

2 M 11. 3353.1

Université de Montréal

Modulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs des
estrogènes par le récepteur de chimiokine CXCR4

par

Julie Lepage

Département de biochimie

Faculté de médecine

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

Août 2005

© Julie Lepage, 2005



W

4

U58

2006

V.032

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Modulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs des
estrogènes par le récepteur de chimiokine CXCR4

présenté par :

Julie Lepage

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Nikolaus Heveker

.....
président-rapporteur

Dr André Tremblay

.....
directeur de recherche

Dr Sylvain Chemtob

.....
membre du jury

RÉSUMÉ

Les ERs sont des facteurs de transcription activés par la présence de leur ligand, l'estrogène, qui font parties de la famille des récepteurs nucléaires. Le ligand de CXCR4, la chimiokine SDF-1 (stromal-cell derived factor 1), est un facteur chimiotactique et prolifératif de nombreux types cellulaires, dont le gène a récemment été identifié comme cible des ERs. L'augmentation de la prolifération cellulaire en réponse aux estrogènes serait médiée par l'augmentation de SDF-1, et donc par l'activation de CXCR4. Le récepteur CXCR4 permet l'activation de plusieurs voies signalétiques impliquant des kinases dont la voie des MAPKs. Notre laboratoire a récemment démontré que la cascade de phosphorylation par les MAPKs augmente l'activité transcriptionnelle de ER α et ER β de façon ligand indépendante. Nous croyons ainsi que l'activation de CXCR4 régule les fonctions de ER α et ER β . Nous observons qu'en réponse à l'activation de CXCR4, les deux isoformes activent la transcription sur un promoteur contenant un ERE (estrogen response element). De plus, cette régulation semble être plus importante en présence d'hormone. Par contre, sur un promoteur contenant un élément de réponse AP-1, les ERs régulent différemment la transcription suite à l'activation de CXCR4. Dans le cas de ER β , l'activation transcriptionnelle sur un AP-1 semble être dépendante de l'AF-1 et de son intégrité puisque la mutation de sérines ciblées par la phosphorylation des MAPKs empêche cette activation. Il semble donc que le signal du récepteur CXCR4 influence l'activité de ER α et ER β permettant ainsi une boucle de régulation entre la réponse estrogénique et celle des chimiokines.

Mots-clés : transcription, récepteurs nucléaires, estrogènes, phosphorylation, chimiokines, signalisation par les MAPKs, récepteurs couplés aux protéines G, cancer du sein

ABSTRACT

Estrogen receptors (ER) are part of the superfamily of nuclear receptors and they modulate the expression of target genes in response to their ligands. The ligand of CXCR4, the chemokine SDF-1 (stromal-cell-derived factor-1) has recently been identified as one of those target genes. CXCR4 is implicated in cellular growth and migration and is largely expressed in breast cancer. Given that ERs are expressed in breast cancer, the proliferative effect of estrogens could be mediated by the expression of SDF-1. Both isoforms, ER α and ER β , are modulated in a ligand-independent manner by phosphorylation by MAPK. Since CXCR4 can activate MAPK, it was important to determine whether the activation of CXCR4 could lead to an increase of ER transcriptional activity. The activity of both ER isoforms was increased in response to SDF-1 in the presence of a classical ERE (estrogen response element) and the response was further increase with estrogens. Moreover, ER β is also up regulated on a non-consensus response element such as an AP-1 in contrast to ER α who is down regulated. The activation of ER β by SDF-1 on AP-1 seems to be mediated by the AF-1 domain. This regulation appears to need an intact AF-1 since point mutations of serine residues commonly phosphorylated by MAPKs, blocks the activation of ER β in presence of SDF-1. Taken together, these results support a role for the CXCR4 signalling in the regulation of ER transcriptional activity. In that respect, the AF-1 domain appears to be a key target for phosphorylation-regulated events in order to modulate the hormonal pathway of estrogen receptors.

Keywords: transcription, nuclear receptors, estrogens, G coupled receptors, chemokines, phosphorylation, MAPK signaling, breast cancer

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	vii
LISTES DES TABLEAUX	viii
LISTES DES ABRÉVIATIONS	ix
REMERCIEMENTS	xii
1 Introduction	54
1.1 Les estrogènes	14
1.1.1 La biosynthèse et fonctions physiologiques.....	14
1.2 Les récepteurs des estrogènes	17
1.2.1 Structure des récepteurs	17
1.2.2 Régulation de la transcription	20
1.2.2.1 Activité transcriptionnelle de ER α et ER β	20
1.2.2.2 Coactivation transcriptionnelle	21
1.2.2.3 Corépression transcriptionnelle	23
1.2.2.4 Phosphorylation ligand dépendante	24
1.2.3 Activation ligand-indépendante	25
1.2.3.1 Activation par les facteurs de croissance	25
1.2.3.2 Régulation de l'activité par PKA	26
1.2.3.3 Activation par PKC.....	27
1.2.3.4 Régulation par AKT.....	27
1.2.3.5 Activation par les CDK.....	28
1.2.4 Activation des éléments de réponse non-consensus.....	29
1.2.5 ER et les cancers	31
1.3 Le récepteur de chimiokine : CXCR4	32
1.3.1 Le ligand : stromal cell derived factor-1 (SDF-1).....	32
1.3.1.1 Description et structure.....	32
1.3.1.2 Sites d'Expression et régulation du SDF-1	33
1.3.1.3 fonctions physiologiques	35
1.3.2 Structure et fonctions du récepteur CXCR4.....	36

1.3.3	Régulation de l'expression de CXCR4.....	39
1.3.4	Voies de Signalisation de l'axe SDF-1 / CXCR4.....	40
1.3.5	CXCR4 et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).....	43
1.3.6	CXCR4, le cancer et les métastases	44
1.4	Interaction fonctionnelle entre ER et CXCR4.....	46
1.5	Hypothèses et objectifs.....	47
2	Matériels et Méthodes.....	50
2.1	Vecteurs d'expression	50
2.2	Culture cellulaire, transfection d'ADN et essais luciférase	51
2.3	Co-culture	52
2.4	Extraction d'ARN, traitement à la DNase, RT-PCR	52
3	Résultats.....	54
4	Discussion.....	74
4.1	Perspectives et Conclusions.....	85
5	Annexes	90
	Annexe 1: Récapitulation des expériences et des résultats	91
6	Bibliographie	93

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Domaines fonctionnels des récepteurs des estrogènes	18
Figure 2. Représentation schématique du récepteur CXCR4.....	38
Figure 3. Les MCF-7 expriment CXCR4, ER β et ER α et répondent à l'E ₂	56
Figure 4. Effet ligand indépendant de l'activation de CXCR4 sur la transactivation des ERs dans les MVLN.....	58
Figure 5. L'activation de CXCR4 modifie l'expression de gènes régulés par les récepteurs des estrogènes en absence de leur ligand	59
Figure 6. Les HEK 293-T répondent à l'estrogène lorsque les récepteurs sont transfectés.....	60
Figure 7. L'activation de CXCR4 stimule autant l'activité transcriptionnelle de ER α que ER β	61
Figure 8. Le traitement des cellules peut se faire de façon paracrine avec des cellules exprimant le SDF-1	63
Figure 9. La stimulation des MVLN avec le SDF-1 en présence d'estrogène permet d'améliorer la réponse ligand dépendante des ERs.....	65
Figure 10. Le SDF-1 a aussi un effet ligand dépendant sur ER β et ER α	66
Figure 11. L'activation de CXCR4 régule l'expression de gènes cibles des ERs contrôlés par un promoteur AP-1	67
Figure 12. Le système rapporteur du gène de la luciférase couplé au promoteur AP-1 fonctionne dans les HEK 293-T	68
Figure 13. Le SDF-1 régule l'activité de ER β et ER α sur un promoteur AP-1	69
Figure 14. ER β et ER α régulent différemment les gènes sous le contrôle d'un promoteur AP-1 en présence de SDF-1	70
Figure 15. L'intégrité de l'AF-1 de ER β est essentielle pour la réponse au SDF-1	72
Figure 16. Modèle proposé pour la modulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes par CXCR4.....	87

LISTES DES TABLEAUX

Tableau I. Cibles de phosphorylation de ER α et ER β et activité transcriptionnelle..... 73

LISTES DES ABRÉVIATIONS

°C : degrés Celcius
A : Alanine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF-1 : Activation function 1
AF-2 : Activation function 2
AIB1 : Amplified in breast cancer 1
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AR : Androgen receptor
Arg : Arginine
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
Asp : Acide aspartique
ATP : Adénosine triphosphate
Bcl-2 : B-cell leukemia/lymphoma 2
BRG1/hBrm : Brahma-related gene/ human brahma
CAK : Cdk-activating kinase
CBP/p300 : CREB-binding protein
CCR : récepteur de chimiokine (motif CC)
Cdk : Cyclin-dependent kinase
ChIP : Chromatin immunoprecipitation
CHO : Chinese hamster ovary
CRE : cAMP response element
CREB : cAMP response element binding protein
CXCL12 (SDF-1) : chimiokine (motif CXC) ligand 12
CXCR4 : récepteur de chimiokine (motif CXC) 4
D : acide aspartique
DAG : Diacylglycerol
DBD : DNA-binding domain
DES : Diethylstilbestrol
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DRIP : Vitamin D receptor interacting proteins
E : Acide glutamique
E₂ : Estradiol
EGF : Epidermal growth factor.
EGFR : Epidermal growth factor receptor
eNOS : Endothelial nitric oxide synthase
ER : Estrogen receptor
ERE : Estrogen response element
Erk : Extracellular signal-regulated kinase
ERR : Estrogen receptor-related receptor
F : Phénylalanine
FAK : Focal adhesion kinase
FBS : Fetal bovine serum
FSH : Hormone folliculostimulante
gp : glycoprotéin

GPCR : G-protein coupled receptor
GPR-30 : G-protein coupled receptor 30
GR : Glucocorticoid receptor
GRK : G-protein coupled receptor kinase
GST : Glutathion S-transferase
H : histidine
HAT : Histone acetyltransferase
HDAC : Histone déacétylase
HeLa : Henrietta Lacks cells
HepG2 : hepatocellular carcinoma cells
HIF : Hypoxia-inducible factor
HNF-3 : Hepatocyte nuclear factor
HRE : Hormone response element
HSP90 : Heat shock protein
ICI : Imperial chemical industries
IGF-1 : Insulin-like growth factor-1
IL : Interleukin
IP-10 : CXCL10 (chimiokine (motif CXC) ligand 10)
JAK : Janus kinase
K : lysine
Kb : kilobase
KSHV : Kaposi's Sarcoma Herpesvirus- G protein-coupled receptor
L : leucine
LBD : Ligand-binding domain
LDL : Low density lipoprotein
LH : Hormone lutéinisante
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MgCl₂ : Chlorure de magnésium
Mic-1 : Macrophage inhibitory cytokine 1
MK : Megacaryocyte
mL : millilitre
mM : millimolaire
MMP : matrice metalloproteinase
MR : Mineralocorticoid receptor
N : Asparagine
N-CoR : nuclear receptor corepressor
NF 1 : Neurofibromin 1
ng : nanogrammes
nM : nanomolaire
NO : Nitric oxyde
NRF-1 : Nuclear respiratory factor 1
OHT : 4-hydroxytamoxifène
P : Proline
pb : paires de bases
p/CAF : p300/CBP-associated factor
p/CIP : p300/CBP/interacting protein
PBS : Phosphate buffer solution
PBSF : pre-B cell growth stimulating factor
PCR : Polymerase chain reaction

PGC : primordial germ cells
 PI 3-kinase : Phosphoinositide 3-kinase
 PIP : Phosphatidyl inositol phosphate
 PKA : Protéine kinase A
 PKC : Protéine kinase C
 PMA : Phorbol myristate acetate
 Pol II : ARN Polymérase II
 PR : Progesterone receptor
 PXR : Pregnane receptor
 R : Arginine
 RAFTK : Related adhesion focal kinase
 RAR : Retinoid acid receptor
 RID : receptor interacting domain
 RLU : Relative luciferase unit
 RTK : Recepteur tyrosine kinase
 RT-PCR : Reverse transcription-polymerase chain reaction
 RXR : Retinoid X receptor
 S : Serine
 SDF-1 : stromal-cell derived factor 1
 Ser : Serine
 SERM : selective estrogen receptor modulators
 SF-1 : Steroidogenic factor 1
 siRNA : small interfering RNA
 SMRT : silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors
 SRC : Steroid receptor coactivator
 STAT : Signal transducers and activators of transcription
 SWI / SNF : Switch gene / gène qui provoque le phénotype « sucrose non-fer » dans la levure
 T : Thréonine
 TAF : Transcription associated factor
 TBP : TATA-binding protein
 TGF : Tumor growth factor
 Thr : Thréonine
 Tk : Thymidine kinase
 TM : Transmembrane domain
 TNF : Tumor necrosis factor
 TNF α : Tumor necrosis factor α
 TPA : phorbol-12-myristate-13-acetate
 TR : Thyroid receptor
 TRAP : thyroid hormone receptor associated proteins
 TRE : TPA response element
 V : Valine
 VEGF : Vascular endothelial growth factor
 VHL : Von Hippel-Lindau
 VIH : virus de l'immunodéficience humaine
 W : Tryptophane
 XPF : Exocrine pancreas transcription factor

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes collègues et amies Mélanie, Annie, Amélie, Nathalie, Julie et Catherine qui m'ont toujours aidée, encouragée et donné de judicieux et précieux conseils.

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

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

Également, un merci très important à Nikolaus Heveker pour sa collaboration et son soutien inestimables dans le projet ainsi que pour sa grande disponibilité.

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

1 INTRODUCTION

1.1 LES ESTROGÈNES

Les estrogènes sont des molécules lipophiliques qui sont responsables d'une variété d'effets sur la croissance, le développement et la différenciation, incluant l'importante fonction de régulation dans le système reproducteur des mâles et des femelles, dans le développement et la différenciation des glandes mammaires, ainsi que ses rôles comme agent anti-athérosclérotique et neuroprotecteur (1).

1.1.1 LA BIOSYNTHÈSE ET FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES

Les estrogènes font partie de la famille des hormones stéroïdiennes et sont synthétisés principalement à partir de précurseurs androgéniques. Le 17β -estradiol, la forme la plus biologiquement active est produite suite à l'incorporation, par les cellules stéroïdogéniques, de cholestérol qui est transféré du cytoplasme vers les membranes internes des mitochondries et dans le réticulum endoplasmique. Les enzymes du cytochrome P450 et le complexe enzymatique P450 aromatasase monooxygénase y catalysent le clivage des chaînes latérales du cholestérol ainsi que l'aromatation. En trois hydroxylations consécutives, l'estrone et l'estradiol sont produits à partir des leurs précurseurs respectifs soit l'androstènedione et la testostérone (2). La principale source d'estradiol chez la femme est le follicule ovarien et le corps jaune, structure formée suite à l'ovulation. Les cellules de la thèque captent le cholestérol et forment les androgènes qui diffusent dans les cellules de la granulosa où ils sont aromatisés en estrogènes (3). Chez les hommes, les estrogènes sont majoritairement produits dans les testicules. Les cellules de Leydig, de Sertoli ainsi que les spermatozoïdes à différents stades de maturation expriment l'aromatase mais les cellules de Leydig sont sans contredit les plus grandes productrices d'estrogènes (4).

La production d'estrogènes est régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire. La Gn-RH (gonadolibérine) est sécrétée par l'hypothalamus selon un mode cyclique, ce qui stimule l'adénohypophyse à produire et à sécréter la FSH (hormone folliculostimulante) et la LH (hormone lutéinisante). La LH et la FSH stimulent la croissance et la maturation du follicule ovarien ainsi que la sécrétion des estrogènes (5).

Les estrogènes sont majoritairement produits par les gonades et ont donc des actions sur le développement de celles-ci. Ils stimulent la croissance et la maturation des organes reproducteurs et des seins au moment de la puberté et maintiennent leur fonctionnement à l'âge adulte, activent l'ovogenèse et l'ovulation et stimulent l'épaississement de l'endomètre. Au niveau des seins, les estrogènes stimulent la croissance et la différenciation du canal épithélial, induisent la mitose des cellules cylindriques des canaux et stimulent la croissance du tissu conjonctif (6). Au cours de la grossesse, ces stéroïdes stimulent les mitoses des cellules myométriales ainsi que la croissance de l'utérus et des glandes mammaires. Ils interagissent également avec la relaxine pour produire le ramollissement et le relâchement des ligaments pelviens et de la symphyse pubienne favorisant la dilatation du col de l'utérus à la fin de la grossesse (7). Certains caractères sexuels secondaires sont aussi contrôlés par les estrogènes comme l'allongement des os, la féminisation du squelette, l'apparition des poils pubiens et la disposition de tissus adipeux aux hanches et dans les seins. Chez les hommes, l'estradiol est maintenant considéré comme un facteur de survie des cellules germinales (8) et serait aussi impliqué dans la maturation des spermatides (9) ainsi que dans la capacitation, la réaction de l'acrosome et dans la fertilisation (10), ces dernières étapes se produisent dans le tractus génital de la femme lors de la fécondation.

Les estrogènes ont des actions diverses sur des tissus périphériques dont le système nerveux central. Le cerveau a la capacité d'aromatiser les androgènes afin de former des estrogènes. Le taux d'aromatisation est très bas comparativement à ceux dans d'autres tissus mais il ne n'est pas négligeable (11). Une de leurs actions serait d'agir en synergie avec les neurotrophines qui aident la migration des axones (12;13). La présence d'estrogènes dans le cerveau pourrait aussi avoir un effet neuroprotecteur en promouvant la défense neuronale et les mécanismes de mémoire dans l'hippocampe où ils augmentent la densité de récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (14). À des concentrations micromolaires les estrogènes ont des propriétés antioxydantes (15) ce qui diminuerait les risques de la maladie d'Alzheimer en protégeant les neurones contre la toxicité des peptides β -amyloïdes (16). Les astrocytes de la glie seraient les cibles majoritaires des estrogènes dans le cerveau puisqu'ils expriment les deux types de récepteurs (17) et qu'ils jouent un rôle dans les processus induits par les estrogènes tels que la formation des synapses, la plasticité et la morphologie neuronale (18). Il est donc, possible de relier l'augmentation

du risque de la maladie d'Alzheimer chez les femmes en postménopause avec la chute de production d'estrogènes et donc d'élaborer des molécules pour l'hormonothérapie, mais pour le moment les études cliniques démontrent aucun effet bénéfique du traitement aux estrogènes pour la progression de la maladie (19).

Les estrogènes ont aussi un effet cardio-protecteur, ils ont été détectés dans les cellules endothéliales à différents endroits (20). La présence d'estrogènes provoque une vasodilatation rapide et de courte durée en stimulant la eNOS (endothelial nitric oxide synthase) responsable de la production d'oxyde nitrique (21) et en stimulant la production de prostacycline (22). Le tonus des muscles lisses vasculaires est aussi réduit par les estrogènes par l'ouverture de canaux calciques spécifiques (23). Le rôle d'antioxydant des estrogènes a été proposé comme étant le facteur de protection contre l'athérosclérose, puisqu'il a été observé que leur utilisation diminue la progression de plaques athérosclérotiques chez des singes ovariectomisés (24). Ils exercent aussi leurs effets anti-athérosclérotiques en diminuant les taux de LDL (low density lipoprotein) sériques en augmentant entre autre l'expression du récepteur LDL dans le foie (25).

Les ostéoclastes et les ostéoblastes sont des cibles des estrogènes qui ont comme effet global de diminuer la résorption osseuse (26;27). Les estrogènes inhibent la fonction des ostéoclastes qui dégradent la matrice osseuse. Une déficience en estrogènes est reconnue pour accélérer la résorption osseuse et les risques de fractures, puisqu'elle entraîne une plus grande activité des ostéoclastes chez des souris ovariectomisées dû à une augmentation de TNF, d'IL-1 et IL-6, trois molécules qui sont reconnues pour stimuler indirectement la différenciation des ostéoclastes (28).

Les estrogènes exercent des fonctions variées dans plusieurs organes différents. Ils peuvent par exemple améliorer l'apparence de la peau, influencer l'humeur, réduire la pression intra-oculaire et diminuer les risques du cancer du colon (2). Par contre, pour médier ces effets, ils doivent interagir avec leurs récepteurs qui eux enclencheront toute une cascade de signalisation et donc la localisation de ces récepteurs influence aussi l'action des estrogènes.

1.2 LES RÉCEPTEURS DES ESTROGÈNES

1.2.1 STRUCTURE DES RÉCEPTEURS

Les récepteurs des estrogènes font partie d'une grande famille de facteurs de transcription nucléaire modulés par la liaison d'un ligand. Ils régulent l'expression de gènes cibles en liant des HRE (hormones response elements) dans le promoteur. Cette famille est subdivisée en quatre grandes classes selon les propriétés de dimérisation et le type de ligand (29;30). Tout d'abord, la Classe I est constituée des récepteurs des stéroïdes s'associant en homodimères pour se lier à des HRE constitués de séquences palindromiques inversées. Cette classe comprend les récepteurs des estrogènes (ER), des androgènes (AR), des glucocorticoïdes (GR), des minéralocorticoïdes (MR) et de la progestérone (PR). La Classe II regroupe les récepteurs qui s'associent en hétérodimères avec le récepteur RXR (retinoid X receptor) et pour lesquels des ligands physiologiques ont été identifiés comme le récepteur de l'acide rétinoïque RAR. La Classe III inclut les récepteurs orphelins, c'est-à-dire les récepteurs pour lesquels aucun ligand n'a été découvert, qui fonctionnent en homodimères et qui se lient à des séquences HRE répétées directes sur l'ADN, comme les récepteurs de la Classe II, tels que le récepteur RXR et le récepteur PXR (pregnane receptor). Enfin, les récepteurs orphelins qui agissent en monomères pour se lier à des sites simples HRE de l'ADN constituent la Classe IV. Cette classe comprend le récepteur SF-1 (steroidogenic factor 1) et les récepteurs ERR (estrogen-related receptor) (29).

Dans le cas des récepteurs des estrogènes il existe deux isoformes. ER α fut initialement cloné en 1986 (31;32) et ce n'est qu'en 1996 qu'un second récepteur des estrogènes, ER β , fut identifié chez l'humain (33). Les deux isoformes sont situés sur deux chromosomes différents soit les chromosomes 6 et 14 respectivement (34), ce qui indique qu'ils auraient divergés très tôt dans l'évolution. Leur structure correspond à celle des récepteurs nucléaires qui ont une structure conservée comprenant trois régions de grande homologie divisées en six domaines nommés par des lettres (**Figure 1**). Il y a le domaine de liaison à l'ADN qui est le plus conservé à travers les récepteurs et deux régions moins conservées soient les régions N-terminale et C-terminale qui contient le domaine de liaison au ligand (LBD) (35).

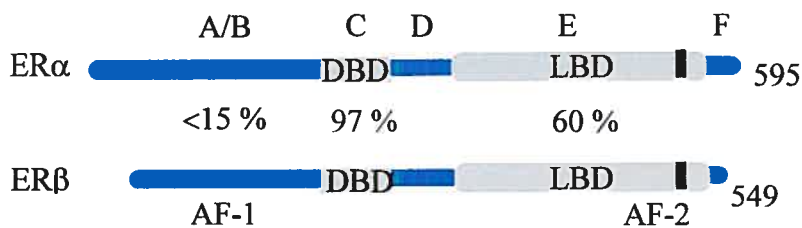


Figure 1. Domaines fonctionnels des récepteurs des estrogènes

La région N-terminale des récepteurs des estrogènes module la transcription de façon gène et cellule spécifique à travers l'AF-1 (Activation Fonction-1) et elle comprend les domaines A et B. Cette région est la moins conservée entre les isoformes, il y a moins de 15% d'homologie et ce serait particulièrement grâce à cette région que les deux récepteurs différencieraient dans leurs fonctions. Il a été démontré que l'AF-1 seul a une activité constitutive intrinsèque et que l'activité de l'AF-1 de ERβ est plus faible que celle de ERα (36;37). La région N-terminale ne peut pas lier le ligand mais elle peut interagir avec la région C-terminale afin de moduler l'activité transcriptionnelle. En effet, les régions C-terminales des deux récepteurs ont une activité transcriptionnelle semblable mais l'utilisation de récepteurs pleine longueur dans certaines conditions permet de retrouver les différences d'activité pour lesquelles ERα est plus actif que ERβ (37). L'AF-1 contient aussi plusieurs sites de phosphorylation ciblés par les protéines faisant parties de la voie de signalisation des MAPKs qui répondent aux facteurs de croissance (38-40). Ce qui suggère que l'activation de l'AF-1 pourrait dépendre de la phosphorylation. Cette région permet également le recrutement de coactivateurs transcriptionnels (41).

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) contient deux motifs à doigts de zinc impliqués dans la liaison à l'ADN et la dimérisation. Cette région est la plus conservée à travers la grande famille des récepteurs nucléaires mais elle reconnaît néanmoins un HRE spécifique à chaque récepteur (42). Dans les cas des récepteurs aux estrogènes, elle permet de lier avec une haute affinité deux séquences répétées inversées appelées ERE (estrogen response element). La séquence minimale consensus d'un ERE est : 5'-GGTCAnnnTGACC-3'. La nature des séquences bordant le ERE est aussi importante pour déterminer l'affinité avec laquelle les ERs s'y lient (43). Les récepteurs aux estrogènes α et β reconnaissent le même demi-ERE et peuvent donc homodimériser ou

hétérodimériser. De plus, l'affinité du récepteur pour son ERE augmente suite à la liaison du ligand et suite à une phosphorylation de l'AF-1 en l'absence du ligand *in vitro*. Par ailleurs, la majorité des gènes cibles des ERs n'ont pas comme ERE un palindrome parfait (43). Tout ceci suggère qu'il pourrait y avoir une sélection des EREs dans différentes conditions ce qui entraîneraient une expression différentielle des gènes cibles.

Le domaine D du récepteur est la région charnière, il sépare la région de C-terminale du DBD et contient des séquences pour la dimérisation des récepteurs et pour la localisation nucléaire (44;45). Il a aussi été démontré que la région charnière peut interagir avec des protéines chaperonnes ou des corépresseurs afin de réguler l'activité des ERs (46).

La région C-terminale contient le domaine E de liaison au ligand (LBD), il est conservé à 60% entre les deux isoformes de ERs (47). Ce domaine est composé de douze hélices α importantes pour la liaison du ligand, l'interaction avec des corégulateurs et la dimérisation (48). Les hélices α forment une structure compacte en forme de pochette qui permet d'accueillir le ligand. La liaison du ligand dans la pochette altère la conformation du LBD (49) et l'hélice 12 forme un couvercle formant une pochette hydrophobe qui entoure le ligand et une plate-forme à la surface du LBD qui permet de recruter des corégulateurs (50) (51). Cette hélice est indispensable à la fonction de l'AF-2 et constitue le domaine F situé à l'extrémité de la région C-terminale qui est essentiel à l'activation transcriptionnelle en réponse au ligand (52). Le recrutement de coactivateurs va se faire de façon différente selon les différents composés estrogéniques qui se lient à ER. En effet, E₂ et le raloxifène forment des contacts différents dans la pochette hydrophobe du LBD de ER α ce qui entraîne une position de l'hélice 12 différente. Par exemple, le coactivateur SRC-1 sera recruté en présence d'E₂ mais pas avec le raloxifène ou le tamoxifène, des anti-estrogènes (53).

Des études indiquent que le rôle de ER β pourrait être redondant à celui de ER α puisqu'il pourrait compenser pour la perte de ER α dans certains mécanismes. En effet, dans les souris dont le gène de ER α a été délété, il reste un niveau basal d'expression de PR (gène cible de ER α) qui serait attribué à un mécanisme indépendant de ER α et peut-être donc à l'action de ER β (54). Cette hypothèse peut être soutenue par la grande homologie qui

existe entre les domaines de liaisons à l'ADN des deux isoformes qui leur permettrait de reconnaître les mêmes ERE et donc les mêmes gènes cibles.

Par contre, ER α et ER β ne sont pas toujours exprimés de façon équivalente et conjointe de sorte que la diversité dans leur patron d'expression suggère que chaque ER possède des fonctions biologiques bien distinctes. L'isoforme ER α est prédominant dans les tissus mammaires, l'utérus, le col de l'utérus et le vagin. Quant à ER β , il est principalement détecté dans les ovaires, la prostate, les testicules, la rate, les poumons, le thymus et l'hypothalamus (55). Dans le foie, se trouve majoritairement ER α tandis que dans les tissus gastro-intestinaux, ER β y est plutôt exprimé seul (56). Il a aussi été démontré que les deux isoformes sont exprimés dans le cerveau mais leur expression est différente selon les régions (57). Par ailleurs, dans les organes où les deux isoformes sont coexprimés, leur niveau d'expression est différent. L'effet spécifique des ERs pourrait alors dépendre de son hormone, du sous-type de récepteur impliqué, des caractéristiques du promoteur du gène cible et de l'équilibre entre coactivateurs et corépresseurs transcriptionnels qui moduleront la réponse transcriptionnelle avec les ERs. Dans cette perspective, les deux récepteurs pourraient donc avoir certaines fonctions redondantes, mais également promouvoir l'expression de gènes qui leur sont spécifiques.

1.2.2 RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION

1.2.2.1 ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DE ER α ET ER β

Les récepteurs des estrogènes sont définis comme étant des facteurs de transcription hormonodépendants, qui doivent lier une hormone afin d'être transcriptionnellement actifs. Ils font aussi partie de la classe I de la grande famille des récepteurs nucléaires dans laquelle les récepteurs inactifs sont liés à des protéines chaperonnes contrairement aux récepteurs de la classe II qui lient l'ADN en absence de ligand et exercent une activité répressive appelée « silencing », sur les promoteurs des gènes cibles (58). En absence de ligand, le récepteur est séquestré par un complexe multiprotéique d'inhibition. Ces protéines servent de chaperones qui maintiennent le récepteur dans un état inactif ou masquent le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs (2). La localisation exacte des récepteurs dans cette conformation n'est pas claire. Une distribution équilibrée survient

probablement entre le cytoplasme et le noyau pour l'ensemble des récepteurs nucléaires. Cet équilibre serait donc renversé après la liaison de l'hormone. Par contre, les récepteurs des estrogènes sont majoritairement nucléaires même en absence de leur ligand (45;59).

En présence de ligand, les récepteurs des estrogènes changent de conformation, se dissocient des complexes de protéines chaperonnes, s'homodimérisent ou s'hétérodimérisent et lient l'ADN. Cette liaison permet le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base qui se fait de façon directe ou indirecte par l'interaction de corégulateurs (60). Ces corégulateurs créés selon leur nature et l'état d'activation du récepteur un environnement favorable ou défavorable à la transcription et communiquent avec la machinerie transcriptionnelle de base (51). Le récepteur peut aussi être phosphorylé de façon ligand-indépendante par les voies de signalisation activées par les facteurs de croissance, ce qui lui permet de lier l'ADN et d'activer la transcription de gènes cibles spécifiques (61). Dans les deux cas, une fois l'association du complexe d'initiation de la transcription complétée, l'ARN polymérase II est recrutée et initie la transcription.

1.2.2.2 COACTIVATION TRANSCRIPTIONNELLE

La liaison du complexe à l'ADN conduit au recrutement de protéines coactivatrices pour former un complexe de coactivation transcriptionnelle assurant les interactions nécessaires avec la machinerie transcriptionnelle de base et le remodelage de la chromatine (51).

Le rôles de ces corégulateurs est de modifier l'enroulement de la chromatine afin de permettre l'accessibilité des promoteurs des gènes cibles à la machinerie transcriptionnelle de base et de stabiliser la formation du complexe de préinitiation de la transcription. Il existe trois classes générales de corégulateurs qui permettent de réguler la transcription en interagissant avec les récepteurs nucléaires, il y a les remodeleurs de chromatine, les coactivateurs qui ont différentes activités enzymatiques et les corépresseurs (62-64).

Plusieurs de ces coactivateurs ou protéines de la machinerie transcriptionnelle de bases ont été trouvées comme interagissant directement avec le récepteurs. L'analyse des domaines d'interaction des récepteurs nucléaires avec les coactivateurs a mené à l'identification d'une séquence consensus LXXLL où le L représente une leucine et les X n'importe quel

acide aminé. Ces motifs interagissent avec la plate-forme de l'hélice 12 formée par la présence du ligand (48). Par contre, un nombre très élevé de coactivateurs a été identifié et plusieurs doivent être présents à un même promoteur pour l'activation de la transcription, le problème conceptuel réside dans le fait que ce nombre de coactivateurs nécessaire excède la capacité des récepteurs à interagir directement avec eux. Un modèle de recrutement combinatoire a donc été élaboré selon lequel, quelques coactivateurs interagiraient directement avec le récepteur et ceux-ci recruteraient de façon séquentielle les autres coactivateurs qui interagissent avec la machinerie transcriptionnelle (65).

Par définition, la chromatine est inactive transcriptionnellement puisque l'ADN est enroulé serré autour de complexes protéiques, les histones, ce qui diminue l'accessibilité à l'ADN par d'autres protéines. Les complexes BRG1/hBrm sont recrutés suite à la liaison du ligand au récepteur. Ces complexes sont les homologues de SWI2/SNF2 chez la drosophile utilisent l'énergie de l'ATP pour mobiliser ou altérer la structure des nucléosomes ce qui facilite l'accès à l'ADN (66). Le recrutement de ces complexes prépare le complexe d'initiation de la transcription pour la deuxième étape d'activation génique qui requiert le recrutement des facteurs avec l'activité HAT (histone acétyltransferase) (65). Parmi ces facteurs, il y a entre autres certains membres de la famille SRC qui recrutent d'autres protéines dont CBP/p300 et pCAF qui ont aussi une activité HAT. Cette activité d'acétylation des histones, leur donne une charge globale négative, ce qui diminue leurs interactions avec l'ADN de charge positive (50). L'activité HAT de certains coactivateurs peut aussi cibler des facteurs de transcription basale comme TFIIE β et TFIIF, ce qui a pour effet d'augmenter leur activité (67). Enfin, le complexe TRAP/DRIP est recruté et interagit directement avec les composants de la machinerie transcriptionnelle de base afin d'accélérer l'initiation de la transcription (65). D'autres coactivateurs possèdent des activités enzymatiques très variées allant de l'activité méthyltransférase, ubiquitine-ligase à hélicase d'ARN mais elles ont toutes pour but de faciliter l'accès à l'ADN aux facteurs de transcription (50). C'est donc en influençant l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription basale, avec l'aide de leurs corégulateurs que les récepteurs stéroïdiens modulent la transcription des gènes ayant des promoteurs hormonodépendant.

Pour initier la transcription, l'ARN polymérase II et les facteurs de transcription basale TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIH doivent s'assembler au promoteur (68).

TFIID est un complexe protéique comprenant TBP (TATA box binding protein) qui s'associe fortement à au moins huit facteurs TAFs (TATA associated factors) (69). Il a été démontré que TBP interagit directement avec l'AF-1 et l'AF-2 de ER *in vitro* (70). Même de façon ligand indépendante, les ERs peuvent interagir avec des facteurs transcriptionnels de base (71). Ces interactions directes contribuent donc à l'assemblage du complexe de pré-initiation qui est favorisé par le recrutement successif de coactivateurs au récepteur nucléaire et permettent de recruter l'ARN polymérase afin d'initier la transcription.

Les coactivateurs peuvent aussi interagir avec les récepteurs des estrogènes de façon ligand-indépendante. Il a été démontré que p68, une hélicase d'ARN, interagit avec l'AF-1 de ER α par des études d'interaction *in vitro*. Cette interaction est augmentée par la phosphorylation de la sérine 118 de l'AF-1 par les MAPK (72). La phosphorylation de cette sérine 118 et aussi des sérines 104/106 de ER α peut aussi permettre le recrutement de SRC et CBP (73). L'activation ligand indépendante de ER β par les facteurs de croissance, permet également le recrutement de SRC-1 à l'AF-1. Par ailleurs, la présence de CBP contribue à augmenter l'activité ligand-indépendante de ER β médiée par SRC-1, ce qui indique que CBP est aussi impliqué dans le complexe de coactivation de ER β phosphorylé (74;75). Ces résultats démontrent la capacité que possèdent plusieurs voies de signalisation d'activer la transcription par l'intermédiaire de ER en permettant le recrutement de corégulateurs uniques ou communs à ces voies.

1.2.2.3 CORÉPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE

Plusieurs membres de la famille des récepteurs nucléaires semblent exercer des rôles physiologiques critiques en réprimant activement la transcription de façon ligand dépendante ou indépendante. En présence de tamoxifène et de raloxifène, les récepteurs des estrogènes recrutent les corépresseurs NCoR et SMRT qui interagissent avec l'hélice 12 des récepteurs par leur domaine RID (receptor interacting domain) en C-terminal (76). Certaines études démontrent que SMRT et NCoR peuvent interagir avec ER même en absence du ligand et l'interprétation qui en découle est que la présence d'anti-estrogènes renforce cette interaction alors que la présence de E2 induit la dissociation des corégulateurs (77). Contrairement aux coactivateurs qui ont l'activité HAT intrinsèque, les

corépresseurs doivent recruter un complexe de protéines ayant l'activité histone déacétylase (HDAC) qui permet de réprimer l'expression de gènes en maintenant la chromatine dans un état plus condensé, ce qui empêche la machinerie de transcription de lier l'ADN (78).

1.2.2.4 PHOSPHORYLATION LIGAND DÉPENDANTE

Le complexe formé par le récepteur stéroïdien et son ligand est une cible pour les kinases et cette phosphorylation coïncide avec une augmentation de l'affinité du récepteur pour son ligand ainsi qu'une augmentation de l'activité transcriptionnelle (60). Cette phosphorylation modifie aussi la localisation cellulaire du récepteur en plus de permettre des interactions avec différentes protéines (61). En utilisant différentes approches, cinq sites de phosphorylation ont, jusqu'à présent, été identifiés sur ER α . Quatre de ces sites se situent dans l'AF-1 soit les sérines 104, 106, 118 et 167 alors que le dernier est situé dans le LBD sur la tyrosine 537 (79-81).

Pour le récepteur des estrogènes ER α , la phosphorylation ligand-dépendante de la serine 118 est provoquée par la surexpression de la Cdk7 causant l'augmentation de l'activité de la transcription. De plus, la phosphorylation de la S118 survient suite à l'interaction de TFIID avec le domaine de liaison au ligand (LBD) de ER α . Pour se faire, l'interaction de ER α avec TFIID, composé de CAK, requiert l'intégrité de l'hélice- α 12 de l'AF-2 du LBD de ER α . Par ailleurs, l'association des sous-unités p62 et XPD de TFIID avec l'AF-2 de ER α dans un mode d'activation ligand-dépendante est également nécessaire (82).

L'activité transcriptionnelle de ER α est aussi régulée par la voie de signalisation de la MAPK p38 dans les cellules cancéreuses de l'endomètre. La présence de 17 β -estradiol active p38 qui phosphoryle ER α non pas dans la partie N-terminale mais sur la thréonine 311 située au début du domaine de liaison au ligand (83). Cette phosphorylation n'altère pourtant pas la liaison du ligand à son récepteur mais plutôt sa localisation cellulaire. Lorsque la Thr311 est phosphorylée, l'export nucléaire de ER α est bloqué et son interaction avec SRC-1 est augmentée ce qui pourrait expliquer le fait que l'activation de p38 augmente l'activité transcriptionnelle de ER α (83).

1.2.3 ACTIVATION LIGAND-INDEPENDANTE

Les récepteurs aux estrogènes peuvent être activés par leur ligand mais aussi par d'autres molécules qui ne sont pas des estrogènes comme l'AMPc, la dopamine, le TPA (phorbol-12-myrostate-13-acetate) et les facteurs de croissance tels que EGF (epidermal growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor), TGF- β (transforming growth factor β) (84). L'activation transcriptionnelle des ERs médiée par ces facteurs est due à la phosphorylation des récepteurs, dont les sites phosphorylés se retrouvent dans l'AF-1. La plupart de ces sites sont des cibles de phosphorylation par les MAPK. Dans la majorité des cas, l'activité ligand-indépendante ne nécessite pas la présence de l'AF-2 du récepteur pour activer la transcription, alors qu'il l'est dans d'autres cas (85).

1.2.3.1 ACTIVATION PAR LES FACTEURS DE CROISSANCE

L'intérêt pour le rôle des facteurs de croissance dans les fonctions médiées par ER de façon estrogène-indépendante est venu suite à la découverte que les actions induites par le EGF étaient bloquées par l'utilisation d'un anti-estrogène, le ICI 164,384 (86). De plus, la synthèse d'ADN et la transcription induites par le EGF sont absentes dans l'utérus de souris dont le gène codant pour ER α est délété (87). La cascade d'événements intracellulaires qui transmet le signal du EGF ou d'un autre facteur de croissance aux ERs, débute par la stimulation de la voie Ras-Raf-MAPK par les récepteurs membranaires tyrosine kinase tels EGFR. Par la suite, cette activation mène à la phosphorylation de ER sur des résidus sérines faisant partie de séquences consensus de phosphorylation par les MAPK, soit le motif PXX-S/T-P où P signifie proline, S, sérine, T, thréonine et X n'importe quel acide aminé. L'activation du récepteur aux EGF entraîne la phosphorylation sur le résidu sérine 118 d'ER α (88) et les résidus sérines 106 et 124 dans le cas d'ER β (74), ce qui résulte en une l'activation transcriptionnelle des récepteurs et le recrutement de SRC-1 par ER β . Une autre étude démontre que l'activation de ER α dépendante de EGF se produit par la phosphorylation de la serine 167 par la kinase pp90^{rsk1} (89) suite à l'activation de pp90^{rsk1} par les MAPK. Plus récemment, il a été déterminé que le dimère ErbB2/ErbB3 faisant partie de la famille des récepteurs tyrosines kinase aux facteurs croissances activé par l'héréguline réprimait la croissance cellulaire dépendante des estrogènes ainsi que l'activité ligand dépendante de ER α et ER β . De plus, la répression de

ER β est dépendante de la fonction AF-1 et implique la voie de la MAPK p38 contrairement à la répression de ER α (90). Enfin, les coactivateurs jouent un rôle important dans l'habilité des facteurs de croissance à activer ER. Il a aussi été montré que les coactivateurs de la famille p160 sont des cibles des MAPK et que cette phosphorylation favorise l'interaction avec p300/CBP et possiblement avec d'autres coactivateurs (91). Ces interactions mènent, par la suite, à une régulation de la transcription par le récepteur.

L'importance pathologique de l'induction de ER par les facteurs de croissance n'est pas encore déterminée. Il serait possible que les facteurs de croissances maintiennent un niveau modéré de ERs transcriptionnellement actifs lorsque les taux d'estrogènes sont bas comme par exemple, chez les mâles ou les femelles dans la phase proestrous. La cascade de signalisation initiée par les facteurs de croissance pourrait aussi moduler la réponse des récepteurs des estrogènes lorsqu'ils sont liés à leur ligand et ainsi augmenter les niveaux d'expression de certains gènes cibles (38).

1.2.3.2 RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ PAR PKA

Les récepteurs aux estrogènes peuvent aussi être régulés par la PKA (cAMP-dependent protein kinase). Il a été montré que le neurotransmetteur dopamine stimule la transactivation des récepteurs des estrogènes possiblement par l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc et l'activation de la PKA (92). Trois mécanismes sont impliqués dans ce phénomène : la phosphorylation directe des ERs, la phosphorylation des cofacteurs et les effets médiés par CREB (93;94). Le récepteur des estrogènes α est phosphorylé aux sérines 104, 106, par la PKA (80), par contre, l'activation transcriptionnelle nécessite la présence de l'AF-2 contrairement à l'activation par EGF (95). Par ailleurs, d'autres expériences suggèrent que la région de l'AF-1 n'est pas essentielle à l'activation médiée par PKA parce que des mutants n'ayant pas cette région sont toujours activés par l'AMPc (93). Des expériences utilisant un activateur de la PKA, le 8-bromo-cAMP dans des cultures primaires de rats ont démontré que ER est transcriptionnellement activé de façon ligand-indépendante. Par contre, dans d'autres types cellulaires, aucun activateur de PKA ou inhibiteurs de phosphatases n'a pu augmenter l'expression de gènes cibles de ER (92;96). Récemment, il a été observé que la phosphorylation provoquée par PKA sur ER α survient sur la serine 236, située dans le

domaine de liaison à l'ADN. Dans ce cas-ci, la phosphorylation ne participe pas à la régulation de l'activité transcriptionnelle du récepteur en modulant l'interaction des domaines d'activation de celui-ci avec les coactivateurs, mais plutôt en empêchant la liaison du récepteur à l'ADN et en abrogeant sa dimérisation (97). Les mécanismes sont différents pour l'activation transcriptionnelle ligand-indépendante par PKA, de ER α et ER β . Tout d'abord, un TRE (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate response element) en amont du ERE est nécessaire pour la transcription par ER β alors qu'elle améliore celle de ER α tout en n'étant pas essentielle. De plus, ER α peut interagir avec les facteurs liant le TRE par ses domaines E/F qui sont aussi phosphorylés alors que ceux de ER β ne sont pas phosphorylés et n'interagissent pas avec ces facteurs (98). Ces observations démontrent que la capacité de ces agents à moduler ER reflète des différences dans les fonctions de ER de façon promoteur et type cellulaire spécifique. De plus, il a été montré que le 8-bromo-AMPC, un activateur de la PKA, provoque la phosphorylation du coactivateur SRC-1 (99) et que la mutation des sites phosphorylés de SRC-1 réduit l'activation transcriptionnelle autant de façon ligand-indépendante que ligand-dépendante des ERs.

1.2.3.3 ACTIVATION PAR PKC

Les réponses transcriptionnelles hormono-indépendantes de ER α peuvent également être influencées par des agents stimulant la protéine kinase C (PKC) (100). En effet, l'activation de gènes rapporteurs par ER peut être bloquée par un inhibiteur de PKC, soit le GF109203X (101). De plus, il a été montré qu'il se produit une augmentation de la phosphorylation du domaine A/B de ER α suite à la stimulation de cellules avec un activateur de la voie de PKC, le phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (80;102). Bien que cette voie d'activation ligand-indépendante de ER reste peu caractérisée, la phosphorylation de la serine 118 semble jouer un rôle dans la réponse de ER α à cette voie (38).

1.2.3.4 RÉGULATION PAR AKT

En plus de la voie des MAPKs, il semble que les facteurs de croissance utiliseraient la voie PI-3K/AKT pour activer ER α et induire une prolifération hormono-indépendante (103). Cette voie est la principale voie de survie cellulaire pour une grande variété de types cellulaires elle pourrait donc contrecarrer l'apoptose induite par le tamoxifène, de façon

ER dépendante, dans les cas de cancer résistant au tamoxifène. En effet, l'activation de cette voie dans les MCF-7, entraîne l'augmentation de l'expression de pS2, MIC-1 et Bcl-2, des gènes qui sont impliqués dans la croissance cellulaire ou dans l'inhibition de l'apoptose et dont la régulation par les estrogènes est bien connue sauf pour MIC-1 dont le promoteur n'est pas encore caractérisé (104). Par ailleurs, la phosphorylation de la sérine 167 pourrait jouer un rôle dans l'activité de ER α modulée par AKT puisque cette sérine est phosphorylée lorsque la voie est activée (104). Il est suggéré que cette phosphorylation modulerait l'interaction du récepteur avec les coactivateurs et corépresseurs comme il a été démontré pour la phosphorylation de d'autres sérines. Des travaux en cours dans notre laboratoire ont aussi démontré que cette voie peut activer ER β puisqu'il existe un site consensus de phosphorylation par AKT dans la région D de ER β . La régulation de ER β par cette voie est particulière puisque l'activation d'AKT entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle de ER β mais lorsque des coactivateurs tels que CBP sont présents cette voie réprime l'activité de ER β . Il a été prouvé que cette régulation était due à la phosphorylation de ER β par AKT puisque la mutation de ce site permet de récupérer l'activité du récepteur.

1.2.3.5 ACTIVATION PAR LES CDK

Durant la phase S du cycle cellulaire, la phosphorylation des composants de la machinerie de réplication de l'ADN par le complexe cycline A-Cdk est importante pour l'initiation de la réplication et pour restreindre l'initiation à une seule fois par cycle. Les sérines 104 et 106 de ER α participent à l'activation transcriptionnelle de ER α suite à leur phosphorylation par le complexe cycline A-Cdk2. De plus, l'activation cycline A-Cdk2-dépendante de la transcription provoquée par ER α ne nécessite pas l'AF-2. Il a donc été proposé, que la phosphorylation ligand-indépendante de ER α sur les sérines 104 et 106 par ce complexe, module le recrutement de corégulateurs sur l'AF-1 de ER α tels que les membres de la famille p160, selon que le récepteur provoque la prolifération ou inhibe la différenciation cellulaire (105). Par ailleurs, le niveau d'activation du complexe cycline A-Cdk2 pourrait engendrer des variations des niveaux de phosphorylation et ainsi, moduler l'interaction de ER α avec des protéines intervenant dans la transcription (39).

1.2.4 ACTIVATION DES ÉLÉMENTS DE RÉPONSE NON-CONSENSUS

Les anti-estrogènes sont des agents thérapeutiques pour le traitement et la prévention du cancer du sein. Le tamoxifène est un anti-estrogène utilisé dans la chimiothérapie contre le cancer du sein et fonctionne comme un agent anti-tumoral en inhibant l'action de ER dans les tissus mammaires (106). Paradoxalement, il semble que le tamoxifène agisse en tant qu'agoniste et induirait la prolifération cellulaire dans les tissus utérins ce qui contribuerait à augmenter les risques de cancer de l'utérus qui sont observés lors d'une thérapie prolongée au tamoxifène (107). Une des explications proposées pour cette action spécifique aux tissus des anti-estrogènes serait que ER lié à un ligand peut avoir différentes propriétés de transactivations lorsqu'il interagit avec différents types d'éléments de réponses. En effet, en plus de l'action classique des récepteurs des estrogènes, plusieurs gènes cibles des estrogènes sont régulés par des séquences qui ne lient pas directement les ERs soit des éléments de réponses AP-1, CRE (cyclic AMP response element) et Sp1. Il a été proposé que ER α puisse induire la transcription dans ces conditions par des interactions protéines-protéines directes entre ER α et les autres facteurs de transcription. En fait, ER α interagit directement avec des facteurs tels que Jun, SP-1, SP-3, NF1 et des coactivateurs, suggérant que ER α forme des complexes de coactivation sur la structure formée des facteurs de transcription et l'ADN. Ceci permet l'activation de la transcription par l'habileté de ER à recruter les coactivateurs (108). Un autre mécanisme d'activation serait que le récepteur lié à l'antagoniste interagit avec un répresseur et le séquestre afin de l'empêcher d'interagir avec la machinerie transcriptionnelle (109).

Le complexe AP-1 est la cible la mieux caractérisée des actions non classiques des récepteurs des estrogènes. Plusieurs gènes sont régulés par cette voie incluant la collagénase, l'IGF-1 et la cycline D1 (110-112). Il a par contre, été déterminé que ER α et ER β répondent différemment à certains ligands sur un élément de réponse AP-1, ce qui suggère différentes fonctions de régulation pour les deux récepteurs. En effet, ER α en présence d'E₂, de DES (diethylstilbestrol) et des anti-estrogènes ICI 164384, tamoxifène et raloxifène stimule la transcription du gène rapporteur luciférase couplé à l'élément de réponse AP-1 de la collagénase dans les HeLa. Par contre, dans les cellules transfectées avec ER β les E₂ et DES n'activent pas la transcription contrairement aux anti-estrogènes.

Par ailleurs, ces résultats sont reproductibles dans les lignées de cancer du sein (MCF-7 et MDA453) et de cancer de l'utérus (Ishikawa) dans lesquelles E_2 et DES inhibent la transcription par $ER\beta$ (113). Il semble donc que la pharmacologie des ligands des ERs est renversée sur les éléments AP-1 avec $ER\beta$, où les anti-estrogènes activent la transcription et les estrogènes agissent comme des inhibiteurs de la transcription. Cette divergence d'activité des ERs selon le ligand sur les éléments AP-1 n'est pas seulement intrinsèque aux isoformes de ERs mais elle est aussi influencée par le type cellulaire. En effet, les effets agonistes du tamoxifène sont observés dans l'utérus et le col de l'utérus mais pas dans les tissus mammaires, contrairement à l'estrogène qui active les sites AP-1 par $ER\alpha$ dans les tissus mammaires et utérins (111).

Un double mécanisme d'activation de l'AP-1 par les ERs a été proposé, basé sur des études de délétions de $ER\alpha$ et le type de ligand. Selon le premier, lorsque le récepteur pleine longueur est lié à l'estrogène, il stimule les promoteurs dépendant de l'AP-1 par ses fonctions d'activation (AF-1 et AF-2) en stabilisant la liaison des coactivateurs sur le complexe Jun/Fos sans que ER et Jun interagissent directement ensemble. Le second mécanisme s'applique à $ER\alpha$ et $ER\beta$ et est régulé par les SERMs ainsi que l'antagoniste « pure » le ICI 182 780, ce mécanisme n'impliquerait pas les fonctions d'activation des ERs mais plutôt la propriété des antagonistes à recruter des corépresseurs, ce qui aurait pour effet de séquestrer ceux-ci loin de la chromatine et permettrait d'activer la transcription sans liaison directe avec l'ADN ou des protéines associées (114). Il a en effet, été démontré qu'en présence de SERMs, $ER\alpha$ n'a pas besoin de lier l'ADN ni Jun pour activer l'AP-1. Il semble que les deux mécanismes proposés puissent être utilisés par un même récepteur pour un même type de promoteur dépendamment du contexte cellulaire et du ligand.

Le concept général de la fonction non-classique des récepteurs stéroïdiens est biologiquement important. En effet, les souris dont le gène du récepteur des glucocorticoïdes (GR) est délété ne sont pas viables. Par contre, les souris dans lesquelles on a introduit un récepteur contenant une mutation qui bloque la voie classique d'activation sont viables avec des défauts adrénaliens et des réponses inflammatoires anormales (115). Dans le cas de $ER\alpha$, la mutation d'un résidu critique pour la liaison à

l'ADN empêche la transcription ERE-dépendante mais n'inhibe pas le mécanisme d'action alternatif sur l'AP-1 (116). L'introduction de ce gène muté dans des souris provoque un phénotype comprenant entre autre des anomalies ovariennes, une hyperplasie de l'endomètre et des glandes mammaires anormales alors que les souris dont ER α a été délété sont stériles (117). La comparaison entre ces souris suggère qu'un équilibre entre les actions classiques et non-classiques des récepteurs des estrogènes est essentielle.

1.2.5 ER ET LES CANCERS

Depuis les années 1970, ER est devenue la cible majeure et la plus efficace pour élaborer des traitements contre le cancer. L'interaction entre E₂ et ER entraîne la prolifération du cancer mais elle peut maintenant être bloquée par plusieurs agents, dont les modulateurs sélectifs des récepteurs des estrogènes (SERMs) ou des antagonistes complets comme le fulvestrant (ICI 182,780) qui est très utilisé dans le traitement des cancers du sein avancés (118;119). Par contre, seulement 53% des patients qui sont ER+ répondent à la thérapie endocrinienne. Ce pourcentage se divise en 69% pour les patients ER+PR+ et 32% pour les patients ER+PR-. Il y a tout de même 13% des patients ER- qui répondent aussi à ce traitement (120). Donc, il est certain que la détection clinique de ces paramètres est importante pour le choix du traitement mais il est évident qu'il manque l'identification d'autres facteurs déterminants. Qui plus est, la plupart de ces études ont été faites sur ER α alors que le rôle de ER β dans le développement de cancers du sein n'est pas encore clair et pourrait être un outil incontestable pour développer un traitement. En effet, ER β pourrait avoir un rôle modulateur dans le cancer puisqu'il est exprimé dans les tissus normaux et malins et que l'on sait que la coexpression des deux isoformes modifie leur activité (121). Les études sont, par contre mitigées, alors que certaines affirment que la présence de ER β est un bon pronostic pour le cancer puisqu'il est associé à une meilleure survie des patients traités avec le tamoxifène (122), d'autres montrent que ER β est associé à des nodules auxiliaires (123). Même s'il semble que la majorité des études suggèrent que la présence de ER β est défavorable à la croissance des tumeurs, les quantités relatives de chacun des isoformes doivent être considérées.

Environ les deux tiers des cancers des ovaires sont ER positifs mais les réponses à des thérapies endocriniennes sont modestes (124). De plus, les résultats démontrent que ER α serait responsable de la prolifération accrue des cellules cancéreuses alors que dans les cellules saines ER β prédomine. La majorité des études démontrent une augmentation des ARNm de ER α relativement à ER β dans des ovaires cancéreux par rapport à des ovaires sains. Ces résultats proposent donc un mécanisme qui résulte d'une surexpression de ER α ou d'un avantage de croissance sélective pour les cellules ER α (125).

Les récepteurs des estrogènes peuvent aussi être impliqués dans les cancers de la prostate et du colon. Dans le cas de la prostate, les évidences suggèrent que ER β serait impliqué puisqu'il est exprimé à de hauts niveaux dans les cellules saines et cancéreuses. Les souris dont le gène codant pour ER β n'est pas fonctionnel démontrent une hyperplasie de la prostate alors que ce n'est pas le cas pour les souris dont c'est le gène de ER α qui est délété. (126). Pour le cancer du colon, autant dans les lignées cancéreuses que dans les tissus humains sains ou malades, ER α est exprimé en très faible quantité par rapport à ER β . Certaines études démontrent qu'il y aurait une baisse d'expression d'ER β lors de la transformation des cellules en cellules malignes sans changement pour ER α (127). Ces résultats indiquent, qu'autant dans le sein, la prostate ou le colon, ER β aurait un rôle protecteur contre le développement du cancer.

1.3 LE RÉCEPTEUR DE CHIMIOKINE : CXCR4

1.3.1 LE LIGAND : STROMAL CELL DERIVED FACTOR-1 (SDF-1)

1.3.1.1 DESCRIPTION ET STRUCTURE

Les chimiokines sont une famille de cytokines pro-inflammatoires qui agissent par l'intermédiaire de 19 différents récepteurs couplés aux protéines G afin de réguler plusieurs processus physiologiques et pathophysiologiques (128). Les chimiokines sont classées selon l'arrangement des deux premières cystéines dans leur séquence d'acides aminés. Il existe environ 26 chimiokines CC, 17 chimiokines CXC, 2 chimiokines C et 1 chimiokines CX₃C, où les C représentent les cystéines et les X n'importe quel acide aminé (129).

Le SDF-1 est un membre de la sous-famille CXC des chimiokines et peut aussi se nommer CXCL12 : CXC pour la sous-famille, L pour ligand et 12 pour son ordre dans la famille. Il a été cloné à partir d'une banque d'ADNc de cellules stromales de la moëlle osseuse de souris (130). L'homologue humain a été trouvé en criblant une banque humaine d'ADNc de cellules pro-B en utilisant la séquence de souris comme sonde, ce qui a permis de déterminer qu'il y a approximativement 99% d'homologie entre les deux séquences protéiques. Il existe deux isoformes de SDF-1 qui sont identiques dans leur séquence d'acides aminés en N-terminal mais la forme bêta possède quatre résidus supplémentaires en C-terminal. Les deux isoformes sont codés par le même gène situé sur le chromosome 10q11.1. La forme bêta est un variant d'épissage alternatif qui contient les exons 1-4 alors que la forme alpha contient les exons 1-3. Il semble qu'il n'y ait pas de différence au niveau de la fonction et de la régulation des deux isoformes (131). Le SDF-1 a tout d'abord été identifié comme étant un facteur stimulant la croissance des lymphocytes B primitives (pre-B cell growth-stimulating factor; PBSF) (132). Par la suite, il a été démontré qu'il est impliqué dans la migration, la survie, la prolifération et l'activation de différents types cellulaires hématopoïétiques et immunitaires (132;133).

Les recherches faites sur la structure des chimiokines ont démontré que les résidus qui précèdent la première cystéine ont un rôle critique dans la liaison au récepteur et l'activation fonctionnelle de celui-ci. Dans le cas du SDF-1, la seule délétion du premier acide aminé lysine empêche le SDF-1 d'activer CXCR4. Même la délétion des trois premiers acides aminés permet la liaison au récepteur mais pas son activation (134). De plus, des expériences de délétions et de mutations de la séquence du SDF-1 ont démontré la nécessité d'autres résidus pour avoir une activité maximale. Les résidus 12-17, correspondant à la région RFFESH ont des caractéristiques bien différentes des autres chimiokines CXC et seraient importants pour une liaison optimale au récepteur mais ne sont pas essentiels pour l'activation (134).

1.3.1.2 SITES D'EXPRESSION ET RÉGULATION DU SDF-1

Contrairement à d'autres chimiokines CXC qui sont induites par des cytokines, le SDF-1 est exprimé à un niveau basal dans plusieurs tissus, et il est donc considéré comme étant exprimé de façon constitutive. L'ARNm de SDF-1 α/β a été détecté dans presque tous les

tissus qui ont été testés mais il était fortement exprimé dans les nodules lymphatiques, la rate, la moelle osseuse, les ovaires, les intestins, le thymus, les reins, les poumons, le cœur, l'estomac et le foie (131). Par la suite, SDF-1 a été retrouvé en grande quantité dans le système nerveux central de rats à l'état embryonnaire et mature mais plus précisément dans le cortex, l'hypothalamus et l'hippocampe (135). Par ailleurs, le promoteur de SDF-1 contient plusieurs îlots CpG, un motif qui lie des facteurs de transcription fréquemment observés pour des gènes domestiques qui ont une expression constitutive dans plusieurs tissus (136). De plus, les motifs de liaison des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 n'ont pas été retrouvés dans les 19-kb du clone génomique (131), alors que ces sites existent dans les gènes d'autres chimiokines CXC et que ces facteurs de transcription induisent l'expression de ces chimiokines en réponse aux stimuli inflammatoires.

Malgré cette apparente expression constitutive du SDF-1, il semble raisonnable de croire que l'accumulation du SDF-1 dans les cellules synoviales et endothéliales est due à une induction locale inflammatoire ou proliférative dans les tissus endommagés par l'arthrite rhumatoïde, suite à l'observation des patrons d'expression anormaux du SDF-1 (137). Le SDF-1 a aussi été identifié comme étant un gène cible des récepteurs des estrogènes puisque son expression était augmentée en présence d'estradiol et semblait être responsable de son effet mitogénique dans des cellules du cancers du sein et des ovaires (138). Ces résultats appuient donc l'idée que l'expression du gène SDF-1 est sous le contrôle d'un promoteur inductible.

Par ailleurs, des expériences d'empreintes *in vitro* ont aussi permis de localiser plusieurs séquences consensus de facteurs de transcription aussi différents les uns des autres, comme le facteur AP2 qui fait partie de la famille de c-Jun, le HNF-3 (hepatocyte nuclear factor 3), le NF-X3 impliqué dans la régulation de l'insuline, le XPF1 (exocrine pancreas factor 1) et le GR (139).

Finalement, il semble que SDF-1 est produit de façon constitutive dans plusieurs tissus et que cette expression n'est pas reliée aux signaux pro-inflammatoires *in vitro* mais que dans certains tissus, il existe une régulation spécifique de l'expression répondant à divers stimuli.

1.3.1.3 FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES

Originellement décrit comme le PBSF (pre-B cell growth-stimulating factor), le SDF-1 est effectivement impliqué dans la lymphopoïèse des cellules B. Les souris déficientes en SDF-1 ont un défaut dans la lymphopoïèse des cellules B dans la moelle osseuse et dans le foie pendant le développement embryonnaire et un défaut dans la myélopoïèse au niveau de la moelle osseuse seulement (140).

Le rôle du SDF-1 dans la migration cellulaire est relativement complexe. Tout d'abord, des études histologiques sur des cervelets de souris déficientes en SDF-1 ont démontré un cervelet désorganisé sans les couches distinctes de types cellulaires observées dans des cervelets normaux. Cette désorganisation serait due à un défaut de migration des neurones (141). Il semble aussi avoir un rôle dans la migration des cellules souches neuronales du système nerveux central chez les adultes. En effet, l'exposition des cellules souches neuronales au SDF-1, stimule leur migration et leur prolifération (142). Par ailleurs, lors de l'organogenèse, les cellules germinales primordiales (PGC) utilisent le système vasculaire comme véhicule pour atteindre leur endroit cible où elles se transformeront en gamètes. Il a été déterminé que ces endroits cibles exprimaient l'ARNm de SDF-1 et qu'une expression ectopique du SDF-1 entraînait une accumulation des PGC à ce site (143). Il est donc évident que le SDF-1 joue un rôle important dans la migration de plusieurs types cellulaires.

En effet, diverses études ont démontré que le SDF-1 est un agent chimioattractif pour plusieurs types cellulaires sanguins et il est donc essentiel pour le bon fonctionnement du système immunitaire. Il semble qu'il aurait plus un rôle au niveau de la surveillance immunitaire et dans l'extravasation basale des lymphocytes et des monocytes plutôt que dans l'inflammation (144). Néanmoins, il est un chimioattractif très efficace et il induit la polymérisation des filaments d'actine intracellulaire chez les lymphocytes, un processus qui est essentiel pour la mobilité cellulaire (144). Ce rôle de chimioattractif implique aussi le SDF-1 dans la migration des mégacaryocytes (MK) et la formation des plaquettes. En effet, le relâchement des plaquettes par les MK se fait au niveau des capillaires pulmonaires donc il faut qu'elles migrent de la moelle osseuse jusqu'aux poumons (145). En plus, de jouer le rôle de chimioattractif de mégacaryocytes, le SDF-1 aide à la

migration de ceux-ci en induisant la production de métalloprotéinases de la matrice (MMP) qui permettent aux MK de dégrader et de traverser la membrane basale afin d'effectuer des migrations transendothéliales (146;147).

En plus de ses rôles très divers dans le chimiotactisme, le SDF-1 est impliqué dans la prolifération et la survie de plusieurs types cellulaires. Entre autre, le traitement d'astrocytes avec du SDF-1 induirait leur prolifération *in vitro* en activant la voie des MAPKs qui est reconnue pour jouer ce rôle (148). L'activation des MAPKs par le SDF-1 a aussi été observée dans des cellules endothéliales puisqu'il induit leur prolifération, ce qui contribue au rôle angiogénique du SDF-1 (149). Par ailleurs, le SDF-1 est impliqué directement dans l'hématopoïèse par sa fonction de prolifération puisqu'il ne permet pas seulement la mobilisation des précurseurs myéloïdes à la moelle osseuse mais il stimule leur prolifération en synergie avec d'autres cytokines. En effet, un traitement de ces cellules avec le SDF-1, augmente le pourcentage de cellules dans les phases du cycle cellulaire S+G2/M qui sont les phases de synthèse d'ADN et de mitose (132).

Le SDF-1 a été le premier exemple d'une chimiokine qui est essentielle dans le développement embryonnaire, suggérant que les chimiokines peuvent être importantes dans plusieurs phénomènes, mis à part leurs rôles dans le chimiotactisme en situation inflammatoire. De plus, cette chimiokine est unique par rapport aux autres chimiokines de par son expression constitutive et ses rôles très divers au niveau de la migration et prolifération cellulaire. Par ailleurs, c'est la seule chimiokine à avoir seulement deux récepteurs connus soit le CXCR4 et le RDC1 (150). De plus, CXCR4 ne possède pas d'autres ligands naturels connus. En effet, les récepteurs des chimiokines ont, en général, la remarquable caractéristique d'être très peu sélectif au niveau de la liaison des ligands et la majorité des chimiokines lient plusieurs récepteurs avec une très grande affinité (151).

1.3.2 STRUCTURE ET FONCTIONS DU RÉCEPTEUR CXCR4

CXCR4 a été originalement cloné comme étant un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) orphelin et classé par erreur comme un récepteur du neuropeptide Y (152). Par la suite, une grande similitude entre ce récepteur et le récepteur de l'IL-8 a été trouvée. Les niveaux d'ARNm de ce récepteur étaient aussi très élevés dans les lymphocytes, il a donc

été suggéré qu'il jouerait un rôle dans l'activation des cellules inflammatoires et qu'il ferait partie de la famille des récepteurs des chimiokines même si aucun ligand n'avait pu être identifié. Le récepteur a donc été nommé LESTR pour « leukocyte-derived seven-transmembrane domain receptor » (153). Plus tard, un récepteur à sept passages transmembranaires a été identifié comme co-récepteur à l'entrée du VIH avec lequel le virus fusionnait pour entrer à l'intérieur de la cellule, le récepteur a donc été renommé, fusin (154). Enfin, le SDF-1 a été identifié comme ligand et agoniste du récepteur LESTR/fusin et le récepteur a donc définitivement été classé dans la famille des récepteurs des chimiokines et nommé CXCR4 en suivant la nomenclature des chimiokines (155;156).

Le récepteur CXCR4 participe à diverses fonctions biologiques comme l'hématopoïèse, la lymphopoïèse, le développement embryologique du cerveau et des vaisseaux sanguins, le chimiotactisme des lymphocytes et il est un co-récepteur du VIH-1. La plupart de ces rôles attribués au CXCR4 ont été identifiés à partir d'expériences de délétion du gène du SDF-1, le ligand de CXCR4. Mais il s'avère que le phénotype des souris CXCR4 $-/-$ est très semblable aux souris délétées pour le gène du SDF-1 (141;157). À la lumière de ces résultats, il est donc possible d'établir que le SDF-1 et CXCR4 forment une paire de ligand-récepteur spécifique et mutuellement exclusive.

Un modèle d'interaction entre le SDF-1 et CXCR4 a été établi et par analogie avec d'autres récepteurs des chimiokines, il a été déterminé que la région RFFESH du SDF-1 interagissait avec la région N-terminale du récepteur, ce qui constituait une étape d'ancrage. Cette étape permettrait le changement de conformation des deux molécules et ainsi la liaison de la région N-terminale du SDF-1, importante pour l'activation du récepteur, à une poche près des régions transmembranaires du récepteur. Il s'en suivrait un autre changement de conformation permettant la signalisation intra-cellulaire (134). Des études de mutation du récepteur CXCR4 ont déterminé que les résidus glutamine et tyrosine de la région N-terminale étaient requis pour la liaison du SDF-1 mais pas pour son activation. De plus, la substitution de résidus acides dans la deuxième boucle extracellulaire et dans les domaines transmembranaires 2 et 7 affecte la liaison du SDF-1 et abolit l'activation du récepteur, ce qui suggère que ces résidus feraient partie du deuxième site de liaison avec le ligand (158).

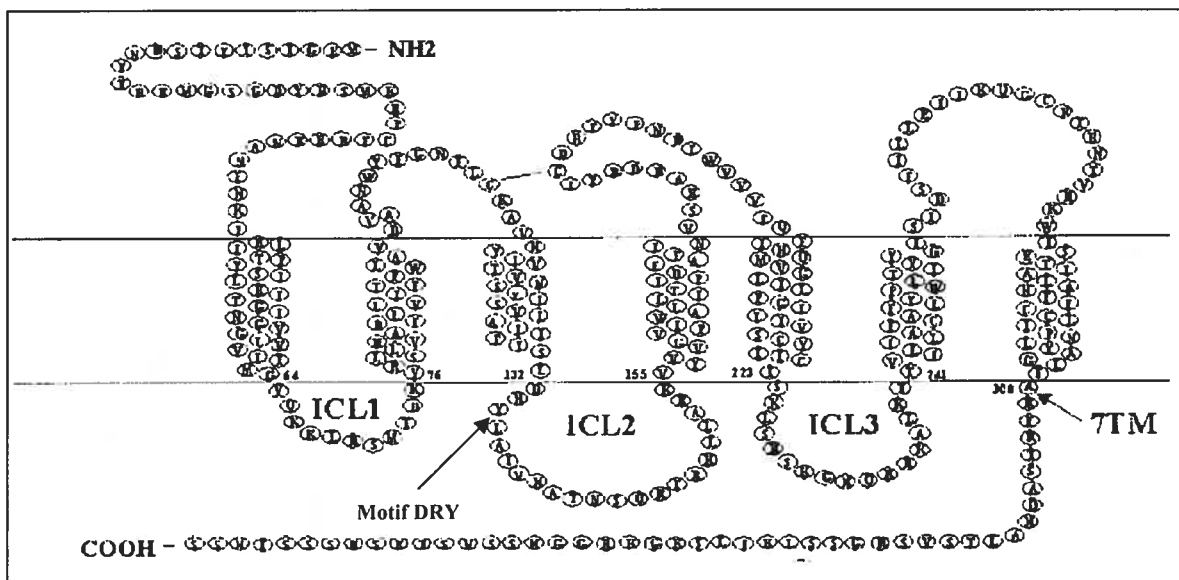


Figure 2. Représentation schématique du récepteur CXCR4. La séquence d'acides aminés de CXCR4 est représentée schématiquement à travers une membrane cytoplasmique. Le récepteur est composé de 7 passages transmembranaires (TM) qui sont reliés par des boucles extra et intracellulaires (ICL) (159).

Les domaines intracellulaires de CXCR4 sont très importants pour la signalisation du récepteur. Le mutant auquel il manque la partie C-terminale intracellulaire qui contient la majorité des sites de phosphorylation par la GRK, ne peut plus être endocytosé même si la troisième boucle intracellulaire est intacte et qu'elle participe à la liaison de la β -arrestine. L'endocytose est un mécanisme important pour la désensibilisation de la cellule suite à une stimulation avec le ligand (159). Ensuite, le motif DRY de la deuxième boucle intracellulaire est hautement conservé à travers la plupart des récepteurs couplés aux protéines G. Dans la majorité des cas, la mutation de ce motif abolit la signalisation du récepteur (160). Cette mutation dans CXCR4 permet la transduction de signaux nécessitant la sous unité $G\alpha_i$. Les signaux transmis par la sous unité $G\alpha_i$ nécessitent une troisième boucle intracellulaire intacte (159). Cette boucle contient le motif BBXXB qui est le déterminant structural pour la fonction de stimulation de la protéine $G\alpha_i$, dans lequel B est un acide aminé basique et X n'importe quel acide aminé (161). En mutant cette troisième boucle, le récepteur ne peut plus mobiliser le calcium intracellulaire, puisque ce mécanisme de mobilisation est dépendant de $G\alpha_i$. La fonction la plus connue de CXCR4 est celle de son implication dans le chimiotactisme. Il s'avère qu'il y a seulement la

mutation de la première boucle intracellulaire qui n'affecte pas la migration cellulaire, ce qui confirme que pour ce processus l'activation de plusieurs voies de signalisation est essentielle, y compris la phosphorylation de la partie C-terminale par la GRK, puisque toutes les boucles sont essentielles (159).

1.3.3 RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE CXCR4

CXCR4 est exprimé ubiquitairement dans une grande variété de types cellulaires incluant la plupart des cellules hématopoïétiques (162). Il est aussi exprimé à de très haut niveaux dans les cellules de l'endothélium vasculaire (157), dans les neurones (163), dans la microglie et les astrocytes (164). Pour la majorité de ces cellules le récepteur est exprimé de façon constitutive. L'étude de la séquence du promoteur de CXCR4 démontre qu'il y a différents sites consensus de liaison à des facteurs de transcription. Sept sites putatifs de liaison pour le facteur de transcription ubiquitaire Sp1 ont été identifiés (165). Par ailleurs, d'autres éléments régulateurs de la transcription constitutive de CXCR4 ont été trouvés mais la participation de ces régions variait selon les types cellulaires, suggérant ainsi une certaine spécificité tissulaire dans la régulation du promoteur de CXCR4 (165). Certains de ces facteurs sont habituellement associés à l'hématopoïèse ou à la maturation des lymphocytes. Pour ce qui est de la capacité du promoteur à être induit, parmi plusieurs stimuli différents comprenant les stimuli imitant l'activation physiologique des lymphocytes T, seulement le PMA et l'ionomycine ont permis une augmentation de l'activité du promoteur. Par ailleurs, une divergence de réponse selon les types cellulaires a aussi été observée. Tout comme pour l'expression constitutive, l'induction du promoteur de CXCR4 démontre des spécificités tissulaires qui dépendraient de l'expression sélective des protéines et des différentes interactions avec l'ADN (165).

La modification de l'expression de CXCR4 peut être modulée au niveau protéique suite à l'activation du récepteur. Par exemple, l'exposition de lymphocytes au PMA et au SDF-1 provoque l'internalisation du CXCR4 dans des puits de clathrine et donc la diminution de son expression à la surface puisqu'il se retrouve séquestré dans les endosomes (166). Ce mécanisme de régulation de l'expression permet une désensibilisation suite à un stimulus intense et de longue durée et permet aussi l'activation de voies de signalisation.

Des situations pathologiques peuvent aussi influencer les niveaux d'expression de CXCR4. En effet, pour plusieurs types de tumeurs le récepteur n'est pas exprimé dans les tissus sains mais les cellules tumorales sont reprogrammées pour exprimer CXCR4 en même temps qu'elles acquièrent leur potentiel de former des métastases. CXCR4 serait activé par le manque d'oxygène aux cellules ce qui leur permettrait de migrer dans d'autres environnements plus favorables. Les tumeurs hautement agressives croissent rapidement et l'apport en oxygène et nutriments par le sang devient insuffisant. Cette hypoxie modifie le complexe contenant la protéine suppresseur de tumeur pVHL (von Hippel-Lindau) ce qui lui l'empêche de dégrader le facteur HIF (hypoxia-inducible factor). L'expression de HIF augmente donc et il ira lier les promoteurs de différents gènes qui permettront de remédier à cette situation d'hypoxie en augmentant la vascularisation tumorale en induisant le VEGF ou en permettant la migration cellulaire par l'augmentation de l'expression du CXCR4. Le promoteur de CXCR4 contient en effet un élément de réponse (hypoxia-response elements; HRE) qui permet de lier le HIF (167). Par ailleurs, le facteur de transcription NF- κ B qui est reconnu pour stimuler l'expression de plusieurs gènes pro-métastatiques et pro-angiogéniques et qui est lui-même induit dans les tumeurs, régule aussi le CXCR4 dans les cellules cancéreuses du sein (168). Finalement, l'expression de CXCR4 dans les tumeurs entraîne une augmentation de la prolifération et de la migration cellulaire.

1.3.4 VOIES DE SIGNALISATION DE L'AXE SDF-1 / CXCR4

L'activation du récepteur débute par la liaison du ligand, ce qui induit un changement de conformation qui conduit à la dissociation des protéines hétérotrimériques associées au récepteur. Il y a des évidences considérables qui indiquent que les deux sous-unités $G\alpha_i$ et $G\beta\gamma$ qui résultent de cette dissociation, jouent le rôle de second messenger dans la signalisation du récepteur. En effet, elles peuvent activer des voies aussi diverses que la voie de PI-3K/AKT, des MAPKs, de la PKC.

De plus, CXCR4 peut activer la voie JAK/STAT de façon G-indépendante. Malgré le fait que cette voie soit généralement associée aux récepteurs tyrosines kinases (RTK), il a été démontré que la stimulation de CXCR4 avec le SDF-1 favorise la dimérisation du récepteur qui est suivie par sa phosphorylation sur des tyrosines. Cette phosphorylation se

produit dans le même intervalle de temps que le recrutement de deux membres de la famille de kinases JANUS soit JAK2 et JAK3, donc elle ne serait pas le produit des activités catalytiques intrinsèques du récepteur contrairement aux RTKs. De plus, pour qu'il y ait association entre le récepteur et la protéine $G\alpha_i$, la liaison du ligand et des JAKs au récepteur est essentielle. Cette étape de phosphorylation serait donc en amont des autres cascades de signalisation. Les JAKs se phosphorylent aussi entre elles ce qui, normalement permet le recrutement et la phosphorylation des STATs qui une fois activés sont transloqués au noyau où ils activent l'expression de gènes. Par contre, les STATs sont faiblement phosphorylés et ce phénomène pourrait être dû à l'activation de phosphatases $G\alpha_i$ -dépendante afin de terminer le signal JAK/STAT (169). L'activation de la voie JAK/STAT servirait donc d'étape d'initiation de la cascade afin d'activer la sous-unité $G\alpha_i$.

L'activation de la majorité des autres voies de signalisation dépend ensuite de l'activité des sous-unités de la protéine G hétérotrimérique. Les sous-unités $G\alpha_i$ et $G\beta\gamma$ peuvent activer la PI-3K, ce qui entraîne la formation de PIP (phosphatidyl inositol phosphate) et l'activation d'AKT. Il s'en suit une cascade de phosphorylation des protéines des points d'adhésion focaux comme RAFTK, FAK, paxillin et Crk. Ces points d'adhésion focaux sont des points d'ancrage du cytosquelette avec la matrice extracellulaire, qui permettent de réguler la flexibilité, la forme et la migration des cellules. Cette voie de signalisation est donc impliquée dans le chimiotactisme et la chimio-invasion des cellules stimulées au SDF-1. En effet, l'inhibition de la PI-3K empêche les cellules de répondre à un gradient de SDF-1 (170;171). L'implication de la PI-3K dans le chimiotactisme peut aussi se faire par l'activation des petites GTPases. La PI-3K active RhoA ce qui conduit à l'activation de Rac et Cdc-42 qui sont importants dans la modification du cytosquelette et la chimio-invasion des cellules (172). L'invasion tissulaire est favorisée par l'activation de CXCR4 puisqu'elle entraîne aussi l'augmentation de l'expression de métalloprotéinases de la matrice (MMP) qui dégradent la membrane basale des vaisseaux sanguins. L'expression de ces MMP est régulée par NF- κ B qui lui est activé par la PI-3K (171). La voie PI-3K/AKT est aussi impliquée dans la survie cellulaire, un autre rôle très important de l'axe SDF-1/CXCR4. Il a été démontré qu'elle pouvait inhiber l'activité de la caspase 3 dans les fibroblastes (173) et que dans les cellules hématopoïétiques elle induisait Bcl-2 une

protéine anti-apoptotique (174). À la lumière de ces observations, il est évident que la voie PI-3K est très importante et est impliquée dans plusieurs fonctions exercées par CXCR4, dont la migration et la survie cellulaire.

Malgré le rôle du CXCR4 dans la survie cellulaire, il semble que l'activation du récepteur puisse entraîner la mort de certains types cellulaires dont les neurones (175), par l'activation de la voie de la MAPK p38. L'activation de cette voie ne provoque pas toujours la mort cellulaire puisque dans les lymphocytes T la voie PI-3K qui promouvoit la survie est activée; il y a donc une balance entre les deux voies et dépendamment des autres signaux extracellulaires reçus une des deux voies sera favorisée (176). D'autres MAPKs qui sont aussi activées par le SDF-1 sont impliquées dans la migration cellulaire et la prolifération cellulaire. Les sous-unités $G\beta\gamma$ peuvent activer Ras, ce qui entraîne une cascade de phosphorylation de Raf, MEK et ERK 1/2 (MAPK p42/44) ou encore, la sous-unité $G\alpha_i$ active directement MEK (176).

La sous-unité $G\alpha_i$ peut aussi activer la voie de la phospholipase C qui par sa cascade de signalisation mobilise le calcium intracellulaire, produit du DAG et induit l'activation de la PKC (protéine kinase dépendante du calcium). L'activation de cette voie a été proposée comme étant importante dans l'adhésion et la migration cellulaire (177). Par contre aucun isoforme de PKC n'avait été identifié dans ce processus. Par ailleurs, il a été récemment trouvé que la PKC ζ , indépendante du calcium et du DAG et est activée par la PI-3K, régule la migration, l'adhésion et la survie cellulaire tout en étant impliquée dans la polymérisation des filaments d'actine et la formation de pseudopodes (178).

La liaison du SDF-1 au récepteur CXCR4 a pour effet de diminuer l'expression de celui-ci à la surface de la cellule par un mécanisme d'endocytose. Les sous-unités $\beta\gamma$ activées recrutent des GRK (G protein-coupled receptor kinase) qui phosphorylent le récepteur ce qui permet le recrutement des β -arrestines. Celles-ci permettent la formation de puits de clathrine et la formation d'endosomes. L'internalisation a pour conséquence d'insensibiliser le récepteur mais permet aussi l'activation des MAPKs et donc le chimiotactisme (179). Ceci démontre donc un rôle pour l'endocytose dans la signalisation du CXCR4. En effet, une modification dans les niveaux d'expression de la β -arrestin2 a

pour effet d'altérer le chimiotactisme des cellules stimulées au SDF-1 et de modifier les niveaux de phosphorylation des MAPKs p38 et p44/42. Par contre, il semble que ce soit plus la MAPK p38 que p44/42 qui médie le chimiotactisme. De plus, l'expression de β -arrestin2 n'altère pas le chimiotactisme induit par d'autres stimuli, dont le EGF, ce qui suggère que ce mécanisme n'est pas impliqué de façon globale dans le chimiotactisme mais qu'il est spécifique à l'activation de CXCR4 (179).

L'activation de CXCR4 permet donc l'intégration de plusieurs voies incluant les événements classiques associés aux GPCR et ceux liés aux récepteurs des facteurs de croissance. Ceci représente un fin système de régulation versatile crucial pour les réponses immunitaires.

1.3.5 CXCR4 ET LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE (VIH)

Suite à l'identification du CD4 comme récepteur primaire pour l'entrée du VIH dans les cellules immunitaires, il est rapidement devenu évident que ce récepteur ne pouvait agir seul. Mais ce n'est que dix ans plus tard, en 1996, que les récepteurs couplés aux protéines G CXCR4 et CCR5 ont finalement été identifiés comme étant des corécepteurs pour l'entrée du VIH (154); CCR5 est le plus important pour l'entrée des souches dont le tropisme est les macrophages et CXCR4 est le plus utilisé par les souches dont le tropisme est les lymphocytes T (180). C'est par l'interaction de la glycoprotéine de l'enveloppe virale (gp120) avec le CD4 et un des corécepteurs que l'enveloppe fusionne avec la membrane cellulaire, ce qui permet l'entrée du virus à l'intérieur de la cellule (181).

Le fait que SDF-1 soit le ligand de CXCR4, lui permet bloquer l'entrée du VIH à de faibles concentrations. Ceci n'est pas seulement dû à l'interférence stérique mais aussi à la diminution de l'expression à la surface cellulaire par l'induction de l'endocytose par l'activation du CXCR4 (182). Ainsi, CXCR4 est devenu une cible attirante pour le développement de traitements anti-VIH. Les antagonistes les plus efficaces décrit à ce jour sont les bicyclams (183). Le composé prototype, le AMD3100, démontre une activité antivirale puissante et sélective contre les virus utilisant le CXCR4 comme corécepteur et a été efficace dans les traitements anti-VIH en phase II d'essais cliniques. Par contre, AMD3100 n'est pas biodisponible oralement et donc, des composés dérivés tel que

AMD3465 et AMD070 ont été développés. Le composé AMD070 est présentement en essais cliniques (184) et le AMD3465 est intéressant puisqu'il est un antagoniste dix fois plus puissant que le AMD3100 (185).

1.3.6 CXCR4, LE CANCER ET LES MÉTASTASES

La formation des métastases n'est pas un processus aléatoire et différents types de cancers ont des sites métastatiques différents. Le cancer du sein par exemple, privilégie les nodules lymphatiques, la moelle osseuse, les poumons et le foie alors que le cancer de la prostate favorise principalement la moelle osseuse. Trois théories ont été émises au fil du temps pour tenter d'expliquer ces phénomènes. Le concept du sol fertile préconise la distribution aléatoire des cellules métastatiques à travers le corps suivie d'une survie et d'une prolifération sélective aux sites produisant les facteurs de croissance appropriés. Le second s'appuie sur le fait que les cellules endothéliales des lits vasculaires de certains organes expriment des molécules d'adhésions différentes qui captent les cellules tumorales de façon sélective. La dernière théorie stipule que les organes cibles de métastases expriment des molécules attractantes spécifiques qui favorisent l'invasion de sites particuliers (186). Puisque des combinaisons de chimiokines, de récepteurs de chimiokines et de molécules d'adhésion à partir d'un code spatial et temporel permettent de déterminer quel sous-groupe de lymphocytes migreront et quelles seront leurs destinations finales lors de situation inflammatoire, Muller et al. ont supposé que le même processus se produisait pour la migration des cellules tumorales (187). Ils ont criblé les gènes de cellules de cancer du sein humaines pour 17 différents récepteurs de chimiokines et ont trouvé que seulement CXCR4 et CCR7 (chemokine receptor 7) étaient considérablement augmentés par rapport aux cellules épithéliales mammaires normales. Ils ont ensuite criblé plusieurs organes humains normaux pour les ligands de CXCR4 et CCR7 et seulement le ligand de CXCR4, le SDF-1 était exprimé à de hauts niveaux dans tous les organes cibles des métastases des cancers du sein et à des niveaux plus bas dans les autres organes. Qui plus est, des extraits de ces tissus cibles ont une activité chimioattractrice pour les cellules de cancer du sein qui peut être spécifiquement neutralisée par des anticorps contre CXCR4, suggérant que le SDF-1 est l'agent actif. Ceci suggère donc que CXCR4 et SDF-1 sont les régulateurs du chimiotactisme des métastases et que les chimiokines contrôlent les patrons de métastases d'autres cancers. En effet, des

études subséquentes ont pu démontrer que l'axe SDF-1/CXCR4 était impliqué dans la prolifération cellulaire et la formation des métastases de plusieurs types de cancers incluant les cancers de la prostate, des reins, des poumons, des ovaires, du pancréas, les neuroblastomes, les lymphomes autres que ceux de Hodgkin, les leucémies lymphocytaires chroniques, plusieurs myélomes et mélanomes (résumé dans (188)). De plus, comme il a été mentionné précédemment, l'expression de CXCR4 est augmentée dans les tumeurs suite à une régulation par différents facteurs de transcription oncogéniques comme NF- κ B et HIF (167;168).

Plusieurs expériences ont par la suite clairement démontré l'implication de CXCR4 au niveau de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses. Il a entre autre été démontré *in vitro* que le SDF-1 augmentait la migration et la capacité d'invasion des cellules de cancer du sein (170). Dans un modèle de souris pour le cancer du sein combinant plusieurs immunodéficiences, l'administration d'un polypeptide antagoniste de CXCR4 réduit la croissance dans les poumons de cellules de cancéreuses injectées de façon intraveineuse (189). De plus, des métastases expérimentales et spontanées de cancer du sein ont été réduites par un anticorps neutralisant de CXCR4 (187).

En plus de l'implication de CXCR4 dans les métastases au niveau de la migration, des études indiquent que CXCR4 peut affecter la prolifération et la survie des cellules dans des conditions suboptimales et donc permettre la croissance cellulaire autant dans les sites primaire que dans des sites distants et moins favorables (168;187-190). L'expression de CXCR4 pourrait donc être liée à l'évolution de la malignité des tumeurs.

Les voies de signalisations activées par le SDF-1 pour la migration des cellules tumorales ou pour leur survie et prolifération, sont sensiblement les mêmes que celles utilisées dans les cellules normales. En effet, plusieurs des voies activées par le SDF-1 ont été définies dans des lymphocytes transformés, mais ce n'est pas clair s'il y a une différence entre les cellules normales et malignes au niveau de l'intensité du signal, de la cinétique ou de l'affinité de la chimiokine pour son récepteur. Le transit de la circulation sanguine à travers l'endothélium et la membrane basale est facilité par le SDF-1 du tissu cible qui induit la production de métalloprotéinases de la matrice qui dégradent ces obstacles (147). Ces métalloprotéinases, tout comme la polymérisation des filaments d'actine et la

formation de pseudopodes qui sont aussi induits par le SDF-1, facilitent aussi l'entrée des cellules dans les vaisseaux sanguins à partir de leur emplacement d'origine (187;191).

L'inhibition de CXCR4 par des anticorps spécifiques, des antagonistes ou des ARNs d'interférence a largement été utilisée afin de démontrer l'implication de l'axe SDF-1/CXCR4 dans la formation des métastases (révisé dans (188)), ce qui en fait donc une cible thérapeutique intéressante. Ces mêmes techniques pourraient être envisagées pour le traitement des cancers. Par ailleurs, l'utilisation d'antagonistes de CXCR4 présentement en essais cliniques pour le traitement du VIH pourrait être envisagée dans le traitement des cancers métastatiques (192). Entre autre, l'antagoniste AMD3100 interfère avec plusieurs processus pathologiques qui dépendent de l'interaction de CXCR4 avec le SDF-1, tels que l'arthrite rhumatoïde, les allergies et certains cancers (révisé dans (183)). Ainsi, l'évolution des connaissances au niveau de la signalisation croisée entre les signaux de CXCR4, les oncogènes et les facteurs de croissance pourraient ouvrir d'autres avenues pour le traitement.

1.4 INTERACTION FONCTIONNELLE ENTRE ER ET CXCR4

Dans les cancers du sein, il est connu que l'action mitogénique des estrogène passe par les récepteurs des estrogènes qui induisent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire comme le récepteur de la progestérone, cathepsin D, c-fos et pS2 (193). Par contre, dans le cancer des ovaires, malgré le fait que les récepteurs des estrogènes semblent responsables de la prolifération tumorale, aucune régulation des gènes cibles classiques des ERs n'est observée en présence d'estrogènes (1). Par ailleurs, le SDF-1 a récemment été identifié comme étant un gène cible des ER dans les cellules tumorales mammaires et ovariennes ce qui a permis de déterminer que l'action proliférative des estrogènes sur les cellules serait due à l'induction du SDF-1 (138). En effet, la stimulation de cellules de cancer d'ovaire et de cancer du sein avec de l'estrogène augmente l'expression du SDF-1 α et β et cette régulation est bloquée en présence d'anti-estrogènes. De plus, le traitement de ces cellules avec le SDF-1 induit la prolifération de façon dose dépendante de façon similaire à un traitement aux l'estrogènes et l'effet mitogénique des estrogènes a été bloqué par l'utilisation d'anticorps contre CXCR4. Les estrogènes permettent donc la prolifération des tumeurs en augmentant l'expression du

SDF-1 et donc en activant CXCR4 de façon autocrine ou paracrine ce qui active les effecteurs en aval du récepteur qui sont reconnus pour être impliqués dans la prolifération et la migration cellulaire (171).

1.5 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Les travaux du laboratoire sont axés sur l'étude de la régulation des récepteurs des estrogènes. Ces récepteurs agissent comme facteurs de transcription pour le contrôle de l'expression de gènes cibles. L'activation de ces récepteurs se fait par la reconnaissance du ligand, les estrogènes, ce qui amène le récepteur à l'ADN au niveau de ses éléments de réponses et permet le recrutement de coactivateurs afin de stimuler la transcription. Il existe également une voie alternative de régulation pour ER α et ER β , soit celle de la signalisation par les facteurs de croissance, qui provoque la phosphorylation du domaine de transactivation AF-1 des ERs par les MAPKs. Ce qui permet, en absence de ligand, de recruter aussi des coactivateurs et d'activer la transcription de gènes cibles. Cette activité est dans la majorité des cas indépendante de la fonction hormonale AF-2. De plus, en comparant les séquences d'acides aminés des deux isoformes de récepteurs, des différences majeures dans la portion de l'AF-1 sont observées alors qu'elles sont relativement homologues dans les autres régions, suggérant ainsi que les fonctions AF-1 de ER α et ER β peuvent jouer des rôles bien distincts. Basé sur des résultats antérieurs du laboratoire concernant la modulation transcriptionnelle ligand-indépendante de ER β , il semble exister des mécanismes différentiels de signalisation qui régulent la fonction AF-1 de ER α et ER β par la phosphorylation en réponse aux facteurs de croissance. Par ailleurs, il existe plusieurs voies de signalisation activées par différents facteurs de croissance qui peuvent réguler l'activation des ERs.

La récente découverte que l'action proliférative des récepteurs des estrogènes était due à l'augmentation de l'expression du SDF-1 et l'activation conséquente du récepteur des chimiokines CXCR4, nous a permis de développer l'hypothèse de l'existence d'une boucle de régulation entre ces deux récepteurs. En effet, le SDF-1 a été identifié comme étant un gène cible de ER α et il est le ligand de CXCR4 qui est un récepteur des chimiokines impliquées dans la prolifération et la migration cellulaire. La stimulation de CXCR4 entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation comme celle des MAPKs, PKC, PI-

3K qui permettent toutes de moduler de façon ligand indépendante les ERs. Il serait donc possible que l'activation de CXCR4 permette de modifier l'activité transcriptionnelle des ERs. De plus, l'axe CXCR4/ SDF-1 a été identifié comme étant le déterminant principal du site de migration des cellules tumorales provenant entre autre de cancers du sein, lesquelles sont souvent régulées par les récepteurs des estrogènes.

Dans le but d'évaluer l'influence de l'activation de CXCR4 sur l'activité transcriptionnelle des ERs, plusieurs aspects du mécanisme d'activation des ERs seront étudiés. Dans un premier temps, l'activité transcriptionnelle des ERs sera étudiée en absence du ligand et des outils tels que des inhibiteurs ou des mutants de CXCR4 seront utilisés afin de modifier son activité et d'observer les effets sur les ERs. Par la suite, il serait intéressant de voir s'il y existe un type de coopération entre les deux voies d'activation des récepteurs soit celle CXCR4 dépendant et ligand dépendante. De plus, les ERs peuvent interagir avec deux types d'éléments de réponses, les éléments classiques consensus, les ERE et les éléments non-consensus comme les éléments AP1. Nous évaluerons donc, l'effet de l'activation de CXCR4 sur la régulation des ces éléments par les récepteurs des estrogènes. Les deux récepteurs des estrogènes seront étudiés en parallèle puisqu'ils peuvent être régulés de façons différentes suite à un même stimulus dû justement à leurs divergences au niveau de l'AF-1.

Afin d'étudier l'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes plusieurs méthodes peuvent être utilisées. Nous privilégierons les essais utilisant le gène de la luciférase comme rapporteur couplé aux éléments de réponse étudiés qui sera transfecté ou co-transfecté dans des modèles cellulaires exprimant de façon endogène ou non les récepteurs étudiés. Nous utiliserons aussi les essais de RT-PCR qui permettront de mesurer de façon relative l'expression des gènes cibles des ERs suite à l'activation de CXCR4.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 VECTEURS D'EXPRESSION

Le plasmide d'expression du récepteur des estrogènes de souris mER β (pCMX-mER β -549) a été construit en introduisant un fragment en 5' du gène mER β à l'aide des sites *Sall*-*BstEII* (GenBank, accession number AF067422) dans le vecteur pCMX-mER β (de 485 résidus) de 2.1 kb décrit antérieurement (194). Ce fragment allonge le cadre de lecture ouvert du gène mER β de 64 acides aminés placés en N-terminal ce qui l'amène à 549 résidus. Le gène de mER β de 549 résidus se retrouve donc bordé des sites de restrictions *Sall* et *EcoRI* dans le vecteur pCMX. Le vecteur d'expression pCMX-mER α a été produit en ligant le fragment de 1.9 kb limité aux extrémités par les sites de digestion *NaeI*-*EcoRI* de mER α dans les sites adéquats du vecteur d'expression eucaryote pCMX. Les vecteurs d'expression des mutants de délétion pCMX-ABCD β (résidus 1- 244) et pCMX-CDEF β (résidus 164-549) ont été construits en amplifiant les fragments appropriés par PCR ou en les sous-clonant à l'aide d'une digestion du vecteur sauvage avec des enzymes de restriction suivie d'une auto-ligation du vecteur digéré. Les mutations ponctuelles des résidus serines en alanines pour le vecteur pCMX-mER β ont été générées par la mutagenèse par PCR en utilisant la polymérase *pfu* (Stratagene). Le gène rapporteur vitA2-ERE-TKLuc a été obtenu en faisant la ligation de l'oligonucléotide vitA2-ERE dans les vecteurs pGL3-Tkluc et digérés avec les enzymes de restriction *Sall*-*BamHI*. Les constructions des gènes rapporteurs de la luciférase AP1-coll-luc et AP1-coll Δ 73-luc ont été décrites précédemment (195). Pour vérifier le cadre de lecture des vecteurs produits, toutes les constructions ont été séquencées. Les formes sauvages et mutantes des ADNc de CXCR4 ont été sous-clonées dans le vecteur d'expression pCDNA3 et les mutants ont été obtenus par mutagenèse dirigée (158). Le mutant NRY de CXCR4 consiste en une substitution du résidu acide aspartique 133 de la région DRY de la deuxième boucle intracellulaire en une asparagine. Le mutant D84N a aussi été créé en substituant l'acide aspartique 84 situé dans le deuxième passage transmembranaire en une asparagine. Le plasmide d'expression du SDF-1 est le pORF hSDF-1 α de chez InvivoGen.

2.2 CULTURE CELLULAIRE, TRANSFECTION D'ADN ET ESSAIS LUCIFÉRASE

Les cellules ont été cultivées dans des pétris de 100-mm (Corning Incorporated) et incubées dans un milieu humidifié à 37°C contenant 5% de CO₂. Les cellules HEK 293-T et Hs578-T sont maintenues dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma) supplémenté avec 5% de sérum fœtal bovin (FBS) (Gibco), alors que les cellules MCF-7 sont maintenues dans le même milieu mais supplémenté avec 10% de sérum. Les transfectants stables des MCF-7, exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle d'un ERE (appelées MVLN) (196), ont été cultivé comme la lignée parentale. Pour les expériences, les cellules sont transférées dans du DMEM en absence de rouge de phénol (Sigma) avec 5% FBS traité avec du charbon activé pour enlever les hormones afin minimiser les effets estrogéniques du milieu de culture complet. À 50-60% de confluence cellulaire, les cellules sont transitoirement transfectées dans des plaques de 24 puits (Corning Incorporated) avec 2 µg d'ADN total incluant 500 ng des plasmides rapporteurs ERE-tkluc, AP-1 coll-luc ou AP-1 collΔ73-luc, 100 ng de vecteur d'expression de ERβ sauvage de souris ou de ERα de souris et de CXCR4 sauvage ou muté D84N ou NRY, et 250 ng de plasmide de β-galactosidase par la méthode de précipitation de l'ADN au calcium-phosphate (197). Le milieu DMEM est remplacé 5-6 heures après la transfection par du milieu frais contenant divers traitements pour les cellules. Lors des expériences avec le gène rapporteur AP-1 coll-luc ce milieu de traitement ne contenait pas de sérum. Pour les traitements avec les ligands des récepteurs des estrogènes, 10 nM de 17β-estradiol (Sigma), 5 µM de 4-OH-Tamoxifène (OHT) ou 1 µM de ICI 182,780 (Imperial Chemical Industries) (gracieusement fournis par Dr. F. Labrie, CHUL, Qc, Ca.) solubilisés dans de l'éthanol sont ajoutés durant 16 heures. Pour les traitements avec les ligands de CXCR4, 25 nM de SDF-1 α (PeproTech) ou 200 ng/ml de TC14012, un analogue de T140 ayant des propriétés biologiques similaires (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japon) ont été utilisés aussi pendant 16 heures. À la suite des traitements, les cellules sont recueillies avec un tampon de lyse de phosphate de potassium contenant 1% Triton X-100, puis un essai luciférase est alors réalisé pour déterminer les niveaux d'expression de la luciférase. Pour ce faire, l'émission de lumière générée par l'addition du substrat de la luciférase, la D(-)Luciférine (Roche), est mesurée à l'aide d'un luminomètre (Wallac). Les valeurs de luciférase, réalisées en duplicata et reproduites pour au moins un

nombre n=2 ou n=3 d'expériences, sont ensuite normalisées avec l'activité de la β -galactosidase et exprimées en unité relative de luciférase (RLU). Les RLU sont convertis en niveau ou en % d'activité en corrigeant les RLU des cellules traitées avec les RLU des cellules non-traitées en fixant leur niveau d'activation à 1.0.

2.3 CO-CULTURE

Les cellules HEK 293-T ont été transfectées avec les vecteurs d'expression des récepteurs et des gènes rapporteurs dans des plaques 24 puits comme décrit dans la section transfection. Pour le traitement, des cellules préalablement transfectées ont été utilisées. Ces cellules ont été transférées dans des pétris de 100 mm (Corning) dans le milieu sans phénol rouge mentionné précédemment. Elles ont été transfectées par la même méthode de calcium phosphate avec 10 μ g d'ADN contenant ou non 0,5 μ g du plasmide d'expression du SDF-1. Les cellules ont été lavées au PBS 1X 5-6 suite à la transfection, trypsinées, resuspendues dans du milieu frais sans rouge de phénol supplémenté de 5% de FBS et 6 x 10³ cellules/ml ont été distribuées dans les plaques 24 puits contenant les cellules transfectées avec les récepteurs et les gènes rapporteur 5-6 plus tôt. Pour le traitement combiné au E₂, 10nM de 17 β -Estradiol a été ajouté aux cellules avant la distribution et pour les contrôles sans co-culture, les cellules ont été traitées comme dans la méthode de transfection décrite précédemment. Suite aux traitements d'une durée de 16 heures, les cellules ont été lysées et l'essai luciférase a été effectué comme dans la section précédente.

2.4 EXTRACTION D'ARN, TRAITEMENT À LA DNASE, RT-PCR

Les cellules MCF-7 et Hs578-T sont transférées dans des plaques à 6 puits (Corning Incorporated) dans le milieu DMEM sans phénol rouge et les Hs578-T sont transfectées à 50-60% de confluence. La méthode utilisée est celle de précipitation de l'ADN au calcium-phosphate avec 4 μ g d'ADN total dont, 200 ng des vecteurs d'expression de ER β sauvage de souris ou de ER α et 100 ng du vecteur d'expression de CXCR4. Ces cellules sont ensuite traitées comme décrit dans la section transfection cellulaire pendant 16 heures. Pour les MCF-7, les traitements se font lorsque les cellules sont à 70-75% de confluence. Le réactif TRIzol (Invitrogen) est utilisé pour lyser les cellules après que le milieu de traitement ait été retiré et l'extraction de l'ARN total se fait selon le protocole proposé par la compagnie. Un

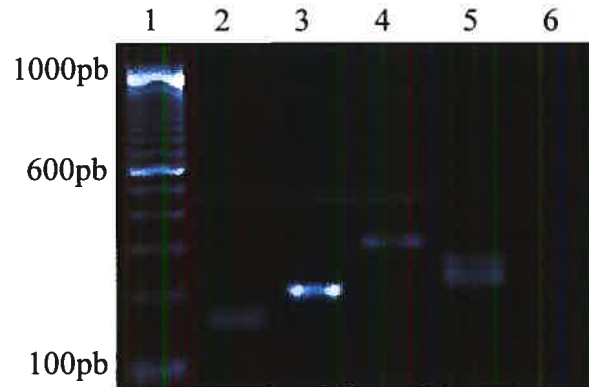
traitement à la DNase est effectué sur l'ARN total, 1,5 µg d'ARN est utilisé avec 1 U de DNase du kit DNA-freeTM (Ambion) dans un volume final de 20 µl et du tampon de réaction DNase I à 1X final. La réaction est incubée 30 minutes à 37°C et arrêtée en utilisant le réactif d'inactivation (DNase Inactivation reagent) à 0.1 volume de la réaction pendant 2 minutes à la température de la pièce. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 1,5 minutes à 10 000g et le surnageant contenant l'ARN est conservé pour la réverse transcription (RT). Pour cette réaction le kit RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) est utilisé avec 200 ng d'ARN total et les amorces d'oligo (dT)₁₈ fournis par le kit. Les étapes suggérées pour poursuivre avec une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ont été suivies. Les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume final de 25 µl en utilisant 1/10 de la réaction de RT, 1 U de Taq polymérase (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dATP, dTTP, dCTP et dGTP (Invitrogen), 0,5 pmol/µl de chaque amorce nucléotidique ainsi que du tampon de réaction à 1 X final par réaction. Les amorces nucléotidiques (AlphaDNA) ont été conçues à partir des séquences d'ADNc humaines obtenues dans GenBank pour les différents gènes d'intérêt, afin d'amplifier des fragments entre 100 et 300 paires de bases. Les séquences paires d'amorces sont dans le sens 5'-3' les suivantes : hCyclinD1 :AGAGGCGGAGGAGAACAAACAG et AGGCGGTAGTAGGACAGGAAGTTG, hPR : GAGGCAAAAAGGAGTTGTGTCTG et AAGAGAAGGGGTTTCACCATCC, hpS2 : TGGAGAACAAGGTGATCTGCG et CGAAACAGCAGCCCTTATTTGC, hc-Myc :CGCTGGATTTTTTTTCGGTAG et AAGTTCTCCTCCTCGTCGCAGTAG hSDF-1β :GCCAGAGCCAACGTCAAGCAT CTC et GGCAAAGTGTCCAAAACAAAGCCC hCXCR4 : ACTACACCG AGGAAATGGGCTC et CGTGATGACAAAGAGGAGGTCG, hERα : GATGATGGG CTTACTGACCAACC et GTTCCTGTCCAAGAGCAAGTTAGG, hERβ : GCTTTGGT TTGGGTGATTGCC et TCCAGCAGCAGGTCATACACTG, hGAPDH : CCATGGAG AAGGCTGGGG et CAAAGTTGTCATGGATGACC. La température d'hybridation est de 55°C pour toutes les amorces sauf pour hSDF-1 c'est 58°C. La durée des étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation est de 30 secondes et ce pendant 30 cycles mais pour la paire d'amorce hGAPDH 22 cycles sont suffisants. Les produits de PCR (5µL) ont été déposés sur gel d'agarose (GIBCO) de 1,5 % contenant du bromure d'éthidium. Les gels ont été exposés aux U.V. et photographiés avec un AlphaImager (Alpha Innotech Corporation). Le gène du GAPDH a été utilisé pour normaliser des variations d'intensités.

3 RÉSULTATS

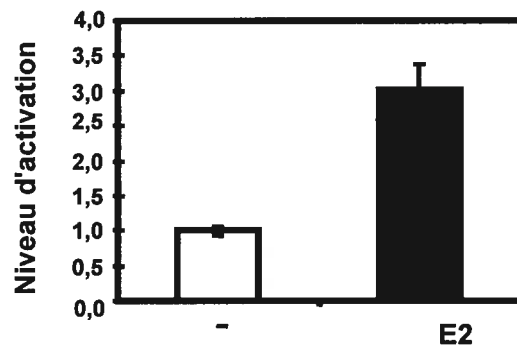
Le lien qui a été établi entre les récepteurs des estrogènes et leur gène cible, le SDF-1, ainsi que le rôle d'intermédiaire que joue CXCR4 dans la prolifération cellulaire médiée par les ERs (138) porte à croire qu'il pourrait exister une boucle de régulation entre ces récepteurs nucléaires et CXCR4. Afin de pouvoir étudier l'effet du récepteur CXCR4 et de son ligand, le SDF-1 sur l'activité transcriptionnelle des récepteurs ER α et ER β nous avons utilisé les MCF-7, des cellules de cancer du sein qui expriment de façon endogène les deux récepteurs des estrogènes ainsi que le CXCR4, comme le démontre la **Figure 3A**. Nous sommes donc assuré qu'elles possèdent toute la machinerie cellulaire pour répondre aux estrogènes ainsi qu'au SDF-1. Ces cellules ont été co-transfectées transitoirement avec le vecteur rapporteur de la luciférase ERE-tk-luc et traitées 16 heures avec 10 nM de 17 β -Estradiol (E₂) afin de mesurer l'activité transcriptionnelle des récepteurs (**Figure 3B**). Cette expérience nous a permis de valider l'essai luciférase puisque les récepteurs ont activé la transcription du gène de la luciférase en réponse à leur ligand. Les MVLN sont des transfectants stables des MCF-7 exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle d'un ERE. Dans ces cellules, nous pouvons aussi observer l'augmentation de la luciférase suite au traitement à l'E₂, ce qui nous permet de valider l'utilisation de ce modèle cellulaire (**Figure 3C**). L'utilisation de ces cellules nous permet aussi de travailler dans un contexte où le promoteur étudié est intégré dans la chromatine et donc toujours identique.

Afin d'évaluer l'effet du SDF-1 sur l'activité des ERs dans ces cellules, les MVLN ont été traitées 16 heures avec 25nM de SDF-1 α (**Figure 4A**). Les résultats démontrent que le SDF-1 augmente l'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes de près de 2 fois leur activité de base en absence de traitement. Ces résultats proposent donc un mécanisme d'activation indépendant du ligand qui permettrait aux ERs de lier l'ADN suite à l'activation de CXCR4 et des voies de signalisation en aval. Afin de s'assurer que cette activation des ERs était vraiment causée par une activation de CXCR4, nous avons traité les cellules avec 200 ng/ml de T140, un inhibiteur de CXCR4. Cet inhibiteur bloque de façon très efficace l'entrée du VIH par le CXCR4 et possède une activité antagoniste sur CXCR4 en inhibant le chimiotactisme des cellules de cancer du sein (198). Suite à l'utilisation du T140 nous observons qu'il diminue l'activité de base des ERs, ce qui nous indique que le CXCR4 peut en effet moduler l'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes.

A)



B)



C)

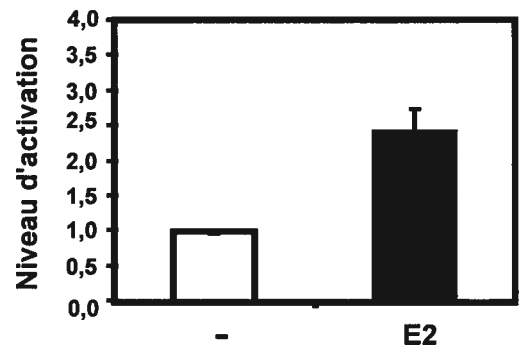


Figure 3. Les MCF-7 expriment CXCR4, ER β et ER α et répondent à l'E₂.

A. RT-PCR pour analyser l'expression de CXCR4, ER β et ER α dans les MCF-7. L'ARN total des cellules a été extrait et les RT-PCR ont été fait avec les amorces spécifiques aux séquences d'ADNc humaines. Montré sur ce gel d'électrophorèse : échelle de poids moléculaire 100pb (ligne 1), 5 μ l de produit de PCR avec les amorces hER β , hER α , hSDF-1, hCXCR4 (lignes 2-5 respectivement), contrôle négatif sans ARN (ligne 6). Les produits de PCR ont tous migrés à la hauteur attendue, hER β 173pb, hER α 217pb, hSDF-1 301pb, hCXCR4 239pb. B. Les MCF-7 ont été transfectées transitoirement avec le gène rapporteur de la luciférase ERE-tk-luc. L'activité transcriptionnelle a été mesurée suite à une stimulation des cellules avec 10 nM de 17 β -estradiol (E2). Les valeurs de luciférase ont été normalisées à partir de l'activité de la β -galactosidase, puis exprimées en niveau d'activation. C. Les MCF-7 transfectées stablement avec le gène rapporteur de la luciférase (MVLN) ont été traitées comme en B.

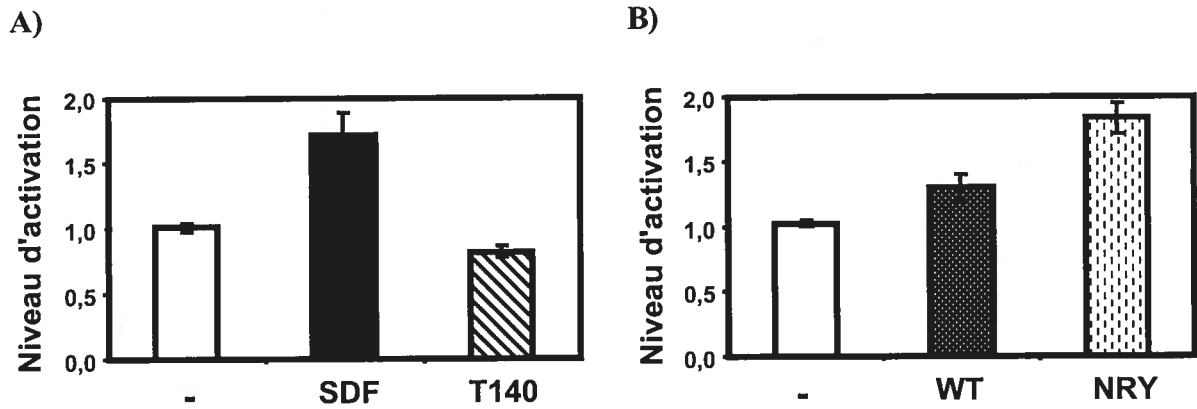


Figure 4. Effet ligand indépendant de l'activation de CXCR4 sur la transactivation des ERs dans les MVLN.

A. Les MVLN ont été traitées avec 25 nM de SDF-1 ou 200 ng/ml de TC14012 (analogue du T140). **B.** Les MVLN ont été transfectées de façon transitoire avec les vecteurs d'expression de CXCR4 type sauvage (WT) et le CXCR4 mutant dont l'aspartate 182 du domaine DRY est mutée en asparagine (NRY). Les valeurs de luciférase ont été traitées comme à la Figure 2.

La mutation NRY dans CXCR4 étant dans le motif DRY, elle abolirait les interactions intramoléculaires et permettrait une structure plus flexible et une activité spontanée même en absence de ligand en favorisant les interactions avec les protéines des voies de signalisation (199). En effet, le motif DRY est hautement conservé à travers les GPCRs et aide à la stabilisation de l'état inactif du récepteur puisqu'il permet des interactions intramoléculaires. La transfection transitoire de ce mutant dans les MVLN permet une augmentation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes (**Figure 4B**) tout comme l'activation de CXCR4 avec SDF-1 le permet (**Figure 4A**). À la lumière de ces résultats, nous suggérons que la signalisation intracellulaire d'un CXCR4 activé permet de modifier l'activité transcriptionnelle de récepteurs des estrogènes en absence de leur ligand.

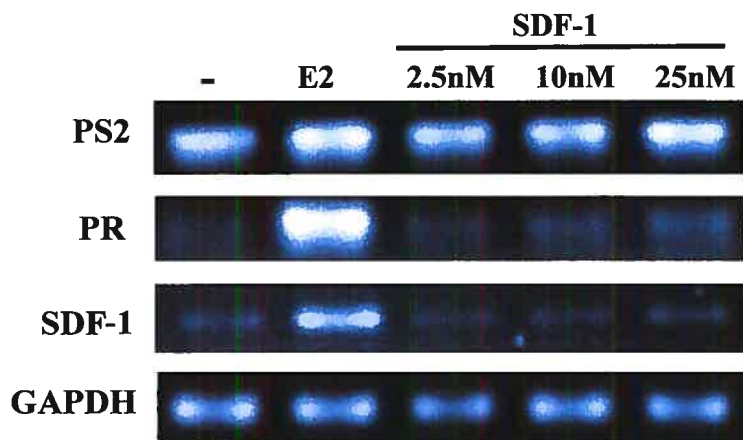


Figure 5. L'activation de CXCR4 modifie l'expression de gènes régulés par les récepteurs des estrogènes en absence de leur ligand.

Analyse des gènes cibles des ERs par RT-PCR dans les MCF-7. Les cellules ont été traitées avec 10 nM de 17 β -Estradiol (E₂) ou 2,5, 10 ou 25 nM de SDF-1 pendant 16 heures. L'ARN total des cellules a été extrait et une réaction de RT-PCR a été effectuée à partir de chaque échantillon traité avec 200 ng d'ARN et en utilisant les amorces spécifiques des ADNc des gènes hPR, hPS2, hSDF-1 et hGAPDH. 5 μ l des produits de PCR ont été déposés sur gel d'électrophorèse et les produits des amorces GAPDH ont servi à normaliser les quantités d'ARN utilisées pour chaque réaction.

Afin de pouvoir mieux évaluer l'impact de l'activation de CXCR4 sur l'expression de gènes cibles des estrogènes sous le contrôle de promoteurs contenant un élément de réponse ERE, nous avons effectué des essais de semi-quantification des ARNm par RT-PCR. Des amorces pour les ADNc du récepteur de la progestérone (PR), de pS2 et du SDF-1 ont été utilisées pour amplifier, par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), les ADNc obtenus d'une réaction de transcription inverse (RT, reverse transcription) des ARNm extraits des MCF-7. Il est connu que PR, pS2 et SDF-1 sont des gènes cibles des ERs et que leur expression est augmentée en présence d'estrogène. En effet, dans les tumeurs primaires, ces marqueurs ont été utilisés comme des facteurs de pronostic pour prédire si la tumeur était sensible aux estrogènes et donc si elle allait répondre à la thérapie anti-estrogénique (193). Les promoteurs de PR et pS2 contiennent un ERE par contre, la présence d'un ERE dans le promoteur du SDF-1 n'a pas encore été décrite (139). Néanmoins, l'équipe de Hall mentionne la présence d'une séquence ressemblant à un ERE dans la région génomique de 2 Kb précédant le site d'initiation de la transcription du SDF-1 (138). À la **Figure 5**, il est possible de constater que l'expression de ces gènes est augmentée suite à un traitement de 16 heures des cellules avec 10nM d'E₂ comme il était

attendu, mais aussi avec un traitement de 25nM de SDF-1. Ces résultats viennent appuyer ceux obtenus avec les essais luciférase et démontrent que l'expression de gènes régulés par les récepteurs des estrogènes peut être modifiée, même en absence d'estrogènes, par l'activation d'un récepteur situé à la membrane, le CXCR4.

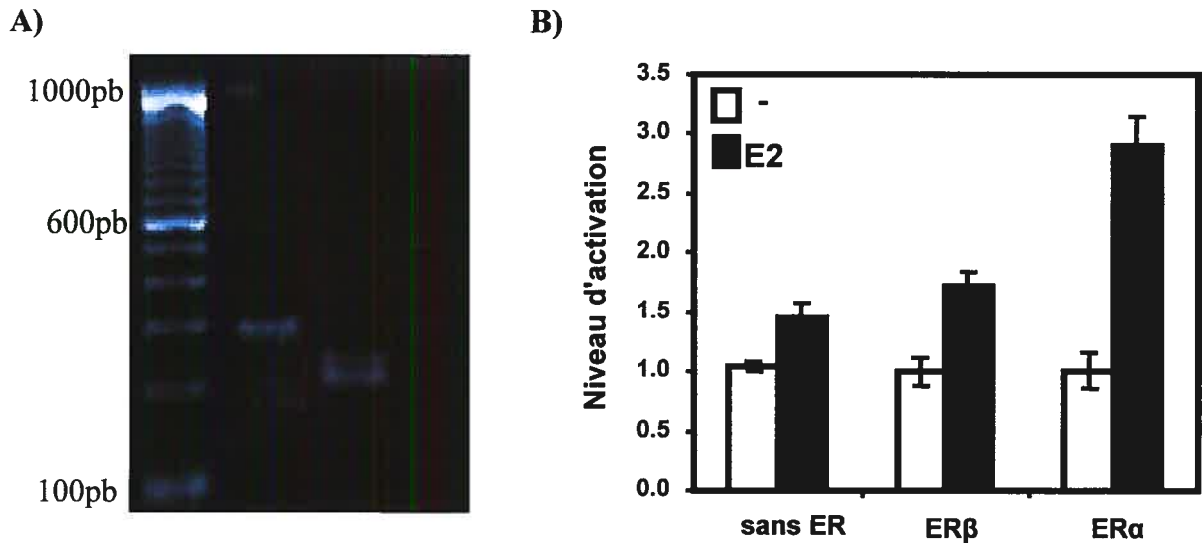


Figure 6. Les HEK 293-T répondent à l'estrogène lorsque les récepteurs sont transfectés.

A. Analyse de l'expression de CXCR4, SDF-1 dans les HEK 293-T. Les RT-PCR ont été fait comme à la Figure 3A. Le gel d'électrophorèse montre : l'échelle de poids moléculaire (ligne 1), 5 µl du produit de PCR avec les amorces hCXCR4 et hSDF-1 (lignes 2-3) et le contrôle négatif sans ARN (ligne 4). **B.** Les HEK 293-T ont été cotransfectées avec le gène rapporteur ERE-Tk-luc et avec ou sans les vecteurs d'expression des gènes ERβ ou ERα. La stimulation a été faite avec 10 nM d'E₂. Les valeurs de luciférase ont été normalisées à partir de l'activité de la β-galactosidase, puis exprimées en niveau d'activation.

Les récepteurs des estrogènes α et β ont un très grand degré d'homologie (**Figure 1**). Cependant, l'AF-1 est le domaine le plus divergent entre les deux récepteurs nucléaires. Ainsi, des évidences d'une activité différentielle provoquée par l'AF-1 de ERα et ERβ ont été montrées lorsque les récepteurs ne sont pas sous l'influence de leur ligand et par conséquent, où la l'AF-2 de ERα et ERβ n'est pas stimulée (37). L'AF-1 est aussi le domaine qui pourrait être régulé par CXCR4 puisqu'il possède plusieurs sites consensus de phosphorylation par les MAPKs (200). Il est donc possible que sous le contrôle du CXCR4 les deux isoformes ne répondent pas de la même façon. Nous avons voulu déterminer le rôle distinct des deux récepteurs dans l'activité transcriptionnelle ligand indépendante observée, puisque les MCF-7 expriment les deux isoformes de récepteurs des estrogènes.

Pour ce faire nous avons utilisé des cellules HEK 293-T transfectées avec un gène rapporteur de la luciférase ERE-tk-luc et des plasmides d'expression encodant ER α et ER β , ce qui nous a permis de déterminer l'effet du SDF-1 sur l'activation ligand indépendante de ER α et ER β séparément. Cette lignée cellulaire est utilisée puisqu'elle n'exprime aucun récepteur des estrogènes mais elle exprime de façon minimale CXCR4 (**Figure 6A**). Dans la **Figure 6B**, nous constatons que les deux récepteurs exprimés par les vecteurs d'expressions sont fonctionnels et permettent une activation de la transcription du gène rapporteur suite à une stimulation à l'E₂.

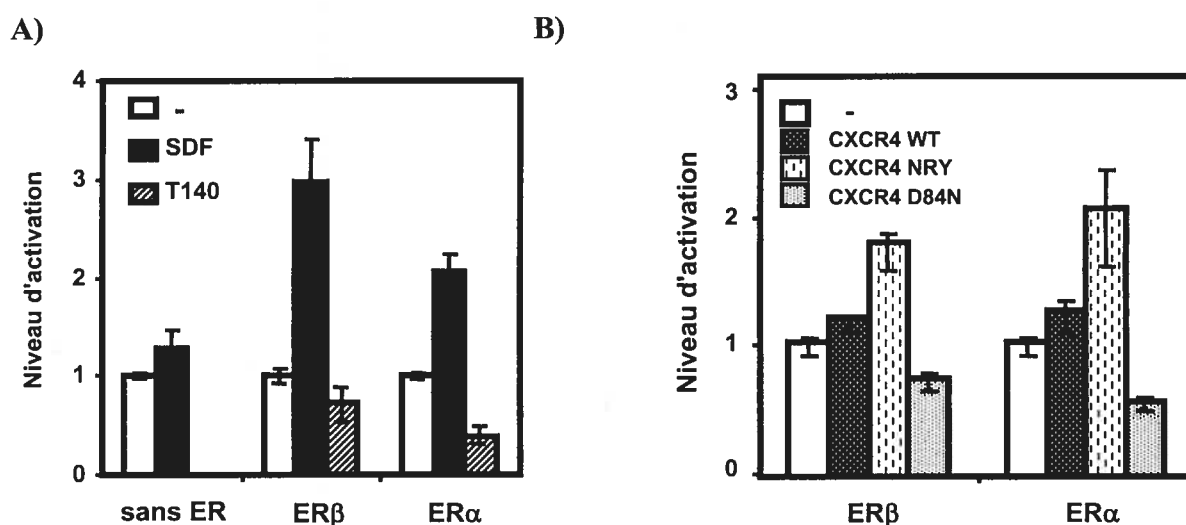


Figure 7. L'activation de CXCR4 stimule autant l'activité transcriptionnelle de ER α que ER β .

A. Les HEK 293-T ont été cotransfectées avec le gène rapporteur ERE-Tk-luc et les vecteurs d'expression des gènes de CXCR4 et avec ou sans les vecteurs d'expression de ER β et ER α . Les cellules ont ensuite été traitées avec 25 nM de SDF-1 ou 200 ng/ml de T140 pendant 16 heures. **B.** Les cellules ont été transfectées avec le gène rapporteur, les gènes des récepteurs des estrogènes seuls ou en présence d'un des types de CXCR4; CXCR4 type sauvage (WT), CXCR4 NRY ou CXCR4 D84N afin de procéder à un essai luciférase.

La **Figure 7A** nous démontre que les deux isoformes des récepteurs des estrogènes sont activés de façon ligand indépendante par le SDF-1 malgré que l'activation de l'isoforme β soit légèrement plus grande que celle de l'isoforme α . L'inhibiteur de CXCR4, le T140 diminue aussi la réponse basale des récepteurs. Ces résultats ont été obtenus en co-transfectant les récepteurs des estrogènes avec le vecteur d'expression de CXCR4. Le taux d'expression de CXCR4 endogène dans les HEK 293-T est faible comparativement à celui

des MCF-7 et nous constatons à la **Figure 7B** que la simple transfection du récepteur CXCR4 de type sauvage n'affecte pas l'activité basale des ERs. Par ailleurs, l'activation des ERs par le SDF-1 observée à la **Figure 7A** a aussi été obtenue sans la transfection de CXCR4 mais elle était moins importante (résultats non montrés), ce qui valide l'utilisation exogène de CXCR4 dans les HEK 293-T afin d'étudier l'effet du SDF-1. À la **Figure 7B**, nous retrouvons les mêmes variations avec la transfection des différentes formes de CXCR4 que nous avons obtenues dans les MVLN et ce, pour les deux types de ER. La surexpression de la forme sauvage du récepteur membranaire a un effet négligeable sur l'activité des ERs alors que la transfection du mutant NRY active la transcription autant pour ER α que pour ER β . Par ailleurs, l'utilisation d'un mutant de CXCR4 qui ne permet pas l'activation de la signalisation, soit le mutant D84N, a un effet inhibiteur sur l'activité des ERs. Ces résultats démontrent que les effets observés dans les MCF-7 sont effectués conjointement par les deux isoformes de récepteurs puisque l'activation du CXCR4 permet d'augmenter l'activité transcriptionnelle des deux isoformes séparément. De plus, la similitude des réponses obtenues suite à l'activation ou l'inhibition de CXCR4 avec les deux récepteurs propose l'existence d'un mécanisme de régulation ligand indépendant commun à ces deux récepteurs.

Le SDF-1 est une protéine très instable qui se dégrade rapidement surtout en présence de sérum puisqu'il contient plusieurs protéases. Le simple clivage des trois premiers acides aminés de la partie N-terminale du SDF-1 α et β le rend incapable de stimuler la prolifération de cellules pre-B et le chimiotactisme de cellules B (201). Afin de s'assurer d'une plus grande stabilité du SDF-1 pendant le traitement, nous avons mis au point une technique de co-culture. Cette technique consiste à transfecter transitoirement des cellules, dans ce cas des HEK 293-T, avec un vecteur d'expression du SDF-1 et de les récolter afin de les ajouter à des HEK 293-T préalablement transfectées avec les vecteurs d'expression des récepteurs et le vecteur rapporteur. Les traitements appropriés d'E₂ sont alors distribués et l'essai luciférase est effectué 16 heures après. Les cellules transfectées au SDF-1 servent donc pour le traitement des cellules transfectées avec les récepteurs puisqu'elles sont une source paracrine constante de SDF-1. Ce système permet donc de s'assurer de la présence de SDF-1 fonctionnel pendant le traitement. Il est possible de constater, en observant la **Figure 8A et B** que le système de co-culture fonctionne puisque

la réponse basale de même que la réponse à l'E₂ des ERs en condition de co-culture sont semblables aux réponses sans co-culture. Ensuite, ce système appuie une fois de plus le fait qu'en absence de ligand les récepteurs des estrogènes sont activés par le SDF-1 et ce, pour les deux isoformes de récepteur. Il semble donc que les traitements des cellules avec le SDF-1 sans co-culture peut être valable et que les variations observées avec ce traitement sont réelles et non influencées par une quelconque dégradation de la molécule ou modification de son activité.

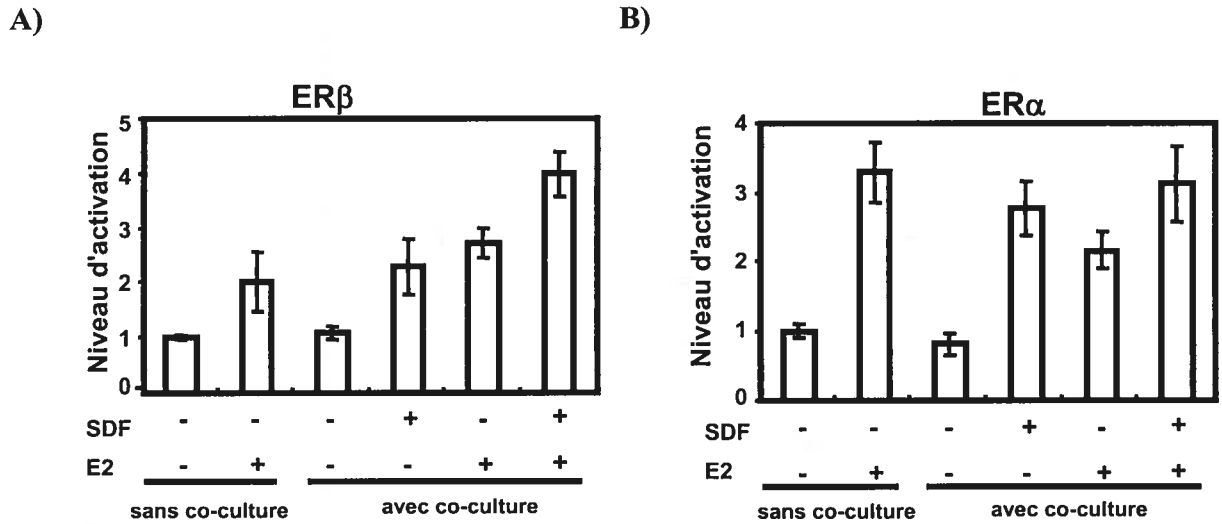


Figure 8. Le traitement des cellules peut se faire de façon paracrine avec des cellules exprimant le SDF-1.

Des cellules HEK 293-T ont été transfectées avec le gène rapporteur de la luciférase ERE-Tk-luc, le gène CXCR4 et ERβ (A) ou ERα (B). D'autres HEK 293-T ont été transfectées ou non avec le gène du SDF-1 et elles ont été ajoutées aux premières cellules au moment du traitement (5-6 heures post-transfection) en présence ou non de 10 nM d'E₂. Les colonnes sans co-culture ont seulement été traitées comme dans les transfections précédentes.

Dans la **Figure 8A et B**, la présence du traitement combiné d'E₂ et de SDF-1 nous permet d'entrevoir un autre effet que pourrait avoir le SDF-1 sur la régulation des ERs. En effet, nous observons que pour ERβ, la réponse transcriptionnelle est non seulement augmentée en présence de SDF-1 ou de E₂ séparément mais que la combinaison des deux traitements a un effet additif sur l'activité de ERβ. Par contre, cet effet n'est pas significatif dans le cas de ERα.

Les récepteurs des estrogènes contiennent deux régions distinctes qui contribuent à leur activité transcriptionnelle. Il y a l'AF-1 situé dans la partie N-terminale qui possède une certaine activité constitutive indépendante du ligand, puis l'AF-2 dans la partie C-terminale qui est régulée par le ligand (**Figure 1**). Selon le type cellulaire et le promoteur étudié, l'AF-1 et l'AF-2 peuvent réguler la transcription de façon indépendante ou coopérative (202). Suite aux résultats obtenus en co-culture, nous avons voulu approfondir l'étude de l'activation des ERs par le SDF-1 en présence de 17β -Estradiol. La **Figure 9A** démontre qu'il est, en effet, possible d'augmenter l'activation transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes causée par leur agoniste, en traitant les cellules avec de faibles concentrations de SDF-1, allant de 2.5nM à 25nM, en présence d'E₂. Les voies de signalisation activées par le CXCR4 ont donc un effet sur l'activité transcriptionnelle des ERs en présence ou en absence d'E₂ (**Figure 4A**). Par contre, à la **Figure 9B** le T140 n'exerce pas l'effet inhibiteur attendu sur l'activité transcriptionnelle des ERs. En effet, les MCF-7 expriment de façon endogène le SDF-1 et un traitement à l'E₂ permet l'augmentation de son expression (**Figure 5**). Nous avons donc supposé que le T140 en présence d'E₂ compétitionnerait avec le SDF-1 endogène ce qui nous permettrait d'obtenir la réponse estrogénique indépendante du SDF-1. Nous croyons que l'activité basale des récepteurs des estrogènes est en partie due à l'activation de CXCR4 par le SDF-1 endogène puisque nous avons observé une diminution de l'activité basale des ERs en présence de T140 seulement (**Figure 4 et 7**). Par contre, la réponse des ERs à leur ligand a probablement masqué la compétition entre le SDF-1 endogène et le T140 et il aurait fallu des concentrations de T140 plus élevées pour pouvoir apprécier son effet inhibiteur. En effet, en traitant avec l'E₂, nous augmentons la quantité de SDF-1 exprimée et la quantité de T140 utilisée est alors probablement insuffisante pour voir un effet. De plus, une étude démontre que le T140 a un effet maximal sur l'inhibition de la migration des cellules cancéreuses du sein à une concentration 10 fois plus élevée que notre concentration utilisée la plus grande, soit à 2 µg/ml (198).

Nous avons aussi vérifié le rôle intrinsèque de chaque isoforme de récepteur dans la réponse ligand dépendante observée dans les MVLN. Pour ce faire, nous avons utilisé les HEK 293-T en co-transfectant le vecteur d'expression de CXCR4 avec chacun des vecteurs d'expressions de ER α et ER β séparément et ce, toujours en présence du vecteur

rapporteur de la luciférase, ERE-tk-luc. Ceci nous a permis de constater, à la **Figure 10**, que le SDF-1 active de façon ligand dépendante les deux isoformes des récepteurs des estrogènes malgré que la réponse de ER α soit plus faible que celle de ER β . Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus en co-culture (**Figure 8**) qui illustrent aussi une divergence de réponse entre ER β et ER α au traitement combiné d'E₂ et de SDF-1. Dans le cas de ER α la réponse au traitement combiné n'est pas significative en co-culture mais cela peut-être seulement dû à une limite de la technique. Ces résultats indiquent donc que les réponses observées dans les MVLN sont engendrées par les deux types de récepteurs tout comme les réponses ligand indépendantes. Nous suggérons que la régulation de l'activité ligand dépendante des ERs, tout comme la régulation ligand indépendante, doit se faire par un mécanisme commun aux deux récepteurs mais que ER α répond moins fortement à ce mécanisme ligand dépendant que ER β .

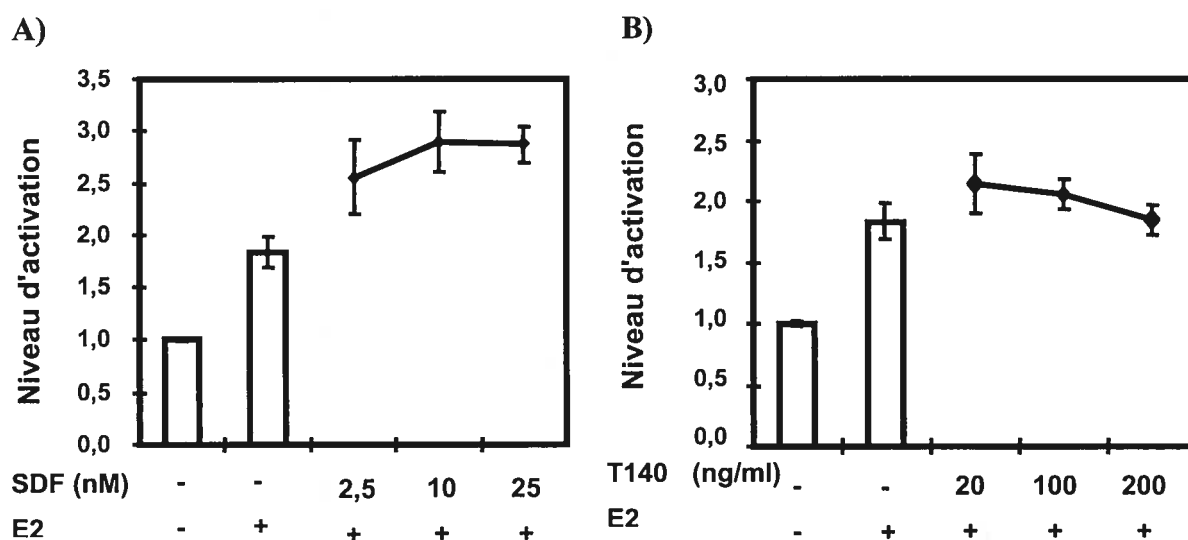


Figure 9. La stimulation des MVLN avec le SDF-1 en présence d'estrogène permet d'améliorer la réponse ligand dépendante des ERs.

Les MVLN ont été traitées avec 10 nM de 17 β -Estradiol (E₂) et des concentrations de SDF-1 allant de 2,5 à 25 nM (**A**) ou des concentrations de T140 allant de 20 à 200 ng/ml (**B**). Les résultats sont exprimés en niveau d'activation par rapport aux cellules non-traitées.

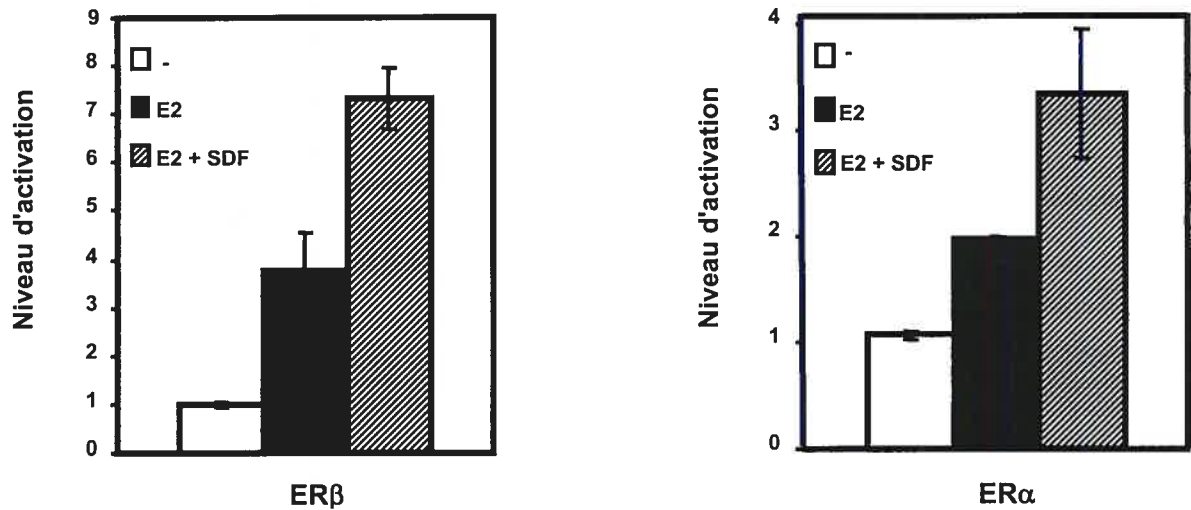


Figure 10. Le SDF-1 a aussi un effet ligand dépendant sur ERβ et ERα.

Les HEK 293-T ont été transfectées avec le gène rapporteur de la luciférase ERE-Tk-luc, CXCR4 et ERβ (A) ou ERα (B). Elles ont été traitées avec 10 nM d'E₂ en présence ou non de 25 nM de SDF-1. Les résultats sont exprimés en niveau d'activation par rapport aux cellules non-traitées.

Suite à l'étude de la régulation des éléments ERE par les récepteurs des estrogènes stimulés par CXCR4, nous avons voulu étudier leurs effets sur des éléments AP-1. En effet, les récepteurs des estrogènes activent la transcription de gènes cibles de deux façons. Premièrement, il y a la voie classique dans laquelle, lorsqu'ils sont activés soit par le ligand ou par la phosphorylation, les ERs peuvent lier l'ADN à des sites consensus qui sont leurs éléments de réponses, les ERE. De cette façon, les récepteurs facilitent le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base et transactivent l'expression des gènes contenant des éléments ERE au niveau de leur promoteur. Deuxièmement, les ERs peuvent activer la transcription par une voie alternative en interagissant avec d'autres facteurs de transcription tels que les membres de la famille AP-1 dont le complexe Jun/Fos et ainsi moduler l'expression de gènes régulés par des éléments AP-1. Certains gènes cibles des ERs dont leur expression est augmentée en présence d'E₂ sont régulés par un promoteur contenant un élément AP-1 comme le gène de la collagénase, c-Myc et cycline D1 (112;203;204).

Lors des expériences de RT-PCR, nous avons vérifié l'expression de gènes cibles des ERs qui sont sous le contrôle d'éléments AP-1 en réponse à un traitement au SDF-1. Il s'est avéré que les gènes c-Myc et cycline D1 sont plus fortement exprimés en présence de 25 nM de SDF-1 que dans le contrôle sans traitement dans les MCF-7, comme le démontre la

Figure 11. Il s'avère donc que l'activation des récepteurs des estrogènes par les voies de signalisation du CXCR4 influence non seulement la voie classique d'activation transcriptionnelle des ERs sur les éléments ERE (**Figure 5**) mais aussi une voie alternative, celle des éléments AP-1.

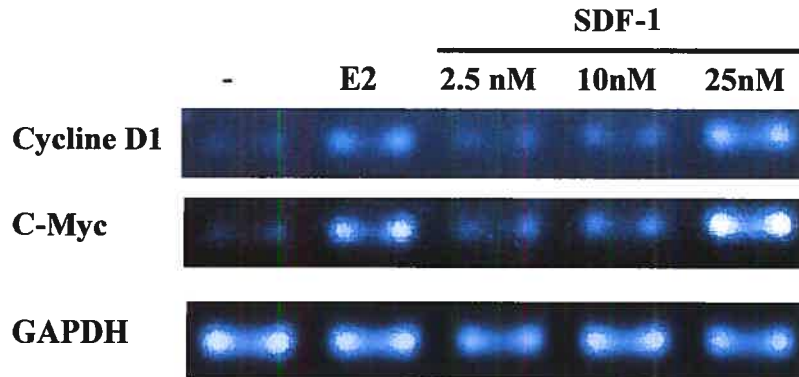


Figure 11. L'activation de CXCR4 régule l'expression de gènes cibles des ERs contrôlés par un promoteur AP-1.

Analyse des gènes cibles des ERs par RT-PCR dans les MCF-7. Les cellules et les échantillons ont été traités comme à la Figure 4 mais les amorces utilisées sont celles spécifiques aux ADNc des gènes hC-Myc et hCyclineD1 qui sont régulés par un promoteur AP-1.

Nous avons voulu étudier plus en détail l'effet de l'activation de CXCR4 sur cette activité transcriptionnelle des ERs et pour ce faire, nous avons utilisé le système de gène rapporteur AP1-coll-luc, qui est constitué de la luciférase sous le contrôle d'un élément de réponse AP-1 provenant du promoteur du gène de la collagénase. Ce système de rapporteur nous a permis de mesurer l'activité transcriptionnelle de chacun des ERs sur les éléments de réponse AP-1. Nous avons transfecté de façon transitoire le vecteur rapporteur AP1-coll-luc ou le vecteur rapporteur mutant AP1-coll Δ 73-luc avec les vecteurs d'expression des ERs dans les HEK 293-T, et suite à un traitement de 16 heures en présence de 10 nM d'E₂, 5 μ M de 4- hydroxytamoxifene (OHT) ou de 1 μ M de ICI 182780 (ICI), nous avons mesuré l'activité transcriptionnelle des ERs. Le promoteur AP1-coll Δ 73-luc ne possède plus le site consensus de l'AP-1 donc ne peut plus répondre à la stimulation par les ERs (111). Dans la **Figure 12**, nous constatons que l'E₂ ne permet pas d'activer la transcription du gène de la luciférase sous le contrôle d'un élément AP-1 et ce, pour les deux types de récepteurs. Par contre, ce sont les composés reconnus pour être des antagonistes des ERs dans la voie classique d'activation de la transcription qui agissent ici

comme des agonistes et permettent d'augmenter l'expression du gène de la luciférase entre 2,5 et 6,5 fois selon le ER et le ligand. Pour ce qui est de la réponse obtenue avec le promoteur muté, nous pouvons observer qu'elle est complètement perdue avec ER α alors qu'elle subsiste légèrement avec ER β . À la lumière de ces résultats, nous avons déterminé à quels ligands notre système de rapporteur AP-1 répond et que ces réponses sont spécifiques à l'élément de réponse AP-1, puisqu'elles sont perdues avec un élément AP-1 muté. L'utilisation de ce système a aussi été validée par ces résultats puisqu'ils reproduisent ceux obtenus par Paech *et al.* (113)

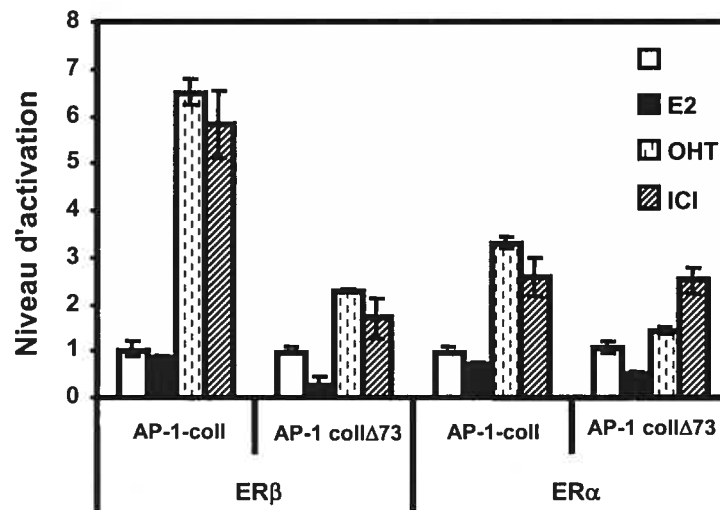


Figure 12. Le système rapporteur du gène de la luciférase couplé au promoteur AP-1 fonctionne dans les HEK 293-T.

Les HEK 293-T ont été cotransfectées le gène rapporteur de la luciférase AP1-coll-luc ou le mutant AP1-coll Δ 73-luc contenant plus la région AP-1 avec ER β ou ER α . Les traitements ont été fait avec 10 nM d'E₂, 5 μ M de 4-OH-tamoxifène (OHT) ou 1 μ M d'ICI 182780 (ICI). Les résultats sont exprimés par rapport aux échantillons non traités de chaque type de gène rapporteur.

Afin d'évaluer l'effet du SDF-1 sur l'activité des récepteurs des estrogènes sur un élément AP-1, nous avons transfecté les vecteurs d'expression des récepteurs étudiés ainsi que le gène rapporteur de la luciférase AP1-coll-luc dans les HEK 293-T en présence de 25nM de SDF-1 et/ou de 5 μ M de OHT, comme illustré à la **Figure 13**. Nous observons une augmentation de l'activité transcriptionnelle de ER β lors de la présence combinée de OHT et de SDF-1, alors que cette combinaison entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle pour ER α . La présence de SDF-1 seule n'a un effet que négligeable sur

l'activité de ER β , alors qu'elle n'a aucun effet sur ER α . La divergence de réponse entre les deux isoformes de récepteurs nous indique que contrairement à la voie classique, cette autre voie des ERs est régulée par des mécanismes distincts en présence de SDF-1.

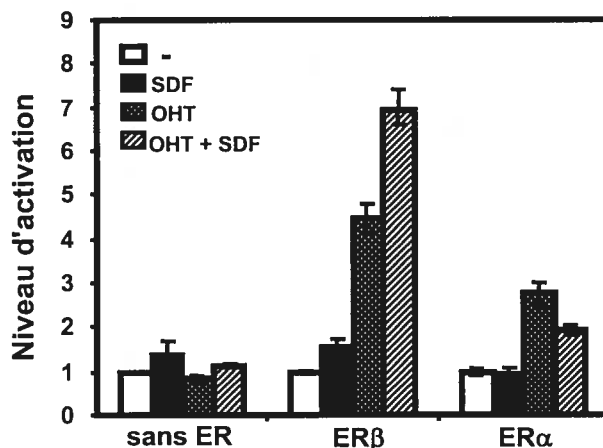


Figure 13. Le SDF-1 régule l'activité de ER β et ER α sur un promoteur AP-1.

Les cellules HEK 293-T ont été transfectées avec le gène rapporteur de la luciférase AP1-coll-luc, le vecteur d'expression de CXCR4 et ceux de ER β ou ER α . La stimulation des cellules a été effectuée avec 25 nM de SDF-1 et/ou 5 μ M de OHT.

Par la suite, nous avons vérifié l'expression des gènes cibles régulés par l'AP-1 dans un modèle de cellules cancéreuses du sein, ER-négatives, soit les Hs578-T (205;206). Nous avons donc transfecté les cellules avec les vecteurs d'expression des ERs et de CXCR4 et traité les cellules avec le OHT et le SDF-1. L'ARN des cellules a ensuite été extrait afin d'effectuer les essais de RT-PCR avec les amorces correspondant aux ADNc des gènes c-Myc et cycline D1. Les résultats obtenus sont montrés à la **Figure 14**, dans laquelle nous observons une augmentation de l'expression des deux gènes en réponse au traitement combiné de OHT et de SDF-1 pour les cellules exprimant ER β et une diminution de l'expression de ces deux gènes pour le même traitement avec les cellules exprimant ER α . Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans les HEK 293-T pour l'activité transcriptionnelle des ERs et nous indiquent probablement une divergence de mécanisme d'activation de la transcription de la voie alternative entre les deux types de récepteurs.

Le traitement au SDF-1 seul fait diminuer l'expression de cyclineD1 avec ER β alors qu'elle augmente avec ER α . Ce résultat nous permet donc de proposer que l'augmentation

de l'expression de la cycline D1 au SDF-1 dans les MCF-7 (**Figure 11**) est le résultat de l'action de ER α . Malgré que les MCF-7 expriment les deux isoformes des récepteurs de estrogènes, l'ARNm de ER α est exprimé en plus grande quantité par rapport à ER β (**Figure 3A**). Cette différence d'expression a aussi été observée au niveau protéique par immunobuvardage de type western (90). Dans le cas où les deux isoformes n'ont pas la même activité transcriptionnelle il est donc possible que ce soit l'activité de ER α qui se démarque dans la réponse globale au SDF-1. Pour ce qui est de l'inhibition de l'expression de la cycline D1 par ER β , elle ne concorde pas avec le fait que le SDF-1 augmente la réponse au OHT ni avec la réponse de ER β au SDF-1 seul dans les HEK 293-T. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'induction de l'expression de la cycline D1 par ER β est strictement dépendante des hormones et qu'elle requiert l'intégrité de l'AF-1 et de l'AF-2 (207). Avec le SDF-1, l'AF-2 ne serait pas stimulé donc l'expression de la cycline D1 ne pourrait pas être augmentée. De plus, l'expression de cycline D1 est non seulement régulée par un promoteur AP-1 mais aussi par un promoteur contenant un élément CRE (112), ce qui peut expliquer les divergences des résultats avec les éléments AP-1 seuls.

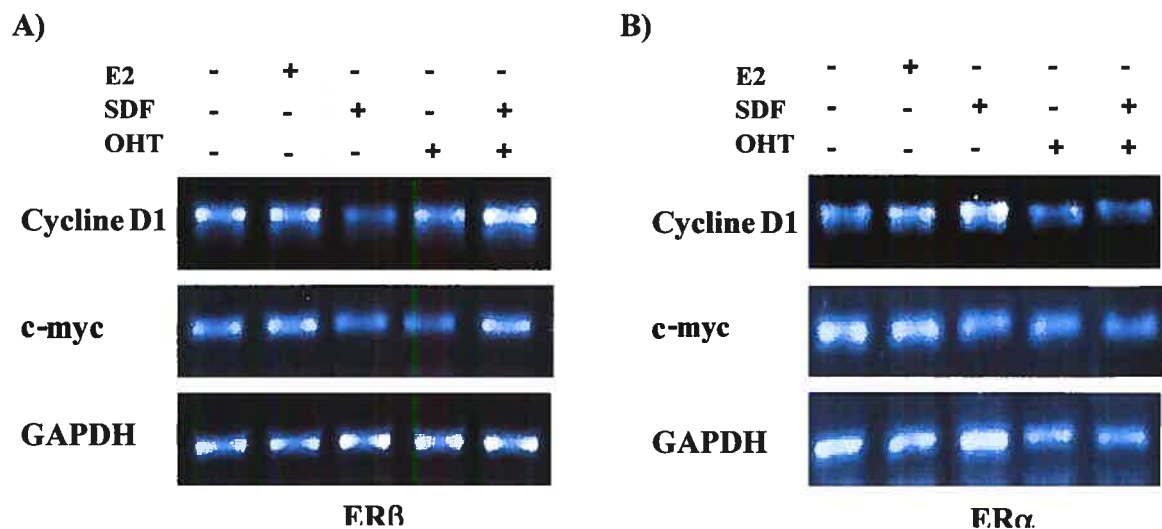


Figure 14. ER β et ER α régulent différemment les gènes sous le contrôle d'un promoteur AP-1 en présence de SDF-1.

Les cellules de la lignée cancéreuse du sein Hs578-T ont été cotransfectées avec le récepteur CXCR4 et ER β ou ER α et traitées avec 10 nM d'E₂, 5 μ l d'OHT, ou 25 nM de SDF-1. L'ARN total des cellules a été extrait et à partir de chaque échantillon traité une réaction de RT-PCR a été effectuée avec 200 ng d'ARN et en utilisant les amorces spécifiques des ADNc des gènes hC-Myc, hcycline D1 et hGAPDH. 5 μ l des produits de PCR ont été déposés sur gel d'électrophorèse et les produits des amorces GAPDH ont servi à normaliser les quantités d'ARN utilisées pour chaque réaction.

Dans le but de déterminer le rôle des domaines fonctionnels dans la régulation de ER β par le SDF-1, nous avons utilisé des vecteurs d'expression codant pour les mutants tronqués de ER β . En effet, le modèle proposé pour la régulation d'un AP-1 par ER α suggère que l'action de ER α lié à l'estrogène stimulerait la transcription via ses fonctions d'activation AF-1 et AF-2 ce qui lui permettrait d'augmenter la liaison des coactivateurs à l'ADN. Alors qu'en présence de tamoxifène l'AF-1 ne serait pas nécessaire pour réguler la transcription de promoteurs AP-1 (114). De plus, puisque nous supposons que CXCR4 régule l'activité des ERs par la phosphorylation il est intéressant de voir qu'elle portion des ER est influencé puisqu'ils peuvent être phosphorylés autant sur l'AF-1 que l'AF-2 (83;97). La **Figure 15A** schématise les différentes constructions effectuées telles que la délétion de l'AF-1 de ER β , nommée CDEF β et la délétion de l'AF-2, nommée ABCD β . Par la suite, les plasmides exprimant ces mutants de délétion ainsi que les récepteurs sauvages ont été cotransfectés avec le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle de l'élément AP-1 dans des cellules HEK 293-T et le niveau d'activation de la transcription a été mesuré. Il s'est avéré, comme l'illustre la **Figure 15B**, que la régulation de ER β dépendante du SDF-1 diffère selon ses domaines fonctionnels et les fonctions d'activation. Le mutant CDEF β répond au OHT, mais pas au traitement combiné de OHT et SDF-1 contrairement à la forme sauvage du récepteur. Le SDF-1 n'a donc pas d'effet sur l'AF-2 mais plutôt sur l'AF-1. En effet, la forme ABCD β a une activité transcriptionnelle augmentée en réponse à ce traitement semblable à celle obtenue pour la forme sauvage. Cette augmentation est de moins grande importance pour le mutant ABCD β dont la partie de l'AF-2 et le domaine E sont manquants, ce qui indique que cette partie est importante pour l'activation maximale de ER β en présence du SDF-1, comme nous l'observons pour la forme sauvage sans toutefois être essentielle.

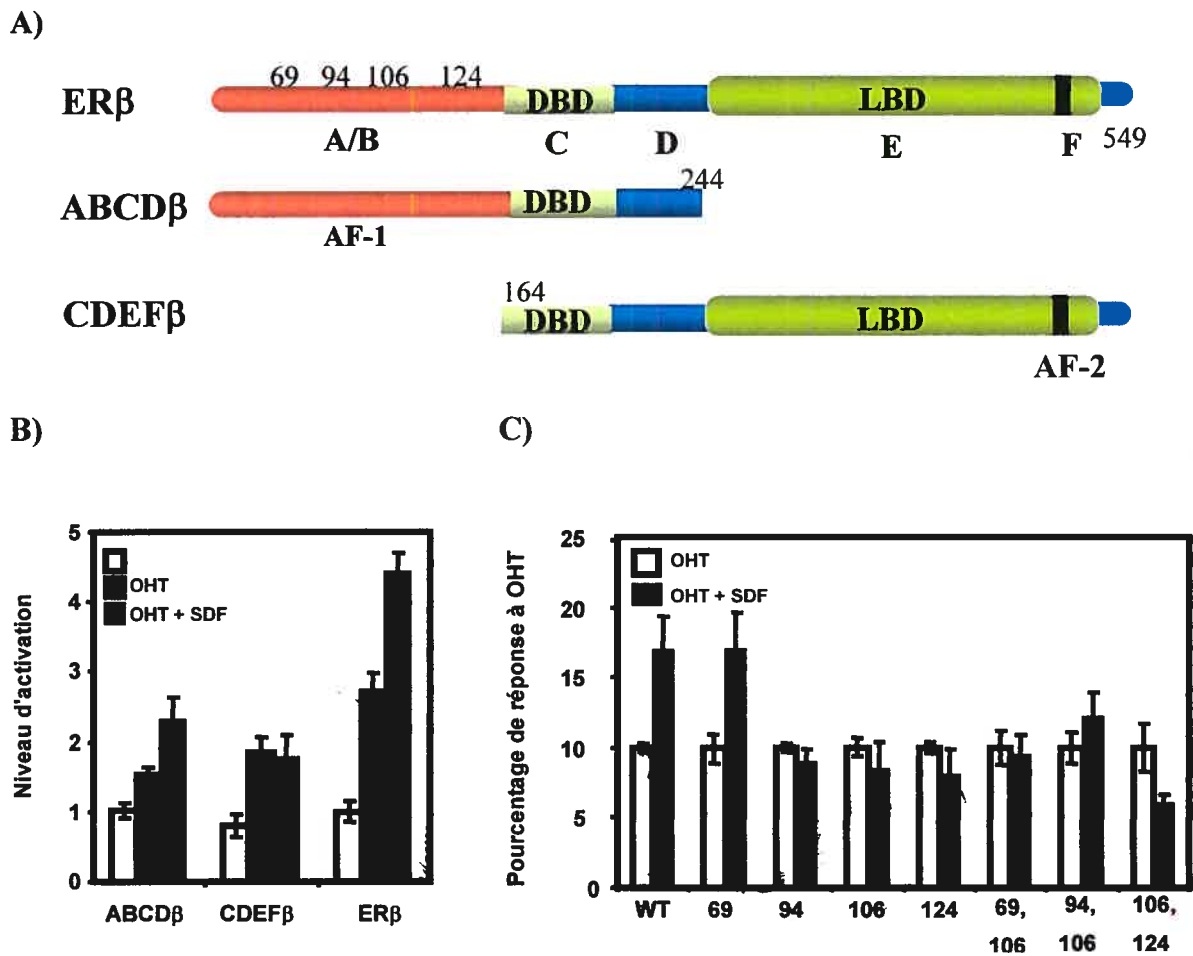


Figure 15. L'intégrité de l'AF-1 de ERβ est essentielle pour la réponse au SDF-1.

A. Les constructions et CDEFβ sont des formes tronquées du récepteur des estrogènes β. pCMX-ABCDβ a été créé par une digestion du vecteur sauvage avec des enzymes de restriction appropriées suivie d'une auto-ligation du vecteur digéré. Le vecteur de CDEFβ a été obtenu par la génération de fragments par PCR. Les chiffres sur le ERβ pleine longueur représentent les sérines mutées en alanine dans la portion AF-1 de ERβ. Les mutants ont été obtenus par mutagenèse par PCR. B. Les cellules HEK 293-T ont été transfectées avec le gène rapporteur de la luciférase AP1-coll-luc, le vecteur d'expression de CXCR4 et pCMX-ABCDβ, pCMX-CDEFβ, pCMX-ERβ ou C. les constructions de ERβ dont les sérines sont mutées en alanines. Elles ont été traitées comme à la Figure 12. La réponse au traitement combiné OHT et SDF-1 a été exprimée en pourcentage de la réponse à OHT de chaque mutant. WT signifie ERβ de type sauvage.

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

Sites de phosphorylation	Voies de phosphorylation impliquées	Activité transcriptionnelle	Références
ERα			
S104	CDK2	↑	(39)
S106	CDK2	↑	(39)
S118	CDK7, MAPK, PKC	↑	(38;79;80;82;88)
S167	AKT, pp90 ^{rsk1}	↑	(89;104)
S236	PKA	↓	(97)
T311	MAPK (p38)	↑	(83)
ERβ			
S25	ND*	ND*	ND*
S31	ND*	ND*	ND*
S69	ND*	ND*	ND*
S94	ND*	ND*	ND*
S106	MAPK	↑	(74)
S124	MAPK	↑	(74)
S154	ND*	ND*	ND*
S158	ND*	ND*	ND*
S255	AKT	↑	article en préparation (Mélanie Sanchez)

ND* : Non-Déterminée

Le domaine A/B peut être phosphorylé sur plusieurs sérines comprises dans des sites consensus de phosphorylation par les MAPKs ayant une séquence riche en proline PXX-S/T-P, ce qui permet la régulation de l'activité des ERs. La caractérisation de ces sites sur ER α est relativement complète alors que pour ER β plusieurs de ces sites consensus demeurent des sites potentiels de phosphorylation (**Tableau I**). Bien que le rôle

fonctionnel de la plupart de ces sites de ER β reste inconnu, certains comme les sérines 106 et 124 sont reconnus pour être des cibles potentielles de la phosphorylation par les MAPKs et intervenir dans le recrutement de coactivateurs. Par ailleurs, la voie des MAPKs fait partie des voies de signalisation activées par CXCR4 (171). Ces faits nous portent à croire que la phosphorylation de ces sérines du domaine A/B par les MAPKs activées par CXCR4 peut être responsable de l'activité transcriptionnelle du récepteur en présence de SDF-1. Afin de déterminer l'implication de ces sites potentiels de phosphorylation dans l'activité de l'AF-1 de ER β en réponse au SDF-1 sur les sites AP-1, nous avons déterminé l'activité transcriptionnelle de récepteurs dont les sérines contenues dans ces sites étaient mutées en alanines (**Figure 15C**). Ce type de mutation empêche la phosphorylation possible par les MAPKs. La simple mutation des sérines 94, 106 ou 124 élimine l'augmentation de l'activité transcriptionnelle observée en présence de OHT et de SDF. Ces résultats démontrent que l'effet du SDF-1 ne peut pas être attribuée à une sérine en particulier mais elles sont toutes essentielles à la réponse au SDF-1. Néanmoins, la sérine 69 ne doit pas être essentielle à l'activité de l'AF-1 puisque c'est la seule mutation à ne pas abolir la réponse transcriptionnelle du récepteur.

Les doubles mutations de sérines n'ont pas d'effets plus marqués que les mutations simples sauf la double mutation S106A, S124A. Il semble aussi que la sérine 106 joue un rôle primordial dans l'activation du récepteur puisque la double mutation S69A et S106A abolit aussi la réponse au SDF-1 alors qu'elle est conservée avec la simple mutation de la sérine 69. Par ailleurs, les sérines 106 et 124 sont bien connues pour recruter en duo le coactivateur SRC-1 (74) lors de l'activation de la transcription par ER β ce qui pourrait expliquer l'effet plus marqué de la double mutation. Il semble donc que l'intégrité de l'AF-1 est essentielle à l'activation de ER β par le SDF-1, ce qui supporte l'idée que l'activation de CXCR4 agit sur l'AF-1 comme nous l'avons observé à la **Figure 15B**.

4 DISCUSSION

Lors de cette étude nous voulions déterminer l'effet de la signalisation de CXCR4 sur l'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes. Des études démontrent que l'activation de ER α par l'estrogène entraîne la stimulation du CXCR4 puisque l'expression de son ligand, le SDF-1 est augmentée par l'activité transcriptionnelle de ER (138). Ainsi, nous supposons qu'il existe une boucle de régulation entre ces deux récepteurs. Notre hypothèse est que les voies impliquées dans la signalisation de CXCR4 pourraient à leur tour permettre l'activation des récepteurs des estrogènes, puisque ceux-ci peuvent être phosphorylés au niveau de la fonction d'activation AF-1, ce qui est suivi de augmentation de l'expression de leurs gènes cibles. L'existence d'une telle boucle de régulation pourrait avoir des conséquences importantes au niveau de la prolifération cellulaire dans plusieurs tissus gynécologiques mais surtout au niveau des cellules tumorales. De récentes études ont démontré une forte expression de CXCR4 dans des cellules malignes de tumeurs du sein alors que son expression n'est pas détectée dans les cellules normales. Par ailleurs, le SDF-1 est exprimé dans les sites où les métastases des cancers du sein sont souvent retrouvées (poumon, moelle osseuse, nodules lymphatiques) (187;208). Enfin, le rôle de ce récepteur dans les cellules tumorales est de promouvoir la croissance des foyers tumoraux primaires et métastatiques, en plus de déterminer les sites de formation des métastases (209;210). L'utilisation de cellules cancéreuses du sein est donc fortement appropriée pour effectuer cette étude.

Tout d'abord, nous savons que l'expression des gènes codant pour le SDF-1, pS2 et PR est régulée par les récepteurs des estrogènes (138),(193). À la **Figure 5**, nous constatons que leur expression est effectivement augmentée en présence d'estradiol dans les MCF-7. Par cette expérience, nous avons non seulement reproduit les résultats obtenus par Hall et *al.*, qui ont initialement décrit la régulation du SDF-1 par l'estrogène. Mais nous démontrons aussi que l'expression de ces gènes cibles des ERs est influencée par le SDF-1. Ces résultats proposent que l'activité transcriptionnelle des ERs puisse être modifiée par CXCR4. L'augmentation de l'expression du gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle d'un ERE suite à un traitement au SDF-1 (**Figure 4A**) supporte aussi fortement cette observation. De plus, en présence de T140, un antagoniste spécifique de CXCR4 (211), l'activité transcriptionnelle basale des récepteurs des estrogènes est diminuée, ce qui nous a permis de confirmer que l'activité de CXCR4 pouvait effectivement avoir un effet sur l'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes.

Le mutant CXCR4 NRY a été créé par la substitution de l'acide aspartique (D) 133 du motif DRY par une asparagine (N). Le motif DRY hautement conservé à travers les GPCRs se trouve dans la partie cytoplasmique du 3^e segment transmembranaire (TM3). Plusieurs expériences de mutations de la chaîne acide de l'acide aspartique ont démontré que cette chaîne régule l'activation du récepteur, le couplage à l'agoniste du récepteur et l'activation de la signalisation des protéines G (212). Par ailleurs, il semble que l'arginine (R) de ce motif soit aussi importante pour la stabilisation à l'état actif ou inactif du récepteur et que la mutation de cet acide aminé permet d'obtenir des mutants constitutivement actifs (213). Des études de la structure cristalline du récepteur de la rhodopsine supportent aussi l'importance de ces acides aminés Asp et Arg dans la stabilisation du récepteur, puisque la chaîne latérale de l'arginine formerait des ponts salins avec l'acide aspartique précédente et une glutamine dans le 6^e passage transmembranaire (TM6) (214). Puisque le TM3 et TM6 sont impliqués dans le changement de conformation du récepteur lors de son activation par le ligand, il est proposé que les interactions entre ces domaines contraignent le récepteur dans sa forme inactive et que le bris de ces interactions entraîne une activation constitutive (199). Il existe aussi des GPCRs qui ne possèdent pas le motif DRY et qui sont actifs en absence d'un ligand, par exemple de KSHV-GPCR (Kaposi's Sarcoma Herpesvirus- G protein-coupled receptor) possède un motif VRY à la place. Ce récepteur est fortement apparenté au GPCR CXCR2 et lorsque l'acide aspartique 138 du motif DRY de CXCR2 est muté en valine, celui-ci devient constitutivement actif avec une activité semblable au KSHV-GPCR (215). Plus récemment, un autre récepteur, le ORF74 (localisé au cadre de lecture 74 du virus de l'herpès équine 2), qui possède une activité constitutive, a été muté afin de restaurer son motif DTW en motif DRY, ce qui a créé une diminution de son activité (216). Ces évidences portent à croire que la mutation NRY de CXCR4 permet d'obtenir un récepteur activé en absence de SDF-1, d'autant plus que la transfection de ce mutant active les ERs sans SDF-1. Par ailleurs, cette activation est similaire à celle observée pour le récepteur de type sauvage endogène en présence de son ligand autant dans les MVLN que dans les HEK 293-T (**Figures 4 et 7**). Ainsi, la transfection du mutant CXCR4 NRY démontre une fois de plus que l'activation des voies de signalisation en aval du récepteur engendre une activation ligand indépendante des récepteurs des estrogènes.

Par ailleurs, la transfection du mutant CXCR4 D84N diminue l'activité basale des récepteurs des estrogènes tout comme l'utilisation du T140. Ce qui confirme que l'activité de CXCR4 a un effet sur les ERs. En effet, il est possible que la mutation de cet acide aminé abolisse la signalisation cellulaire du récepteur puisqu'il est situé dans le deuxième passage transmembranaire qui joue un rôle important dans la signalisation du récepteur en plus d'être un acide aminé hautement conservé à travers les récepteurs des chimiokines (158).

Plusieurs voies de signalisation activées par CXCR4 peuvent être à l'origine de l'activation des récepteurs des estrogènes en absence de leur ligand. Ces voies sont celles de PI-3K/AKT, des MAPKs p38 et p44/42 et de la PKC. En effet, il a été démontré que ces voies peuvent activer de façon ligand indépendante les ERs (200) mais ces voies sont aussi activées par la liaison du SDF-1 au CXCR4 (171). L'action de ces voies sur les récepteurs des estrogènes se situe surtout au niveau de l'AF-1, elles phosphorylent les sérines des sites consensus, ce qui permet d'interagir avec des coactivateurs et ainsi d'activer la transcription de gènes cibles. Par contre, le mécanisme d'action de ces voies sur les deux types de ERs est souvent différent, puisque l'AF-1 est la région la moins conservée au niveau de leurs structures ce qui engendre des différences au niveau de leur activité transcriptionnelle (37).

Malgré le fait que les MCF-7 étaient un modèle approprié puisqu'elles sont des cellules de cancer du sein qui expriment les deux formes de récepteurs des estrogènes, CXCR4 et SDF-1 (**Figure 3A**), il était difficile de distinguer les effets de chacun des isoformes. Nous avons donc voulu étudier l'effet de l'activation de CXCR4 sur chacun des ERs séparément. Pour ce faire, nous avons choisi un modèle cellulaire qui n'exprimait aucun des récepteurs des estrogènes. Les cellules HEK 293-T ont donc été utilisées puisqu'elles expriment légèrement CXCR4 et SDF-1 mais aucun des ERs (**Figure 6A**). Par ailleurs, la **Figure 6B** démontre que l'étude de l'activité transcriptionnelle des ERs par essais luciférase sur un ERE est possible dans ces cellules et que la réponse au ligand est comparable à celle obtenue dans les MCF-7 (**Figure 3A et B**).

Aux **Figures 7 A et B** nous constatons que les réponses des ERs aux différents états d'activation de CXCR4 sont semblables entre les deux isoformes, donc il ne semble pas y

avoir de mécanisme de régulation différent pour ER α et ER β . En effet, le traitement au SDF-1 augmente l'activité transcriptionnelle de ER β et de ER α , tout comme la transfection du mutant CXCR4 NRY. Nous supposons que cette activation est causée par la phosphorylation de l'AF-1 des récepteurs par les voies de signalisation activées par CXCR4, ce qui entraîne le recrutement de coactivateurs tels que SRC-1 et CBP autant pour ER α que ER β . Cette phosphorylation et le recrutement de coactivateurs permettraient l'activation de la transcription même en absence du ligand, de la même façon que cela se produit lors de l'activation ligand indépendante des ERs par les facteurs de croissance (73;74). Néanmoins, il est possible que les voies de signalisation activées par CXCR4 aient un effet indirect sur l'activité des récepteurs nucléaires en phosphorylant les coactivateurs. En effet, CBP est reconnu pour être un intégrateur de plusieurs voies de signalisation dont la phosphorylation par les MAPKs résulte d'une augmentation du potentiel de coactivation de CBP (217;218). De plus, il a été démontré que la phosphorylation de AIB1/SRC-3 par les MAPKs stimule son interaction avec p300, ce qui entraîne une augmentation de la transcription ER dépendante (219). Il serait donc intéressant de faire des études complémentaires afin de pouvoir cerner le rôle de la phosphorylation sur l'AF-1 ainsi que sur les coactivateurs dans cette régulation des ERs par CXCR4.

Le fait que le T140 inhibe la réponse basale des ERs autant dans les MVLN que dans les HEK 293-T, nous permet de supposer que cette activité de base est en partie due à l'activation des ERs par le SDF-1 endogène des cellules. En effet, nous avons constaté aux **Figure 3A et 6A** que le SDF-1 est légèrement exprimé dans les cellules non traitées et aux **Figure 4A et 7A** que le SDF-1 permet d'activer les ERs. Il est donc possible de croire que cette quantité endogène de SDF-1 contribue à une partie de l'activité basale des ERs que le T140 permet de bloquer en compétitionnant avec le SDF-1.

Les récepteurs des estrogènes sont connus pour activer la transcription en présence de leurs ligands. Cette voie d'activation est dépendante de l'activité de l'AF-2 mais peut aussi interagir de façon indépendante ou synergique avec l'AF-1 dépendamment du type cellulaire et du promoteur étudié (202). Nos résultats nous démontrent qu'il est possible d'augmenter la réponse ligand dépendante des récepteurs des estrogènes en ajoutant du

SDF-1 aux cellules (**Figure 9A et 10A et B**), ce qui indique que les fonctions d'activation peuvent coopérer afin de maximiser la réponse ligand dépendante lorsqu'ils sont activés par leurs stimuli respectifs. Nous suggérons une coopération ou un phénomène additif en supposant que les deux fonctions d'activations soient activées indépendamment, l'AF-1 par la signalisation de CXCR4 et l'AF-2 par son ligand, ce qui nous permet d'observer une plus grande augmentation de l'activité du récepteur. En effet, l'activation de ces fonctions d'activation a le même effet sur les récepteurs, soit le recrutement des coactivateurs. L'activation de l'AF-2 par le ligand ne potentialise donc pas l'activité des ERs en présence de SDF-1, il ne fait qu'améliorer la réponse transcriptionnelle. Nous supposons que le mécanisme d'activation ligand dépendant par le SDF-1 soit le même que le mécanisme ligand indépendant puisque l'effet du SDF-1 va encore dans le même sens pour ER α que ER β . De plus, plusieurs études ont démontré que la phosphorylation de ER α et ER β à des sites spécifiques sur l'AF-1 suite à des stimulations par des facteurs de croissance comme l'EGF et l'IGF-1 promouvoit l'activation ligand dépendante et indépendante des récepteurs (88;194;220).

Afin de vérifier l'implication des domaines fonctionnels des ERs dans la réponse à CXCR4, il faudrait utiliser des formes tronquées des récepteurs contenant une seule des deux fonctions d'activation (comme il a été effectué dans les expériences sur l'élément AP-1). Nous pourrions donc vérifier que les voies de signalisation de CXCR4 agissent sur l'AF-1. De plus, afin de s'assurer que la phosphorylation des ERs est bien impliquée dans ce phénomène il serait intéressant de faire des expériences de phosphorylation *in vitro*. L'importance de l'intégrité de l'AF-1 pourrait aussi être étudiée en utilisant des mutants des sites de phosphorylations consensus des MAPKs dans les essais luciférase. Ces mutations pourraient empêcher la phosphorylation ou la mimiquer en remplaçant les sérines par des alanines ou des acides aspartiques respectivement. Afin d'identifier les voies signalétiques activées par CXCR4 qui agissent sur les ERs autant au niveau de l'AF-1 ou de l'AF-2 il faudrait utiliser des inhibiteurs spécifiques de chacune des voies et des mutants des protéines impliquées dans ces voies pour observer l'effet sur l'activité transcriptionnelle suite à l'activation de CXCR4.

Nous avons mis au point la technique de co-culture afin de s'assurer une production constante de SDF-1 pendant toute la durée du traitement, étant donné la dégradation possible du SDF-1 lors de nos traitements. Cependant, il nous était difficile de contrôler la quantité de SDF-1 produit par les cellules transfectées et utilisées pour le traitement. Des expériences démontrent qu'une stimulation de 30 minutes avec 125 nM de SDF-1 provoque une diminution de plus de 50% l'expression de CXCR4 à la surface cellulaire (166). Cette diminution de l'expression est due à une endocytose. Malgré que suite à cette endocytose il puisse avoir y recyclage du récepteur et réexpression à la surface cellulaire, ce qui n'aurait pas influencé nos résultats si tel avait été le cas, l'équipe n'a pas pu mesurer le taux de recyclage du récepteur lors d'une présence continue du ligand. Par contre, les résultats que nous avons obtenus en co-culture (**Figure 8A et B**) démontrent bien que l'activité des récepteurs des estrogènes est augmentée en présence de SDF-1 et ce, pour ER α et ER β . Nous pouvons donc déduire qu'il y a bel et bien expression du SDF-1 par les cellules servant au traitement et que la concentration est suffisante pour activer CXCR4 et nous permettre d'observer un effet sur les ERs. Par ailleurs, l'envergure des réponses obtenues en présence de SDF-1 avec la co-culture est la même que celle obtenue sans co-culture (**Figure 7**). Finalement, cette technique nous a fourni une autre évidence que l'activation du CXCR4 avait pour effet d'activer les ERs en absence d'estrogène et ER β en présence d'estrogène mais aussi que la réponse observée dans les MCF-7 résulte de l'activation conjointe des deux récepteurs.

Lors de l'utilisation des MCF-7 et des HEK 293-T nous avons obtenu des résultats similaires malgré la grande divergence entre ces types cellulaires. Ces résultats permettent de supposer que le type cellulaire influence peu la réponse des ERs au SDF-1 ainsi que la coopération entre les deux fonctions d'activation. Par contre, il serait intéressant de vérifier l'effet de l'activation de CXCR4 sur les ERs dans plusieurs autres types cellulaires et surtout des cellules de cancer d'ovaires qui constituent l'autre type cellulaire (à part des MCF-7) dans lequel la régulation du SDF-1 par les ERs a été déterminée (138). Il faudrait aussi vérifier la régulation d'un plus grand nombre de gènes cibles.

En plus des effets de l'activation de CXCR4 sur l'activité transcriptionnelle des ERs sur un promoteur ERE, nos résultats démontrent que cette activation a des effets sur la régulation

de la transcription de gènes AP-1 dépendants. En effet, l'ajout de SDF-1 en présence de tamoxifène augmente l'expression des gènes sous le contrôle d'un promoteur AP-1 avec ER β , alors qu'avec ER α , leur expression est diminuée (**Figure 13 et 14**).

Notre hypothèse est basée sur le fait que la signalisation de CXCR4 pourrait influencer l'activité transcriptionnelle des ERs par la phosphorylation. Malgré le fait que la majorité des sites de phosphorylation des ERs se trouvent sur l'AF-1 (**Tableau 1**) il pourrait aussi avoir certains sites sur l'AF-2 de ER β comme c'est le cas pour ER α . En effet, il existe des sites de phosphorylation des MAPKs dans l'AF-2 de ER α qui permettent aussi l'activation du récepteur. Il y a la thréonine 311 phosphorylée par la MAPK p38 (83) et la sérine 236 phosphorylée par la PKA (83;97). La PKA n'est pas activée par CXCR4 il est donc peu probable que cette sérine soit responsable de la régulation observée. Par ailleurs, des études précédentes ont estimé que l'activation d'un AP-1 par ER β était indépendante du domaine fonctionnel AF-1, puisque la délétion de l'AF-1 de ER α permettait d'obtenir les mêmes résultats qu'avec un ER β pleine longueur (195). Nous observons qu'effectivement, même en absence de l'AF-1, ER β tronqué peut activer la transcription en présence de OHT (**Figure 15B**). Par contre, l'effet additif du SDF-1 sur le OHT est perdu en présence de l'AF-2 seul, alors que sur l'AF-1, le SDF-1 conserve son pouvoir d'activer la transcription. Nos résultats indiquent donc, que c'est l'AF-1 qui est régulé par CXCR4 mais que la présence de l'AF-2 est tout de même essentielle à l'action du SDF-1 puisqu'elle permet de maximiser la réponse sur un récepteur de type sauvage. Il y a donc un effet additif sur l'activité transcriptionnelle de ER β lors du traitement des cellules avec le SDF-1 et le OHT. La nécessité de la stimulation de l'AF-2 de ER β est aussi évidente à la **Figure 11** où l'expression de la cycline D1 est augmentée en réponse au SDF-1 seulement en présence de OHT. Nous attribuons donc un rôle important à l'AF-1 dans l'activation de ER β sur des promoteurs AP-1 et ce en réponse à l'activation de CXCR4 et non en réponse au ligand.

Basé sur des résultats précédents, selon lesquels le recrutement du coactivateur SRC-1 serait favorisé suite à la phosphorylation des sérines 106 et 124 permettant l'activation de l'AF-1 (74), et sur le fait que les réponses avec ER β dépendent de la présence de l'AF-1, nous avons voulu vérifier le rôle de ces deux sites dans l'activation de ER β par la

signalisation de CXCR4. De plus, ces sérines sont ciblées par la voie des MAPKs p44/p42 (74) qui sont aussi activées par CXCR4 (171). Il s'avère qu'effectivement la substitution de ces sérines par des alanines inhibe l'activation par le SDF-1 par rapport à la réponse au OHT (**Figure 15C**). De plus, il semble que les sérines 106 et 124 jouent un rôle primordial dans cette activation puisque c'est la seule double mutation qui a un effet plus marqué que les simples mutations. Nous pouvons donc supposer que le recrutement de SRC-1 et CBP par ces sérines est essentiel à la réponse de ER β au SDF-1 sur un élément AP-1. Par ailleurs, la mutation d'autres sérines, faisant aussi partie des sites consensus des MAPKs, entraîne la perte de l'activation en présence de SDF-1, ce qui démontre l'importance de l'intégrité de l'AF-1 dans l'activité transcriptionnelle de ER β et suggère un rôle pour la phosphorylation dans cette activation.

Par contre, nous ne pouvons pas affirmer avec certitude que c'est par leur phosphorylation que ces sérines régulent l'activité des ERs. Afin de s'en assurer, il serait intéressant d'effectuer le même type d'expérience qui a été suggéré précédemment pour vérifier l'effet de la phosphorylation dans la régulation des ERs sur les éléments ERE. Brièvement, il faudrait mimiquer la phosphorylation de ER β en substituant les sérines cibles par des acides aspartiques par exemple, mais aussi mesurer la phosphorylation du récepteur suite à la stimulation de CXCR4. En plus, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la signalisation de CXCR4 agisse sur d'autres cibles régulatrices. En effet, il a été démontré que la phosphorylation de SRC-1, SRC-3 et CBP pouvait augmenter leur potentiel de coactivateurs en augmentant les interactions avec d'autres coactivateurs résultant de l'activation de la transcription médiées par les ERs (99;218;219). Il a aussi été rapporté que la phosphorylation de la sérine 118 de ER α ne serait pas requise pour l'activation de la transcription induite par le EGF, comme il a été plusieurs fois démontré, mais que ce serait plutôt la phosphorylation de SRC-3 qui serait nécessaire (219). De plus, sept sites de phosphorylation sur SRC-1 et six sur SRC-3 ont été identifiés et ces sites sont ciblés par un large éventail de signaux environnementaux incluant le EGF, les hormones stéroïdes et l'augmentation de l'AMPc intracellulaire. Par ailleurs, SRC-1 interagit avec plusieurs facteurs de transcription (révisé dans (221)), ce qui en fait un important intégrateur de plusieurs signaux permettant l'activation spécifique de différents promoteurs selon le contexte cellulaire. Ces faits permettent donc de supposer que SRC-1 pourrait

aussi être la cible de la signalisation de CXCR4. Ceci pourrait donc s'appliquer dans le cas présent, autant pour l'activation de la transcription sur un promoteur ERE avec ER β et ER α que sur un promoteur AP-1 avec ER β .

Le mécanisme de régulation de ER α sur un AP-1 par CXCR4 semble être différent de celui de ER β puisqu'il inhibe la transcription en présence de SDF-1 (**Figures 13 et 14**). Par contre, ER α est aussi une cible de phosphorylation et ces phosphorylations permettent presque toutes l'activation de ER α (**Tableau 1**). De plus, les modèles proposés de régulation de la voie alternative par ER α en présence de tamoxifène sont basés sur le fait que ER α active la transcription. Un ER α pleine longueur en présence de tamoxifène interagirait avec les coactivateurs p160/SRC et CBP/p300 associés à Jun/Fos sur un promoteur AP-1 afin de stabiliser le complexe et d'activer la transcription. Aussi, un ER α dont l'AF-1 est délété ou inactif lierait un complexe de corépresseurs et de HDAC en présence de SERMs, ce qui séquestrerait les corépresseurs loin de l'AP-1 et permettrait donc à Jun/Fos d'activer la transcription (114). Par contre, selon nos résultats, nous pourrions envisager la possibilité que ER α interagisse avec des corépresseurs pour inhiber la transcription mais pas pour les séquestrer. Il se pourrait que la phosphorylation de ER α permette l'interaction avec des corépresseurs qui serviraient, tout comme les coactivateurs, d'intermédiaires d'interaction indirecte avec Jun/Fos. Ceci est possible puisque le recrutement des corépresseurs peut être régulé suite à la phosphorylation de récepteurs nucléaires comme cela a été observé pour PPAR γ et TR (76;222). Il est aussi possible que ER α interagisse directement avec Jun/Fos et il servirait à amener les corépresseurs au promoteur, ce qui contribuerait à l'inhibition de la transcription. En effet, ER α peut interagir directement avec le domaine de liaison à l'ADN de Jun (223). Par ailleurs, la phosphorylation des corépresseurs est aussi impliquée dans la régulation du recrutement de corépresseurs par les récepteurs nucléaires. La phosphorylation de SMRT par la cascade de signalisation de MEK-1 inhibe ses fonctions et modifie sa distribution cellulaire et son recrutement par les récepteurs (224), alors que le recrutement de SMRT est favorisé par la phosphorylation de PPAR γ (76). En fait, afin de mieux comprendre cette inhibition il serait essentiel, tout comme précédemment, de déterminer le rôle de chacun des domaines fonctionnels de ER α et de vérifier l'implication de la phosphorylation de ces domaines et des corégulateurs dans la modulation de l'activité transcriptionnelle. Il se peut aussi que ce

soit des voies de signalisation activées par CXCR4 différentes qui agissent sur ER α et ER β il serait donc de mise d'identifier les voies responsables de ces régulations.

L'effet opposé de l'activation de CXCR4 sur l'activité transcriptionnelle des ERs peut être étonnant étant donné leurs grandes similitudes au niveau fonctionnel et structural. Par contre, la modulation des promoteurs AP-1 par les anti-estrogènes a été à priori observée dans des conditions pathologiques plutôt que dans des conditions normales. En effet, lors de l'utilisation de tamoxifène dans le traitement de cancers du sein l'augmentation de la prolifération et de l'expression de gènes cibles des ERs ont été observés dans les tissus utérins (111). Par ailleurs, dans la majorité des cancers, les deux isoformes de récepteurs des estrogènes sont exprimés mais les proportions de chacun varient selon plusieurs critères tels que le type cellulaire ou le stade de malignité de la tumeur (125). Ainsi, l'effet global sur l'expression des gènes cibles pourrait dépendre des quantités relatives de chacun. Néanmoins, il a récemment été découvert que ER β peut moduler l'activation de la transcription effectuée par ER α en altérant le recrutement de c-Fos et c-Jun aux promoteurs AP-1 et en augmentant la dégradation de ER α (225). Nous pouvons supposer que ce phénomène puisse se produire dans la boucle CXCR4/ERs et ainsi, une augmentation de l'expression des gènes cibles serait observée. Par ailleurs, la modulation des promoteurs AP-1 par les ERs est observée en présence de tamoxifène dont l'utilisation vise à bloquer l'expression des gènes ayant des promoteurs ERE. Il est donc possible de moduler indépendamment l'action des ERs sur ces deux types de promoteurs.

L'étude de l'expression des ARNm des gènes cibles de ERs nous a permis de comprendre en partie l'implication de CXCR4 au niveau de la prolifération cellulaire. En effet, on observe aux **Figures 11** que le traitement des cellules augmente l'expression des ARNm codant pour la cycline D1, C-Myc. Ces protéines sont normalement impliquées dans la prolifération cellulaire et leur expression est un indicatif de l'état prolifératif de la cellule. Dans une cellule normale quiescente, l'expression de C-Myc est faible mais lors d'une stimulation par un facteur de croissance l'expression augmente drastiquement et reste à un niveau très élevé tout le long du cycle cellulaire. Par la suite, l'expression chute à un niveau basal dans les cellules filles résultantes de la division mitotique et cette augmentation de l'expression provoque le début du cycle cellulaire (226). La cycline D1 est un intégrateur des signaux extracellulaires qui contrôlent l'entrée de la cellule dans la

phase G1 (227). Puisque ces gènes sont des cibles des ERs et que nous venons d'établir que l'activation de CXCR4 augmente l'activité transcriptionnelle des ERs nous pouvons affirmer que l'action proliférative de CXCR4 passe en partie par les récepteurs des estrogènes. Par ailleurs, comme ces protéines contrôlent le cycle cellulaire, elles sont considérées comme des interrupteurs oncogéniques. Leur expression anormalement élevée augmente la prolifération et l'instabilité génomique en accélérant le passage entre les différentes phases du cycle cellulaire, en abolissant les points de contrôle et en augmentant le métabolisme. Dans la majorité des situations, ces altérations mènent à l'apoptose, mais dans une cellule où il y a d'autres signaux anti-apoptotiques, ces protéines contribuent à la transformation cellulaire (228;229). Ainsi, l'augmentation de l'expression ou de l'activation de CXCR4 dans des situations pathologiques de développement tumoral augmente inévitablement l'expression de ces interrupteurs et contribue à l'augmentation de la malignité des tumeurs.

Un autre rôle bien connu de la cycline D1 est de réguler positivement la transcription médiée par ER α en augmentant la liaison du récepteur à son élément de réponse et son association avec P/CAF (230). Cette boucle de régulation en association avec celle de CXCR4 et des récepteurs des estrogènes devient donc un moyen efficace d'amplifier une réponse au SDF-1. La cycline D1 régule aussi l'adhésion cellulaire, la mobilité et la migration de macrophages de la moëlle osseuse. Cette capacité de modifier la migration vers des cytokines chimioattractantes pourrait aussi interférer avec le pouvoir d'invasion et le phénotype métastatique de ces cellules (231). Si la même régulation se produit dans les cellules exprimant le CXCR4, la cycline D1 pourrait être un intermédiaire dans la modulation du chimiotactisme engendré par l'activation de CXCR4.

4.1 PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

Afin de développer plus en profondeur le modèle global de la boucle de régulation entre CXCR4 et les récepteurs des estrogènes, autant au niveau de la voie classique d'action des estrogènes (sur les ERE) qu'au niveau des éléments AP1, il serait intéressant de déterminer la composition des complexes protéiques liés aux promoteurs ainsi que l'état d'occupation des promoteurs selon l'état d'activation de CXCR4. Ceci pourrait être fait par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) en utilisant les promoteurs de

plusieurs gènes cibles et des anticorps contre les cofacteurs normalement associés au récepteurs nucléaires (232). Par cette méthode, il serait aussi intéressant d'évaluer l'occupation des promoteurs des gènes cibles par ER α ou ER β en utilisant des anticorps contre ces isoformes afin de vérifier si ce nouveau mécanisme d'activation des ERs permet une sélection de certains promoteurs et donc l'expression différentielle de gènes cibles. Il serait donc possible de déterminer si la faible activité transcriptionnelle de ER α sur un promoteur AP-1 suite au traitement avec le SDF-1 est due à une diminution de l'occupation du promoteur ou à l'interaction avec des corépresseurs comme nous l'avons supposé. Une diminution de l'occupation d'un élément ERE a été démontrée pour ER β activé par p38 et serait la cause de la diminution de l'activité transcriptionnelle observée (90). Cette technique pourrait donc permettre de comprendre les similitudes et les différences entre les mécanismes régulant l'activité de ER α et ER β sur les différents éléments de réponse. Par ailleurs, il a été mentionné précédemment que les variations d'activité transcriptionnelle des ERs en réponse au SDF-1 pouvaient être dues à la phosphorylation des cofacteurs. L'évaluation de l'état de phosphorylation de ces protéines serait donc un élément clé dans la compréhension des mécanismes étudiés.

Le récepteur CXCR4 est impliqué, tout comme les ERs (6), dans la prolifération cellulaire mais en plus dans la migration (132), il serait intéressant d'évaluer l'effet de l'activation de cette boucle de régulation au niveau de ces réponses cellulaires. Il pourrait être aussi intéressant d'étendre notre champs de recherche à d'autres récepteurs nucléaires puisque les ERs ne sont pas les seuls à pouvoir être régulés par la phosphorylation des MAPKs, et ce autant positivement que négativement. En effet, la phosphorylation de sites consensus des MAPKs à l'intérieur de l'AF-1 de PR augmente l'activation dépendante de la progestine (233), alors que la phosphorylation de l'AF-1 de AR (234) et RXR (235) régule négativement les fonctions des récepteurs dépendantes du ligand dépendamment du contexte du gène promoteur. Les récepteurs nucléaires sont aussi impliqués dans la prolifération cellulaire, ce qui pourrait ajouter à l'explication de l'implication de CXCR4 dans la prolifération cellulaire. En effet, RXR en hétérodimère avec RAR γ médie les effets de l'acide rétinoïque (236) (237) alors que AR peut autant stimuler la croissance que l'apoptose, dépendamment des types cellulaires, (238). PR est pour sa part impliqué entre autre dans la croissance cellulaire du cancer du sein (233).

Il est depuis longtemps déterminé que l'utilisation d'un adjuvant, lors d'une thérapie anti-cancer, augmente la survie des patients atteints d'un cancer du sein (239). Par ailleurs, CXCR4 n'est pas ou presque pas exprimé dans les cellules mammaires normales et l'acquisition de ce phénotype représente une étape précoce dans la carcinogenèse, ce qui en fait une cible intéressante même en début de traitement (240). L'existence de cette boucle de régulation pourrait donc faciliter le traitement de cancers ER négatifs résistants aux traitements anti-estrogéniques comme le tamoxifène, puisque cette molécule inhiberait la production de SDF-1 dans les organes cibles des métastases qui eux ne sont pas résistants au tamoxifène. Un traitement contre CXCR4 pourrait aussi s'avérer utile lors d'un traitement au tamoxifène contre le cancer du sein afin de réduire les effets agonistes de ce SERMs sur les tissus utérins. En effet, la prolifération des tissus utérins est due à l'activation des ER par le tamoxifène, sur les promoteurs AP-1, (111) et nous venons de démontrer que le SDF-1 active aussi cette voie.

L'identification du SDF-1, comme étant un médiateur de l'effet mitogénique des estrogènes sur les cellules de cancer du sein et d'ovaire et un gène régulé par ER α , (138) a permis d'entrevoir une nouvelle possibilité thérapeutique utilisant le récepteur CXCR4 comme cible. Par ailleurs, la démonstration par nos travaux qu'il existe une plus grande relation entre le CXCR4 et les récepteurs des estrogènes, soit une boucle de régulation positive, amplifie l'importance de développer un traitement ciblant ces deux joueurs importants dans la prolifération et la migration tumorale. En plus d'être en grande partie responsable de la migration des cellules tumorales, et donc de la formation de métastases (186), l'axe SDF-1/ CXCR4 semble être au centre de la survie et de la croissance des tumeurs et des métastases. Ceci avait été trouvé dans différentes études (210;241;242) mais nous venons de trouver une autre raison de l'implication de CXCR4 dans la prolifération cellulaire. En effet, le SDF-1 et CXCR4 seraient impliqués dans la prolifération cellulaire puisqu'ils permettent l'activation des récepteurs des estrogènes qui eux, sont connus pour être impliqués dans la prolifération cellulaire et tumorale en augmentant l'expression de gènes régulant dans la croissance cellulaire, comme ceux de la cycline D1 et de c-Myc (125). En plus, les récepteurs des estrogènes permettent une activation relativement continue du CXCR4 en induisant la transcription de son ligand, ce qui assure aussi une activation aux récepteurs des estrogènes.

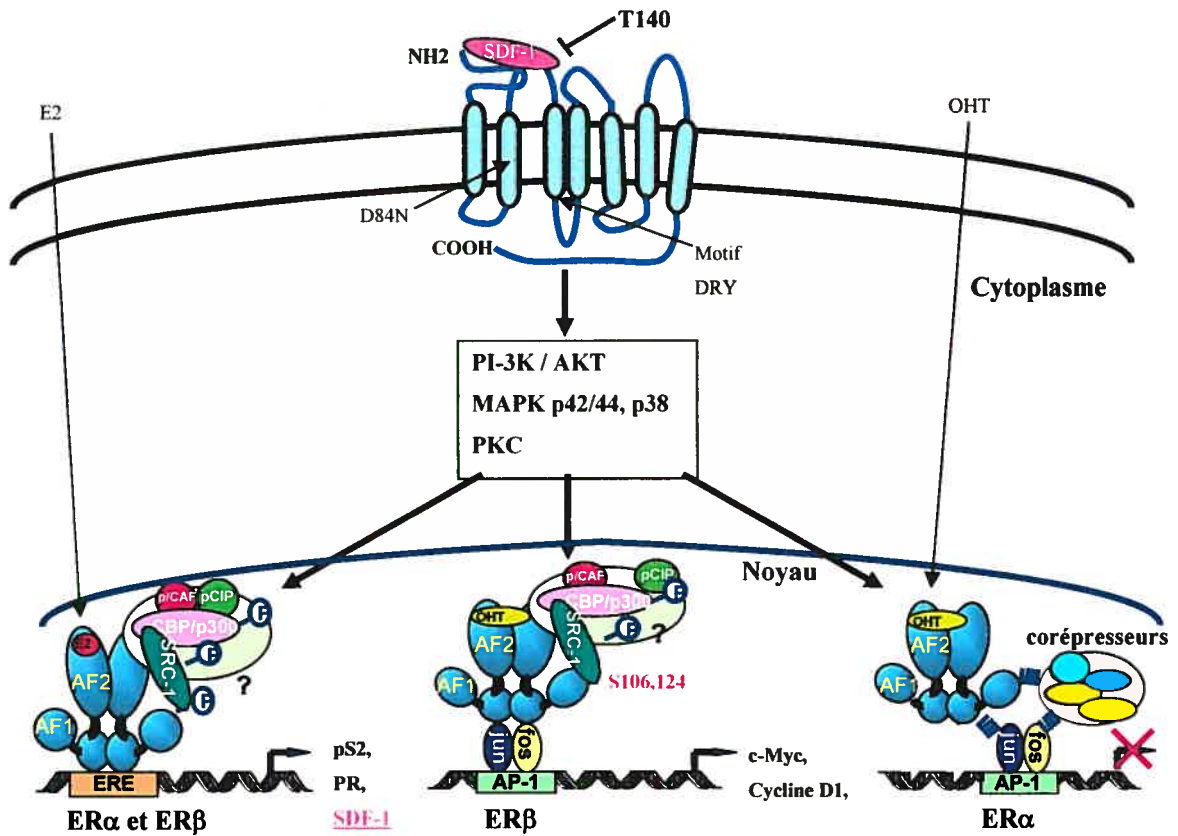


Figure 16. Modèle proposé pour la modulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes par CXCR4. La liaison du SDF-1 sur CXCR4 entraîne l'activation de cascades signalétiques en aval qui influencent l'activité transcriptionnelle des ERs en présence ou en absence de E₂ sur un promoteur contenant un ERE (schéma de gauche). Ces voies de signalisation pourraient moduler l'activité transcriptionnelle des ERs en agissant directement sur les récepteurs en phosphorylant leur région AF-1 ou indirectement en phosphorylant les coactivateurs (SRC-1 ou CBP/p300). L'activation de CXCR4 permet aussi l'augmentation de la transcription de gènes contrôlés par un promoteur AP-1 en présence de ERβ (schéma du centre) ou l'inhibition de la transcription avec ERα (schéma de droite). Dans le cas de ERβ l'intégrité de l'AF-1 est essentielle à la réponse au SDF-1 et plus particulièrement les sérines 106 et 124. Les coactivateurs peuvent aussi être modifiés par la signalisation de CXCR4 et ainsi augmenter la transcription des gènes cibles sur un promoteur AP-1. Dans le cas de ERα, l'activation de CXCR4 permettrait au récepteur de recruter les corépresseurs, ou bien ce seraient ceux-ci qui seraient modifiés par la signalisation de CXCR4 et serviraient d'intermédiaires d'interaction entre Jun/Fos et ERα.

Finalement, nous avons identifié une nouvelle voie de régulation de l'activité transcriptionnelle des ERs, soit l'activation de la transcription par l'activation de CXCR4. Cette voie d'activation crée une boucle de régulation positive entre ces deux récepteurs, puisque les ERs activés augmentent l'expression du SDF-1 qui va activer CXCR4. Cette boucle de régulation a un effet sur la voie classique d'activation de la transcription des ERs, soit sur les éléments ERE, et agit de façon similaire sur les deux isoformes α et β des récepteurs. En effet, l'activation de CXCR4 par le SDF-1 augmente l'activité transcriptionnelle des ERs et nous supposons que c'est par l'intermédiaire de la phosphorylation de l'AF-1 ou de coactivateurs que la stimulation se fait. L'activation du CXCR4 influence aussi l'activité transcriptionnelle des ERs sur des promoteurs contenant un élément de réponse AP-1. Par contre, l'activité transcriptionnelle de ER β est augmentée par la stimulation de CXCR4 alors qu'elle est diminuée pour ER α sur ce type de promoteur. Dans le cas de ER β , nous avons déterminé l'importance de la présence et de l'intégrité de l'AF-1 dans la réponse au SDF-1 et nous supposons que l'activation de la transcription est en partie due au recrutement de coactivateurs par les sérines 106 et 124. Peu importe de type de promoteur utilisé par les ERs, ceux-ci répondent à la stimulation de CXCR4 indépendamment de la présence du ligand. Néanmoins, l'ajout d'un ligand permet de maximiser la réponse puisque l'AF-1 et l'AF-2 coopèrent de façon additive. Pour ce qui est de ER α , nous n'avons pas élucidé la cause de l'inhibition de la transcription en réponse au SDF-1 mais nous supposons que c'est par l'interaction avec des corépresseurs et cette interaction serait aussi modulée par la phosphorylation des protéines impliquées dans cette régulation. Plusieurs voies de signalisation activées par CXCR4 peuvent être à l'origine de cette régulation des ERs, soit la voie des MAPKs p44/42 ou p38, la voie de PI-3K/ AKT ou la voie de PKC. En effet, toutes ces voies sont aussi connues pour activer les récepteurs des estrogènes par la phosphorylation. Cette étude démontre la possibilité de moduler l'activité des ERs par la stimulation de CXCR4 et que malgré les similitudes structurales des isoformes, ceux-ci peuvent agir différemment selon le contexte du promoteur.

5 **ANNEXES**

ANNEXE 1 : Récapitulation des expériences effectuées et des résultats obtenus.

Type de promoteur	Observations	Numéro de figure	Résultats	Type cellulaire et d'expérience
ERE	L'activité transcriptionnelle des ERs est augmentée suite à l'activation de CXCR4.	4 A et B	Augmentation de l'activité transcriptionnelle des ERs avec du SDF-1 et le mutant NRY. Diminution de l'activité transcriptionnelle avec le T140.	- MVLN - Essai luciférase
		5	Augmentation de la quantité d'ARNm de gènes cibles des ERs (pS2 et PR) en présence de SDF-1.	- MCF-7 - RT-PCR
	ER α et ER β réagissent de la même façon à l'action de CXCR4.	7 A 8 A et B	L'activité transcriptionnelle de ER α et de ER β est augmentée par le SDF-1 mais diminuée par le T140.	- HEK 293-T - Essai luciférase et co-culture
		7 B	Le mutant NRY augmente l'activité des ERs alors que le mutant D84N la diminue	- HEK 293-T - Essai luciférase et co-culture
	La modulation de la transcription par le SDF-1 est aussi ligand dépendante pour ER α et ER β .	8 A et B 10 A et B	La présence d'E ₂ avec le SDF-1 augmente la réponse transcriptionnelle de ER α et ER β par rapport à la réponse au SDF-1 seul.	- HEK 293-T - Essai luciférase et co-culture
		9 A et B	L'effet ligand dépendant de l'activation de CXCR4 sur les ERs est aussi présent dans des cellules de cancer du sein	- MVLN - Essai luciférase

AP-1	L'activation de CXCR4 permet aussi la régulation de l'activité transcriptionnelle des ERs sur un promoteur AP-1	11	Augmentation de la quantité d'ARNm des gènes cibles des ERs (Cycline D1 et C-Myc) régulés par un promoteur AP-1	-MCF-7 -RT-PCR
		13	L'activité transcriptionnelle de ER β est augmentée et celle de ER α est diminuée en présence SDF-1 et de OHT sur une construction d'un promoteur AP-1 (collagénase)	- HEK 293-T - Essai luciférase
		14	ER α et ER β régulent différemment l'expression de gènes cibles sous le contrôle d'un promoteur AP-1	- Hs578-T - RT-PCR
	L'intégrité de l'AF-1 de ER β est essentielle à la réponse pour la réponse au SDF-1.	15 B	En absence de l'AF-1 l'ajout de SDF-1 au OHT n'a pas d'effet sur l'activité transcriptionnelle de ER β .	- HEK 293-T - Essai luciférase
		15 C	La mutation de sérines cibles de la phosphorylation par les MAPK dans l'AF-1 de ER β affecte son activité transcriptionnelle.	- HEK 293-T - Essai luciférase

6 **BIBLIOGRAPHIE**

1. Couse, J. F. and K. S. Korach. "Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?" Endocrine Reviews 20.3 (1999): 358-417.
2. Gruber, C. J. et al. "Production and actions of estrogens." N.Engl.J.Med. 346.5 (2002): 340-52.
3. Hillier, S. G. "Intrafollicular paracrine function of ovarian androgen." J.Steroid Biochem. 27.1-3 (1987): 351-57.
4. Carreau, S. et al. "Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review." Reprod.Biol.Endocrinol. 1.1 (2003): 35.
5. Messinis, I. E. et al. "Evidence of differential control of FSH and LH responses to GnRH by ovarian steroids in the luteal phase of the cycle." Hum.Reprod. 17.2 (2002): 299-303.
6. Porter, J. C. "Proceedings: Hormonal regulation of breast development and activity." J.Invest Dermatol. 63.1 (1974): 85-92.
7. Samuel, C. S. et al. "The effect of relaxin on collagen metabolism in the nonpregnant rat pubic symphysis: the influence of estrogen and progesterone in regulating relaxin activity." Endocrinology 137.9 (1996): 3884-90.
8. Pentikainen, V. et al. "Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro." J.Clin.Endocrinol.Metab 85.5 (2000): 2057-67.
9. Shetty, G. et al. "Effect of estrogen deprivation on the reproductive physiology of male and female primates." J.Steroid Biochem.Mol.Biol. 61.3-6 (1997): 157-66.
10. Adeoya-Osiguwa, S. A. et al. "17beta-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function." Hum.Reprod. 18.1 (2003): 100-07.
11. Naftolin, F. "Brain aromatization of androgens." J.Reprod.Med. 39.4 (1994): 257-61.
12. Toran-Allerand, C. D., M. Singh, and G. Setalo, Jr. "Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story." Front Neuroendocrinol. 20.2 (1999): 97-121.
13. Carrer, H. F. et al. "Neurotrophic factors and estradiol interact to control axogenic growth in hypothalamic neurons." Ann.N.Y.Acad.Sci. 1007 (2003): 306-16.
14. Brinton, R. D. "Impact of estrogen therapy on Alzheimer's disease: a fork in the road?" CNS.Drugs 18.7 (2004): 405-22.
15. Bonnefont, A. B., F. J. Munoz, and N. C. Inestrosa. "Estrogen protects neuronal cells from the cytotoxicity induced by acetylcholinesterase-amyloid complexes." FEBS Lett. 441.2 (1998): 220-24.
16. Marin, R. et al. "An oestrogen membrane receptor participates in estradiol actions for the prevention of amyloid-beta peptide1-40-induced toxicity in septal-derived cholinergic SN56 cells." J.Neurochem. 85.5 (2003): 1180-89.

17. Hosli, E., W. Ruhl, and L. Hosli. "Histochemical and electrophysiological evidence for estrogen receptors on cultured astrocytes: colocalization with cholinergic receptors." Int.J.Dev.Neurosci. 18.1 (2000): 101-11.
18. Mong, J. A., E. Glaser, and M. M. McCarthy. "Gonadal steroids promote glial differentiation and alter neuronal morphology in the developing hypothalamus in a regionally specific manner." J.Neurosci. 19.4 (1999): 1464-72.
19. Mulnard, R. A. et al. "Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. Alzheimer's Disease Cooperative Study." JAMA 283.8 (2000): 1007-15.
20. Venkov, C. D., A. B. Rankin, and D. E. Vaughan. "Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function." Circulation 94.4 (1996): 727-33.
21. Wyckoff, M. H. et al. "Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i)." J.Biol.Chem. 276.29 (2001): 27071-76.
22. Mueck, A. O. and H. Seeger. "Estrogens acting as cardiovascular agents: direct vascular actions." Curr.Med.Chem.Cardiovasc.Hematol.Agents 2.1 (2004): 35-42.
23. White, R. E., D. J. Darkow, and J. L. Lang. "Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism." Circ.Res. 77.5 (1995): 936-42.
24. Clarkson, T. B., M. S. Anthony, and K. P. Klein. "Hormone replacement therapy and coronary artery atherosclerosis: the monkey model." Br.J.Obstet.Gynaecol. 103 Suppl 13 (1996): 53-57.
25. Walsh, B. W. "The effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators on cardiovascular risk factors." Ann.N.Y.Acad.Sci. 949 (2001): 163-67.
26. Oursler, M. J. et al. "Avian osteoclasts as estrogen target cells." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 88.15 (1991): 6613-17.
27. Eriksen, E. F. et al. "Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells." Science 241.4861 (1988): 84-86.
28. Jilka, R. L. "Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update." Bone 23.2 (1998): 75-81.
29. Mangelsdorf, D. J. et al. "The nuclear receptor superfamily: the second decade." Cell 83 (1995): 835-39.
30. Laudet, V. "Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor." Journal of Molecular Endocrinology 19 (1997): 207-26.
31. Green, S. et al. "Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erbA." Nature (London) 320 (1986): 134-39.

32. Greene, G. L. et al. "Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA." Science 231 (1986): 1150-54.
33. Mosselman, S., J. Polman, and R. Dijkema. "ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor." Federation of European Biological Societies Letters 392 (1996): 49-53.
34. Enmark, E. et al. "Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 82 (1997): 4258-65.
35. Weinberger, C. et al. "Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the *v-erb-A* oncogene product." Nature (London) 318 (1985): 670-72.
36. Lees, J. A., S. E. Fawell, and M. G. Parker. "Identification of two transactivation domains in the mouse oestrogen receptor." Nucleic Acids Research 17 (1989): 5477-88.
37. Cowley, S. M. and M. G. Parker. "A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta." J.Steroid Biochem.Mol.Biol. 69.1-6 (1999): 165-75.
38. Joel, P. B., A. M. Traish, and D. A. Lannigan. "Estradiol-induced phosphorylation of serine 118 in the estrogen receptor is independent of p42/p44 mitogen-activated protein kinase." Journal of Biological Chemistry 273 (1998): 13317-23.
39. Rogatsky, I., J. M. Trowbridge, and M. J. Garabedian. "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 (1999): 22296-302.
40. Tremblay, G. B. et al. "Dominant Activity of Activation Function 1 (AF-1) and Differential Stoichiometric Requirements for AF-1 and -2 in the Estrogen Receptor α - β Heterodimeric Complex." Molecular and Cellular Biology 19.3 (1999): 1919-27.
41. Warnmark, A. et al. "Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation." Mol.Endocrinol. 17.10 (2003): 1901-09.
42. Green, S. and P. Chambon. "Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimaeric receptor." Nature (London) 325 (1987): 75-78.
43. Driscoll, M. D. et al. "Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements." J.Biol.Chem. 273.45 (1998): 29321-30.
44. Ogawa, S. et al. "The complete primary structure of human estrogen receptor β (Her- β) and its heterodimerization with ER α in vivo and in vitro." Biochemical & Biophysical Research Communications 243.1 (1998): 122-26.
45. Picard, D. et al. "Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors." Cell Regul. 1.3 (1990): 291-99.
46. Jackson, T. A. et al. "The Partial Agonist Activity Of Antagonist-Occupied Steroid Receptors Is Controlled By a Novel Hinge Domain-Binding Coactivator L7/Spa

- and the Corepressors N-Cor or Smrt." Molecular Endocrinology 11.6 (1997): 693-705.
47. Hall, J. M., J. F. Couse, and K. S. Korach. "The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling." J.Biol.Chem. 276.40 (2001): 36869-72.
 48. Tanenbaum, D. M. et al. "Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 95.11 (1998): 5998-6003.
 49. McDonnell, D. P. et al. "Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens." Mol.Endocrinol. 9.6 (1995): 659-69.
 50. Klinge, C. M. "Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors." Steroids 65.5 (2000): 227-51.
 51. McKenna, N. J., R. B. Lanz, and B. W. O'Malley. "Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology." Endocrine Reviews 20.3 (1999): 321-44.
 52. Danielian, P. S. et al. "Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors." European Molecular Biology Organization Journal 11 (1992): 1025-33.
 53. Brzozowski, A. M. et al. "Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor." Nature (London) 389 (1997): 753-58.
 54. Couse, J. F. and K. S. Korach. "Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? [published erratum appears in Endocr Rev 1999 Aug;20(4):459]." Endocr.Rev. 20.3 (1999): 358-417.
 55. Couse, J. F. et al. "Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER- α) and estrogen receptor- β (ER- β) messenger ribonucleic acid In the wild-type and ER- α -knockout mouse." Endocrinology 138.11 (1997): 4613-21.
 56. Gustafsson, J. A. "Estrogen receptor b." J.Endocrinol. 163.3 (1999): 379-83.
 57. Shughrue, P. J., M. V. Lane, and I. Merchenthaler. "Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system." J.Comp Neurol. 388.4 (1997): 507-25.
 58. Tsai, M. J. and B. W. O'Malley. "Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members." Annu.Rev.Biochem. 63 (1994): 451-86.
 59. Htun, H. et al. "Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor." Mol.Biol.Cell 10.2 (1999): 471-86.
 60. Denton, R. R., N. J. Koszewski, and A. C. Notides. "Estrogen receptor phosphorylation. Hormonal dependence and consequence on specific DNA binding." J.Biol.Chem. 267.11 (1992): 7263-68.

61. Weigel, N. L. "Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation." Biochemical Journal 319 (1996): 657-67.
62. Collingwood, T. N., F. D. Urnov, and A. P. Wolffe. "Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription." J.Mol.Endocrinol. 23.3 (1999): 255-75.
63. Robyr, D., A. P. Wolffe, and W. Wahli. "Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks." Mol.Endocrinol. 14.3 (2000): 329-47.
64. Urnov, F. D. and A. P. Wolffe. "Chromatin remodeling and transcriptional activation: the cast (in order of appearance)." Oncogene 20.24 (2001): 2991-3006.
65. McKenna, N. J. and B. W. O'Malley. "Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators." Cell 108.4 (2002): 465-74.
66. Kingston, R. E. and G. J. Narlikar. "ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity." Genes Dev. 13.18 (1999): 2339-52.
67. Imhof, A. et al. "Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases." Curr.Biol. 7.9 (1997): 689-92.
68. Greenblatt, J. "RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation." Curr.Opin.Cell Biol. 9.3 (1997): 310-19.
69. Verrijzer, C. P. et al. "Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II." Cell 81.7 (1995): 1115-25.
70. Sadovskiy, Y. et al. "Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding protein." Mol.Cell Biol. 15.3 (1995): 1554-63.
71. Jacq, X. et al. "Human TAF_{II}30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor." Cell 79 (1994): 107-17.
72. Endoh, H. et al. "Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha." Mol.Cell Biol. 19.8 (1999): 5363-72.
73. Dutertre, M. and C. L. Smith. "Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor-alpha: regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains." Mol.Endocrinol. 17.7 (2003): 1296-314.
74. Tremblay, A. et al. "Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor β through phosphorylation of activation function AF-1." Molecular Cell 3 (1999): 513-19.
75. Tremblay, A. and V. Giguere. "Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor beta." J.Steroid Biochem.Mol.Biol. 77.1 (2001): 19-27.

76. Lavinsky, R. M. et al. "Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95.6 (1998): 2920-25.
77. Zhang, X. et al. "A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor." Molecular Endocrinology 12 (1998): 513-24.
78. Nagy, L. et al. "Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3a, and histone deacetylase." Cell 89.3 (1997): 373-80.
79. Ali, S. et al. "Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region." European Molecular Biology Organization Journal 12 (1993): 1153-60.
80. Le Goff, P. et al. "Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity." Journal of Biological Chemistry 269.6 (1994): 4458-66.
81. Arnold, S. F. et al. "Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 in vivo and by src family tyrosine kinases in vitro." Mol.Endocrinol. 9.1 (1995): 24-33.
82. Chen, D. et al. "Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIID and participation of CDK7." Mol.Cell 6.1 (2000): 127-37.
83. Lee, H. and W. Bai. "Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation." Mol.Cell Biol. 22.16 (2002): 5835-45.
84. Smith, C. L. "Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways." Biol.Reprod. 58.3 (1998): 627-32.
85. El-Tanani, M. K. K. and C. D. Green. "Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor." Molecular Endocrinology 11 (1997): 928-37.
86. Ignar-Trowbridge, D. M. et al. "Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 89.10 (1992): 4658-62.
87. Curtis, S. W. et al. "Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93.22 (1996): 12626-30.
88. Kato, S. et al. "Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase." Science 270.5241 (1995): 1491-94.
89. Joel, P. B. et al. "pp90^{rsk1} regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167." Molecular & Cellular Biology 18.4 (1998): 1978-84.

90. St Laurent, V. et al. "Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway." J.Steroid Biochem.Mol.Biol. 94.1-3 (2005): 23-37.
91. Lopez, G. N. et al. "Growth factors signal to steroid receptors through mitogen-activated protein kinase regulation of p160 coactivator activity." J.Biol.Chem. 276.25 (2001): 22177-82.
92. Power, R. F. et al. "Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors." Science 254 (1991): 1636-39.
93. Fujimoto, N. and B. S. Katzenellenbogen. "Alteration in the agonist/antagonist balance of antiestrogens by activation of protein kinase A signaling pathways in breast cancer cells: antiestrogen selectivity and promoter dependence." Molecular Endocrinology 8 (1994): 296-304.
94. Schreihofner, D. A. et al. "Ligand-independent activation of pituitary ER: dependence on PKA-stimulated pathways." Endocrinology 142.8 (2001): 3361-68.
95. Lamb, J. et al. "Regulation of the functional interaction between cyclin D1 and the estrogen receptor." Mol.Cell Biol. 20.23 (2000): 8667-75.
96. Cho, H. and B. S. Katzenellenbogen. "Synergistic activation of estrogen receptor-mediated transcription by estradiol and protein kinase activators." Molecular Endocrinology 7.3 (1993): 441-52.
97. Chen, D. et al. "Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization." Molecular & Cellular Biology 19.2 (1999): 1002-15.
98. Coleman, K. M. et al. "Mechanistic differences in the activation of estrogen receptor-alpha (ER alpha)- and ER beta-dependent gene expression by cAMP signaling pathway(s)." J.Biol.Chem. 278.15 (2003): 12834-45.
99. Rowan, B. G. et al. "8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein." Mol.Cell Biol. 20.23 (2000): 8720-30.
100. Coleman, K. M. and C. L. Smith. "Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors." Front Biosci. 6 (2001): D1379-D1391.
101. Demay, F. et al. "Steroid-independent activation of ER by GnRH in gonadotrope pituitary cells." Endocrinology 142.8 (2001): 3340-47.
102. Joel, P. B., A. M. Traish, and D. A. Lannigan. "Estradiol and phorbol ester cause phosphorylation of serine 118 in the human estrogen receptor." Mol.Endocrinol. 9.8 (1995): 1041-52.
103. Zimmermann, S. and K. Moelling. "Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B)." Science 286.5445 (1999): 1741-44.

104. Campbell, R. A. et al. "Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance." J.Biol.Chem. 276.13 (2001): 9817-24.
105. Webb, P. et al. "Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins." Molecular Endocrinology 12 (1998): 1605-18.
106. Grainger, D. J. and J. C. Metcalfe. "Tamoxifen: teaching an old drug new tricks?" Nat.Med. 2.4 (1996): 381-85.
107. Kedar, R. P. et al. "Effects of tamoxifen on uterus and ovaries of postmenopausal women in a randomised breast cancer prevention trial." Lancet 343.8909 (1994): 1318-21.
108. Wang, M. M. et al. "Non-classical regulation of estrogen receptor-alpha by ICI182,780." J.Steroid Biochem.Mol.Biol. 92.1-2 (2004): 51-62.
109. Uht, R. M. et al. "A conserved lysine in the estrogen receptor DNA binding domain regulates ligand activation profiles at AP-1 sites, possibly by controlling interactions with a modulating repressor." Nucl.Recept. 2.1 (2004): 2.
110. Uht, R. M. et al. "Transcriptional activities of estrogen and glucocorticoid receptors are functionally integrated at the AP-1 response element." Endocrinology 138.7 (1997): 2900-08.
111. Webb, P. et al. "Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens." Mol.Endocrinol. 9.4 (1995): 443-56.
112. Liu, M. M. et al. "Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression." J.Biol.Chem. 277.27 (2002): 24353-60.
113. Paech, K. et al. "Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites." Science 277 (1997): 1508-10.
114. Kushner, P. J. et al. "Estrogen receptor pathways to AP-1." J.Steroid Biochem.Mol.Biol. 74.5 (2000): 311-17.
115. Reichardt, H. M. et al. "DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival." Cell 93 (1998): 531-41.
116. Jakacka, M. et al. "An estrogen receptor (ER)alpha deoxyribonucleic acid-binding domain knock-in mutation provides evidence for nonclassical ER pathway signaling in vivo." Mol.Endocrinol. 16.10 (2002): 2188-201.
117. Lubahn, D. B. et al. "Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after disruption of the mouse estrogen receptor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (1993): 11162-66.
118. Jordan, V. C., S. Gapstur, and M. Morrow. "Selective estrogen receptor modulation and reduction in risk of breast cancer, osteoporosis, and coronary heart disease." J.Natl.Cancer Inst. 93.19 (2001): 1449-57.

119. Osborne, C. K. et al. "Double-blind, randomized trial comparing the efficacy and tolerability of fulvestrant versus anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing on prior endocrine therapy: results of a North American trial." J.Clin.Oncol. 20.16 (2002): 3386-95.
120. Horwitz, K. B. "The central role of progesterone receptors and progestational agents in the management and treatment of breast cancer." Semin.Oncol. 15.2 Suppl 1 (1988): 14-19.
121. Hall, J. M. and D. P. McDonnell. "The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens." Endocrinology 140.12 (1999): 5566-78.
122. Mann, S. et al. "Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer." Hum.Pathol. 32.1 (2001): 113-18.
123. Jarvinen, T. A. et al. "Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer." Am.J.Pathol. 156.1 (2000): 29-35.
124. Makar, A. P. "Hormone therapy in epithelial ovarian cancer." Endocr.Relat Cancer 7.2 (2000): 85-93.
125. Pearce, S. T. and V. C. Jordan. "The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer." Crit Rev.Oncol.Hematol. 50.1 (2004): 3-22.
126. Krege, J. H. et al. "Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95.26 (1998): 15677-82.
127. Campbell-Thompson, M., I. J. Lynch, and B. Bhardwaj. "Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer." Cancer Res. 61.2 (2001): 632-40.
128. Hasegawa, H. and S. Fujita. "Chemokines and lymphocytes: the role of chemokines and their receptors in the immune system." Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand) 47.4 (2001): 599-607.
129. Murphy, P. M. et al. "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." Pharmacol.Rev. 52.1 (2000): 145-76.
130. Nishikawa, S. et al. "B lymphopoiesis on stromal cell clone: stromal cell clones acting on different stages of B cell differentiation." Eur.J.Immunol. 18.11 (1988): 1767-71.
131. Shirozu, M. et al. "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene." Genomics 28.3 (1995): 495-500.
132. Lataillade, J. J. et al. "Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival." Blood 95.3 (2000): 756-68.

133. Burger, J. A. et al. "Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1." Blood 96.8 (2000): 2655-63.
134. Crump, M. P. et al. "Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1." EMBO J. 16.23 (1997): 6996-7007.
135. Tham, T. N. et al. "Developmental pattern of expression of the alpha chemokine stromal cell-derived factor 1 in the rat central nervous system." Eur.J.Neurosci. 13.5 (2001): 845-56.
136. Smale, S. T. "Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes." Biochim.Biophys.Acta 1351.1-2 (1997): 73-88.
137. Buckley, C. D. et al. "Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium." J.Immunol. 165.6 (2000): 3423-29.
138. Hall, J. M. and K. S. Korach. "Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells." Mol.Endocrinol. 17.5 (2003): 792-803.
139. Garcia-Moruja, C. et al. "Functional characterization of SDF-1 proximal promoter." J.Mol.Biol. 348.1 (2005): 43-62.
140. Nagasawa, T. et al. "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myeloopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." Nature 382.6592 (1996): 635-38.
141. Ma, Q. et al. "Impaired B-lymphopoiesis, myeloopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in C." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 95.16 (1998): 9448-53.
142. Imitola, J. et al. "Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 101.52 (2004): 18117-22.
143. Stebler, J. et al. "Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12." Dev.Biol. 272.2 (2004): 351-61.
144. Bleul, C. C. et al. "A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)." J.Exp.Med. 184.3 (1996): 1101-09.
145. Levine, R. F. et al. "Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs." Eur.J.Haematol. 51.4 (1993): 233-46.
146. Hamada, T. et al. "Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation." J.Exp.Med. 188.3 (1998): 539-48.
147. Lane, W. J. et al. "Stromal-derived factor 1-induced megakaryocyte migration and platelet production is dependent on matrix metalloproteinases." Blood 96.13 (2000): 4152-59.

148. Bajetto, A. et al. "Stromal cell-derived factor-1alpha induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway." J.Neurochem. 77.5 (2001): 1226-36.
149. Neuhaus, T. et al. "Stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) induces gene-expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation." Cell Prolif. 36.2 (2003): 75-86.
150. Balabanian, K. et al. "The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes." J.Biol.Chem. 280.42 (2005): 35760-66.
151. Tian, Y. et al. "Differential chemokine activation of CC chemokine receptor 1-regulated pathways: ligand selective activation of Galpha 14-coupled pathways." Eur.J.Immunol. 34.3 (2004): 785-95.
152. Herzog, H. et al. "Molecular cloning, characterization, and localization of the human homolog to the reported bovine NPY Y3 receptor: lack of NPY binding and activation." DNA Cell Biol. 12.6 (1993): 465-71.
153. Loetscher, M. et al. "Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes." J.Biol.Chem. 269.1 (1994): 232-37.
154. Feng, Y. et al. "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science 272.5263 (1996): 872-77.
155. Bleul, C. C. et al. "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." Nature 382.6594 (1996): 829-33.
156. Oberlin, E. et al. "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1." Nature 382.6594 (1996): 833-35.
157. Tachibana, K. et al. "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." Nature 393.6685 (1998): 591-94.
158. Brelot, A. et al. "Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities." J.Biol.Chem. 275.31 (2000): 23736-44.
159. Roland, J. et al. "Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling." Blood 101.2 (2003): 399-406.
160. Franke, R. R. et al. "Structure and function in rhodopsin. Studies of the interaction between the rhodopsin cytoplasmic domain and transducin." J.Biol.Chem. 267.21 (1992): 14767-74.
161. Okamoto, T. et al. "A simple structure encodes G protein-activating function of the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor." Cell 62.4 (1990): 709-17.
162. Bleul, C. C. et al. "The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 94.5 (1997): 1925-30.

163. Stumm, R. K. et al. "A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia." J.Neurosci. 22.14 (2002): 5865-78.
164. Tanabe, S. et al. "Functional expression of the CXC-chemokine receptor-4/fusin on mouse microglial cells and astrocytes." J.Immunol. 159.2 (1997): 905-11.
165. Caruz, A. et al. "Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene." FEBS Lett. 426.2 (1998): 271-78.
166. Signoret, N. et al. "Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4." J.Cell Biol. 139.3 (1997): 651-64.
167. Staller, P. et al. "Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL." Nature 425.6955 (2003): 307-11.
168. Helbig, G. et al. "NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4." J.Biol.Chem. 278.24 (2003): 21631-38.
169. Vila-Coro, A. J. et al. "The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway." FASEB J. 13.13 (1999): 1699-710.
170. Fernandis, A. Z. et al. "Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells." Oncogene 23.1 (2004): 157-67.
171. Ganju, R. K. et al. "The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways." J.Biol.Chem. 273.36 (1998): 23169-75.
172. Bug, G. et al. "Rho family small GTPases control migration of hematopoietic progenitor cells into multicellular spheroids of bone marrow stroma cells." J.Leukoc.Biol. 72.4 (2002): 837-45.
173. Scotton, C. J. et al. "Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer." Cancer Res. 62.20 (2002): 5930-38.
174. Henschler, R. et al. "SDF-1alpha-induced intracellular calcium transient involves Rho GTPase signalling and is required for migration of hematopoietic progenitor cells." Biochem.Biophys.Res.Comm. 311.4 (2003): 1067-71.
175. Hesselgesser, J. et al. "Neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 and the chemokine SDF-1 alpha is mediated by the chemokine receptor CXCR4." Curr.Biol. 8.10 (1998): 595-98.
176. Vlahakis, S. R. et al. "G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways." J.Immunol. 169.10 (2002): 5546-54.
177. Wang, J. F., I. W. Park, and J. E. Groopman. "Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration

of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C." Blood 95.8 (2000): 2505-13.

178. Petit, I. et al. "Atypical PKC-zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells." J.Clin.Invest 115.1 (2005): 168-76.
179. Sun, Y. et al. "Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation." J.Biol.Chem. 277.51 (2002): 49212-19.
180. Zhang, Y. J. and J. P. Moore. "Will multiple coreceptors need to be targeted by inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry?" J.Virol. 73.4 (1999): 3443-48.
181. Berson, J. F. et al. "A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains." J.Virol. 70.9 (1996): 6288-95.
182. Amara, A. et al. "HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1 alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication." J.Exp.Med. 186.1 (1997): 139-46.
183. De Clercq, E. "Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100." Mini.Rev.Med.Chem. 5.9 (2005): 805-24.
184. Castagna, A. et al. "The appealing story of HIV entry inhibitors : from discovery of biological mechanisms to drug development." Drugs 65.7 (2005): 879-904.
185. Hatse, S. et al. "AMD3465, a monomacrocyclic CXCR4 antagonist and potent HIV entry inhibitor." Biochem.Pharmacol. 70.5 (2005): 752-61.
186. Moore, M. A. "The role of chemoattraction in cancer metastases." Bioessays 23.8 (2001): 674-76.
187. Muller, A. et al. "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature 410.6824 (2001): 50-56.
188. Balkwill, F. "The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4." Semin.Cancer Biol. 14.3 (2004): 171-79.
189. Liang, Z. et al. "Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4." Cancer Res. 64.12 (2004): 4302-08.
190. Zhou, Y. et al. "CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival." J.Biol.Chem. 277.51 (2002): 49481-87.
191. Itoh, Y. and H. Nagase. "Matrix metalloproteinases in cancer." Essays Biochem. 38 (2002): 21-36.
192. Bachmann, A. S. and I. Gamper. "Killing two birds with one drug: a new application for HIV-1 cell entry inhibitors in the treatment of metastatic cancer." Hawaii Med.J. 64.8 (2005): 220-23.

193. Rochefort, H. "[Estrogen-induced genes in breast cancer, and their medical importance]." Bull.Acad.Natl.Med. 183.5 (1999): 955-68.
194. Tremblay, G. B. et al. "Cloning, chromosomal localization and functional analysis of the murine estrogen receptor β ." Molecular Endocrinology 11 (1997): 353-65.
195. Webb, P. et al. "The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions." Mol.Endocrinol. 13.10 (1999): 1672-85.
196. Badia, E. et al. "Hydroxytamoxifen induces a rapid and irreversible inactivation of an estrogenic response in an MCF-7-derived cell line." Cancer Res. 54.22 (1994): 5860-66.
197. Giguère, V. et al. "Identification of a novel isoform of the retinoic acid receptor γ expressed in the mouse embryo." Molecular & Cellular Biology 10 (1990): 2335-40.
198. Tamamura, H. et al. "T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer." FEBS Lett. 550.1-3 (2003): 79-83.
199. Ballesteros, J. A. et al. "Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6." J.Biol.Chem. 276.31 (2001): 29171-77.
200. Driggers, P. H. and J. H. Segars. "Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling." Trends Endocrinol.Metab 13.10 (2002): 422-27.
201. De La Luz, Sierra M. et al. "Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity." Blood 103.7 (2004): 2452-59.
202. Tzukerman, M. T. et al. "Human estrogen receptor transcriptional capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions." Molecular Endocrinology 8 (1994): 21-30.
203. Rochefort, H. "Oestrogen- and anti-oestrogen-regulated genes in human breast cancer." Ciba Found.Symp. 191 (1995): 254-65.
204. Dubik, D. and R. P. Shiu. "Mechanism of estrogen activation of c-myc oncogene expression." Oncogene 7.8 (1992): 1587-94.
205. Engel, L. W. et al. "Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas." Cancer Res. 38.10 (1978): 3352-64.
206. Hackett, A. J. et al. "Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines." J.Natl.Cancer Inst. 58.6 (1977): 1795-806.
207. Sabbah, M. et al. "Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96.20 (1999): 11217-22.

208. Allinen, M. et al. "Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer." Cancer Cell 6.1 (2004): 17-32.
209. Darash-Yahana, M. et al. "Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis." FASEB J. 18.11 (2004): 1240-42.
210. Smith, M. C. et al. "CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer." Cancer Res. 64.23 (2004): 8604-12.
211. Tamamura, H. et al. "A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: a strong anti-HIV peptide T140." Biochem.Biophys.Res.Comm. 253.3 (1998): 877-82.
212. Wess, J. "Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity." Pharmacol.Ther. 80.3 (1998): 231-64.
213. Chen, A. et al. "Constitutive activation of A(3) adenosine receptors by site-directed mutagenesis." Biochem.Biophys.Res.Comm. 284.3 (2001): 596-601.
214. Palczewski, K. et al. "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." Science 289.5480 (2000): 739-45.
215. Burger, M. et al. "Point mutation causing constitutive signaling of CXCR2 leads to transforming activity similar to Kaposi's sarcoma herpesvirus-G protein-coupled receptor." J.Immunol. 163.4 (1999): 2017-22.
216. Rosenkilde, M. M., T. N. Kledal, and T. W. Schwartz. "High constitutive activity of a virus-encoded seven transmembrane receptor in the absence of the conserved DRY motif (Asp-Arg-Tyr) in transmembrane helix 3." Mol.Pharmacol. 68.1 (2005): 11-19.
217. Janknecht, R. and T. Hunter. "A growing coactivator network." Nature (London) 383 (1996): 22-23.
218. Goodman, R. H. and S. Smolik. "CBP/p300 in cell growth, transformation, and development." Genes Dev. 14.13 (2000): 1553-77.
219. Font de Mora, J and M. Brown. "AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor." Mol.Cell Biol 20.14 (2000): 5041-47.
220. Bunone, G. et al. "Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation." European Molecular Biology Organization Journal 15 (1996): 2174-83.
221. Wu, R. C., C. L. Smith, and B. W. O'Malley. "Transcriptional regulation by steroid receptor coactivator phosphorylation." Endocr.Rev. 26.3 (2005): 393-99.
222. Hong, S.-H., C.-H. Wong, and M. L. Privalsky. "Signaling by tyrosine kinases negatively regulates the interaction between transcription factors and SMRT (silencing mediator of retinoid acid and thyroid hormone receptor) corepressor." Molecular Endocrinology 12 (1998): 1161-71.

223. Teyssier, C. et al. "Characterization of the Physical Interaction between Estrogen Receptor alpha and JUN Proteins." J.Biol.Chem. 276.39 (2001): 36361-69.
224. Hong, S. H. and M. L. Privalsky. "The SMRT corepressor is regulated by a MEK-1 kinase pathway: inhibition of corepressor function is associated with SMRT phosphorylation and nuclear export." Mol.Cell Biol. 20.17 (2000): 6612-25.
225. Matthews, J. et al. "ER{beta} modulates ER{alpha}-mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen responsive promoters." Mol.Endocrinol. (2005).
226. Marcu, K. B., S. A. Bossone, and A. J. Patel. "myc function and regulation." Annual Review of Biochemistry 61 (1992): 809-60.
227. Fu, M. et al. "Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions." Endocrinology 145.12 (2004): 5439-47.
228. Facchini, L. M. and L. Z. Penn. "The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights." FASEB J. 12.9 (1998): 633-51.
229. Weinstein, I. B. "Relevance of cyclin D1 and other molecular markers to cancer chemoprevention." J.Cell Biochem.Supp 25 (1996): 23-28.
230. Zwijzen, R. M. L. et al. "Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1." Genes & Development 12.22 (1998): 3488-98.
231. Neumeister, P. et al. "Cyclin D1 governs adhesion and motility of macrophages." Mol.Biol.Cell 14.5 (2003): 2005-15.
232. Huang, Z. Q. et al. "A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and Mediator for transcription." EMBO J. 22.9 (2003): 2146-55.
233. Shen, T., K. B. Horwitz, and C. A. Lange. "Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294." Mol.Cell Biol. 21.18 (2001): 6122-31.
234. Lin, H. K. et al. "Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98.13 (2001): 7200-05.
235. Lee, H. Y. et al. "Stress pathway activation induces phosphorylation of retinoid X receptor." J.Biol.Chem. (2000).
236. Lohnes, D. et al. "Function of retinoic acid receptor γ in the mouse." Cell 73 (1993): 643-58.
237. Kastner, P. et al. "Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development." Development 124 (1997): 313-26.

238. Olsen, N. J. et al. "Androgens accelerate thymocyte apoptosis." Endocrinology 139.2 (1998): 748-52.
239. Epstein, R. J. "The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies." Nat.Rev.Cancer 4.11 (2004): 901-09.
240. Schmid, B. C. et al. "CXCR4 is expressed in ductal carcinoma in situ of the breast and in atypical ductal hyperplasia." Breast Cancer Res.Treat. 84.3 (2004): 247-50.
241. Bachelder, R. E., M. A. Wendt, and A. M. Mercurio. "Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4." Cancer Res. 62.24 (2002): 7203-06.
242. Zeelenberg, I. S., L. Ruuls-Van Stalle, and E. Roos. "The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases." Cancer Res. 63.13 (2003): 3833-39.