainsi que pour le vecteur qui n'ont été faites qu'une seule fois ( $n=1$ ). La moyenne des expériences est présentée, sauf pour L540A, L539A et le vecteur où la moyenne du triplicata est présentée. Les barres d'erreurs représentent la somme des écarts types de chacune des expériences ou l'écart type à l'intérieur d'un triplicata.

### **1.6- Disponibilité de ER $\alpha$ sauvage ou mutant suite au traitement par E2, OHT, ICI ou Ral.**

La dégradation et la disponibilité de ER $\alpha$  sont influencées par la présence de ligands oestrogéniques ou antagonistes. Un traitement à OHT entraîne une stabilisation du récepteur, tandis qu'un traitement à ICI ou Ral rend le récepteur absent de la fraction extraite par un tampon à haute teneur en sel (HSB), mais toujours présent dans une extraction totale des protéine par le tampon Laemmli (pour explication, voir Introduction, section 6.1.1, page 30).

Dans la lignée MDA-MB 231 HEG0 c22A, une telle extraction protéique au HSB, permettant une extraction des protéines solubles, montre aussi de telles particularités (Figure 14). En effet, le récepteur sauvage y est stabilisé en présence d'OHT comparativement au control de traitement (0). De plus, le récepteur est pratiquement absent dans les fractions HSB traitées par ICI et Ral, deux composés agissant comme des agonistes inverses dans ce système. Cependant, une extraction des protéines totales, par le tampon Laemmli, des cellules traitées par ces deux antagonistes démontre des niveaux stabilisés de récepteurs. Cela reproduit donc les résultats observés dans les cellules HepG2 transfectée de façon transitoire (Figure 8).

De même, dans les lignées exprimant des mutants de ER $\alpha$  de façon stable, les résultats obtenus avec les cellules HepG2 peuvent être reproduits. Ainsi, sous traitements à ICI ou Ral, les mutants semblent tous avoir des niveaux de ER $\alpha$  stabilisés dans leur fraction soluble par rapport au récepteur sauvage, ce qui corrèle avec la capacticité transactivationnelle accrue de ces derniers dans ces conditions.



**Figure 14: Stabilité de ER $\alpha$  sauvage ou mutant suite au traitement par E2, OHT, ICI et Ral dans les MDA-MB 231 transfectées de façon stable**

Les cellules MDA-MB 231 HEG0 c22A, L536A c1B, L539A c4A et L540A c6B ont été traitées par E2 ( $2,5 \times 10^{-8} M$ ), OHT, ICI ou Ral ( $1 \times 10^{-7} M$ ) diluées dans l'éthanol (véhicule) pour 16h avant d'être récoltées dans un tampon à haute teneur en sel (HSB) et dans le tampon Laemmli. 100ug de protéines extraites par le tampon HSB et des quantités équivalentes de cellules récoltées dans le tampon Laemmli ont été passées sur gel de polyacrylamide dénaturant de 8%. De la même manière, des extraits de cellules MCF7 (+) et MDA-MB 231 Vecteur c10A (-) ont été obtenus et passés sur les mêmes gels à titre de contrôles. L'immunobuvardage de type Western ont été faits ciblant la protéine ER $\alpha$ . Les membranes ont été décapées et réhybridées avec un anti-actine  $\beta$  pour s'assurer que les quantités de protéines totales passées sur gel étaient constantes d'un puits à l'autre (résultats non montrés).

**CHAPITRE V: DISCUSSION**

### **1- Modèle d'étude des mutations L536A, L539A et L540A de ER $\alpha$**

La poursuite de l'étude des mutations du ER $\alpha$  conférant une activité agoniste partielle aux antioestrogènes nécessitait le développement de nouveaux modèles cellulaires exprimant de façon stable ces ER $\alpha$  mutants. Il était essentiel d'obtenir des lignées exprimant les récepteurs de façon stable afin d'étudier adéquatement les profils d'expressions des gènes en utilisant des techniques précises, tels le PCR en temps réel et les micropuces d'ADN, ou encore la technique d'immunoprécipitation de la chromatine. Ainsi on s'assure de l'uniformité des populations de cellules étudiées. Étant donné que les mutations étudiées préalablement (L536A, L539A et L540A) de façon transitoire dans la lignée hépatique HepG2 n'ont jamais été retrouvées dans des lignées, il a fallu utiliser la technique de transfection stable pour générer ces nouveaux modèles cellulaires.

Il faut noter que malgré le fait que les mutations étudiées ne surviennent pas de façon naturelle, cela n'affecte en rien la valeur de l'étude qui en est faite. Bien qu'il soit intéressant de connaître les variants retrouvés dans les cas de cancer du sein et leur influence sur la croissance des tumeurs, ce n'est pas le but de cette étude. Ces mutations sont étudiées dans le but de mieux caractériser le rôle de chacun des acides aminés hydrophobes de l'hélice 12 dans la modulation de l'activité transcriptionnelle en présence d'antioestrogènes. Cette hélice est en effet critique dans l'activation hormono-dépendante du récepteur, mais est déplacée de sa position dans la structure active du récepteur par la chaîne latérale des antioestrogènes.

La lignée cellulaire MDA-MB-231 est souvent choisie pour réintroduire des ER $\alpha$  mutés (Balasenthil, et al. 2004; Gougelet, et al. 2005). Cette lignée de carcinome mammaire ER $\alpha$  négative se prête donc à ce genre d'expérimentation, ce qui en fait un bon choix pour dériver de nouvelles lignées exprimant des mutants du ER $\alpha$ . Par contre, comme il s'agit d'une lignée qui n'exprime pas ER $\alpha$  de façon endogène, des variations de réponse des gènes cibles par rapport à d'autres lignées

auraient pu être notées. Cela n'a pas été le cas pour les deux gènes étudiés jusqu'à maintenant, mais devra être tenu en compte lors de l'analyse de résultats futurs, comme ceux résultant de la technique de micropuces d'ADN.

La génération de cinq nouvelles lignées cellulaires dérivées de la lignée MDA-MB-231 a été réalisée, soit les lignées MDA-MB-231-HEG0 (HEG0 = ER $\alpha$ ), MDA-MB-231-L536A, MDA-MB-231-L539A, MDA-MB-231-L540A et MDA-MB-231-Vecteur, grâce à la transfection stable de vecteurs de type pCDNA3-hygro conférant une résistance à l'antibiotique hygromicine.

### **1.1- Validation des modèles cellulaires générés**

Avant de commencer l'investigation de nouveaux résultats dans les lignées monoclonales nouvellement dérivées des MDA-MB-231, il faut d'abord s'assurer de la validité du modèle développé afin de confirmer le bon choix de son utilisation. C'est ce qui a été réalisé dans la présente étude.

#### **1.1.1- Niveau d'expression de ER $\alpha$ dans les nouvelles lignées MDA-MB-231-HEG0, MDA-MB-231-L536A, MDA-MB-231-L539A, MDA-MB-231-L540A**

Afin de pouvoir comparer facilement l'influence de différentes protéines réintroduites dans une lignée cellulaire, il est normalement préférable d'obtenir des lignées exprimant des niveaux protéiques comparables entre eux. Par exemple, si tel est le cas et qu'une lignée démontre un niveau moindre de transcription d'un gène cible donné, cela est bel et bien dû à l'influence de la protéine réintroduite et non pas à une présence réduite de cette dernière par rapport à celle de la lignée contrôle. Il est donc normalement admis de sélectionner de nouvelles lignées monoclonales sur leur niveau semblable d'expression de la protéine voulue.

Ainsi, nous aurions pu sélectionner les lignées nouvellement générées dans les MDA-MB-231 pour leur niveau d'expression de ER $\alpha$  en protéine. Cependant,

il est connu que la transactivation de ER $\alpha$  est couplée à sa dégradation, voir même essentielle à son activation transcriptionnelle (Reid, et al. 2002) et que les mutations étudiées pourraient amener une déstabilisation basale du récepteur (Lupien, et al. 2005). À la lumière de ces résultats, le fait de sélectionner les clones sur leur niveau du récepteur en protéine n'est pas un bon choix dans ce cas-ci. Il serait intéressant de retester les niveaux protéiques en présence d'inhibiteurs du protéasome tels le MG132, le lactacystine ou l'époxomicine, afin de confirmer que le niveau protéique plus faible de ER $\alpha$  L539A correspond à une dégradation accrue de la protéine.

Comme ces lignées expriment ER $\alpha$  ou ces mutants à partir des mêmes types de vecteurs intégrés aux génomes, il est possible de supposer que le taux de transcription des messagers influencent majoritairement le taux d'expression en protéine de ER $\alpha$ . Les différences de niveaux d'ARNm entre clones peuvent en effet varier en fonction du site d'intégration dans le génome du vecteur. Il est peu probable que les mutations introduites affectent la stabilité de l'ARNm, mais ceci pourrait être confirmé en mesurant la demi-vie des messagers de ER $\alpha$  en présence d'inhibiteurs transcriptionnels par RT-PCR.

D'après la figure 9, les niveaux en ARNm de ER $\alpha$  déterminés par PCR en temps réel sont équivalents d'une lignée à une autre, sauf pour le mutant L540A. En effet, L540A donne un niveau en ARNm 3,5 fois plus élevé que les trois autres lignées. Ces niveaux différentiels d'expression ont été pris en compte lors de l'analyse des résultats de PCR en temps réel, lorsque les résultats ont été normalisés sur ces niveaux (Figure 12B et 13B). Cependant, comme un niveau de production du mutant L540A 3,5 fois élevé n'est pas garant d'un niveau de transactivation exactement 3,5 fois plus élevé, il nous a semblé nécessaire de présenter les résultats avant et après normalisation sur le niveau d'ARNm de ER $\alpha$ . Il ne s'agit pas d'une méthode d'analyse sans faille, mais de la meilleure disponible. La situation idéale serait de caractériser un autre clone de cette mutation exprimant un niveau d'ARNm de ER $\alpha$  semblable aux autres lignées, ce qui éviterait d'avoir à normaliser sur le niveau en ARNm de ER $\alpha$ . De plus, nous

aurions pu caractériser plusieurs clones par mutations, affichant des niveaux divers d'expression, et caractériser l'influence des différents niveaux d'expression sur les patrons de transactivation observés.

### **1.1.2- Le contexte cellulaire des MDA-MB-231 permet l'activité agoniste des antioestrogènes**

L'activité agoniste partielle de ER $\alpha$  de type sauvage parfois observée en présence d'OHT dépend du contexte cellulaire, c'est-à-dire du type cellulaire et du gène observé. Dans d'autres lignées cellulaires, l'activité agoniste du récepteur de type sauvage sous traitement à OHT et des récepteurs mutants sous traitement aux divers antagonistes a pu être observée sur un rapporteur synthétique de type ERE3. Afin de connaître la capacité des lignées MDA-MB-231 nouvellement générées à démontrer une telle activité agoniste, il a donc semblé nécessaire d'utiliser d'abord ce type de vecteur rapporteur exogène.

La lignée MDA-MB-231-HEG0 démontre à la fois une activité agoniste partielle d'OHT sur ce vecteur rapporteur et permet de reproduire les profils d'activité des récepteurs mutants en présence d'antioestrogène total, ce qui justifie l'utilisation de ces nouveaux modèles pour l'étude voulue. Si cela n'avait pas été le cas, il aurait fallu choisir une autre lignée de départ que les MDA-MB-231. En effet, le mutant L536A montre non seulement une activité basale augmentée, mais aussi une activité accrue sous OHT et Ral. L539A et L540A montrent aussi des activités accrues sous traitement à OHT et ICI et L539A démontre une activité agoniste partielle sous Ral. Ainsi, les patrons observés sont très semblables à ceux retrouvés lors des essais transitoires dans les cellules HepG2 (Figure 7).

Il est important d'apporter des précisions sur la nature particulière de l'activité constitutive du mutant L536A. En effet, on pourrait croire que cette mutation entraîne une affinité réduite du récepteur pour les antioestrogènes et que

par conséquent l'activité agoniste observée sous traitement par ces derniers n'est que le résultat de l'activité basale du récepteur. Cependant, des études faites dans les cellules HepG2 montrent que les concentrations utilisées en ICI sont plus que saturantes (résultats non montrés), ce qui diminue les risques qu'une éventuelle affinité différente du mutant aie une influence. Afin d'en être vraiment certain, il faudrait cependant réaliser des études de liaison à l'hormone *in vitro*.

## **2- L'activité agoniste partielle des antioestrogènes est observable de façon endogène**

Une des visées de l'élaboration des nouvelles lignées stables est la possibilité de visualiser l'effet agoniste partiel des antioestrogènes sur l'expression de gènes de la cellule plutôt que sur un rapporteur synthétique et d'étudier le recrutement au promoteur de gènes cibles des différents ER $\alpha$  mutants. L'utilisation de lignées exprimant les récepteurs mutants de façon stable plutôt que transitoire devenait nécessaire. Cela confère des niveaux d'expression en récepteur uniforme à l'intérieur d'une même lignée, autant dans le temps que d'une cellule à l'autre, comparativement à la technique de transfection transitoire. Cela est essentiel à la reproductivité des résultats étant donné la sensibilité des techniques utilisées.

### **2.1- L'activité agoniste partielle des antioestrogènes est observable sur le gène cible TFF1 grâce à la technique de RT-PCR en temps réel**

TFF1 est un gène cible de ER $\alpha$  connu et caractérisé pour son expression dans des tumeurs mammaires, alors qu'il n'est habituellement pas exprimé dans les tissus mammaires sains (Barkhem, et al. 2002b; Metivier, et al. 2003). Dans les lignées nouvellement dérivées, l'induction de sa transcription par E2 est aussi observable (Figure 12). Cependant, dans la lignée MDA-MB-231-HEG0, OHT ne démontre pas une activité agoniste partielle sur ce promoteur mais est plutôt

antagoniste, avec un niveau d'activité transcriptionnelle semblable à celui observé en absence de traitement. Par contre, les récepteurs mutants démontrent quant à eux une activité agoniste partielle en présence d'antioestrogènes semblables à celle observée sur le rapporteur ERE3, mais aussi à des niveaux un peu moins marqués. Les seules différences sont que les niveaux obtenus avec les antioestrogènes pour un mutant donné sont semblables entre eux, ce qui peut être une spécificité de ce promoteur en particulier, et que le mutant L540A démontre une activité transcriptionnelle plus élevée en présence de Ral, qui pourrait être expliqué par un niveau saturant de récepteur sur le promoteur endogène comparativement au promoteur synthétique transfecté, qui est présents en plusieurs copies.

Ces résultats démontrent que l'activité agoniste partielle des antioestrogènes apportée par les mutations L536A, L539A et L540A de ER $\alpha$  peut être visualisée sur un promoteur endogène. Cela est très encourageant pour le développement d'expériences futures.

## **2.2- L'activité agoniste partielles des antioestrogènes est gène spécifique**

Les observations faites quant à l'activation transcriptionnelle du gène GREB confirment que les niveaux d'activité agoniste partielle des antioestrogènes sont promoteurs spécifiques, ce qui n'est pas étonnant puisque celle démontrée par le récepteur sauvage en présence d'OHT l'est aussi. L'étude de la réponse sur ce promoteur est aussi intéressante que celle faite sur le promoteur de TFF1, car, bien que les niveaux obtenus sous traitement aux antioestrogènes soient inférieurs à ce qu'on obtient avec TFF1, les patrons sont plus semblables à ce qui est retrouvé sur le rapporteur synthétique. De plus, le mutant L536A y est actif. La nature des élément de réponse retrouvés dans les deux promoteurs est différente, ce qui peut en partie expliquer les différences retrouvées entre les deux cas.

### **3- La disponibilité sous traitement aux antioestrogènes totaux des récepteurs sauvage ou mutants corrèle avec leur capacité transactivationnelle**

Il a été montré dans les cellules HepG2, en transfection transitoire, que chacun des ligands utilisés provoquaient une dégradation différentielle du récepteur et que cette dégradation était modifiée par les mutations apportées au récepteur (Figure 8). Suite à seize heures de traitement par OHT, on note une très forte stabilisation du récepteur sauvage dans la fraction extraite par un tampon à haute teneur en sel (HSB). Par contre, le traitement par ICI ou Ral ne provoque aucune accumulation du récepteur sauvage dans ce type de fraction. Le récepteur semble plutôt s'accumuler sous une forme insoluble, non disponible, tel que montré par une extraction au tampon Laemmli. Ce patron de dégradation est modifié lorsque le récepteur est muté. En effet, le mutant L536A stabilise le récepteur dans la fraction soluble suite au traitement par ICI et Ral, contrairement à ce qui est observé pour le récepteur sauvage. De même pour L539A et L540A, on peut observer une stabilisation du récepteur après traitement à ICI ou Ral. La conclusion tirée des résultats obtenus dans les HepG2, lorsque les essais de dégradation sont mis en relation avec les essais de transactivation, est que la stabilisation du récepteur dans la fraction soluble est essentielle à un gain d'activité agoniste partielle des antioestrogènes. Les résultats semblables obtenus dans les lignées MDA-MB 231 transfectées de façon stable confirme cette conclusion.

### **4- Analyses futures**

La mise en place de ces nouvelles lignées dérivées des MDA-MB-231 ouvre la porte à une panoplie de nouvelles expériences à réaliser afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des mutations étudiées.

Afin de démontrer que l'activité agoniste partielle des récepteurs mutants suite aux traitements par des antioestrogènes est la conséquence d'une quantité plus grande de récepteur disponible au promoteur des gènes cibles et que ces derniers recrutent les mêmes types de cofacteurs transcriptionnels que lorsque le récepteur sauvage démontre une activité agoniste partielle sous OHT, des essais

d'immunoprécipitations de la chromatine seront effectuées sur les promoteurs des gènes TFF1 et GREB. Ces gènes sont de bonnes cibles pour ces études puisque leurs éléments de réponse aux oestrogènes ont été caractérisés (Bourdeau, et al. 2004; Metivier, et al. 2003). De plus, il sera possible à la lumière de ces résultats de les corrélérer avec les résultats des essais de dégradation. Ces expériences permettent d'examiner si la quantité de récepteur globale dans la cellule en présence de différents traitements corrèle avec la quantité de récepteur présent sur les promoteurs des gènes cibles en plus de permettre l'étude des coactivateurs et des corépresseurs recrutés par les différentes formes de ER $\alpha$  en présence d'antioestrogènes.

De même, afin de constater si les deux mécanismes étudiés mènent à l'activation transcriptionnelle des mêmes gènes cibles, des études de micropuces d'ADN seront réalisées. Cela permettra une analyse à grande échelle des gènes ciblés par l'activité agoniste partielle des antioestrogènes.

Afin de mieux comprendre le mécanisme de l'activité agoniste partiel des antioestrogènes, des études se concentrant sur la structure des récepteurs devront aussi être faites. La cristallographie du ER $\alpha$  est bien établie et pourrait éventuellement être réalisée pour les différentes mutations en présence d'antioestrogènes afin de comparer avec les structures du ER $\alpha$  sauvage disponibles. Vu l'ampleur du travail de cristallographie envisagé et la difficulté à cristalliser l'hélice 12 du récepteur, d'autres études portant sur la structure des mutants pourraient aussi être envisagées. Des études d'anisotropie de la fluorescence d'un récepteur couplé, à la base de son hélice 12, à un fluorophore permettent de caractériser la position de cette hélice en présence de différents ligands (Tamrazi, et al. 2003). Cette technique pourrait aussi très bien servir à la caractérisation des différents mutants étudiés ici. En effet, il serait possible, à l'aide de cette technique, de caractériser la position de l'hélice 12 des différents mutants en présence des antioestrogènes qui apportent une activité agoniste partielle.

## 5- Conclusion

L'élaboration des lignées dérivées des MDA-MB-231 exprimant HEG0 ou les mutants L536A, L539A et L540A a permis de visualiser l'activité agoniste partielle des antioestrogènes totaux sur des cibles endogènes de ER $\alpha$ , au même titre qu'il est possible de visualiser l'activité agoniste partielle du récepteur sauvage en présence d'OHT, de même que confirmé que l'activité agoniste partielle des antioestrogènes totaux dépend de la solubilité du récepteur. Cela constitue la première étape de la preuve que l'activité agoniste partielle des antioestrogènes totaux observée avec les mutants L536A, L539A et L540A dépend de la structure adoptée par l'hélice 12, avec des conséquences sur la demi-vie du récepteur et sur le recrutement de cofacteurs, et que celle-ci est semblable à celle du ER $\alpha$  de type sauvage observée en présence d'OHT.

Les expériences futures permettront de déterminer, par des analyses de régulation génique à grande échelle ainsi que par des études de recrutement des mutants et de cofacteurs transcriptionnels, si l'influence de la structure de H12 sur la demi-vie du récepteur est importante ou si le recrutement de coactivateurs spécifiques est déterminant pour l'activité agoniste partielle des antioestrogènes.

Ces études permettent une meilleure compréhension du mécanisme d'action des antioestrogènes, compréhension essentielle au développement de traitements plus efficaces dans la lutte au cancer du sein.

## CHAPITRE VI : RÉFÉRENCES

**Anderson, E.**

**2002** The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res* 4(5):197-201.

**Anghel, S. I., V. Perly, G. Melancon, A. Barsalou, S. Chagnon, A. Rosenauer, W. H. Miller, Jr. and S. Mader**

**2000** Aspartate 351 of estrogen receptor alpha is not crucial for the antagonist activity of antiestrogens. *J Biol Chem* 275(27):20867-72.

**Aranda, A. and A. Pascual**

**2001** Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81(3):1269-304.

**Balasenthil, S., C. J. Barnes, S. K. Rayala and R. Kumar**

**2004** Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS Lett* 567(2-3):243-7.

**Bannister, A. J. and T. Kouzarides**

**1996** The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384(6610):641-3.

**Barkhem, T., L. A. Haldosen, J. A. Gustafsson and S. Nilsson**

**2002a** pS2 Gene expression in HepG2 cells: complex regulation through crosstalk between the estrogen receptor alpha, an estrogen-responsive element, and the activator protein 1 response element. *Mol Pharmacol* 61(6):1273-83.

**2002b** Transcriptional synergism on the pS2 gene promoter between a p160 coactivator and estrogen receptor-alpha depends on the coactivator

subtype, the type of estrogen response element, and the promoter context. *Mol Endocrinol* 16(11):2571-81.

**Belandia, B., R. L. Orford, H. C. Hurst and M. G. Parker**

2002 Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes. *Embo J* 21(15):4094-103.

**Birge, S. J.**

2003 The use of estrogen in older women. *Clin Geriatr Med* 19(3):617-27, viii.

**Bossenmeyer-Pourie, C., R. Kannan, S. Ribieras, C. Wendling, I. Stoll, L. Thim, C. Tomasetto and M. C. Rio**

2002 The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J Cell Biol* 157(5):761-70.

**Bourdeau, V., J. Deschenes, R. Metivier, Y. Nagai, D. Nguyen, N.**

**Bretschneider, F. Gannon, J. H. White and S. Mader**

2004 Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol* 18(6):1411-27.

**Brzozowski, A. M., A. C. Pike, Z. Dauter, R. E. Hubbard, T. Bonn, O.**

**Engstrom, L. Ohman, G. L. Greene, J. A. Gustafsson and M. Carlquist**

1997 Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389(6652):753-8.

**Campbell, R. A., P. Bhat-Nakshatri, N. M. Patel, D. Constantinidou, S. Ali and H. Nakshatri**

**2001 Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 276(13):9817-24.**

**Campos, S. M.**

**2004 Aromatase inhibitors for breast cancer in postmenopausal women. *Oncologist* 9(2):126-36.**

**Carreau, S.**

**2002 The testicular aromatase: from gene to physiological role. *Reprod Biol* 2(1):5-12.**

**Chen, D., S. M. Huang and M. R. Stallcup**

**2000 Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. *J Biol Chem* 275(52):40810-6.**

**Chen, D., T. Riedl, E. Washbrook, P. E. Pace, R. C. Coombes, J. M. Egly and S. Ali**

**2000 Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIIH and participation of CDK7. *Mol Cell* 6(1):127-37.**

**Chen, H., R. J. Lin, W. Xie, D. Wilpitz and R. M. Evans**

**1999 Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* 98(5):675-86.**

**Clarke, R., F. Leonessa, J. N. Welch and T. C. Skaar**

**2001 Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol Rev* 53(1):25-71.**

**Colozza, M., F. Cardoso, C. Sotiriou, D. Larsimont and M. J. Piccart**

**2005 Bringing molecular prognosis and prediction to the clinic. *Clin Breast Cancer* 6(1):61-76.**

**Couse, J. F. and K. S. Korach**

**1999 Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20(3):358-417.**

**Cummings, S. R., S. Eckert, K. A. Krueger, D. Grady, T. J. Powles, J. A.**

**Cauley, L. Norton, T. Nickelsen, N. H. Bjarnason, M. Morrow, M. E.**

**Lippman, D. Black, J. E. Glusman, A. Costa and V. C. Jordan**

**1999 The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *Jama* 281(23):2189-97.**

**Danielian, P. S., R. White, J. A. Lees and M. G. Parker**

**1992 Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *Embo J* 11(3):1025-33.**

**Daujat, S., U. M. Bauer, V. Shah, B. Turner, S. Berger and T. Kouzarides**

**2002 Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr Biol* 12(24):2090-7.**

**Dauvois, S., R. White and M. G. Parker**

**1993 The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* 106 ( Pt 4):1377-88.**

**Dickson, R. B. and M. E. Lippman**

**1988 Control of human breast cancer by estrogen, growth factors, and oncogenes. *Cancer Treat Res* 40:119-65.**

**Dobrzycka, K. M., S. M. Townson, S. Jiang and S. Oesterreich**

**2003 Estrogen receptor corepressors -- a role in human breast cancer? *Endocr Relat Cancer* 10(4):517-36.**

**Edwards, D. P.**

**2000 The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(3):307-24.**

**Egner, U., N. Heinrich, M. Ruff, M. Gangloff, A. Mueller-Fahrnow and J. M. Wurtz**

**2001 Different ligands-different receptor conformations: modeling of the hER alpha LBD in complex with agonists and antagonists. *Med Res Rev* 21(6):523-39.**

**Feng, W., P. Webb, P. Nguyen, X. Liu, J. Li, M. Karin and P. J. Kushner**

**2001 Potentiation of estrogen receptor activation function 1 (AF-1) by Src/JNK through a serine 118-independent pathway. *Mol Endocrinol* 15(1):32-45.**

**Flourirot, G., H. Brand, S. Denger, R. Metivier, M. Kos, G. Reid, V. Sonntag-Buck and F. Gannon**

**2000 Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *Embo J* 19(17):4688-700.**

**Fondell, J. D., H. Ge and R. G. Roeder**

1996 Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16):8329-33.

Font de Mora, J. and M. Brown

2000 AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 20(14):5041-7.

Freedman, L. P.

1992 Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev* 13(2):129-45.

Gennari, L., D. Merlotti, V. De Paola, A. Calabro, L. Becherini, G. Martini and R. Nuti

2005 Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 161(4):307-20.

Glass, C. K. and M. G. Rosenfeld

2000 The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14(2):121-41.

Gougelet, A., C. Bouclier, V. Marsaud, S. Maillard, S. O. Mueller, K. S. Korach and J. M. Renoir

2005 Estrogen receptor alpha and beta subtype expression and transactivation capacity are differentially affected by receptor-, hsp90- and immunophilin-ligands in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94(1-3):71-81.

Gregory, C. W., X. Fei, L. A. Ponguta, B. He, H. M. Bill, F. S. French and E. M. Wilson

**2004 Epidermal growth factor increases coactivation of the androgen receptor in recurrent prostate cancer. *J Biol Chem* 279(8):7119-30.**

**Hampsey, M.**

**1998 Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(2):465-503.**

**Hayashi, S. I., H. Eguchi, K. Tanimoto, T. Yoshida, Y. Omoto, A. Inoue, N. Yoshida and Y. Yamaguchi**

**2003 The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocr Relat Cancer* 10(2):193-202.**

**Heery, D. M., E. Kalkhoven, S. Hoare and M. G. Parker**

**1997 A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387(6634):733-6.**

**Henderson, B. E. and H. S. Feigelson**

**2000 Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21(3):427-33.**

**Herynk, M. H. and S. A. Fuqua**

**2004 Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev* 25(6):869-98.**

**Huang, S. M. and Y. S. Cheng**

**2004 Analysis of two CBP (cAMP-response-element-binding protein-binding protein) interacting sites in GRIP1 (glucocorticoid-receptor-interacting protein), and their importance for the function of GRIP1. *Biochem J* 382(Pt 1):111-9.**

**Joel, P. B., J. Smith, T. W. Sturgill, T. L. Fisher, J. Blenis and D. A. Lannigan**

1998 pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Mol Cell Biol* 18(4):1978-84.

Joel, P. B., A. M. Traish and D. A. Lannigan

1995 Estradiol and phorbol ester cause phosphorylation of serine 118 in the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 9(8):1041-52.

Jordan, V. C.

2004 Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer Cell* 5(3):207-13.

Kato, S.

2001 Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer* 8(1):3-9.

Kato, S., H. Endoh, Y. Masuhiro, T. Kitamoto, S. Uchiyama, H. Sasaki, S. Masushige, Y. Gotoh, E. Nishida, H. Kawashima, D. Metzger and P. Chambon

1995 Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270(5241):1491-4.

Katzenellenbogen, B. S. and J. Frasor

2004 Therapeutic targeting in the estrogen receptor hormonal pathway. *Semin Oncol* 31(1 Suppl 3):28-38.

Klinge, C. M.

2000 Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65(5):227-51.

Kos, M., G. Reid, S. Denger and F. Gannon

2001 Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol Endocrinol* 15(12):2057-63.

Kushner, P. J., D. A. Agard, G. L. Greene, T. S. Scanlan, A. K. Shiau, R. M. Uht and P. Webb

2000 Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74(5):311-7.

Lannigan, D. A.

2003 Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* 68(1):1-9.

Leo, C. and J. D. Chen

2000 The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 245(1):1-11.

Lindsay, R.

2004 Hormones and bone health in postmenopausal women. *Endocrine* 24(3):223-30.

Lippman, M. E., R. B. Dickson, A. Kasid, E. Gelmann, N. Davidson, M. McManaway, K. Huff, D. Bronzert, S. Bates, S. Swain and et al.

1986 Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer. *J Steroid Biochem* 24(1):147-54.

Lonard, D. M., Z. Nawaz, C. L. Smith and B. W. O'Malley

2000 The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol Cell* 5(6):939-48.

Lupien, M., A. Auger, D. Dayan, G.-A. Pinard, S. I. Anghel, C. Loch, J. M. Wurtz, D. Moras and S. Mader

**2005 ROLE OF AF-2 HELIX 12 POSITIONING IN  
TRANSCRIPTIONAL REPRESSION OF ESTROGEN RECEPTOR  
ALPHA BY FULL ANTIESTROGENS. *Submitted.***

**Mader, S., P. Chambon and J. H. White**

**1993 Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain.  
*Nucleic Acids Res* 21(5):1125-32.**

**McDonnell, D. P.**

**2004 The molecular determinants of estrogen receptor  
pharmacology. *Maturitas* 48 Suppl 1:S7-12.**

**McInerney, E. M., D. W. Rose, S. E. Flynn, S. Westin, T. M. Mullen, A.**

**Krones, J. Inostroza, J. Torchia, R. T. Nolte, N. Assa-Munt, M. V. Milburn,**

**C. K. Glass and M. G. Rosenfeld**

**1998 Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear  
receptor transcriptional activation. *Genes Dev* 12(21):3357-68.**

**Metivier, R., G. Penot, G. Flouriot and F. Pakdel**

**2001 Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1)  
and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1:  
requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct  
interaction between the N- and C-terminal domains. *Mol Endocrinol*  
15(11):1953-70.**

**Metivier, R., G. Penot, M. R. Hubner, G. Reid, H. Brand, M. Kos and F.**

**Gannon**

**2003 Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and  
combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter.  
*Cell* 115(6):751-63.**

**Migliaccio, A., G. Castoria, M. Di Domenico, A. de Falco, A. Bilancio, M. Lombardi, D. Bottero, L. Varricchio, M. Nanayakkara, A. Rotondi and F. Auricchio**

**2002 Sex steroid hormones act as growth factors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83(1-5):31-5.**

**Nakajima, T., C. Uchida, S. F. Anderson, C. G. Lee, J. Hurwitz, J. D. Parvin and M. Montminy**

**1997 RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* 90(6):1107-12.**

**Nawaz, Z., D. M. Lonard, A. P. Dennis, C. L. Smith and B. W. O'Malley**

**1999 Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5):1858-62.**

**Nelson, L. R. and S. E. Bulun**

**2001 Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* 45(3 Suppl):S116-24.**

**Nichols, M. and K. S. McCarty, Jr.**

**2002 Functional mutations of estrogen receptor protein: assay for detection. *Breast Cancer Res Treat* 72(1):61-8.**

**Nilsson, S. and J. A. Gustafsson**

**2000 Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res* 2(5):360-6.**

**Nilsson, S., S. Makela, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner and J. A. Gustafsson**

**2001 Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81(4):1535-65.**

- Nolte, R. T., G. B. Wisely, S. Westin, J. E. Cobb, M. H. Lambert, R. Kurokawa, M. G. Rosenfeld, T. M. Willson, C. K. Glass and M. V. Milburn**  
1998 Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395(6698):137-43.
- Ogryzko, V. V., R. L. Schiltz, V. Russanova, B. H. Howard and Y. Nakatani**  
1996 The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87(5):953-9.
- Onate, S. A., V. Boonyaratanakornkit, T. E. Spencer, S. Y. Tsai, M. J. Tsai, D. P. Edwards and B. W. O'Malley**  
1998 The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem* 273(20):12101-8.
- Parker, M. G.**  
1993 Action of "pure" antiestrogens in inhibiting estrogen receptor action. *Breast Cancer Res Treat* 26(2):131-7.
- Peekhaus, N. T., T. Chang, E. C. Hayes, H. A. Wilkinson, S. W. Mitra, J. M. Schaeffer and S. P. Rohrer**  
2004 Distinct effects of the antiestrogen Faslodex on the stability of estrogen receptors-alpha and -beta in the breast cancer cell line MCF-7. *J Mol Endocrinol* 32(3):987-95.
- Prevot, V., D. Croix, C. M. Rialas, P. Poulain, G. L. Fricchione, G. B. Stefano and J. C. Beauvillain**  
1999 Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor. *Endocrinology* 140(2):652-9.

**Rackley, C. E.**

**2004** Hormones and coronary atherosclerosis in women. *Endocrine* 24(3):245-50.

**Rae, J. M., M. D. Johnson, J. O. Scheys, K. E. Cordero, J. M. Larios and M. E. Lippman**

**2005** GREB1 is a critical regulator of hormone dependent breast cancer growth. *Breast Cancer Res Treat* 92(2):141-9.

**Ratajczak, T.**

**2001** Protein coregulators that mediate estrogen receptor function. *Reprod Fertil Dev* 13(4):221-9.

**Reid, G., S. Denger, M. Kos and F. Gannon**

**2002** Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell Mol Life Sci* 59(5):821-31.

**Rocha, W., R. Sanchez, J. Deschenes, A. Auger, E. Hebert, J. H. White and S. Mader**

**2005** Opposite effects of HDAC inhibitors on glucocorticoid and estrogen signaling in human endometrial Ishikawa cells. *Mol Pharmacol*.

**Rochette-Egly, C.**

**2003** Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal* 15(4):355-66.

**Roeder, R. G.**

**2005** Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett* 579(4):909-15.

**Rogatsky, I., J. M. Trowbridge and M. J. Garabedian**

**1999** Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem* 274(32):22296-302.

**Rowan, B. G., N. L. Weigel and B. W. O'Malley**

**2000** Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 275(6):4475-83.

**Ruff, M., M. Gangloff, J. M. Wurtz and D. Moras**

**2000** Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res* 2(5):353-9.

**Sanchez, R., D. Nguyen, W. Rocha, J. H. White and S. Mader**

**2002** Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. *Bioessays* 24(3):244-54.

**Sathya, G., P. Yi, S. Bhagat, R. A. Bambara, R. Hilf and M. Muyan**

**2002** Structural regions of ERalpha critical for synergistic transcriptional responses contain co-factor interacting surfaces. *Mol Cell Endocrinol* 192(1-2):171-85.

**Sato, S., C. Tomomori-Sato, T. J. Parmely, L. Florens, B. Zybaylov, S. K.**

**Swanson, C. A. Banks, J. Jin, Y. Cai, M. P. Washburn, J. W. Conaway and R. C. Conaway**

**2004** A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Mol Cell* 14(5):685-91.

**Savkur, R. S. and T. P. Burris**

**2004 The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J Pept Res* 63(3):207-12.**

**Scherrer, L. C., D. Picard, E. Massa, J. M. Harmon, S. S. Simons, Jr., K. R. Yamamoto and W. B. Pratt**

**1993 Evidence that the hormone binding domain of steroid receptors confers hormonal control on chimeric proteins by determining their hormone-regulated binding to heat-shock protein 90. *Biochemistry* 32(20):5381-6.**

**Schwabe, J. W., L. Chapman, J. T. Finch and D. Rhodes**

**1993 The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 75(3):567-78.**

**Shiau, A. K., D. Barstad, P. M. Loria, L. Cheng, P. J. Kushner, D. A. Agard and G. L. Greene**

**1998 The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95(7):927-37.**

**Simoncini, T., A. Hafezi-Moghadam, D. P. Brazil, K. Ley, W. W. Chin and J. K. Liao**

**2000 Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407(6803):538-41.**

**Smith, C. L., Z. Nawaz and B. W. O'Malley**

1997 Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol* 11(6):657-66.

Song, R. X., R. A. McPherson, L. Adam, Y. Bao, M. Shupnik, R. Kumar and R. J. Santen

2002 Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol* 16(1):116-27.

Spencer, T. E., G. Jenster, M. M. Burcin, C. D. Allis, J. Zhou, C. A. Mizzen, N. J. McKenna, S. A. Onate, S. Y. Tsai, M. J. Tsai and B. W. O'Malley

1997 Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389(6647):194-8.

Stenoien, D. L., K. Patel, M. G. Mancini, M. Dutertre, C. L. Smith, B. W. O'Malley and M. A. Mancini

2001 FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. *Nat Cell Biol* 3(1):15-23.

Struhl, K.

2005 Transcriptional activation: mediator can act after preinitiation complex formation. *Mol Cell* 17(6):752-4.

Tamrazi, A., K. E. Carlson and J. A. Katzenellenbogen

2003 Molecular sensors of estrogen receptor conformations and dynamics. *Mol Endocrinol* 17(12):2593-602.

Taunton, J., C. A. Hassig and S. L. Schreiber

1996 A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272(5260):408-11.

- Van Den Bemd, G. J., G. G. Kuiper, H. A. Pols and J. P. Van Leeuwen**  
1999 Distinct effects on the conformation of estrogen receptor alpha and beta by both the antiestrogens ICI 164,384 and ICI 182,780 leading to opposite effects on receptor stability. *Biochem Biophys Res Commun* 261(1):1-5.
- Vasudevan, N., L. M. Kow and D. Pfaff**  
2005 Integration of steroid hormone initiated membrane action to genomic function in the brain. *Steroids* 70(5-7):388-96.
- Wang, L., C. L. Hsu and C. Chang**  
2005 Androgen receptor corepressors: an overview. *Prostate* 63(2):117-30.
- Westin, S., R. Kurokawa, R. T. Nolte, G. B. Wisely, E. M. McInerney, D. W. Rose, M. V. Milburn, M. G. Rosenfeld and C. K. Glass**  
1998 Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. *Nature* 395(6698):199-202.
- White, J. H., I. Fernandes, S. Mader and X. J. Yang**  
2004 Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors. *Vitam Horm* 68:123-43.
- Wilkinson, K. D.**  
1999 Ubiquitin-dependent signaling: the role of ubiquitination in the response of cells to their environment. *J Nutr* 129(11):1933-6.
- Wong, C. W., C. McNally, E. Nickbarg, B. S. Komm and B. J. Cheskis**

2002 Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(23):14783-8.

Wu, S. N.

2003 Large-conductance Ca<sup>2+</sup>- activated K<sup>+</sup> channels:physiological role and pharmacology. *Curr Med Chem* 10(8):649-61.

Wurtz, J. M., W. Bourguet, J. P. Renaud, V. Vivat, P. Chambon, D. Moras and H. Gronemeyer

1996 A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* 3(1):87-94.

Xu, L., C. K. Glass and M. G. Rosenfeld

1999 Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 9(2):140-7.

Ylikomi, T., J. M. Wurtz, H. Syvala, S. Passinen, A. Pekki, M. Haverinen, M. Blauer, P. Tuohimaa and H. Gronemeyer

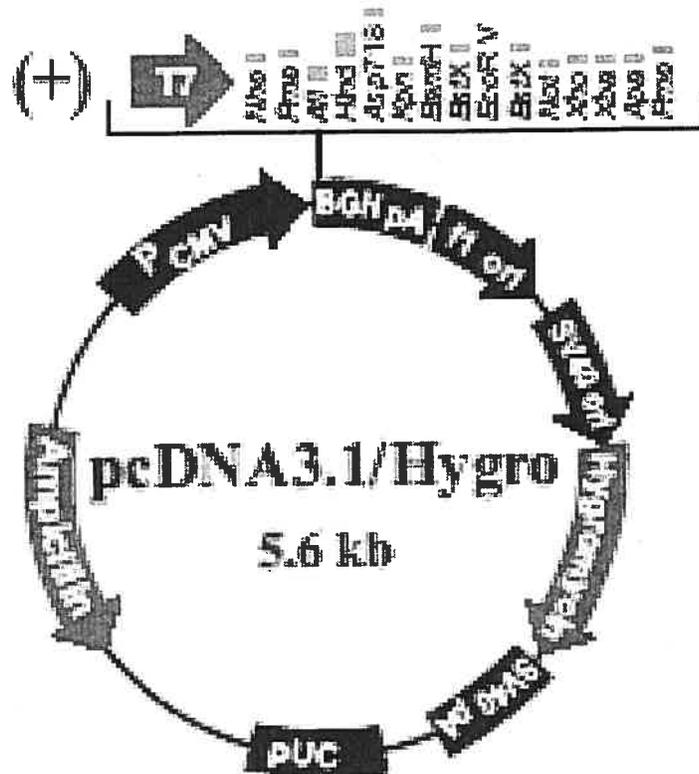
1998 Reappraisal of the role of heat shock proteins as regulators of steroid receptor activity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33(6):437-66.

Zilliacus, J., A. P. Wright, J. Carlstedt-Duke and J. A. Gustafsson

1995 Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors. *Mol Endocrinol* 9(4):389-400.

**CHAPITRE VII : ANNEXES**

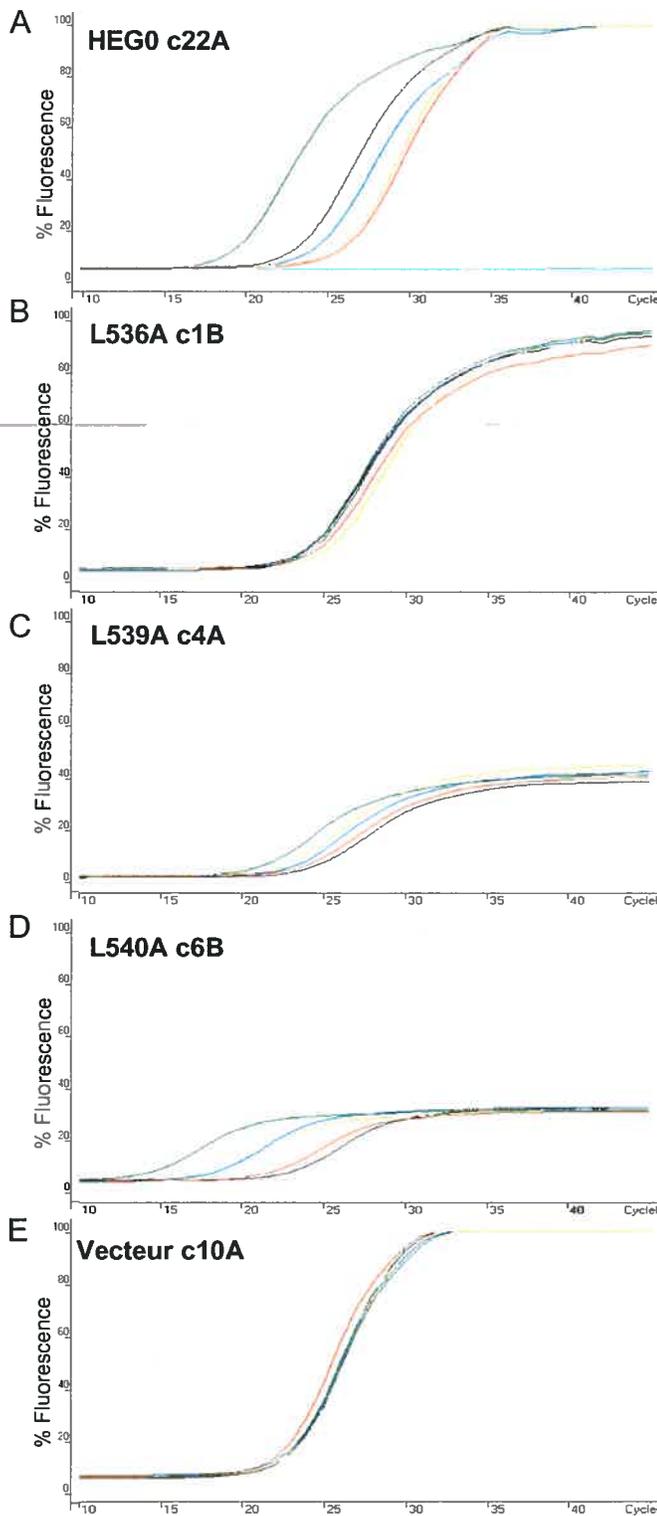
Document 1 : Représentation schématique du vecteur pcDNA3.1-hygro(+)



Comments for pcDNA3.1/Hygro (+):  
5307 nucleotides

CMV promoter: bases 209-368  
T7 promoter/priming site: bases 863-882  
Multiple cloning site: bases 895-9210  
BGH reverse priming site: bases 1022-1030  
BGH polyadenylation signal: bases 1024-1035  
ori origin: bases 1208-1711  
SV40 promoter and origin: bases 1776-2100  
Hygromycin resistance gene: bases 2152-3541  
SV40 early polyadenylation signal: bases 3354-3538  
pUC origin: bases 3785-4456 (complementary strand)  
Ampicillin resistance gene: bases 4631-5416 (complementary strand)

[www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)



### Document 2: Exemples de courbes d'amplification résultant du PCR en temps réel

Résultats obtenus lors de l'amplification du gène TFF1 dans les cellules MDA-MB 231-HEG0 c22A (A), MDA-MB 231-L536A c1B (B), MDA-MB 231-L539A c4A (C), MDA-MB 231 L540A c6B (D) et MDA-MB 231 vecteur c10A (E) en PCR en temps réel en absence et en présence d'E2, d'OHT, d'ICI et de Ral. Chaque courbe montre un échantillon représentatif du triplicata d'une expérience.