

2m11.3447.1

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

Avril 2006

© Julie Martin, 2006

Université de Montréal





**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Modulation de l'activité transcriptionnelle du récepteur aux  
estrogènes  $\beta$  par le facteur de transcription SCL/Tal-1

Présenté par :

Julie Martin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Alain Moreau

.....

Membre président du jury

Dr Hugo Soudeyns

.....

Membre du jury

Dr André Tremblay

.....

Directeur de recherche

## RÉSUMÉ

Les ERs sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils peuvent être activés suite à la liaison de l'estrogène ou encore via la phosphorylation de certains sites dans leur région N-terminale, et ainsi favoriser la transcription de gènes cibles. Il existe deux isoformes des ERs, soit ER $\alpha$  et ER $\beta$ , qui sont très homologues pour leur domaine de liaison à l'ADN et leur domaine de liaison au ligand, mais qui comportent des différences structurales au niveau de leur domaine N-terminal. Notre laboratoire a récemment effectué des études de criblage d'interaction protéine-protéine qui ont mené à l'identification de la protéine SCL/Tal-1 comme étant un facteur interagissant avec le domaine N-terminal d'ER $\beta$ . La protéine Tal-1 est un facteur de transcription de type bHLH qui est requis pour le développement des cellules hématopoïétiques. Tal-1 est également la cible de réarrangements chromosomiques qui sont impliqués dans la leucémie T-ALL (T-cell acute lymphoblastic leukemia). Dans ce travail, nous démontrons qu'ER $\beta$  et Tal-1 sont coexprimés dans deux types cellulaires de cancers du sein. Il semble que Tal-1 inhibe la réponse au ligand d'ER $\beta$ , ainsi que sa réponse à la signalisation induite par la cascade de signalisation des MAPK. De plus, des expériences ont montré que Tal-1 interagit plus fortement avec ER $\beta$  lorsque ce dernier est dans un état activé. En effet, l'activation d'ER $\beta$  par Erk1 ou par la liaison de l'estrogène augmente le recrutement de Tal-1 sur ER $\beta$ . Lorsque le récepteur est activé par la signalisation des MAPK en combinaison à la liaison du ligand, une coopération entre les deux fonctions d'activation d'ER $\beta$  permet un recrutement additif de Tal-1. D'autres expériences ont également démontré que le domaine bHLH n'est pas suffisant pour que l'interaction entre ER $\beta$  et Tal-1 soit possible. Aussi, des essais impliquant des constructions tronquées d'ER $\beta$  suggèrent fortement que Tal-1 aurait la possibilité d'interagir avec le domaine N-terminal d'ER $\beta$ , mais également avec le domaine C-terminal. Il semble donc exister une relation d'interaction-régulation entre ER $\beta$  et Tal-1, où Tal-1 joue le rôle d'un corépresseur auprès du récepteur et inhibe l'activité transcriptionnelle de ce dernier.

**Mots clés :** transcription, récepteurs nucléaires, estrogènes, signalisation par les MAPKs, hématopoïèse, cancers du sein.

## ABSTRACT

Estrogen receptors (ER) are transcription factors belonging to the nuclear receptors superfamily. Their activation occur when estrogen bind them, or through phosphorylation by MAPK signaling on precise sites in their N-terminal domain. When activated, ER modulates the expression of target genes. There are two isoforms of ER, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , which share high homology in their ligand- and DNA-binding domains, but are structurally different in their N-terminal domain. Our group has recently identified the protein SCL/Tal-1 as a factor interacting with the N-terminal domain of ER $\beta$ . Tal-1 is a bHLH transcription factor essential for hematopoietic cells development. Tal-1 is also a target of chromosomal rearrangement in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). In this study, we demonstrate that ER $\beta$  and Tal-1 are coexpressed in two different breast cancers cell lines. Tal-1 seems to repress the estrogen-response and the MAPK signaling response of ER $\beta$ . Moreover, experiments have shown that Tal-1 interacts strongly with ER $\beta$  when the receptor is in an activated state. In fact, the activation of ER $\beta$  by Erk1 or by estrogen results in an augmentation of Tal-1 recruitment. In addition, when ER $\beta$  is activated both by ligand and by Erk1, which results in a cooperation between the two activation functions of ER $\beta$ , an additive recruitment of Tal-1 occurs. Experiments with truncated Tal-1 showed that the bHLH domain of Tal-1 is not sufficient for the interaction between ER $\beta$  and Tal-1. Assays with truncated constructs of ER $\beta$  strongly suggest an interaction between the N-terminal domain of ER $\beta$  and Tal-1, but also with the C-terminal domain of ER $\beta$ . A relationship of interaction-regulation is therefore proposed between ER $\beta$  and Tal-1, in which Tal-1 acts as a corepressor of ER $\beta$  transcriptional activity.

**Keywords:** transcription, nuclear receptor, estrogens, MAPK signaling, hematopoïesis, breast cancers.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>IX</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>XII</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>13</b>
1.1 LES ESTROGÈNES .....	14
1.1.1 STRUCTURE.....	14
1.1.2 SOURCES ET TRANSPORT.....	14
1.1.3 EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES ESTROGÈNES .....	15
1.2 LES RÉCEPTEURS AUX ESTROGÈNES .....	18
1.2.1 STRUCTURE.....	18
1.2.2 FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DES ER.....	19
1.2.3 ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DES ER .....	21
1.2.3.1 ACTIVITÉ LIGAND-DÉPENDANTE DES ER.....	21
1.2.3.2 ACTIVITÉ LIGAND-INDÉPENDANTE DES ER .....	22
1.2.3.3 VOIE NON-CLASSIQUE D'ACTIVATION DES ER .....	25
1.2.4 EFFETS NON-GÉNOMIQUES DES ER.....	27
1.2.5 CORÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DES ER .....	29
1.2.5.1 LES COACTIVATEURS DE LA FAMILLE p160/SRC .....	29
1.2.5.2 CBP/p300.....	31
1.2.5.3 ACÉTYLATION ET DÉACÉTYLATION DES HISTONES.....	31
1.2.5.4 SMRT ET NCoR .....	32
1.2.6 ER ET CANCERS.....	34
1.3 SCL/TAL-1 .....	35
1.3.1 STRUCTURE.....	35
1.3.2 EXPRESSION DE TAL-1 DANS LES TISSUS HUMAINS.....	37
1.3.3 FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES.....	38
1.3.4 RÉGULATION .....	40
1.3.5 IMPLICATION DANS LA LEUCÉMIE.....	41
1.4 ER ET TAL-1 .....	42
1.5 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS .....	43
<b>2 MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>45</b>
2.1 VECTEURS D'EXPRESSION .....	46
2.2 CULTURE CELLULAIRE, TRANSFECTION D'ADN ET ESSAIS LUCIFÉrase .....	47
2.3 EXTRACTION D'ARN, TRAITEMENT À LA DNASE, RT-PCR.....	48
2.4 MICROSCOPIE SUR FLUORESCENCE .....	49
2.5 DOUBLE HYBRIDE .....	49
2.6 ESSAI D'INTERACTION À LA GST (PULL DOWN).....	50
2.7 LIGNÉES STABLES .....	51
<b>3 RÉSULTATS .....</b>	<b>52</b>
<b>4 DISCUSSION.....</b>	<b>72</b>
4.1 PERSPECTIVES.....	82
<b>5 BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>85</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Représentation schématique de la structure des récepteurs aux estrogènes, incluant leurs domaines fonctionnels .....	19
<b>Figure 2.</b> Les différents mécanismes de signalisation de l'estradiol et des récepteurs aux estrogènes.....	28
<b>Figure 3.</b> Convergence de la signalisation de l'hormone estrogène et des facteurs de croissance vers l'activation des récepteurs aux estrogènes.....	33
<b>Figure 4.</b> Schéma représentant la protéine Tal-1, les différentes isoformes pouvant être obtenues par épissage alternatif.....	36
<b>Figure 5.</b> L'ARNm de Tal-1 est exprimé dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-468 .....	55
<b>Figure 6.</b> La localisation cellulaire de Tal-1 et ER $\beta$ est nucléaire .....	57
<b>Figure 7.</b> Tal-1 inhibe la réponse au ligand d'ER $\beta$ et d'ER $\alpha$ , mais inhibe aussi la réponse à la phosphorylation d'ER $\beta$ .....	58
<b>Figure 8.</b> Les effets de Tal-1 sur ER $\beta$ sont AF-1-dépendant et AF-2-dépendant .....	64
<b>Figure 9.</b> Tal-1 interagit avec la portion N-terminale d'ER $\beta$ lorsque le récepteur n'est pas activé, cette interaction étant favorisée lorsque le récepteur est phosphorylé par Erk1 .....	65
<b>Figure 10.</b> La mutation des sérines 94 et 106 sur le domaine AF-1 n'affecte pas la capacité de Tal-1 à inhiber la réponse hormonale d'ER .....	66
<b>Figure 11.</b> Représentation schématique des constructions tronquées de hTal1 .....	67
<b>Figure 12.</b> L'interaction entre Tal-1 et ER $\beta$ est favorisée par le traitement à l'estrogène seul et en combinaison avec la cotransfection des cellules avec Mek1 et Erk1 .....	67
<b>Figure 13.</b> L'interaction entre Tal-1 et ER $\alpha$ est favorisée par le traitement à l'estrogène seul et en combinaison avec la cotransfection des cellules avec Mek1 et Erk1, mais est moins forte qu'entre Tal-1 et ER $\beta$ .....	68
<b>Figure 14.</b> Réponse au ligand estrogène de plusieurs clones de cellules HS-578T exprimant stablement ER $\beta$ , ER $\alpha$ ou deux mutants d'ER $\beta$ .....	71

**Figure 15.** Modèle préliminaire de la relation entre ER $\beta$  et Tal-1 .....81

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau I.</b> Niveaux d'estrogènes dans le sang selon le stade du cycle menstruel de la femme normale .....	15
<b>Tableau II.</b> Réactivité des anticorps monoclonaux contre Tal-1 sur des tissus humains normaux .....	38
<b>Tableau III.</b> Gènes cibles potentiels de Tal-1 durant le développement normal de l'hématopoïèse et dans la T-ALL.....	40

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C : degrés Celcius  
A : Alanine  
AIB1 : Amplified in breast cancers 1  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire  
AF-1 : Activation function 1  
AF-2 : Activation function 2  
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique  
AR : Androgen receptor  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
bHLH: motif basic hélice-tour-hélice  
CBP/p300 : CREB-binding protein  
Cdk : Cyclin-dependent kinase  
CKII: Casein kinase 2  
CRE : cAMP response element  
CREB : cAMP response element binding protein  
DBD : DNA-binding domain  
DERKO: Double estrogen receptors knock out  
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
DRG : development regulated GTP-binding protein  
DRIP : Vitamin D receptor interacting proteins  
E<sub>2</sub> : Estradiol  
EGF : Epidermal growth factor.  
EGFR : Epidermal growth factor receptor  
eNOS : Endothelial nitric oxide synthase  
ER : Estrogen receptor  
ER $\alpha$ KO: Estrogen receptor  $\alpha$  knock out  
ERE : Estrogen response element  
Erk : Extracellular signal-regulated kinase  
FBS : Fetal bovine serum  
FSH : Hormone folliculostimulante  
GnRH: Gonadotrophin releasing hormone  
GTP :guanosine triphosphate  
GR : Glucocorticoid receptor  
GST : Glutathion S-transférase  
hTal-1: human T-cell acute lymphoblastic leukemia 1  
HAT : Histone acétyltransférase  
HDAC : Histone désacétylase  
ICI : Imperial chemical industries  
IGF-1 : Insulin-like growth factor-1  
Kb : kilobase  
LBD : Ligand-binding domain  
LDL : Low density lipoprotein  
LH : Hormone lutéinisante  
LMO: LIM-only protein  
MAPK : Mitogen activated protein kinase



MgCl<sub>2</sub> : Chlorure de magnésium  
mL : millilitre  
mM : millimolaire  
MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazolium bromide  
N-CoR : nuclear receptor corepressor  
ng : nanogrammes  
nM : nanomolaire  
NO : Nitric oxyde  
pb : paires de bases  
p/CAF : p300/CBP-associated factor  
p/CIP : p300/CBP/interacting protein  
PBS : Phosphate buffer solution  
PCR : Polymerase chain reaction  
PI 3-kinase : Phosphoinositide 3-kinase  
PKA : Protéine kinase A  
PKC : Protéine kinase C  
Pol II : ARN Polymérase II  
PR : Progesterone receptor  
RLU : Relative luciferase unit  
RTK: Recepteur tyrosine kinase  
RT-PCR : RevERe transcription-polymerase chain reaction  
S : Serine  
SCL: Stem cell leukemia  
SHBG: Sex-hormone  $\beta$ -globulin  
SERM : selective estrogen receptor modulators  
SMRT : silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors  
SRC : Steroid receptor coactivator  
Tal-1: T-cell acute lymphoblastic leukemia 1  
T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemia  
TGFA : Transforming growth factor  $\alpha$   
uORF: Upstream open reading frame

## REMERCIEMENTS

Je veux remercier mes collègues et amies Julie, Nathalie, Karine, Annie, Mélanie et Amélie qui m'ont toujours soutenue et encouragée, sans compter leur aide indispensable et leurs judicieux conseils.

Un merci tout spécial à mes parents et à Félix, qui m'ont accompagnée durant cette période et sans qui cet accomplissement aurait été difficile.

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

Merci à tous les étudiants, professionnels de recherche et chercheurs du premier étage du Centre de recherche Mère-enfant du CHU Ste-Justine.

# **1 INTRODUCTION**

## 1.1 LES ESTROGÈNES

### 1.1.1 STRUCTURE

Les estrogènes 17 $\beta$ -estradiol (E2), estrone (E1) et estriol (E3) sont des stéroïdes de 18 carbones dérivés du cholestérol. Différents stéroïdes sont ainsi formés par la réduction du nombre d'atome de carbone, lorsque le cholestérol entre dans les cellules stéroïdogéniques, suite à sa liaison aux récepteurs de lipoprotéines (1). Par la suite, le cholestérol est emmagasiné et déplacé vers les sites de synthèse des stéroïdes. Une étape importante de la synthèse de stéroïdes à partir du cholestérol est le transfert de celui-ci du cytosol vers la membrane interne mitochondriale. Ce mouvement est facilité par le cytosquelette et par des protéines intracellulaires telle que la protéine transporteuse de stérols-2 (sterol carrier protein-2) (2). Dans la mitochondrie, une enzyme du cytochrome P450 est responsable de catalyser la coupure de la chaîne latérale du cholestérol. La synthèse des estrogènes est complétée suite à l'aromatisation de la molécule, en ayant recours au complexe de l'enzyme aromatase p450 mono-oxygénase. Celui-ci se retrouve dans le réticulum endoplasmique lisse. La différence entre l'estrone et l'estradiol réside dans leur précurseur respectif : l'androsténone et la testostérone.

### 1.1.2 SOURCES ET TRANSPORT

Chez les femmes, l'estradiol est retrouvé en majorité dans la thèque folliculaire et dans les cellules granuleuses de l'ovaire. L'estrone et l'estriol sont surtout formés dans le foie à partir de l'estradiol. Toutefois, une activité aromatase a été détectée dans d'autres tissus, dont le muscle, le gras, le tissu nerveux et dans les cellules des testicules (3-6). Les niveaux d'estradiol varient avec le stade de développement de la femme. Durant le cycle menstruel, l'estradiol est produit de façon cyclique, où les taux les plus élevés concordent avec la phase préovulatoire (7;8). À l'opposé, les taux de production sont les plus bas avant les menstruations. Les niveaux d'estrogènes sont également influencés par l'âge et par le poids de la femme. Le **tableau I** décrit les taux d'estrogènes circulant au cours du cycle menstruel de la femme.

**Tableau I** : Niveaux d'estrogènes dans le sang selon le stade du cycle menstruel de la femme normale\*.

Phase	17 $\beta$ -Estradiol		Estrone		Estriol	
	Concentration dans le sérum pg/mL	Production par jour $\mu$ g	Concentration dans le sérum pg/mL	Production par jour $\mu$ g	Concentration dans le sérum pg/mL	Production par jour $\mu$ g
Folliculaire	40-200	60-150	30-100	50-100	3-11	6-23
Préovulatoire	250-500	200-400	50-200	200-350	-	-
Lutéine	100-150	150-300	50-115	120-250	6-16	12-30
Préménstruelle	40-50	50-70	15-40	30-60	-	-
Postménopause	<20	5-25	15-80	30-80	3-11	5-22

\* Pour convertir les valeurs de l'estradiol dans le sérum en picomoles par litre, multiplier par 3,67; pour convertir les valeurs de la production quotidienne d'estradiol en nanomoles, multiplier par 3,67; pour convertir les valeurs d'estrone dans le sérum en picomoles par litre, multiplier par 3,70; pour convertir les valeurs de la production quotidienne d'estrone en nanomoles, multiplier par 3,70; pour convertir les valeurs de l'estriol dans le sérum en picomoles par litre, multiplier par 3,47; et pour convertir les valeurs de la production quotidienne d'estriol en nanomoles, multiplier par 3,47. Ce tableau a été adapté à partir de Gruber CJ et al. 2002 (1).

Dans le sérum, l'estradiol est lié de façon réversible à une  $\beta$ -globuline (sex-hormone  $\beta$ -globulin, SHBG) et lie l'albumine, mais avec moins d'affinité (9). Environ deux à trois pour cent de l'estradiol est libre. L'estradiol transporté est lié à l'albumine dans 60% des cas, et dans 30% des cas il est lié à la SHBG.

### 1.1.3 EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES ESTROGÈNES

Les effets des estrogènes sont nombreux et variés. Ils dépendent du type d'estrogène, de l'isoforme du récepteur aux estrogènes (ER) impliqué (voir section 1.2), du tissu ou de l'organe où se situe l'action. Plusieurs autres molécules peuvent intervenir, par exemple des coactivateurs ou des corépresseurs, qui vont moduler l'effet de ces ligands. De façon générale, les estrogènes favorisent la croissance cellulaire, le flux sanguin et la rétention d'eau dans les organes sexuels (1).

Les estrogènes assument plusieurs fonctions physiologiques au niveau des tissus reproducteurs. Tout d'abord, les estrogènes sont importants pour la relâche d'hormones induite par la glande thyroïde. De concert avec les signaux de l'hypothalamus, la glande thyroïde est, entre autres, responsable de la relâche de gonadostimulines (10). Cette production et relâche d'hormones doit être rigoureusement régulée afin de permettre un

développement adéquat de l'ovocyte, menant à l'ovulation. Lors de l'ovulation, l'augmentation de l'estradiol dans l'ovaire permet de réguler négativement la production des gonadostimulines LH (hormone lutéinisante) et FSH (hormone folliculostimulante), en créant une rétroaction négative de la production de GnRH (gonadotrophin releasing hormone) au niveau de la glande thyroïde (11). Ces fonctions estrogéniques ont été démontrées par l'entremise de souris nulles pour le récepteur aux estrogènes  $\alpha$  (ER $\alpha$ KO). Ces souris présentaient des anomalies de développement, résultant, entre autres, en des follicules immatures (12). Ce phénotype est également retrouvé chez des souris surexprimant l'hormone LH $\beta$ , indiquant que les anomalies observées chez les souris ER $\alpha$ KO étaient probablement dues à une surexposition à la LH (13). Sans l'action de l'estradiol, l'environnement endocrinien de l'ovule ne permettrait pas un développement approprié de celui-ci. En somme, les estrogènes ont pour fonction de réguler la production et la sécrétion de gonadostimulines au niveau de la glande thyroïde, ce qui résulte en une diminution de la LH et de la FSH dans l'ovaire.

Toujours au niveau du système reproducteur féminin, les estrogènes sont également importants au niveau de l'utérus. En apparence, les utérus de souris nulles pour ER $\alpha$  ou ER $\beta$  sont immatures et comparables pour les deux isoformes. La carence en ER $\alpha$  mène à des anomalies de croissance au stade post-pubère du développement des souris, alors que la carence en ER $\beta$  mène à un utérus semblable à celui des souris de type sauvage, sauf que les femelles montrent une fertilité diminuée (14).

Enfin, les estrogènes ont aussi des fonctions physiologiques dans la glande mammaire. Des études avec des souris nulles pour ER $\alpha$  ont mis en évidence le rôle des estrogènes dans le développement de la glande mammaire et dans l'élongation canalaire (12). Comme ces souris n'ovulent pas, les concentrations endogènes de progestérone sont insuffisantes pour supporter le développement des alvéoles lobuleux (12).

Même si les estrogènes sont très importants dans les tissus reproducteurs, ils assument également plusieurs rôles dans d'autres tissus de l'organisme. Au niveau du système nerveux, un modèle proposé dans la littérature suggère une différenciation sexuelle dans le cerveau basée sur la conversion locale d'androgènes en estrogènes, favorisant ou non la sécrétion des gonadostimulines chez les femmes (15). Les taux de production des estrogènes sont beaucoup plus bas dans le cerveau, par rapport à d'autres tissus tel que

l'ovaire, mais ceux-ci semblent avoir des répercussions importantes malgré tout. Il a notamment été suggéré que les estrogènes auraient des effets neuroprotecteurs lors du vieillissement (16). Les estrogènes sont également reconnus pour être des agents vasoprotecteurs (17-19).

Les estrogènes ont également été détectés dans les cellules épithéliales où ils ont un effet cardio-protecteur (18). Leur présence induit une vasodilatation rapide et de courte durée en stimulant la eNOS (endothelial nitric oxide synthase), qui est responsable de la production d'oxyde nitrique (20), et en stimulant la production de prostacycline (21). Le tonus des muscles lisses vasculaires est aussi réduit par les estrogènes via l'ouverture de canaux calciques spécifiques (22).

Les estrogènes jouent aussi un rôle d'antioxydant, ce qui explique la protection des estrogènes contre l'athérosclérose. Leur utilisation chez des singes ovariectomisés diminue la progression des plaques athérosclérotiques (18). Les estrogènes exercent également leurs effets anti-athérosclérotiques en diminuant les taux de LDL (low density lipoprotein) sériques, et ce entre autres en augmentant l'expression du récepteur LDL dans le foie (23).

Finalement, le lien entre l'ostéoporose et les estrogènes se doit d'être mentionné. Les ostéoclastes (24) et les ostéoblastes (25) expriment les ERs, et les estrogènes sont présentement classés comme des agents antirésorptifs. Ceux-ci inhibent les ostéoclastes de façon directe. Il a été rapporté que les thérapies impliquant l'utilisation des estrogènes diminuent la perte des os et réduisent le risque de fracture chez les femmes souffrant d'ostéoporose, mais aussi chez les femmes normales (26;27).

Les estrogènes sont également impliqués dans la stimulation du développement du cancer du sein, par exemple dans le cas des tumeurs ER-positives, c'est-à-dire exprimant ces récepteurs. Chez les femmes post-ménopausées ayant le cancer du sein, la concentration d'estradiol dans les tumeurs est élevée, malgré une faible concentration de cette hormone dans le sérum. On retrouve une aromatisation *in situ* au niveau de la tumeur (28). Par contre, dans d'autres cas, il est suggéré que les estrogènes protègent contre les cancers, notamment dans le tractus gastrointestinal, où les estrogènes semblent contrer le cancers du colon (29).

## 1.2 LES RÉCEPTEURS AUX ESTROGÈNES

### 1.2.1 STRUCTURE

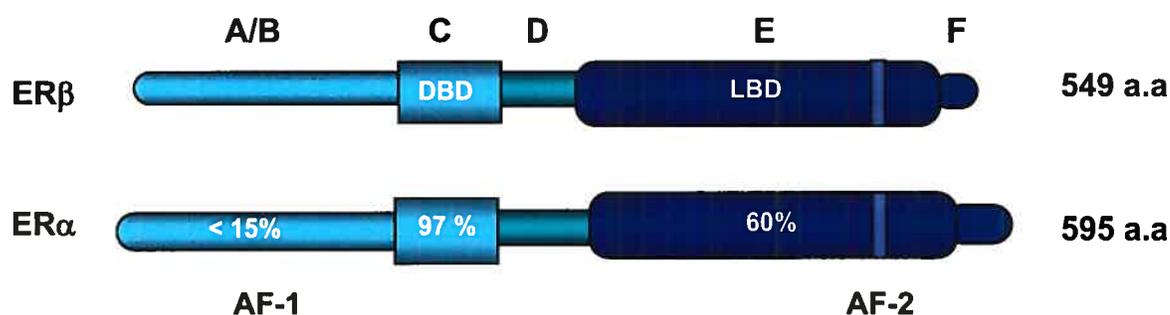
Les ER font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Parmi les sous-classes de cette famille, les ER se retrouvent avec les récepteurs stéroïdiens, tels que le récepteur des glucocorticoïdes (GR) et le récepteur de la progestérone (PR). Ces récepteurs comportent des similarités dans leur structure, notamment au niveau des domaines présents dans ces protéines. Il existe deux isoformes connues des ER, soit  $\alpha$  et  $\beta$ . Elles sont situées sur deux chromosomes différents, soit les chromosomes 6 et 14 respectivement (30). Le degré de divergence entre les isoformes et le fait que cette séparation soit constatée chez plusieurs espèces indique qu'elles auraient divergé très tôt dans l'évolution. Ces isoformes sont identiques à 50% sur le plan des acides aminés et lient le même élément de réponse sur l'ADN. Elles ont également des affinités comparables pour la liaison au ligand, le 17 $\beta$ -estradiol (31).

La **figure 1** illustre la structure de ces deux isoformes, qui contiennent six domaines identifiés A à F. En comparant la structure des deux isoformes, on remarque qu'elle est généralement conservée. Les récepteurs comprennent deux domaines de fonction d'activation, ou 'activation function', soit l'AF-1 et l'AF-2 (32). Ces domaines permettent le recrutement de coactivateurs et par conséquent l'activation transcriptionnelle des récepteurs. Il existe aussi un site de liaison à l'ADN (DBD), hautement conservé (à 97%), contenant deux motifs en doigts de zinc. Ceux-ci sont nécessaires pour permettre l'hétérodimérisation des récepteurs ainsi que la reconnaissance des sites de liaison sur l'ADN. Le domaine représenté par la lettre D est une région charnière qui permet d'adopter une conformation active suite à la liaison du ligand. Cette région possède aussi les signaux pour la localisation nucléaire du récepteur, ainsi que pour la liaison des protéines de choc thermique.

Les domaines E et F en C-terminal de ces récepteurs contiennent le domaine de liaison du ligand ainsi que la fonction activatrice AF-2. Le domaine de liaison au ligand (LBD) est assez homologue entre les deux isoformes, soit à 60%. Cette région est impliquée dans la réponse ligand-dépendante des ERs et est composée de douze hélices  $\alpha$  importantes pour la liaison du ligand, l'interaction avec les corégulateurs et la dimérisation des récepteurs (33).

Les hélices  $\alpha$  sont agencées de façon à former une pochette permettant d'accueillir le ligand. Lors de la liaison du ligand, la conformation du LBD change (34) et l'hélice 12 vient former un couvercle. Ceci crée une cavité hydrophobe qui entoure le ligand et une plate-forme à la surface du LBD permettant le recrutement de coactivateurs. Cette hélice 12 est une hélice- $\alpha$  amphipatique hautement conservée (H-12) qui est essentielle pour l'activation transcriptionnelle du récepteur par le ligand et aussi pour l'interaction avec les protéines corégulatrices de la famille p160 (35;36) (section 1.2.5.2).

Finalement, il y a les domaines A et B en N-terminal de la protéine, contenant la fonction AF-1 qui permet la transactivation du récepteur. L'homologie de cette région entre les deux isoformes est très faible, soit moins de 15%. Cette région est associée à une activité ligand-indépendante et est régulée par phosphorylation (37;38).



**Figure 1 : Représentation schématique de la structure des récepteurs aux estrogènes, incluant leurs domaines fonctionnels.**

Les deux isoformes possèdent un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé, soit à plus de 97%. Leur domaine de liaison au ligand est assez semblable, avec environ 60% d'homologie. La région N-terminale contient la fonction AF-1 et est le domaine comportant le plus de différences structurales entre les deux isoformes, n'ayant que moins de 15% d'homologie.

### 1.2.2 FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DES ER

Depuis que le récepteur aux estrogènes  $\alpha$  a été cloné, soit il y a un peu plus de 20 ans, plusieurs découvertes ont été rapportées au sujet des ERs. Des études *in vitro* ont démontré que la fonction des deux isoformes était redondante. Par contre, plusieurs évidences

suggèrent qu'elles pourraient avoir des rôles distincts au sein de l'organisme. Tout d'abord, leur localisation tissulaire varie et montre des patrons d'expression différents. L'isoforme  $\alpha$  est retrouvée dans plusieurs tissus, notamment le sein, l'utérus, le cervix et le vagin. D'autres organes expriment également cette isoforme, par exemple le tractus urogénital, le système nerveux central et les os. Quant à l'isoforme  $\beta$ , elle est surtout exprimée au niveau de l'ovaire, la prostate, les testicules, la rate, les poumons, l'hypothalamus et le thymus (39). Dans le cerveau, des différences d'expression entre les deux isoformes ont également été mesurées.

Les différences d'expression entre les deux isoformes peuvent sans doute expliquer les effets tissus-spécifiques des estrogènes. La combinaison des dimères formés par les ER ( $\alpha/\alpha$ ,  $\alpha/\beta$ ,  $\beta/\beta$ ) pourrait également expliquer la spécificité tissulaire de la réponse aux estrogènes, en plus de l'interaction différentielle de ces dimères à d'autres protéines. L'hétérodimère  $\alpha/\beta$  a été démontré comme étant fonctionnel (40-43).

L'importance biologique de chacune des isoformes a été étudiée dans le contexte de souris rendues déficientes pour les gènes des ERs. Chez les souris ER $\alpha$ KO, les femelles et les mâles sont stériles. Chez la femelle, l'insensibilité à l'estrogène mène à une hyperplasie du tractus reproductif. La présence augmentée de follicules kystiques et hémorragiques a été observée dans l'ovaire. Une absence de développement pubertaire de la glande mammaire et un excès de tissu adipeux ont aussi été associés au phénotype chez ces femelles (44). Chez les mâles ayant la même déficience génétique (ER $\alpha$ KO), le phénotype obtenu se caractérise par une dégénération testiculaire et une dysfonction de l'épididyme. Pour les mâles ayant une déficience au niveau de l'isoforme  $\beta$  (ER $\beta$ KO), le phénotype diffère : ces mâles sont fertiles et aucun autre phénotype n'est remarqué. Par contre, chez les femelles ER $\beta$ KO, la fonction ovarienne est inefficace et elles présentent une fertilité diminuée due à un blocage au niveau de la dernière étape du développement folliculaire. Lorsque ces femelles sont traitées avec les hormones FSH et LH, la fertilité est récupérée. Plus récemment, un rapport a décrit une fonction vasculaire anormale due à de l'hypertension chez les souris ER $\beta$ KO (45). Une génération de souris déficientes pour les deux isoformes a été développée (DERKO) et ces animaux montrent une baisse d'activité sexuelle significative ainsi qu'un comportement agressif (45-47).

### 1.2.3 ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DES ER

Les ERs se retrouvent dans le cytosol et dans le noyau. Ils sont liés par des protéines qui agissent à titre de chaperonnes. Celles-ci, lorsqu'associées au récepteur, le maintiennent dans une conformation inactive en masquant son site de liaison à l'ADN (48). La proportion de récepteurs dans le cytosol par rapport à la concentration dans le noyau est déterminée par un équilibre qui peut être déplacé d'un côté ou de l'autre, dépendamment d'une liaison au ligand ou non. Lorsque le ligand se lie au récepteur, il s'ensuit un changement conformationnel de la protéine. Ceci a comme conséquence de promouvoir la dimérisation du récepteur (en homo- ou hétérodimère) et d'augmenter son affinité pour lier ses éléments de réponse à l'estrogène sur l'ADN (ERE). Ces éléments de réponse à l'estrogène sont situés dans les régions régulatrices des gènes cibles des ERs. Les éléments de réponse classiques des ERs possèdent une séquence consensus palindromique qui est reconnue par le récepteur: AGGTCAnnnTGACCT, où n représente n'importe quel nucléotide (49). Toutefois, ce ne sont pas tous les gènes cibles des ERs qui possèdent cette séquence consensus. Les ERs peuvent également activer la transcription de gènes sans ERE et sans lier l'ADN. Par exemple, les ERs peuvent activer des gènes via des sites AP-1 sur l'ADN en liant des membres de la famille des facteurs de transcription Jun/Fos (50;51). Des études ont démontré que l'activation par ER à ces sites nécessitait à la fois l'AF-1 et l'AF-2 du récepteur (52-54). D'autres gènes peuvent également être activés transcriptionnellement par l'intermédiaire des ERs, notamment certains possédant des sites de type SP-1 (55;56). La régulation transcriptionnelle des gènes cibles des ERs peut être positive ou négative, et peut être influencée par la présence de coactivateurs et de corépresseurs.

#### 1.2.3.1 ACTIVITÉ LIGAND-DÉPENDANTE DES ER (VOIE CLASSIQUE)

L'activation ligand-dépendante des ERs correspond au mécanisme d'action classique de ces récepteurs. Ce modèle prévoit qu'en absence d'hormone, le récepteur est séquestré dans un complexe multiprotéique inhibiteur localisé dans le noyau de la cellule. La liaison au ligand amène un changement conformationnel du récepteur, permettant une homodimérisation et augmentant l'affinité pour lier l'ERE au niveau de l'ADN. Les récepteurs liés à l'ADN recrutent la machinerie basale de transcription ainsi que des

cofacteurs (protéines corégulatrices mentionnées plus haut), de façon directe ou indirecte (35;57). Dépendamment du contexte cellulaire, les récepteurs liés à l'ADN exercent alors un effet positif ou négatif sur l'expression de gènes cibles situés en aval.

Le domaine C-terminal des ERs contient le domaine de liaison à l'estrogène et la fonction AF-2. Les deux domaines de fonctions activatrices (AFs) des ERs peuvent agir de façon additive dans la plupart des mécanismes d'action déclenchés par la liaison du récepteur au ligand (58). Par contre, ces deux AFs peuvent également agir de façon indépendante l'une de l'autre, selon le contexte cellulaire et le promoteur. Compte tenu de la forte homologie des domaines de liaison à l'ADN des deux isoformes des ERs, on a initialement postulé que l'isoforme  $\beta$  avait une fonction redondante. La réponse résiduelle des effets estrogéniques d'ER $\alpha$  dans des souris déficiente pour ce gène indique la capacité de l'isoforme  $\beta$  à compenser certains de ces effets ligand-dépendants (12). Par contre, lorsque les deux isoformes sont coexprimées *in vitro*, l'hétérodimère semble favorisé (40), ce qui suggère qu'il pourrait y avoir une convergence directe entre les voies d'ER $\alpha$  et ER $\beta$ . De plus, ER $\beta$  a été démontré comme pouvant interagir de façon constitutive et ligand-indépendante avec les EREs de promoteurs cibles de manière à atténuer l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante d'ER $\alpha$  (59). Il a donc été suggéré que dans les cellules exprimant les deux isoformes, la réponse estrogénique résultante serait déterminée par le ratio des deux isoformes.

### 1.2.3.2 ACTIVITÉ LIGAND-INDÉPENDANTE DES ER

Mise à part une activation suite à la liaison de l'hormone, les ERs peuvent également être régulés par des signaux extracellulaires. Le rôle biologique d'une telle régulation reste cependant incertain. Il est possible que ce mécanisme soit présent pour permettre à l'ER d'être activé même lorsque les niveaux d'hormones sont bas, par exemple chez les mâles. Aussi, il est possible que cette voie existe dans le but d'amplifier la signalisation des facteurs de croissance et ainsi favoriser la mitogénèse dans les tissus ER-positifs (60). Ce mécanisme d'activation, quoique différent de celui de la voie classique impliquant la liaison au ligand, implique tout de même la liaison du récepteur à un ERE sur l'ADN.

Les premières indications dans cette avenue ont mis en évidence la capacité des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance épithélial (epidermal growth factor, EGF) et le facteur de croissance à l'insuline (insulin-like growth factor, IGF-1) à activer ER $\alpha$  et ainsi augmenter l'expression des gènes cibles de l'ER (61). Chez des souris ovariectomisées, le traitement à l'EGF induit la translocation de l'ER dans le noyau des cellules utérines où il est retrouvé dans un état phosphorylé, imitant les effets de l'estrogène (62). Le traitement d'anticorps contre l'EGF était capable d'atténuer la réponse aux estrogènes dans l'utérus. En retour, l'administration d'un antagoniste de l'ER, le ICI 164,384, réduisait la réponse utérine à l'EGF (62;63). Ces études suggèrent un modèle où l'action mitogénique de l'estrogène est au moins en partie médiée par l'EGF dans ces tissus. De plus, des études chez des souris ER $\alpha$ KO femelles qui expriment des niveaux normaux d'EGF et d'EGFR (epidermal growth factor receptor) montraient qu'il n'y avait aucune transduction du signal au niveau de l'utérus en réponse aux actions mitotiques médiées par l'EGF (64).

La communication croisée entre les voies de signalisation des facteurs de croissance et des ER débute par la stimulation de la voie Ras-Raf-MAPK par les récepteurs membranaires de type tyrosine-kinase, tels que EGFR, ErbB2, ErbB3 et ErbB4. Les MAPK (mitogen activated protein kinase) ont la possibilité de moduler l'ER par un processus de phosphorylation au niveau de sites précis sur le récepteur. Ces phosphorylations surviennent surtout au niveau de résidus sérine/thréonine ou tyrosine sur l'ER (65). Plusieurs résidus phosphorylables ont été identifiés chez ER $\alpha$  humain (hER $\alpha$ ), la plupart étant situés dans la région A/B en N-terminal du récepteur. Par exemple, le résidu sérine S118 sur le domaine AF-1 du hER $\alpha$  est phosphorylé par les voies des MAPK en réponse au traitement avec l'EGF ou l'IGF, permettant au récepteur d'interagir avec son coactivateur spécifique, l'hélicase à ARN p68, et ainsi d'activer la transcription du gène cible en l'absence d'estrogène (66). Ce résidu peut aussi être phosphorylé par la kinase cycline-dépendante Cdk7 (cycline-dependante kinase 7) par un recrutement ligand-dépendant du complexe de facteurs de transcription TFIID au niveau du domaine AF-2 du ER (67).

Ces études suggèrent un mécanisme de régulation du récepteur nucléaire via le recrutement par le domaine AF-2 de complexes associés à des kinases. Plus récemment, il a été

démontré que la MAPK Erk7 (extracellular regulator kinase 7), activable par des signaux extracellulaires indépendamment des voies de Erk1/2 (p42/p44), favorisait la phosphorylation du résidu S118 d'une façon hormone-dépendante et pouvait ainsi diriger l'ER vers la voie de l'ubiquitine. Une relation inverse des niveaux d'expression de ER $\alpha$  et Erk7 a été mise en évidence dans des échantillons tumoraux mammaires, faisant corrélérer l'activité d'Erk7 avec la destruction d'ER $\alpha$  (68). Il en découle donc que le site de phosphorylation S118 joue un rôle majeur dans la régulation d'ER $\alpha$ .

D'autres voies ont été identifiées comme pouvant phosphoryler ER $\alpha$ , notamment celles de TGF $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ), qui est capable d'augmenter l'activité transcriptionnelle de ER via la cascade des MAPK ainsi que via les voies d'activation de la PKC (protéine kinase C) et la PKA (protéine kinase dépendante de l'AMPc) (69). Par des approches de cartographie de phosphopeptides, trois sites consensus ont été identifiés sur le domaine AF-1 d'ER $\alpha$ , soit S104, S106 et S118, sites qui étaient phosphorylés suite à l'activation par la PKC et la PKA. Cette activation menait à une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  et la présence de l'estrogène potentialisait cette augmentation (70). Le contexte séquentiel de ces résidus leur permet d'être ciblés par les MAPK, mais également par les kinases cycline-dépendantes (Cdk). Des études effectuées dans des cellules de mammifère en culture et utilisant des mutants ponctuels d'ER $\alpha$  ont démontré la phosphorylation des résidus S104 et S106 par le complexe cyclineA-Cdk2, menant à une augmentation de l'activité transcriptionnelle suite à la surexpression de la cyclineA (71). Cette augmentation de l'activité d'ER $\alpha$  était indépendante de l'hormone et le traitement au tamoxifène ne bloquait pas cette augmentation, suggérant que l'activation de hER $\alpha$  par la cycline A est AF-1 dépendante (71).

Une autre sérine identifiée sur hER $\alpha$  dans le domaine AF-1, la S167, constitue un site majeur de régulation du récepteur (72). Cette sérine est phosphorylée par la caséine kinase II, impliquée dans la phosphorylation de c-jun (73;74). La liaison d'ER $\alpha$  à son ERE sur l'ADN est augmentée suite à cette phosphorylation dans les cellules MCF-7, qui sont des cellules de cancers du sein ER-positives (75;76). Le résidu S167 est également la cible de la kinase pp90<sup>rsk1</sup>, qui médie l'activation transcriptionnelle du récepteur aux estrogènes  $\alpha$  en réponse aux facteurs de croissance. La voie impliquée dans la survie cellulaire, PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase), cible également le résidu S167.

Des résidus autres que des sérines peuvent être phosphorylés. C'est notamment le cas de la thréonine 311, ciblée par la MAP kinase p38 dans des cellules cancéreuses endométriales, favorisant ainsi la translocation au noyau d'ER $\alpha$  et l'interaction avec des cofacteurs de transcription (77). En somme, le contexte cellulaire et la palette de voies de régulation influencent l'activité du récepteur aux estrogènes, incluant les signaux extracellulaires.

L'isoforme ER $\beta$  peut également être la cible de phosphorylations sur des sites précis. Par exemple, il a été démontré que deux résidus sérine, S106 et S124, sont impliqués dans l'activation d'ER $\beta$  par l'oncogène Ras et par la signalisation des facteurs de croissance. En effet, l'activation du ER $\beta$  murin est possible via la phosphorylation de ces résidus par la voie des MAPK et mène au recrutement de coactivateurs transcriptionnels au domaine AF-1 du récepteur (37;78). La voie p38 a été démontrée comme activant ER $\beta$  d'une façon ligand-dépendante (79). De façon similaire, des niveaux croissants d'AMP cyclique augmentent l'activité d'ER $\beta$ . Ces effets ne dépendent pas du domaine AF-1, comme c'est le cas pour ER $\alpha$ , et une phosphorylation réduite en C-terminal est observée (80).

L'importance biologique de la voie d'activation hormone-indépendante reste encore à être élucidée. Comme mentionné plus haut, il est possible que cette voie serve à maintenir un niveau d'activation basal des ERs, lorsque l'hormone est en faible concentration. Il reste également à déterminer si les gènes ciblés par la voie ligand-dépendante diffèrent de ceux ciblés par la voie ligand-indépendante. La disponibilité et la capacité des seconds messagers à activer les ERs dépendent du type cellulaire et expliquent sans doute la variabilité des actions d'ER selon le contexte cellulaire. Par contre, l'activation hormone-indépendante d'ER peut survenir dans des tumeurs mammaires estrogène-positives, où la stimulation d'ER par les MAPK est augmentée, menant à des phénotypes de résistance thérapeutique chez les femmes traitées (81;82).

#### 1.2.3.3 VOIE NON-CLASSIQUE D'ACTIVATION DES ER (ERE-INDÉPENDANTE)

Les ERs peuvent également activer la transcription de gènes par un mécanisme d'action non-classique, qui implique des éléments de réponse sur l'ADN de type AP-1, CRE-like (cyclic AMP response element) et SP-1. Dans cette voie non-classique, les ERs ne lient pas l'ADN, mais interagissent plutôt avec des membres de la famille de facteurs de

transcription Jun/Fos. La liaison de Jun/Fos à l'ADN au niveau d'un site AP-1 est donc requise pour qu'ER puisse agir et il a été démontré que, dans ce cas, l'ER augmentait l'activité transcriptionnelle de Jun/Fos (50;52;83;84). De plus, le tamoxifène et d'autres SERM (modulateurs sélectifs des ERs), sont capables d'activer des gènes cibles de l'AP-1. Cette stimulation est encore plus évidente dans le cas de l'isoforme ER $\beta$  : le raloxifène est capable d'augmenter l'activation de l'AP-1 par ER $\beta$  de 10 fois comparativement à ER $\alpha$  lié à l'estrogène (54).

Des études ont montrés que l'activation d'un AP-1 par l'ER lié à l'estrogène requiert les deux domaines de fonctions activatrices, soit l'AF-1 et l'AF-2. Ces fonctions d'activation peuvent augmenter l'activité des protéines p160 qui sont recrutés au site par Jun/Fos. Différentes recherches ont suggéré qu'ER n'interagissait pas directement avec Jun/Fos. Un modèle proposé stipule que l'hétérodimère Jun/Fos stimule la transcription en recrutant CBP/p300 (CREB-binding protein) et ses protéines associées (85). Dans ce complexe, il est probable de retrouver les protéines de la famille p160. Donc, le même complexe de coactivateurs est recruté par Jun/Fos sur un site AP-1 que par l'ER dans un contexte de liaison à un ERE. Toutefois, les interactions protéines-protéines sont différentes dans les deux cas. Dans le contexte du promoteur AP-1, Jun/Fos interagit avec CBP/p300, et l'ER interagit avec une protéine p160. Il a été démontré que p160 interagissait avec CBP/p300. Ainsi, la présence d'ER rend le complexe activateur encore plus actif (54).

Il existe une autre voie d'activation des éléments de réponse non-consensus par l'ER, qui ne requiert pas l'AF-1 ou l'AF-2. Cette voie alternative implique les SERM, et les fonctions activatrices (AFs) d'ER semblent inhiber cette deuxième voie, suggérant que les deux voies (voie impliquant un AP-1 versus voie sans liaison à l'ADN) pourraient s'exclure mutuellement. De façon intéressante, l'ER lié par un SERM semble activer la transcription d'un AP-1, mais sans même faire partie du complexe activateur. Cette activation ne peut être due à une activation des MAPK ou des seconds messagers par les SERM, parce qu'il a été démontré qu'ils en sont incapables (54).

Un plus récent modèle a été mis au jour, selon lequel ER lie des corépresseurs tel que NCoR en présence de SERM (86;87). Le modèle suggère donc qu'ER, en présence de SERM, lierait des complexes de corépresseurs, comprenant même les HDACs (histones désacétylases), sur un site autre que celui où interagit l'AP-1. De cette façon, ER séquestre

les corépresseurs pouvant réprimer l'activité de l'AP-1 et favorise donc la transcription des gènes cibles de l'AP-1.

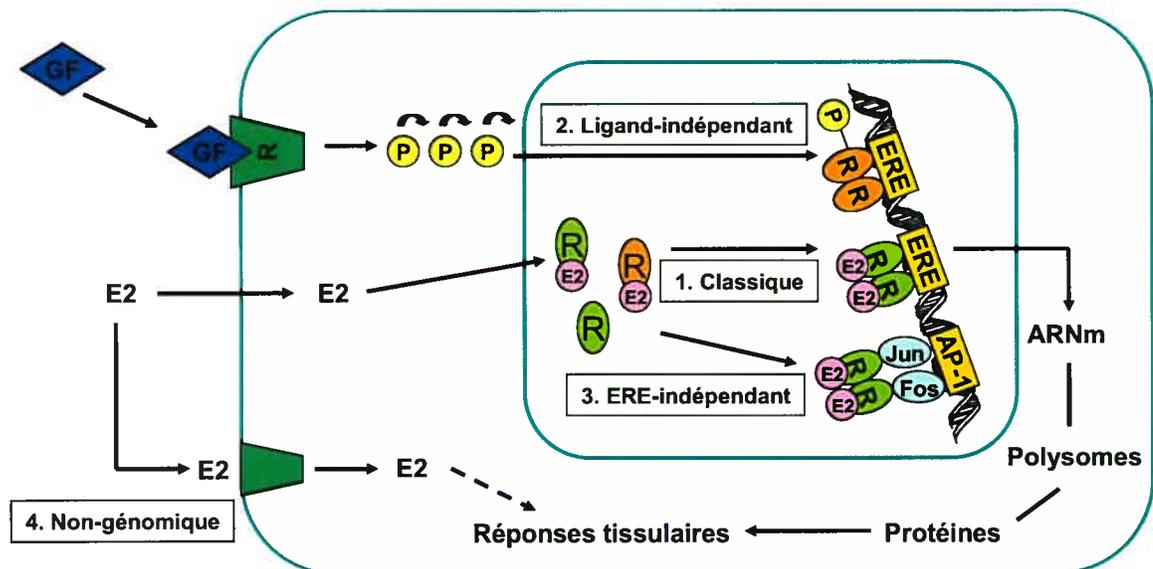
Certaines études ont mis en évidence la possibilité que le profil de transactivation de l'ER à un élément AP-1, suite à l'activation par liaison d'un ligand, varie pour les deux isoformes du récepteur (88). En effet, alors que les deux isoformes d'ER répondent au ligand de la même façon lors de la transactivation à un site ERE, elles présenteraient des profils de transactivation différents lorsqu'un site de type AP-1 est impliqué (88). Des études comparatives entre les deux isoformes d'ER, utilisant l'estrogène et quatre antiestrogènes (tamoxifène, raloxifène, ICI 164384 ou diethylstilbestrol), ont décelé des différences de réponse à ces ligands entre ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Pour ER $\alpha$ , l'estrogène a été classé comme un activateur complet pour un élément AP-1, tout comme le tamoxifène, alors que le raloxifène a été classé comme activateur partiel (88). Pour ER $\beta$ , il semble que le patron soit dissemblable : l'estrogène agirait comme un inhibiteur de la transcription pour un élément AP-1, alors que les antiestrogènes agirait comme activateurs (88). Ces études suggèrent qu'ER $\alpha$  et ER $\beta$  répondraient différemment à ces ligands avec des sites AP-1 et que des mécanismes distincts de régulation de la transcription à ces sites pour les deux isoformes d'ER pourraient être en cause.

L'importance biologique de la voie non-classique d'activation des ERs est non-négligeable. Par exemple, la mutation d'un résidu critique pour la liaison à l'ADN sur ER $\alpha$  empêche la transcription ERE-dépendante mais n'inhibe pas le mécanisme d'action alternatif sur l'AP-1 (89). L'introduction de ce gène muté dans des souris provoque un phénotype comprenant, entre autres, des anomalies ovariennes, une hyperplasie de l'endomètre et des glandes mammaires anormales, alors que les souris ER $\alpha$ KO sont stériles (90). La comparaison entre ces souris suggère qu'un équilibre entre les actions classiques et non-classiques des récepteurs des estrogènes est essentiel.

#### 1.2.4 EFFETS NON-GÉNOMIQUES DES ER

Les effets rapides de l'estrogène observés sur les os, les glandes mammaires, le système vasculaire et le système nerveux suggèrent que les estrogènes peuvent avoir des actions non-génomiques, possiblement via des ERs situés à la surface membranaire et liés à des signaux intracellulaires. La communication croisée entre l'ER et les récepteur tyrosine-

kinase membranaires est généralement observée et les voies de signalisation impliquées sont assez connues. Il a été montré que l'estrogène a la capacité d'activer les voies de signalisation des MAPK dans une grande variété de types cellulaires. De plus, il semble que les effets estrogéniques protecteurs observés sur le système vasculaire soient de nature non-génomiques, impliquant l'activation de la synthèse d'oxyde nitrique endothéliale et la voie PI3K/Akt (91;92). Dans les ostéoblastes et les ostéoclastes, les MAPK sont aussi activées rapidement par l'estrogène, procurant éventuellement les effets génomiques prolifératifs et antiapoptotiques de l'hormone et suggérant une explication au rôle protecteur de l'estrogène sur la masse osseuse (93). Ces différentes études proposent donc que les ER puissent induire des effets non-génomiques dans la cellule, en plus des effets dus à leur activité transcriptionnelle.



**Figure 2 : Les différents mécanismes de signalisation de l'estradiol et des récepteurs aux estrogènes.**

1) La voie classique d'activation d'ER implique la liaison du ligand au domaine AF-2 du récepteur. Cette interaction amène ER à s'asseoir sous forme de dimère sur son ERE et ainsi de moduler l'expression de gènes cibles. 2) La voie d'activation ligand-indépendante d'ER implique la phosphorylation de sites précis sur le domaine AF-1 suite à la signalisation des facteurs de croissance (GF) et ne nécessite pas la présence de l'estrogène. Le récepteur activé est amené à lier son ERE sur l'ADN sous forme de dimère pour moduler l'expression de gènes cibles. 3) La voie non-classique implique des éléments de réponse différents du ERE, tels que AP-1, CRE-like et SP-1. ER n'interagit pas avec l'ADN mais agit comme facteur de transcription en interagissant avec les membres de la famille Jun/Fos. D'une façon alternative, les récepteurs pourraient

également lier les SERMs et séquestrer des protéines corégulatrices, affectant ainsi l'activité transcriptionnelle au site AP-1. 4) Les estrogènes peuvent médier des effets sans passer par la régulation transcriptionnelle de gènes cibles au niveau de l'ADN, produisant des effets non-génomiques. Figure adaptée à partir de Hall J.M. et al. 2001 (60).

### 1.2.5 CORÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLES DES ER

Plusieurs protéines interagissent avec les ERs et entre elles pour ainsi réguler l'activité transcriptionnelle des ERs, en augmentant la transcription de gènes cibles (coactivateurs) ou en la réprimant (corépresseurs). Certains facteurs, tel que p/CAF, ont été démontrés comme interagissant en fonction du ligand, où le recrutement de ceux-ci nécessite le domaine AF-2 des ERs. D'autres facteurs, comme GRIP1, peuvent interagir de façon ligand-indépendante, où le domaine AF-1 est impliqué dans leur recrutement. La régulation des récepteurs passe par une action séquentielle ou combinée de ces facteurs, de façon à réorganiser la chromatine pour rendre l'élément de réponse des récepteurs nucléaires accessible et permettre le recrutement des facteurs de transcription de la machinerie de transcription basale et l'ARN polymérase II (94;95). Des études biochimiques et d'interaction protéine-protéine suggèrent que plusieurs de ces protéines corégulatrices font partie de complexes de protéines qu'on croit capables de s'assembler aux récepteurs nucléaires via plusieurs modifications telles que la phosphorylation, l'acétylation et l'ubiquitination des composantes protéiques du complexe. Ces modifications et associations se font en réponse à des stimuli extracellulaires, de manière à transmettre un signal au niveau de la transcription de gènes cibles.

#### 1.2.5.1 LES COACTIVATEURS DE LA FAMILLE P160/SRC

Le premier coactivateur des récepteurs nucléaires à avoir été identifié est SRC-1/NCoA-1 (steroid receptor coactivator 1). Par la suite, d'autres protéines ont été caractérisées, soient SRC-2/GRIP-1/TIF2 et SRC-3/AIB1/pCIP, formant ainsi la famille des protéines p160. Les membres de cette famille ont un domaine central conservé qui médie des interactions ligand-dépendantes avec l'hélice- $\alpha$  12 du domaine de liaison au ligand d'ER, situé dans la portion AF-2. La partie C-terminale conservée chez cette famille de coactivateurs contient un domaine d'activation de la transcription et médie l'interaction avec d'autres

coactivateurs (96-98). Basé sur la présence de trois domaines de régulation, il a été suggéré que les protéines p160 fonctionnent comme coactivateurs, en partie en servant de molécules adaptatrices qui recrutent les complexes CBP et/ou p300 aux récepteurs nucléaires déjà associés à leur promoteur (99;100).

Les membres de la famille p160 interagissent avec les récepteurs nucléaires via trois motifs LXXLL répétés, où L représente une leucine et X n'importe quel acide aminé. Ce motif LXXLL a été démontré nécessaire et suffisant pour les interactions ligand-dépendantes avec le domaine de liaison au ligand des récepteurs nucléaires (36). Une leucine conservée au niveau de l'hélice 3 du domaine de liaison au ligand et un glutamate conservé dans l'AF-2 du récepteur nucléaire permettent l'interaction en s'agrippant à l'hélice LXXLL des protéines p160, de façon à ce que les résidus leucine internes se compactent dans une poche hydrophobe de la partie C-terminale du récepteur (101-103). Ces contacts sont également sensibles à des changements conformationnels pouvant être induits par des ligands structurellement différents (104;105).

Le recrutement des coactivateurs SRC décrit jusqu'à présent concerne l'activation du récepteur de façon indépendante au ligand. Par contre, les mécanismes décrivant le recrutement de coactivateurs pour augmenter l'activité du domaine AF-1 (ligand-indépendant) en réponse à la signalisation des facteurs de croissance sont moins bien compris. Il est connu que les ERs ont la possibilité d'être régulés par la cascade de signalisation des MAPK au niveau de sites de phosphorylation dans leur région AF-1 (section 1.2.3.2). Cette régulation l'AF-1 indépendante du ligand pourrait possiblement produire un signal d'assemblage de corégulateurs. Il a été démontré que les protéines SRC peuvent interagir avec la portion AF-1 du récepteur ER $\alpha$ , par une région en C-terminal des SRC. Cette interaction ne requiert pas un état phosphorylé d'ER $\alpha$  (106;107). Contrairement à l'isoforme  $\alpha$ , la phosphorylation du domaine AF-1 d'ER $\beta$  recrute SRC-1, résultant en l'activation du récepteur en réponse aux facteurs de croissance et à l'oncogène Ras (37). Pour une activation maximale, il a été démontré que le recrutement du coactivateur CBP était requis (78).

### 1.2.5.2 CBP/P300

CBP (CREB-binding protein) et p300 sont des homologues partageant 63% d'identité au niveau de leurs acides aminés et agissent à titre de coactivateurs pour plusieurs récepteurs nucléaires. CBP/p300 contient une fonction acétyltransférase intrinsèque. Il se distingue des autres polypeptides HAT (histones acétylases) parce qu'il a la capacité d'acétyler les quatre types d'histones natives (H2A, H2B, H3, H4) complexées au nucléosome, ce qui contribue au remodelage de la chromatine (108). p300 et CBP sont connus pour interagir physiquement avec plusieurs facteurs de transcription activés par des cascades de signalisation, incluant CREB, c-Jun/v-Jun, Fos et des récepteurs nucléaires stéroïdiens. CBP/p300 contribuent à intégrer des signaux venant de plusieurs activateurs et ainsi induisent l'activité transcriptionnelle d'ER (109).

Il a été démontré que p300 peut acétyler ER $\alpha$ . La substitution des sites d'acétylation de ER $\alpha$  dans la région charnière du récepteur (domaine D) augmente de façon drastique la sensibilité d'ER $\alpha$  à l'estrogène, sans toutefois changer son induction par les MAPK, suggérant que l'acétylation d'ER $\alpha$  agit comme suppresseur de sa sensibilité au ligand. De plus, CBP/P300 peut acétyler le coactivateur SRC-3, qui possède une activité acétylase, et qui désunit les coactivateurs du récepteur ER $\alpha$  lié à son promoteur, résultant en une atténuation de la réponse médiée par les estrogènes (110).

Des études récentes suggèrent que CBP/p300 servirait de point de convergence entre les ERs et les voies de signalisation des facteurs de croissance (109). Les MAPK peuvent phosphoryler CBP et ainsi favoriser une activité acétyltransférase maximale pour CBP, qui ensuite va favoriser l'activité transcriptionnelle des ERs (111). Finalement, les composantes et la conformation des complexes recrutés pourraient expliquer pourquoi différentes acétyltransférases sont requises par différents facteurs de transcription liés à l'ADN pour des gènes cibles spécifiques (112).

### 1.2.5.3 ACÉTYLATION ET DÉSACÉTYLATION DES HISTONES

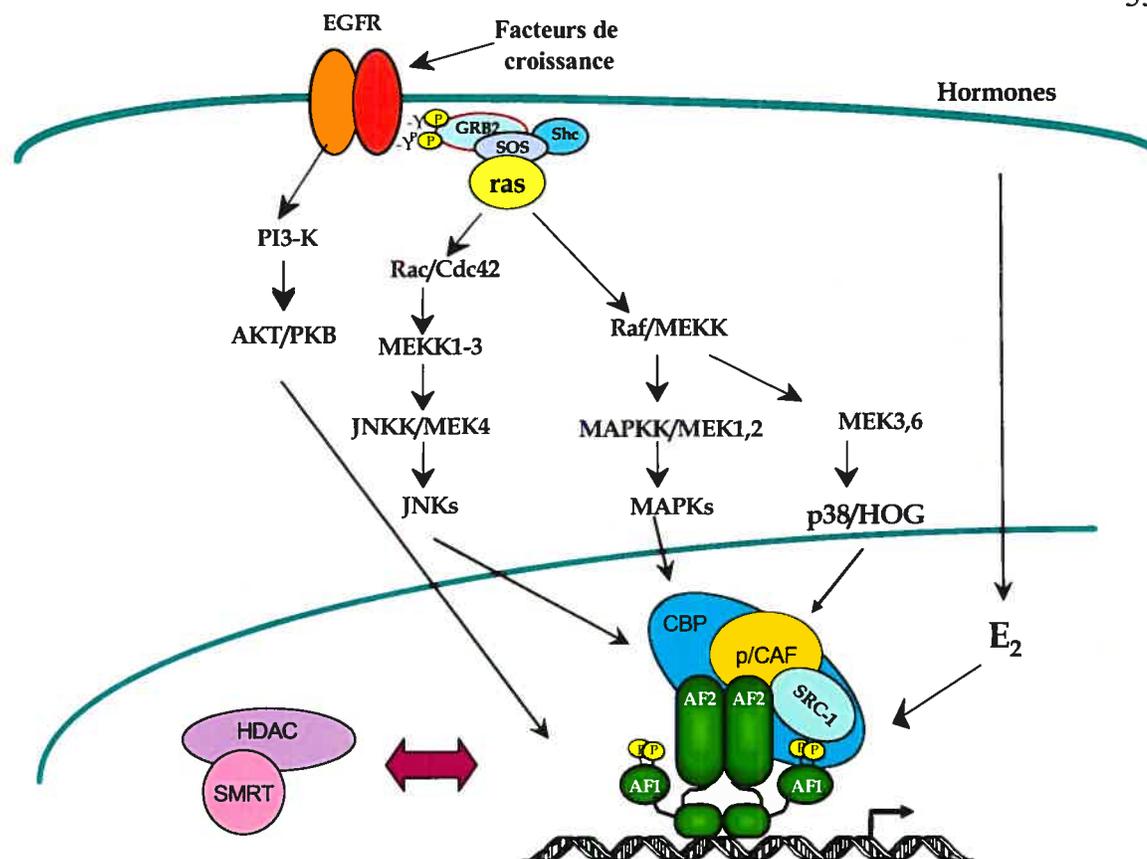
Cette modification post-traductionnelle joue un rôle clé dans le processus de transcription des gènes et dans l'assemblage de la chromatine. L'hyperacétylation des histones est associée à une activité transcriptionnelle, alors que l'hypoacétylation est corrélée à une

transcription silencieuse de la chromatine et à l'hétérochromatine. L'acétylation réduit la charge positive nette des histones et affaiblit les interactions avec l'ADN, inhibe l'enroulement serré des nucléosomes et détruit les interactions spécifiques avec les régulateurs non-histones. Ainsi, la chromatine au niveau d'un promoteur devient relâchée et accessible à la machinerie transcriptionnelle, d'où une transcription de gènes active (113;114). Le recrutement spécifique d'un complexe avec une activité acétyltransférase à un promoteur peut donc jouer un rôle crucial pour surpasser les effets répressifs de la structure de la chromatine sur la transcription. La découverte que l'histone désacétylase de mammifère était un homologue du corépresseur RPD3 chez la levure (115) a permis d'émettre l'hypothèse que les événements de régulation de l'activité transcriptionnelle d'ER pourraient impliquer l'échange de complexes contenant des fonctions histones désacétylases avec des complexes contenant des activités acétyltransférases. Il apparaît que dans la plupart des cas, les HAT ne sont pas recrutées directement au récepteur nucléaire, mais plutôt associées avec d'autres coactivateurs qui ont une plus grande affinité pour le récepteur.

Les HDAC, ou histones désacétylases, ont une fonction inverse à celles des HAT. En effet, elles induisent une hypoacétylation des histones, ce qui a pour effet de rendre la chromatine inaccessible à la machinerie transcriptionnelle. Elles agissent comme corépresseurs, et peuvent lier plusieurs facteurs de transcription dans des complexes de répression de la transcription. Par exemple, il est possible de retrouver les corépresseurs de récepteurs nucléaires NCoR (nuclear receptor corepressor) et SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) dans des complexes protéiques contenant des histones désacétylases (116-118).

#### 1.2.5.4 SMRT ET NCoR

SMRT et NCoR sont des corépresseurs structurellement reliés qui sont responsables du recrutement des histones désacétylases, afin de permettre l'assemblage de complexes pouvant réprimer l'activité transcriptionnelle. Certaines études démontrent que SMRT et NCoR peuvent interagir avec l'ER même en absence du ligand et l'interprétation qui en découle est que la présence d'antiestrogènes renforce cette interaction, alors que la présence de l'estrogène induit la dissociation des corégulateurs (119).



**Figure 3 : Convergence de la signalisation de l'hormone estrogène et des facteurs de croissance vers l'activation des récepteurs aux estrogènes.**

Les voies d'activation des ER impliquant un élément de réponse à l'estrogène (ERE) prévoient que les récepteurs peuvent être activés par liaison de l'hormone estrogène ou par la phosphorylation de leur domaine AF-1 via la signalisation des facteurs de croissance. Des interactions avec des complexes de coactivateurs ou de corépresseurs influencent l'activité transcriptionnelle des ER. Figure adaptée à partir de M. Sanchez et al. 2005 (120).

En somme, les ERs voient leur activité transcriptionnelle régulée de plusieurs façons : la présence du ligand, la phosphorylation due à la signalisation des facteurs de croissance, des voies des MAPK, des voies de PI3-K, la présence et la disponibilité de coactivateurs et de corépresseurs, ainsi que l'état de la chromatine, contrôlé par les HAT et les HDAC. Il semble donc exister une sorte d'équilibre entre la répression et l'induction de la transcription de gènes cibles, influencé par les signaux extracellulaires qui sont intégrés par les différentes composantes des complexes corégulateurs. La **figure 3** regroupe les composantes de l'activation des ERs pour un site ERE, comprenant les différentes interactions avec les protéines régulatrices.

### 1.2.6 ER ET CANCERS

Il est connu que la liaison de l'estrogène aux ERs amène un effet de prolifération cellulaire dans plusieurs cancers. Différentes approches thérapeutiques ont été développées au cours des dernières années afin de contrer cet effet. Il existe notamment des antagonistes bloquant complètement l'activation des ERs, par exemple le fulvestrant, aussi identifié ICI 182 780 (121). De plus, toutes une série de SERM ont été découverts et sont également utilisés en thérapie. Le tamoxifène est un SERM couramment utilisé comme antagoniste de l'activation des ERs. C'est le SERM le plus souvent choisi dans les traitements de cancers du sein à tous les stades de développement, et il est aussi employé à titre préventif chez les femmes plus susceptibles de développer un cancers (122). Bien que le tamoxifène utilisé comme thérapie endocrinienne réduit de 40 à 50% l'incidence annuelle de la récurrence des cancers du sein (123), il est problématique dans certains tissus tel que l'utérus, où il semble imiter l'effet de l'estrogène, menant à une prolifération accrue du tissu tumoral (124;125). Cette observation doit être prise en considération lors de son utilisation prophylactique pour le traitement du cancer du sein. De plus, le tamoxifène s'est révélé inefficace pour bloquer l'activation des ERs via le domaine AF-1, ce qui a pour effet de ne pas inhiber suffisamment l'activité des ERs dans le cancers du sein (124;126).

L'utilisation d'inhibiteurs d'aromatase semblait donc capable d'éviter les effets du tamoxifène sur les cancers de l'endomètre, tout en permettant de créer un environnement sans effets estrogéniques. Malheureusement, le deux tiers des patientes atteintes de cancers du sein ER-positif et traitées avec ce type d'approche développent un phénotype de résistance au traitement à long terme (81;82), menant souvent à une progression tumorale (81;82). Ce phénomène a été étudié et il semble que les récepteurs tyrosine kinase ErbBs soient souvent surexprimés dans ces cas de résistance. La communication croisée entre l'ER et les membres de la famille ErbBs (RTK) est de plus en plus caractérisée depuis quelques années, mais il reste encore à identifier des cibles pharmacologiques pouvant intervenir dans ces cas de phénotype de résistance (127).

Il faut également ajouter que la majorité des études faites précédemment ont été effectuées sur l'isoforme  $\alpha$  des ERs et, comme il en a été mentionné à plusieurs endroits dans cette introduction, il est envisageable que les deux isoformes des ERs aient des rôles différents dans la signalisation cellulaire et dans les cancers. L'observation que la coexpression des

deux isoformes modifie leur activité dans les cancers semble appuyer cette hypothèse (59). De plus, certains résultats démontrent qu'ER $\alpha$  serait responsable de la prolifération accrue des cellules cancéreuses, alors que dans les cellules saines, l'isoforme ER $\beta$  prédominerait (128).

Même si les cas décrits jusqu'ici concernent surtout le cancer du sein, les ERs peuvent être impliqués dans plusieurs autres cancers et le rôle de chacune des isoformes reste à clarifier. Par exemple, certaines études sur le cancer de la prostate suggèrent une implication de l'isoforme  $\beta$  puisqu'elle est surexprimée dans les cellules saines et cancéreuses (129). De plus, on remarque chez des souris une hyperplasie de la prostate lorsque le gène  $\beta$  est délété, conséquence non observée dans le cas où le gène de l'isoforme  $\alpha$  est délété (14). Dans certains cas de cancers du colon, il a été démontré que l'expression d'ER $\beta$  était diminuée lors de la transformation des cellules saines en cellules malignes, alors qu'aucun changement d'expression n'a été remarqué pour l'isoforme  $\alpha$  (130). Ces résultats suggèrent donc un rôle protecteur d'ER $\beta$  dans le cancer du colon.

### 1.3 SCL/TAL-1

(Stem cell leukemia/T-cell acute lymphoblastic leukemia 1)

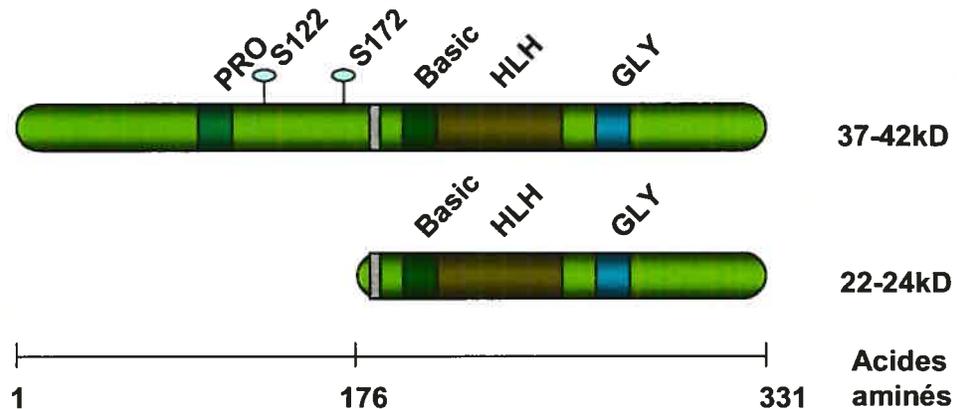
#### 1.3.1 STRUCTURE

Le gène *tal-1* est composé de huit exons distribués sur une séquence génomique de 16 kB. Il permet la production d'un facteur de transcription de type bHLH (motif basique d'hélice-tour-hélice) qui est requis pour le développement des cellules hématopoïétiques (131). La protéine contient donc un motif basique d'hélice-tour-hélice impliqué dans la liaison à l'ADN et dans le phénomène de dimérisation des protéines. Ce motif est retrouvé chez plusieurs régulateurs transcriptionnels connus comme participant à la croissance et la différenciation cellulaires (132). Des études *in vitro* ont montré que le domaine bHLH de Tal-1 médie sa dimérisation avec plusieurs protéines bHLH de classe A, incluant les produits des gènes E2A, E12 et E47 (133). L'hétérodimère contenant Tal-1 peut lier l'ADN de façon séquence-spécifique sur une boîte-E (E-box) : AACAGATGGT (134). La protéine Tal-1 contient également un domaine riche en proline, qui pourrait représenter un

domaine d'activation transcriptionnelle (135;136). En C-terminal, un domaine riche en glycine est présent, mais l'impact d'un tel domaine dans la structure de Tal-1 n'a pas vraiment été élucidé (137).

Deux différentes études ont confirmé la présence de deux phosphoprotéines majeures de Tal-1, la première de 37 à 42 kD (pp42) et la seconde de 22 à 24 kD (pp22), dans des lignées de cellules T et de cellules hématopoïétiques (138;139). La **figure 4** illustre la structure de ces protéines. La protéine pp42 contient deux sites de phosphorylation connus, soient les résidus S122 et S176. De plus, la traduction de l'isoforme longue ou de la courte dépend de l'épissage alternatif du gène *tal-1*, qui est contrôlé par une cadre de lecture ouvert situé en amont du gène. Ces éléments sont décrits plus en détail à la section 1.3.4.

Quatre gènes structurellement reliés à *tal-1* ont été identifiés, soit *lyl-1*, *tal-2*, *hen-1*, *hen-2*. Ces facteurs ne forment pas une famille de protéines, ni ne sont des isoformes de Tal-1. Certaines de ces protéines, telle que Tal-2, ont été identifiées dans des tissus exprimant Tal-1. Les gènes *lyl* et *tal-2* ont été identifié au niveau de translocations dans des tumeurs de cellules T (140;141). Les gènes *lyl-1*, *tal-2*, *hen-1* et *hen-2* codent pour des facteurs de transcription dont le domaine bHLH est semblable à celui de Tal-1. À ce jour, aucune évidence ne suggère de similarités de fonction ou de régulation entre ces gènes et *tal-1*.



**Figure 4: Schéma représentant la protéine Tal-1, les différentes isoformes pouvant être obtenues par épissage alternatif.**

La région en C-terminal comprenant le domaine bHLH est présente chez tous les variants transcriptionnels. C'est la portion de la région N-terminale excisée qui change selon la régulation du cadre de lecture ouvert situé en amont du gène.

### 1.3.2 EXPRESSION DE TAL-1 DANS LES TISSUS HUMAINS

Plusieurs études sur l'expression de l'ARNm de *tal-1* dans différentes lignées cellulaires et tissus ont démontré que l'ARNm de *tal-1* était fortement exprimé dans les lignées cellulaires érythroïdes, plaquettaires et mastocytaires (142-146). L'ARNm de *tal-1* a également été identifié dans les cellules endothéliales, notamment dans les vaisseaux sanguins de la rate (147).

Des expériences d'immunocytochimie ont permis de caractériser l'expression de Tal-1 en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine humaine (137). Le **tableau II** témoigne des résultats de ces recherches et montre les taux d'expression de la protéine retrouvée dans plusieurs tissus humains, ainsi que la localisation cellulaire de la protéine dans ces tissus. Notamment durant l'embryogénèse, Tal-1 est exprimée spécifiquement aux sites hémogéniques (131;148-151) ainsi que dans les tissus endothéliaux et neuronaux (131;145;147;150;152;153). Cette importance de Tal-1 dans le développement embryonnaire a été révélée en délétant le gène chez des souris, résultant en une létalité embryonnaire. De plus, il est connu que l'hématopoïèse est un phénomène qui arrive par vagues au cours du développement, mais également au cours de la vie adulte (154). Les connaissances acquises à ce jour sur Tal-1 montrent que le patron d'expression de Tal-1 semble être impliqué dans ce mouvement.

La présence de la protéine Tal-1 dans les cellules hématopoïétiques suggère encore une fois un rôle dans leur différenciation et leur demi-vie cellulaire. Il est aussi très intéressant de constater la présence de Tal-1 dans des tissus non-hématopoïétiques. En effet, les fonctions physiologiques démontrées concernent l'hématopoïèse et la leucémogénèse, mais la présence de Tal-1 dans d'autres tissus porte à croire que cette protéine pourrait avoir d'autres fonctions au sein de l'organisme (section 1.3.3). Il est également intéressant de constater que le patron d'expression de Tal-1 a été fortement conservé au cours de l'évolution, puisqu'il est très semblable de la levure du boulanger aux mammifères (155;156). Puisque que la structure du gène est aussi très homologue à travers ces espèces, il est attendu que les fonctions physiologiques de Tal-1 pourraient avoir été en grande partie conservées à travers l'évolution.

**Tableau II : Réactivité des anticorps monoclonaux contre Tal-1 sur des tissus humains normaux.**

Tissu	2TL170	2TL75 et 2TL242	BTL73
Foie foetal	++++ Noyau des précurseurs érythroïdiques et des plaquettes	+++++ Noyau des précurseurs érythroïdiques et des plaquettes	+++++ Comme 2TL75 et 2TL242
Moëlle épinière	+++ Noyau des précurseurs érythroïdiques et des plaquettes	++++ Noyau des précurseurs érythroïdiques et des plaquettes	++++ Comme 2TL75 et 2TL242
Sang	-	-	-
Tonsille palatine	+/- Noyau de quelques cellules endothéliales	+/- Noyau et cytoplasme de quelques cellules endothéliales et de macrophages du tissu conjonctif	+/- Comme 2TL75 et 2TL242
Thymus	-	+/- Certains noyaux endothéliaux des vaisseaux larges	+/- Comme 2TL75 et 2TL242
Rate	+/- Quelques noyaux endothéliaux de la pulpe rouge	+/- Lumière interne des sinusoides, des endothélium et des macrophages de la pulpe rouge	+/- Comme 2TL75 et 2TL242
Poumon	-	+/- Noyau et cytoplasme des macrophages	+/- Noyau et cytoplasme de seulement quelques macrophages
Rein	-	+/- Quelques noyaux endothéliaux et macrophages du glomérule	+/- Quelques noyaux endothéliaux
Foie	-	-	-
Cervelet	-	+ Noyau et cytoplasme de quelques macrophages	ND
Utérus	-	+ Muscle lisse	+ Muscle lisse
Muscle cardiaque	-	-	-

Les plus et moins indiquent l'intensité du marquage. Ce tableau a été adapté à partir de Pulford K. et al. 1995 (137).

### 1.3.3 FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES

Tal-1 est un facteur de transcription bHLH et un régulateur essentiel à plusieurs niveaux durant l'hématopoïèse. Une régulation inappropriée de ce facteur contribue au

développement de la leucémie pédiatrique T-ALL (T-cell acute lymphoblastic leukemia), dont il sera question la section 1.3.5.

L'hématopoïèse est caractérisée par la production d'une douzaine de types cellulaires distincts via la différenciation régulée de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes et de progéniteurs oligo-potents (154). Plusieurs études de gènes cibles chez les souris ou des cellules en culture ont mené à l'identification de plusieurs régulateurs, dont Tal-1, ayant des fonctions non-redondantes à différents stades de différenciation cellulaire de l'hématopoïèse (157). Des études où le gène *tal-1* a été rendu inactif ont confirmé un rôle crucial de Tal-1 dans l'hématopoïèse. Notamment, chez des souris nulles pour le gène *tal-1*, on a remarqué une absence d'hématopoïèse dans le sac vitellin (158;159) et des problèmes de développement des lignées hématopoïétiques, tant chez les souris immatures que chez les adultes (160;161). D'autres études ont rapporté des problèmes dans la mégakaryopoïèse et l'érythro-poïèse suite à l'absence du gène *tal-1* (162). Les détails mécanistiques de l'implication de Tal-1 dans ces nombreux phénomènes restent encore à être clairement établis.

Des recherches ont éclairé le rôle physiologique de Tal-1 comme étant un des régulateurs les plus précoces dans la spécification des cellules souches hématopoïétiques. Tal-1 est nécessaire à l'autonomie cellulaire pour la génération des cellules hématopoïétiques primitives et définitives, ceci ayant été démontré chez des souris *tal-1<sup>-/-</sup>* (160;161). Ces conclusions ont été confirmées par d'autres recherches démontrant que la spécification des compartiments hématopoïétiques primitifs et définitifs requiert l'expression de Tal-1 dans les précurseurs mésodermaux durant le stade mésodermale de développement (163).

D'autres études ont démontré que Tal-1 fonctionnait à l'interface entre les lignées hématopoïétiques et vasculaires endothéliales, ces lignées provenant des hémangioblastes (164). En fait, des cellules souches embryonnaires *tal-1<sup>-/-</sup>* sont incapables de générer ces précurseurs pluripotents, impliquant donc Tal-1 dans la spécification des hémangioblastes (165-168). Plus concrètement, certaines études ont tenté d'identifier des gènes ciblés par Tal-1. Plusieurs évidences pointent vers quelques gènes potentiellement régulés par Tal-1 au cours de l'hématopoïèse et dans la maladie T-ALL. Ces gènes sont énumérés dans le **tableau III** (169).

**Tableau III :** Gènes cibles potentiels de Tal-1 durant le développement normal de l'hématopoïèse et dans la maladie T-ALL.

Type cellulaire	Cibles moléculaires
Cellules hémangioblastes/endothéliales	Flk-1, otogelin-like
Cellules souches/progénitrices	c-kit, GATA-1
Lignées plaquettaires/érythroïdiques	GATA-1, GPA, EKLF, otogelin-like
T-ALL	TALLA-1, RALDH-2, Pre-T $\alpha$ , CD4, TCR $\alpha/\delta$

Tableau tiré de Lécuyer E. et al. 2004 (169).

### 1.3.4 RÉGULATION

Différentes études portent à croire que Tal-1 soit régulée par des signaux extracellulaires. En effet, des recherches *in vitro* ont montré que la protéine kinase Erk-1 phosphoryle Tal-1 sur un résidu sérine en position S122 (170). Cette modification module ainsi le domaine de transactivation riche en proline situé dans la portion N-terminale de la protéine Tal-1 (171-174). Tal-1 est également phosphorylé sur son résidu S172 par la PKA. Cette modification affecte la liaison de Tal-1 à son motif boîte-E particulier sur l'ADN (175;176). Aussi, deux différents groupes ont identifié, par la méthode de double hybride, une protéine liant le GTP (guanosine triphosphate), soit DRG (development regulated GTP-binding protein), comme interagissant avec Tal-1 (177;178). Il semble que DRG augmente le pouvoir transformant de cellules fibroblastiques induit par c-myc/ras. Il a été suggéré que l'interaction entre DRG et Tal-1 est impliquée dans la réponse de Tal-1 à des voies signalétiques spécifiques (169). Enfin, d'autres laboratoires ont rapporté que la protéine Tal-1 est régulée par les différents taux de cytokines présents (179;180).

De plus, le gène *tal-1* peut lui aussi être sujet à une régulation stricte. Comme mentionné précédemment, il existe différents transcrits de *tal-1*, dépendamment de la portion en N-terminal transcrite (pp42 et pp22 majoritairement). La production de ces isoformes est contrôlée par un cadre de lecture ouvert situé en amont des transcrits *tal-1*. Cet uORF (upstream open reading frame) répond à des voies de signalisation qui régulent les facteurs eucaryotes d'initiation de la traduction (181). Même si ces différentes isoformes incluent des proportions variantes de la région N-terminale de la protéine Tal-1 complète, elles contiennent toutes le domaine bHLH. Il a été démontré que des isoformes distinctes favorisaient différemment la différenciation vers les voies érythroïde ou plaquettaire (169).

En somme, Tal-1 agit à titre de régulateur décisif à différents niveaux de l'hématopoïèse et semble représenter un effecteur en aval de plusieurs voies de signalisation.

### 1.3.5 IMPLICATION DANS LA LEUCÉMIE

Le gène *tal-1* est la cible la plus fréquente de réarrangements chromosomiques chez les patients souffrant de T-ALL. Ce gène a longtemps été suspecté comme un instigateur clé dans le développement des cellules T en cellules cancéreuses (135;136;142;182-187). Suite à ces réarrangements, Tal-1 devient exprimé inadéquatement dans les cellules T en développement, alors qu'il est normalement sous régulé durant la différenciation (188). Initialement, 12 à 25% des patients souffrant de T-ALL étaient répertoriés positifs pour des réarrangements chromosomiques du gène *tal-1* (135;189-191). Des études plus récentes ont démontré que l'expression ectopique de Tal-1 était détectée dans une proportion considérable d'échantillons T-ALL, sans qu'il y ait eu détection de réarrangements du locus de *tal-1* (191;192), appuyant la notion que l'activation de Tal-1 est un événement majeur dans la leucémogénèse.

Par contre, Tal-1 n'est que peu oncogénique lorsqu'il est exprimé dans le thymus de souris transgénique (193-196). En effet, il semble plutôt collaborer efficacement avec d'autres oncogènes tels que v-ABL, la caséine kinase II (CKII), N-Ras, p53 et les protéines LIM-only LMO1 et LMO2, pour favoriser l'induction agressive de tumeurs dans les cellules T *in vivo* (139;188;194-199). Les oncogènes LMO1 et LMO2 sont également des cibles de réarrangements chromosomiques dans la maladie T-ALL (200;201) et ont été trouvés associés spécifiquement à Tal-1 dans des extraits de cellules leucémiques (201-203). Cette relation entre les protéines LMO et Tal-1 est également retrouvée durant l'hématopoïèse dans des tissus normaux. Tal-1 et les protéines LMO présentent des patrons d'expression qui se chevauchent dans les sites hématopoïétiques précoces et dans les lignées hématopoïétiques adultes (148;204-207). L'interaction Tal-1/LMO semble donc jouer un rôle central durant l'hématopoïèse normale et dans la génération de T-ALL, rôle surtout situé au niveau d'activation de gènes cibles.

Un autre mécanisme par lequel Tal-1 semble exercer ses effets oncogéniques passe via l'inhibition des fonctions normales des protéines-E E2A et HEB, qui sont d'importants

régulateurs de la différenciation des lymphocytes (188;197;208-210). La protéine E2A a d'ailleurs été démontrée comme possédant des caractéristiques d'un suppresseur de tumeur dans les cellules T (211-213). C'est donc à travers son interaction avec E2A que Tal-1 peut interférer avec ses fonctions régulatrices normales durant la différenciation des cellules T. D'autres études ont suggéré que Tal-1 aurait une fonction anti-apoptotique dans les lignées T-ALL, fonction relevée lorsque l'activité d'E2A est restaurée (214;215). L'identification de plusieurs autres facteurs bHLH, tels que LYL-1, Tal-2 et BHLHB1, comme cibles de translocations dans la leucémie T-ALL suggère que l'inhibition des protéines E semble une façon récurrente de favoriser la génération de leucémie au niveau des cellules T (140;192;216-218).

#### 1.4 ER ET TAL-1

Des travaux antérieurs ont établi qu'ER activé par l'estrogène était requis pour le renouvellement intrinsèque (self-renewal) à long terme des progéniteurs érythroïdes aviaires exprimant c-ErbB (219). La différenciation terminale des cellules progénitrices est induite lorsque les facteurs à 'self-renewal' sont enlevés et remplacés par les facteurs de différenciation. Une régulation appropriée de la balance entre la différenciation terminale et le 'self-renewal' est très importante pour générer le nombre adéquat d'érythrocytes matures dans flux sanguin au cours de la durée de vie de l'organisme.

Quoique la fonction majeure d'ER semble être reliée au système reproducteur féminin, il a été démontré que l'estrogène augmente le nombre de cellules érythroïdes dans les souris *in vivo* (220;221), et que cette hormone est requise *in vitro* pour la prolifération des cellules érythroïdes aviaires (222). Il est également connu qu'ER est capable d'arrêter ou de retarder la différenciation érythroïde, dépendamment de son niveau d'expression (212). L'activation d'ER inhibe l'expression de plusieurs gènes normalement induits dans les stades tardifs de différenciation. Dans des cellules surexprimant ER, ce dernier peut former un complexe protéique avec le facteur de transcription érythroïde-spécifique Gata-1 (223). Cette interaction est hormono-dépendante et réprime Gata-1. Il est possible que l'inactivation partielle de Gata-1 par l'ER puisse contribuer à l'arrêt de la différenciation durant le 'self-renewal' des progéniteurs érythroïdes (219).

Une étude a démontré qu'ER surexprimé pouvait affecter la différenciation érythroïde à n'importe quel stade et qu'ER avait un rôle dans le contrôle transcriptionnel de gènes normalement surrégulés lors de la différenciation érythroïde (219). L'expression des gènes de Gata-1, de Tal-1 et des gènes de globine est réprimée en présence d'estrogène. Cette répression est indépendante de la liaison d'ER à l'ADN et implique des corépresseurs. Le domaine AF-2 est requis pour permettre la répression de ces gènes par ER (214).

Peu d'études font le pont entre Tal-1 et l'ER. Les résultats présentés ci-dessus ont été effectués sur des systèmes cellulaires érythroïdes, et seul le récepteur ER $\alpha$  est pris en considération. Tal-1 n'a pas été répertorié dans d'autres cancers que la leucémie T-ALL. Néanmoins, il semble que lorsque surexprimé, l'ER a la capacité d'influencer négativement l'expression de Tal-1, ceci dans un contexte hématopoïétique.

## 1.5 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Notre laboratoire se concentre sur la régulation des ERs. Ces récepteurs voient leur activité transcriptionnelle influencée par la liaison du ligand, l'estrogène, et d'anti-estrogènes tels que le fulvestrant et le tamoxifène. Leur activité transcriptionnelle est également modulée par des voies de signalisation qui ciblent le domaine AF-1 des récepteurs. Notamment, la signalisation des facteurs de croissance, des seconds messagers PKA et PKC, des cytokines, mais surtout des MAPK mène à la phosphorylation de sites spécifiques du domaine AF-1. Ces sites de phosphorylation sont uniques à chacune des isoformes des ERs. Les complexes protéiques de corépresseurs et de coactivateurs régulent également l'activité des récepteurs. Des différences structurales au niveau du domaine AF-1 des récepteurs suggèrent des rôles physiologiques spécifiques à chacune des isoformes et des mécanismes de régulation différents.

Des essais de criblage d'interaction de type protéine-protéine récemment effectués dans notre laboratoire ont permis d'identifier Tal-1 comme étant une protéine capable d'interagir avec la portion N-terminale d'ER $\beta$ . Suite à cette découverte, nous voulons évaluer le rôle de la présence de Tal-1 sur l'activité transcriptionnelle des ERs, plus particulièrement de l'isoforme  $\beta$ . Comme les ERs ont différents mécanismes d'activation, nous voulons déterminer l'impact de Tal-1 sur l'activation du domaine AF-1 par la

signalisation des MAPK, mais également sur la réponse hormonale, qui implique la région AF-2.

Le rôle de Tal-1 dans la tumorigénèse mammaire n'a pas été rapporté à ce jour. Étant donné que les résultats de criblage montrent une interaction entre ER $\beta$  et Tal-1 et que les ERs sont fréquemment associés à un contexte de tumeur mammaire, nous désirons évaluer l'expression de Tal-1 dans des cellules de cancers du sein en culture. Enfin, nous voulons confirmer l'interaction entre ER $\beta$  et Tal-1 suggérée par les essais de criblage.

Les méthodes choisies pour mener à bien ces expériences impliquent des essais luciférase, utilisant le gène rapporteur de la luciférase dans des cellules en culture n'exprimant pas de façon endogène ER $\beta$ , ni Tal-1. L'utilisation de ce gène rapporteur permettra de mesurer l'activité transcriptionnelle d'ER sur un ERE en présence ou en absence de Tal-1. De plus, des expériences de RT-PCR (reverse transcription – polymerase chain reaction) seront effectuées afin de déterminer s'il y a expression de Tal-1 dans des lignées cellulaires de cancers du sein. Des essais de type 'coprécipitation avec protéine couplée à la GST' et de double hybride seront utilisés afin de confirmer l'interaction entre ER $\beta$  et Tal-1. Finalement, nous désirons développer une lignée exprimant de façon endogène ER $\beta$  par transfection stable et sélection avec antibiotique afin d'évaluer ultérieurement l'impact de Tal-1 sur l'expression de gènes cibles d'ER $\beta$ .

## **2 MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 2.1 VECTEURS D'EXPRESSION

Le plasmide d'expression du récepteur des estrogènes murin mER $\beta$  (pCMX-mER $\beta$ -549) a été construit en introduisant un fragment en 5' du gène mER $\beta$  à l'aide des sites *SalI*-*BstEII* (GenBank accession number AF067422) dans le vecteur pCMX-mER $\beta$  (de 485 résidus) de 2.1 kb décrit antérieurement (126). Ce fragment allonge le cadre de lecture ouvert du gène mER $\beta$  de 64 acides aminés placés en N-terminal, ce qui l'amène à 549 résidus. Le gène de mER $\beta$  de 549 résidus se retrouve donc bordé des sites de restrictions *SalI* et *EcoRI* dans le vecteur pCMX.

Le vecteur d'expression du mutant de délétion pCMX-ABC $\beta$  (résidus 1- 244) a été obtenu par digestion enzymatique avec *SmaI* suivi d'une auto-ligation. Le vecteur d'expression du mutant de délétion pCMX-CDEF $\beta$  (résidus 164-549) a été construit en amplifiant par méthode PCR la région comprenant les domaines C à F du récepteur puis inséré dans le vecteur pCMX avec les enzymes *SalI* et *EcoRI*.

Le vecteur d'expression GEX-2T-ABC $\beta$  a été créé par digestion enzymatique de pCMX-ABC $\beta$  avec *SalI* et *EcoRI* et insertion dans le vecteur GEX-2T par les mêmes enzymes. Le plasmide d'expression de pCMX-Gal-ER $\beta$  a été créé en insérant le domaine de liaison de Gal obtenu par amplification PCR dans le vecteur pCMX, puis nous avons inséré ER $\beta$  avec les enzymes *SalI* et *EcoRI*.

Les mutations ponctuelles des résidus sérines pour le vecteur pCMX-mER $\beta$  ont été générées par mutagenèse via la méthode PCR en utilisant la polymérase *Pfu* (Stratagene). Le vecteur d'expression pCMX-YFP-mER $\beta$  a été créé en excisant la séquence de 549 acides aminés du plasmide d'expression pCMX-mER $\beta$  par les enzymes de restriction *SalI* et *EcoRI*, puis cette séquence a été insérée dans le vecteur pCMX-YFP par les mêmes enzymes de restriction.

Le vecteur d'expression pCMX-mER $\alpha$  a été produit en ligant le fragment de 1.9 Kb limité aux extrémités par les sites de digestion *NaeI*-*EcoRI* de mER $\alpha$  dans les sites adéquats du vecteur d'expression eucaryote pCMX. Le gène rapporteur vitA2-ERE-TKLuc a été obtenu en effectuant la ligation de l'oligonucléotide vitA2-ERE dans le vecteur pGL3-Tkluc digéré avec les enzymes de restriction *SalI* et *BamHI*.

Le plasmide d'expression pCMX-hTal-1 a été obtenu en sous-clonant le produit PCR obtenu à partir de RT de cellules Jurkat. L'insertion du fragment s'est faite par les enzymes de restriction *Sall* et *EcoRI*. Cette construction a été séquencée et correspond à la séquence disponible pour hTal-1 sur GenBank (accession number NM003189). Le plasmide d'expression pCMX-CFP-hTal-1 a été obtenu en excisant la séquence de hTal-1 de pCMX-hTal-1 par les enzymes de restriction *Sall* et *EcoRI* et en insérant ce fragment dans le vecteur pCMX-CFP avec les mêmes enzymes de restriction.

Le plasmide d'expression pCMX-VP16-hTal-1 a été créé de la même façon que pCMX-CFP-hTal-1. Le vecteur d'expression pCMX-VP16-Tal1-Cterm est obtenu en amplifiant par méthode PCR la région C-terminale de l'ADNc de *tal-1* et en la sous-clonant dans le vecteur pCMX-VP16 avec les enzymes *Sall* et *EcoRI*. Le vecteur d'expression pCMX-VP16-Tal1-Nterm est obtenu en excisant la région C-terminale du vecteur pCMX-VP16-hTal-1 avec les enzymes *SmaI* et *NheI*. Les vecteurs d'expression pCMX-RasV12, pCMX-Mekk1, pCMX-Erk1 et CMX-VP16 sont décrits dans les références (37;224).

## **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<sup>0</sup>C contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules HEK 293-T sont maintenues dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté avec 5% de sérum fœtal bovin (FBS) (Gibco), alors que les cellules Hs-578t et MCF-7 sont maintenues dans le même milieu mais supplémenté de 10% de FBS. Les cellules MDA-MB-468 et Jurkat sont maintenues dans du milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium) supplémenté avec 10% de FBS. Pour les expériences d'essais luciférase, les cellules sont transférées dans du milieu DMEM en absence de rouge de phénol, avec 5% de FBS prétraité avec du charbon activé pour minimiser les effets estrogéniques du milieu de culture complet. À 50-60% de confluence cellulaire, les cellules sont transfectées avec 1,5 µg d'ADN total incluant 500 ng du plasmide rapporteur ERE-tkluc, 100 ng de vecteur d'expression de ER, 100 ng ou 300 ng de hTal-1 et 200 ng des vecteurs d'expression de RasV12, Mekk1 ou Erk1 par la méthode de précipitation de l'ADN au phosphate-calcium (225). Cinq à six heures après la

transfection, le milieu DMEM est remplacé par du milieu frais contenant 10 nM de 17 $\beta$ -estradiol (Sigma). Après 16 heures, les cellules sont recueillies et lysées avec 1% Triton X-100. L'essai luciférase est alors réalisé pour déterminer les niveaux d'activité de la luciférase par l'addition de son substrat, la D(-)Luciférine (Roche) et l'activité 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  $\beta$ -galactosidase et exprimées en unités relatives de luciférase (RLU). Les RLU sont converties en niveau 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 EXTRACTION D'ARN, TRAITEMENT À LA DNASE, RT-PCR**

Les cellules MCF-7, Jurkat et MDA-MB-468 sont transférées dans des plaques à 6 puits (Corning) dans le milieu DMEM / RPMI respectivement, sans phénol rouge. 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 (Ambion) est effectué sur l'ARN total pour éliminer toute trace contaminante d'ADN génomique. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 10 000 g et l'ARN est conservé pour la transcription inverse (RT). Pour cette réaction, le kit RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) est utilisé, avec les amorces d'oligo (dT)<sub>18</sub> fournis, sur 200 ng d'ARN total. Les étapes suggérées par le fabricant 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  $\mu$ l en utilisant 1/10 de la réaction de RT, 1U de Taq polymérase (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de dATP, dTTP, dCTP et dGTP (Invitrogen), 0,5  $\mu$ mol/ $\mu$ l de chaque amorce nucléotidique ainsi que du tampon de réaction à 1X 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 autour de 100 paires de bases. Les paires d'amorces utilisées sont les suivantes : hTal-1 5' GGATGCCTTCCCTATGTTCCACC 3' et 5' GATACGCCGCACAACTTTGG 3'; hER $\beta$

5' GCTTTGGTTTGGGTGATTGCC 3' et 5' TCCAGCAGCAGGTCATACTG 3'; hGAPDH 5' CCATGGAG AAGGCTGGGG 3' et 5' CAAAGTTGTCATGGATGACC 3'. La température d'hybridation est de 55°C pour les deux combinaisons d'amorces. La durée des étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation est de 30 secondes, pour 30 cycles.

## 2.4 MICROSCOPIE À FLUORESCENCE

Les cellules HEK 293-T sont transférées dans des plaques de 6 puits (Corning) puis transfectées tel que décrit ci-dessus (section 2.2) avec les plasmides d'expression pCMX-YFPmER $\beta$  et/ou pCMX-CFP-hTal-1. Le milieu est changé après six heures et les cellules sont laissées à l'incubateur pour 16 heures. Les cellules sont lavées avec du PBS et fixées avec du 4% formaldéhyde (15 minutes) à température de la pièce. Les cellules sont rapidement rincées avec du PBS et 300nM de DAPI est ajouté par puits et laissé une à cinq minutes, suivi de trois lavages de cinq minutes avec du PBS. Les cellules sont ensuite visualisées au microscope (Nikon) en utilisant des longueurs d'onde d'excitation de 430 nm et 500 nm, ce qui résulte en des longueurs d'onde d'émission de 475 et 540 nm pour le CFP et le YFP respectivement.

## 2.5 DOUBLE HYBRIDE

Les cellules HEK-293 sont cotransfectées dans des plaques de 24 puits (Corning) avec 500 ng du vecteur d'expression du gène rapporteur de la luciférase couplé au domaine de liaison de Gal, 100 ng de vecteur d'expression pCMX-Gal-ER $\beta$  ou pCMX-Gal-ER $\alpha$ , 100 ng de pCMX-VP16-hTal-1 sauvage, de pCMX-VP16-Tal1-Cterm ou de pCMX-VP16-tal1-Nterm, et 200 ng des vecteurs d'expression de Mekk1 et Erk1 par la méthode de précipitation de l'ADN au phosphate-calcium (225). Après la transfection, les cellules sont traitées, incubées, lysées et l'activité luciférase est mesurée tel que décrit à la section 2.2

## 2.6 COPRÉCIPITATION DE PROTÉINE COUPLÉE À LA GST (PULL DOWN)

Des protéines de fusion avec la portion N-terminale d'ER $\beta$  (GST-ABC $\beta$ ) sont préalablement produites dans un système bactérien, isolées, puis purifiées. Les protéines obtenues contiennent l'étiquette GST, qui a une grande affinité pour le glutathion lié aux billes de Sépharose (Amersham). En mettant en contact les protéines de fusion et les billes de Sépharose-glutathion une heure à 4°C, les protéines se retrouvent liées aux billes (via l'interaction GST-glutathion), ce qui permet tout au long de l'expérience de suivre nos protéines de fusion. Une phosphorylation *in vitro* de 30 minutes des protéines de fusion liées aux billes est effectuée en utilisant la MAPK Erk1 (BioLabs). Cette étape permet de phosphoryler ER $\beta$  et ainsi de le rendre dans une conformation active. Nous pouvons alors comparer un ER $\beta$  basal avec un ER $\beta$  phosphorylé.

En parallèle, la traduction *in vitro* du vecteur d'expression pCMX-Tal-1 est effectuée selon les instructions du fournisseur (Promega, TNT coupled reticulocyte lysate systems). La protéine produite présente des méthionines marquées au  $^{35}\text{S}$ . La protéine Tal-1 marquée à la radioactivité est ensuite mise en contact pendant 90 minutes avec les protéines de fusion GST-ABC $\beta$  phosphorylées et liées aux billes. Les extraits sont lavés et seuls les culots sont conservés. Ces culots contiennent les billes de sépharose, liées aux protéines de fusion et, s'il y a eu interaction entre ABC $\beta$  et Tal-1, la protéine Tal-1 marquée est également présente dans le culot. Les protéines sont dénaturées en ajoutant du bleu de Laemmli et en bouillant les échantillons. Les extraits cellulaires sont ensuite mis sur gel d'acrylamide 10%. Le gel est séché et exposé pendant trois jours. Le film est finalement développé et la radioactivité qui a marquée le film correspond aux échantillons dans lesquels il y a eu interaction entre ABC $\beta$  et Tal-1.

Dans le but d'évaluer le rôle relatif de certaines sérines situées sur l'AF-1 de ER $\beta$ , nous avons fait les mêmes essais mais en utilisant des protéines de fusion GST-ABC $\beta$  dont certaines sérines ont été substituées par des alanines. Ces mutants sont GST-ABC $\beta$ -S94,106A, GST-ABC $\beta$ -S94,106,124A et GST-ABC $\beta$ -S69,94,106,124,154A, identifiés ainsi selon la position des résidus sérines pour lesquels ils sont mutés.

## 2.7 LIGNÉES STABLES

Les cellules de glande mammaire ER-négatives Hs-578t sont maintenues dans du DMEM (Sigma) supplémenté avec 10% de FBS (Gibco). Elles sont stablement cotransfectées avec 5 µg total d'ADN dans des plaques de 6 puits par la méthode de précipitation de l'ADN au phosphate-calcium (225). Une quantité de 2,5 µg des vecteurs d'expression pCMX-mERβ, pCMX-mERβS94,106A ou pCMX-mERα est utilisée en combinaison avec 2,5 µg du vecteur d'expression pcDNA3.1neo (contient la résistance à la néomycine). Le milieu de transfection est remplacé après six heures par du milieu frais. Les cellules croissent pendant 48 heures avant que la sélection à la néomycine commence. Le milieu des cellules est changé tous les deux jours et une quantité de 0,5 mg de G418 (GIBCO) est utilisée.

Les cellules n'ayant pas incorporé le vecteur contenant la résistance meurent et les cellules survivantes forment des îlots de cellules, ou foci. Un embout stérile de pipette est passé dans ces foci et des puits contenant du milieu frais avec antibiotique sont inoculés. Les cellules croissent jusqu'à une confluence de 80% et sont ensuite divisées pour être congelées et testées. Des essais luciférase (section 2.2) sont effectués sur chaque clone afin de vérifier l'activité en réponse au ligand estrogène, en comparant avec la lignée maternelle ER-négative, révélant ainsi la réponse estrogénique de ces clones.

### **3 RÉSULTATS**

Notre récente identification de Tal-1 comme étant un partenaire d'interaction avec ER $\beta$ , qui avait été suggéré par des études antérieures de criblage faites dans notre laboratoire, ceci nous a amené à formuler l'hypothèse que Tal-1 était impliqué dans la régulation transcriptionnelle d'ER $\beta$ . Pour débiter, nous voulions trouver au moins un modèle cellulaire pouvant exprimer les ER et Tal-1, de manière à démontrer qu'il était physiologiquement possible qu'ils interagissent ensemble.

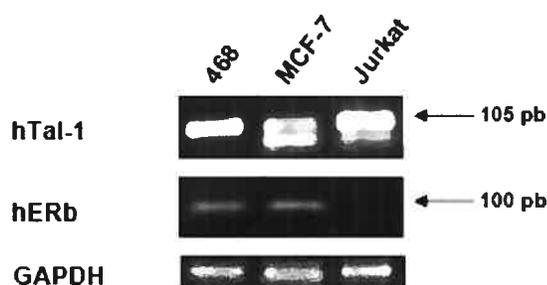
Étant donné l'implication des ER dans le cancer du sein, nous avons voulu déterminer si Tal-1 était exprimé dans des cellules de cancers du sein en culture. L'ARN total de cellules MCF-7 et de cellules MDA-MB-468 a donc été extrait par la méthode de TRIzol dans le but d'effectuer des analyses de type RT-PCR sur ces extraits. Les cellules MCF-7 sont des cellules de cancers du sein qui expriment de façon endogène les deux isoformes des ER. Les cellules MDA-MB-468 sont des cellules mammaires métastatiques exprimant également de façon endogène les ER. L'ARN de cellules Jurkat (cellules provenant de la maladie T-ALL) a également été extrait, afin de servir de contrôle positif pour la protéine Tal-1, puisque notre laboratoire a cloné le gène Tal-1 à partir d'extraits d'ARN messagers de ces cellules.

Comme attendu, la **figure 5** montre que l'ARNm de *tal-1* est présent dans les cellules Jurkat, alors que ER $\beta$  est exprimé dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-468. Il est intéressant de voir que l'ARNm de *tal-1* est présent dans les deux lignées cellulaires de cancers du sein, suggérant qu'il est physiologiquement possible que la protéine Tal-1 puisse interagir avec les ER dans ces types cellulaires. De plus, la présence de Tal-1 n'avait pas été rapportée à ce jour dans des cellules du sein, encore moins dans des cellules de cancers du sein. Ces résultats amènent une piste intéressante à savoir qu'elle pourrait être l'implication de Tal-1 dans ces tissus. On remarque toutefois la présence de bandes additionnelles pour les amorces Tal-1 sur les extraits de cellules MCF-7 et Jurkat. Il est improbable que les bandes plus basses correspondent à l'amplification de formes mineures de Tal-1 (37-41 kD), puisque que les amorces Tal-1 utilisées s'apparient dans une petite région au centre de la séquence, qui n'est pas située dans la région où l'épissage alternatif au niveau de l'ARN peut amener des variations dans la séquence. Donc même si ces autres formes sont présentes dans la population d'ARN de départ, reconnues et amplifiées, nous obtenons une seule bande pour ces différentes versions à 105 pb. Concernant la forme

tronquée de Tal-1, de 22 kD, rappelons qu'elle est obtenue par traduction débutant à un 2<sup>e</sup> codon de départ à partir de la séquence complète de Tal-1, et non pas par épissage alternatif. Ainsi, cette forme n'apparaît que suite à la traduction, qui se trouve en aval de l'analyse de type PCR. Ce n'est donc pas cette isoforme qui peut causer les bandes additionnelles. Il est plutôt possible que ces bandes soient dues à un appariement des amorces avec du matériel non-spécifique, ce qui concorderait avec le fait que cette bande additionnelle ne soit pas retrouvée chez tous les types cellulaires utilisés.

Pour pouvoir interagir ensemble, il est vraisemblable que Tal-1 et ER $\beta$  doivent avoir la même localisation cellulaire. Pour vérifier la localisation cellulaire de ces protéines, des cellules HEK-293 ont été transfectées avec pCMX-YFP-ER $\beta$ , pCMX-CFP-Tal-1 ou bien avec les deux. Le milieu est changé après six heures puis les cellules croissent pendant 16 heures, pour être finalement fixées. Les cellules sont observées au microscope optique.

La **figure 6** montre que la localisation subcellulaire de Tal-1 est nucléaire. La sublocalisation cellulaire d'ER $\beta$  est également nucléaire. La cotransfection des protéines ne semble pas influencer la localisation cellulaire de Tal-1 ni de ER $\beta$ , tel que montré dans la colonne 'merge' pour la troisième ligne de la **figure 6**. Nous avons également traité les cellules avec 10 nM de 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) pendant 16 heures et/ou cotransfectées les cellules avec le mutant constitutif de l'oncogène ras, soit RasV12. La quatrième ligne de la **figure 6** montre que le traitement à l'estrogène n'influence pas la localisation cellulaire de Tal-1, ni de ER $\beta$ , lorsque les cellules sont cotransfectées avec les deux plasmides d'expression. La cotransfection avec RasV12 n'a pas non plus d'impact sur la localisation des protéines, tout comme le traitement à l'estrogène cumulé à la cotransfection avec RasV12 (**figure 6, lignes 5 et 6**). Ceci suggère que même activé par l'estrogène et/ou RasV12, ER $\beta$  reste nucléaire, comme attendu par la littérature. La protéine Tal-1 elle aussi ne voit pas sa localisation cellulaire influencée par la présence d'ER $\beta$ , activé ou non, ce qui était prévisible puisqu'il s'agit d'un facteur de transcription. La confirmation de la localisation nucléaire d'ER $\beta$  et Tal-1 permet de dire qu'il est physiologiquement possible que ces protéines interagissent ensemble puisqu'elles sont retrouvées dans le même compartiment cellulaire.



**Figure 5: L'ARNm de Tal-1 est exprimé dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-468.**

Analyses de type RT-PCR pour évaluer l'expression de Tal-1 et ER $\beta$  dans les cellules MCF-7, MDA-MB-468 et Jurkat. L'ARN total des cellules a été extrait et les RT-PCR ont été fait avec les amorces spécifiques aux séquences d'ADNc humaines. Montrés sur ce gel d'électrophorèse : 10 $\mu$ L de produit PCR avec les amorces hTal-1 (ligne du haut), avec les amorces hER $\beta$  (milieu), ou avec les amorces GAPDH (ligne du bas) utilisé à titre de contrôle positif. Les produits PCR ont tous migrés à la hauteur attendue selon les amorces utilisées, soit 105 pb pour hTal-1 et 100 pb pour hER $\beta$ .

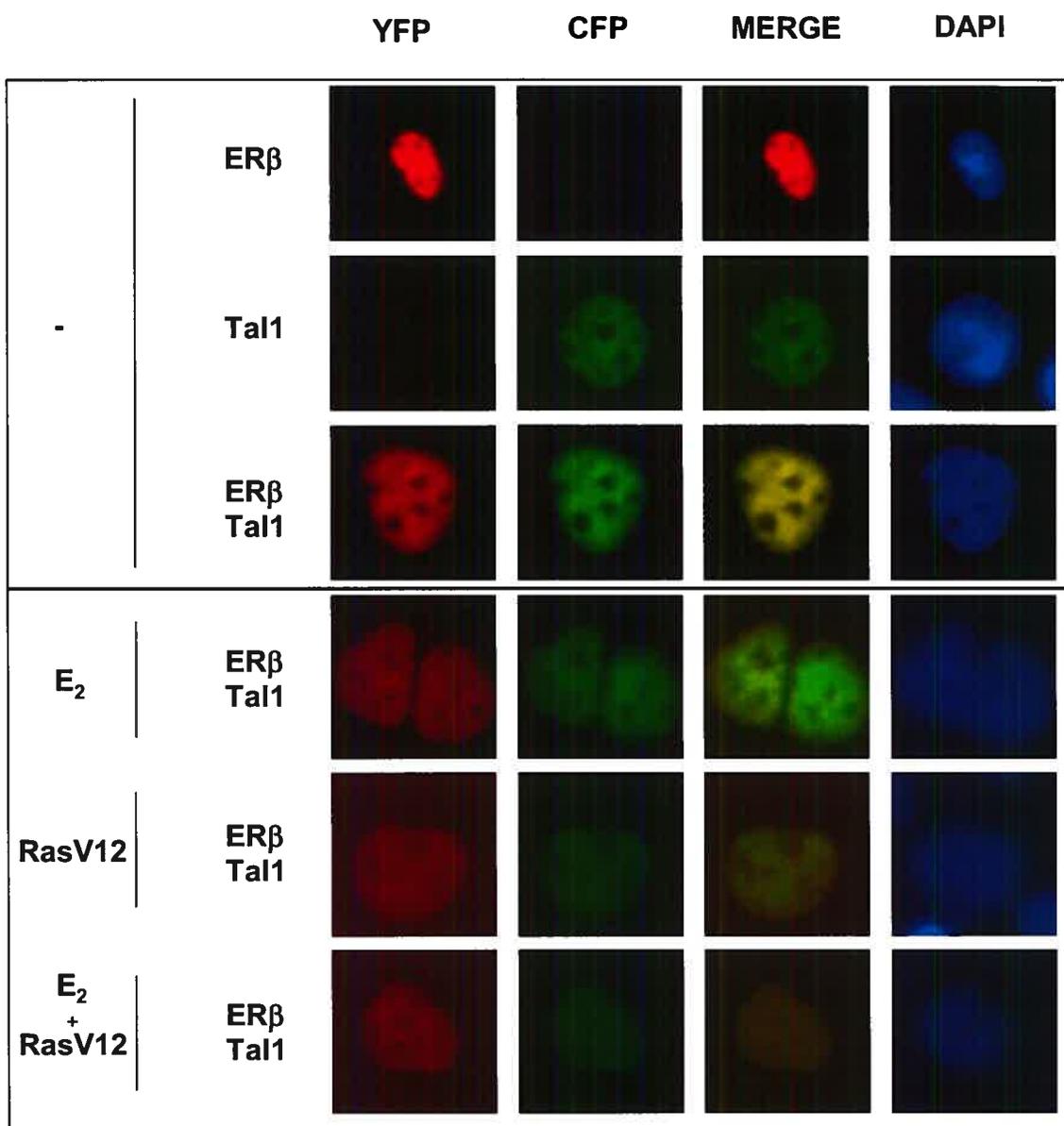
Étant donné que Tal-1 et ER $\beta$  sont coexprimés dans un même type cellulaire et qu'ils présentent une colocalisation cellulaire, nous avons évalué l'impact de Tal-1 sur l'activité transcriptionnelle d'ER $\beta$ . Pour ce faire, des essais luciférase ont été effectués dans des cellules HEK-293. Les cellules MCF-7 et MDA-MB-468 expriment les deux isoformes du récepteur, ce qui ne permet pas de mesurer l'effet de Tal-1 sur l'activité transcriptionnelle d'une isoforme des ER en particulier, c'est pourquoi les cellules HEK-293 ont été utilisées parce qu'elles n'expriment aucun des ER, ni Tal-1, de façon endogène. Ainsi, en transfectant transitoirement ces cellules avec le plasmide d'expression de l'isoforme de ER désirée, il nous est possible de distinguer l'effet de Tal-1 sur cette isoforme. Cette activité transcriptionnelle est mesurée via la cotransfection des cellules HEK-293 avec le vecteur du gène rapporteur de la luciférase couplé à un ERE. Ainsi, lorsque le récepteur lie son ERE, il active la transcription de la luciférase. En ajoutant un substrat de la luciférase aux extraits cellulaires, il est possible de mesurer l'activité de la luciférase et, par conséquent, l'activité transcriptionnelle d'ER.

Les cellules HEK-293 ont été cotransfectées ou non avec deux concentrations de Tal-1, tel que représenté à la **figure 7**, pour évaluer l'effet de sa présence sur l'activité

transcriptionnelle de ER $\beta$ . Les résultats obtenus à la **figure 7A** montrent que Tal-1 n'a pas vraiment d'effet sur l'activité transcriptionnelle basale d'ER $\beta$ .

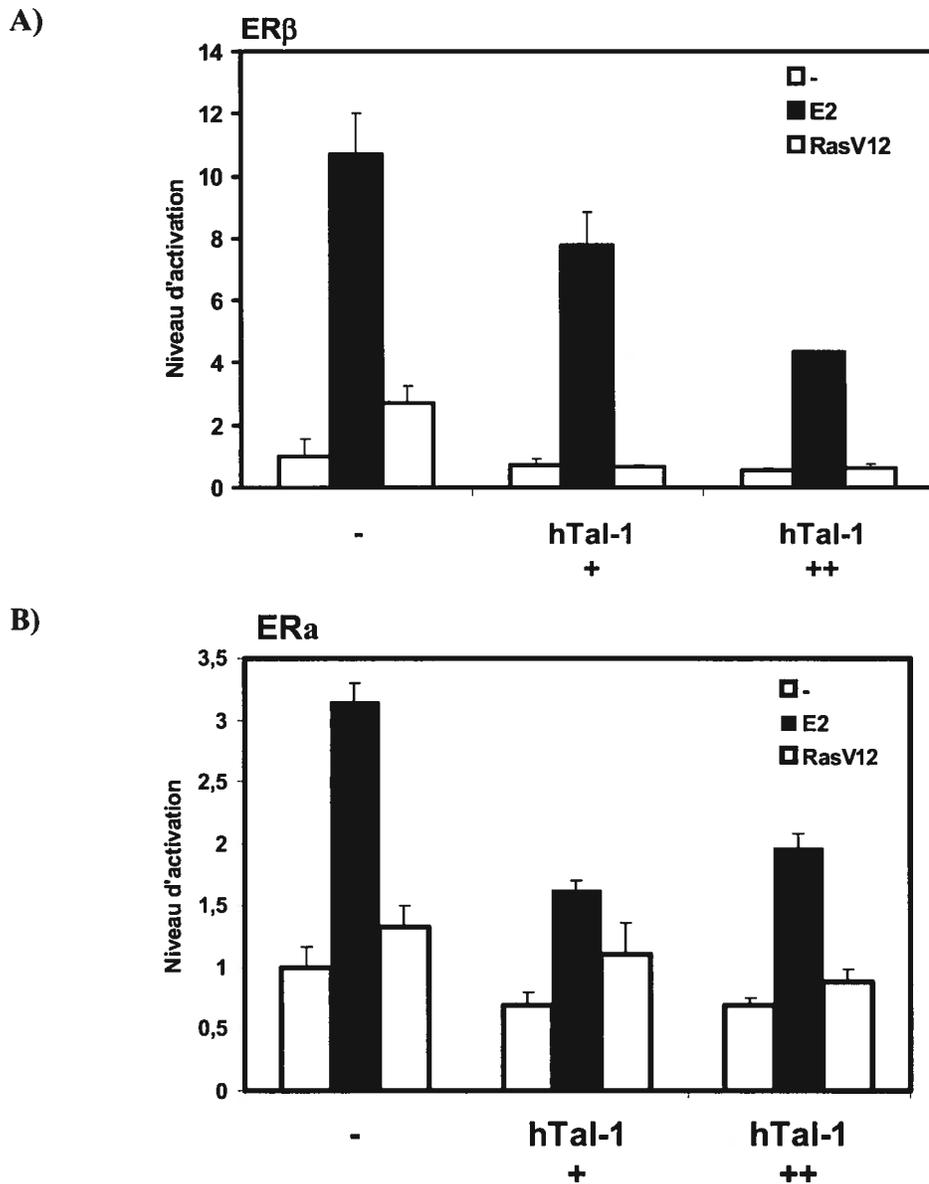
En plus de regarder l'effet de Tal-1 sur l'activité basale d'ER $\beta$ , nous avons voulu évaluer son impact sur la réponse du récepteur à son ligand. Pour ce faire, les cellules ont été traitées 16 heures avec 10 nM de 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>). La **figure 7A** montre qu'ER $\beta$  est activable par la liaison de son ligand, comme attendu. De plus, Tal-1 semble capable d'inhiber la réponse hormonale du récepteur. Cette inhibition semble être dose-dépendante, tel que démontré via l'utilisation de deux concentrations croissantes de Tal-1. Ces résultats suggèrent donc que Tal-1 inhibe l'activité AF-2 dépendante d'ER $\beta$ . Par contre, cette inhibition n'est que partielle puisque Tal-1 ne réussit pas à ramener le niveau d'activation d'ER en présence de son ligand à un niveau près du niveau d'activité basal. En effet, même si Tal-1 diminue la réponse d'ER $\beta$  à son ligand, il ne réussit pas à abolir complètement cette activation.

Comme mentionné précédemment, les ER peuvent être activés par la liaison de leur ligand, mais également suite à des phosphorylations venant des MAPK au niveau de leur domaine AF-1. Nous avons donc voulu évaluer l'impact de Tal-1 sur la réponse de ER $\beta$  à la signalisation des MAPK. Pour ce faire, nous avons cotransfecté les cellules avec le plasmide d'expression du mutant constitutif de l'oncogène Ras, soit RasV12. Ce mutant constitutif permet de déclencher la cascade de la voie de signalisation des MAPK, qui mène à la phosphorylation d'ER $\beta$  sur des sites présents dans sa région AF-1 en N-terminal du récepteur. La **figure 7A** montre que l'activation du récepteur induite par la signalisation de RasV12 est elle aussi inhibée par l'expression de Tal-1. Par contre, une relation dose-dépendante de peut pas vraiment être assumée ici, puisque la plus petite concentration de Tal-1 suffit à couper la réponse de ER $\beta$ . Cette inhibition semble être plus complète que partielle, étant donné que la présence de Tal-1 ramène ER $\beta$  à un niveau d'activation basal en présence de RasV12. Il est intéressant de noter que Tal-1 semble donc être capable d'influencer les deux mécanismes d'activation d'ER $\beta$ , soit celui par la liaison de l'estrogène, impliquant le domaine AF-2 du récepteur, et le mécanisme impliquant la phosphorylation de sites du domaine AF-1 du récepteur.



**Figure 6 : La localisation cellulaire de Tal-1 et ER $\beta$  est nucléaire.**

Observation au microscope optique de la fluorescence de Tal-1 et ER $\beta$ . La première colonne est observée avec un filtre pour la longueur d'onde de l'étiquette YFP. La seconde colonne est visualisée à l'aide d'un filtre ajusté pour la longueur d'onde de l'étiquette CFP. La troisième colonne, 'merge', est obtenue en superposant les deux premières colonnes. La coloration jaune indique une localisation des protéines au même endroit. La dernière colonne est obtenue avec un filtre UV qui détecte le DAPI utilisé lors de la fixation des cellules. Cette molécule est localisée dans le noyau et sert de repère visuel pour situer le noyau dans la cellule observée au microscope.



**Figure 7 : Tal-1 inhibe la réponse au ligand d'ER $\beta$  et d'ER $\alpha$ , mais inhibe aussi la réponse d'ER $\beta$  à la signalisation induite par RasV12**

**A.** Les cellules HEK-293 ont été cotransfectées transitoirement avec le vecteur du gène rapporteur ERE-Tk-luc, le plasmide d'expression du gène ER $\beta$  et avec ou sans les plasmides d'expression de Tal-1 et de RasV12. Les cellules sont transfectées pendant six heures et traitées ou non avec 10 nM de 17  $\beta$ -estradiol (E2). Deux concentrations de Tal-1 sont utilisées, soit 100 ng (+), représentant un rapport ER $\beta$ :Tal-1 de 1:1, et 300 ng (++), représentant un rapport ER $\beta$ :Tal-1 de 1:3. **B.** Les cellules HEK-293 sont cotransfectées comme en A sauf que le plasmide d'expression d'ER $\alpha$  est utilisé à la place d'ER $\beta$ . Les valeurs de luciférase ont été normalisées à partir de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase, puis exprimées en niveau d'activation.

Les deux isoformes des ERs ont une forte homologie pour leur domaine AF-2, impliqué dans l'activation hormonale. Puisque l'expression de Tal-1 semble inhiber la réponse au ligand d'ER $\beta$ , nous avons voulu vérifier s'il était capable du même effet pour ER $\alpha$ . La **figure 7B** montre que Tal-1 est capable d'inhiber de façon partielle la réponse hormonale d'ER $\alpha$ . Par contre, cette inhibition n'est pas dose-dépendante et ceci diffère des résultats obtenus à la **figure 7A**, où Tal-1 inhibait de façon dose-dépendante la réponse hormonale d'ER $\beta$ . De plus, comme on sait que l'homologie entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  au niveau de leur domaine AF-1 est très faible, nous avons voulu évaluer l'impact de Tal-1 sur la réponse d'ER $\alpha$  à la signalisation induite par RasV12. Les résultats présentés à la **figure 7B** montrent qu'ER $\alpha$  n'a pas de réponse significative à la signalisation induite par RasV12. Ces observations sont différentes de celles obtenues avec ER $\beta$ , où Tal-1 inhibait complètement la réponse d'ER $\beta$  à la signalisation induite par RasV12. La signalisation de l'oncogène Ras mène à la phosphorylation des deux isoformes de ER (section 1.2.3.2), mais les résultats présentés à la **figure 7** sont des mesures de l'activité transcriptionnelle des ER et non la phosphorylation de ceux-ci. Donc, malgré la signalisation induite par RasV12, il n'y a pas d'augmentation significative de l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  (**figure 7B**). L'expression de Tal-1 dans ce cas ne vient pas moduler l'activité transcriptionnelle de l'isoforme  $\alpha$ , ni de façon positive, ni de façon négative. Il y a donc des différences au niveau de la régulation de chacune des isoformes d'ER par l'expression de Tal-1.

Afin de déterminer si les effets de Tal-1 sur ER $\beta$  sont AF-1-dépendants ou AF-2-dépendants, nous avons utilisé des constructions tronquées d'ER $\beta$ . La **figure 8A** illustre la structure de ces constructions. La construction ABC $\beta$  est obtenue en excisant les domaines D, E et F, ce qui a pour conséquence d'enlever le domaine de liaison au ligand. Cette construction n'a donc plus la capacité de répondre à l'estrogène. Par contre, la région N-terminale du récepteur est conservée, de sorte que l'activation d'ABC $\beta$  peut se faire via la phosphorylation de sites sur son domaine AF-1.

L'autre construction tronquée du récepteur, CDEF $\beta$ , conserve la région C-terminale, les domaines A et B ayant été excisés. À l'opposé de la construction ABC $\beta$ , la version CDEF $\beta$  du récepteur a la capacité de répondre à l'estrogène, puisque son domaine de liaison au ligand est intact. Par contre, cette construction ne peut pas être la cible de phosphorylations

menées sur des sites en N-terminal, puisque cette section est absente du récepteur. Le but visé par l'utilisation de ces constructions est de déterminer si les effets inhibiteurs de Tal-1 sur ER $\beta$ , tels qu'observés à la **figure 7A**, requièrent la région N-terminale ou C-terminale.

Les résultats obtenus à la **figure 8B** nous indiquent que la construction ABC $\beta$  voit son activité transcriptionnelle augmentée suite à la cotransfection des cellules HEK-293 avec le plasmide d'expression de RasV12. Cette augmentation est toutefois plus forte qu'avec le récepteur sauvage (**figure 7A**). La présence de Tal-1 amène une inhibition de l'activation d'ABC $\beta$  par RasV12. Si ces résultats sont comparés à l'inhibition d'ER $\beta$  sauvage par Tal-1 en présence de RasV12, il est possible de dénoter que l'inhibition d'ER $\beta$  par Tal-1 n'est pas complète lorsque les domaines D, E et F du récepteur sont absents. Toutefois, il est possible que ce qui semble une moins bonne inhibition de ABC $\beta$  par Tal-1 soit dû à l'activation plus importante de cette construction par RasV12 par rapport à ER $\beta$  complet.

Par la suite, nous avons évalué l'effet de Tal-1 sur la réponse hormonale de la construction CDEF $\beta$  (**figure 8C**). Tel que prévu, cette construction est capable de répondre à l'estrogène de façon comparable au récepteur complet. Puis, l'expression de Tal-1 résulte en une inhibition de la réponse hormonale. Cette inhibition est aussi comparable à celle observée sur le récepteur complet (**figure 7A**). Il semble donc que l'absence des domaines A et B du récepteurs n'altère pas la capacité de Tal-1 à inhiber la réponse au ligand. Les résultats obtenus suite à l'utilisation des constructions tronquées d'ER $\beta$  nous amènent à suggérer que Tal-1 nécessite le domaine N-terminal pour inhiber l'activation du récepteur par RasV12, comme il nécessite le domaine C-terminal pour inhiber la réponse hormonale.

Suite aux résultats obtenus précédemment, nous avons voulu confirmer les études antérieures de criblage afin de valider une interaction entre Tal-1 et ER $\beta$ . Ces études avaient été effectuées avec une construction tronquée d'ER $\beta$ , soit ABC $\beta$ . Nous avons commencé par déterminer s'il y avait une interaction entre Tal-1 et ER $\beta$  en utilisant la méthode de 'pull down'. Des constructions de protéines de fusion ont été utilisées, et ces protéines ont été préalablement produites en les faisant exprimer dans des systèmes bactériens. Ces constructions couplent l'étiquette GST à la région N-terminale d'ER $\beta$  ou de différents mutants d'ER $\beta$ . Ces mutants sont ABC $\beta$ -S94,106A, ABC $\beta$ -S94,106,124A et ABC $\beta$ -S69,94,106,124,154A, identifiés ainsi à cause des résidus sérine substitués en

résidus alanine qu'ils contiennent respectivement. Sachant que plusieurs de ces sites de phosphorylation présents sur l'AF-1 d'ER $\beta$  sont impliqués dans la liaison de protéines corégulatrices, nous avons également phosphorylé *in vitro* le récepteur tronqué sauvage ou les mutants en utilisant la MAPK Erk1, dans le but d'évaluer s'il y avait des différences de recrutement de Tal-1 selon l'état de phosphorylation d'ER $\beta$ .

La **figure 9** montre les résultats obtenus suite à ces expériences. Il est possible de constater la présence de deux rangées de bandes d'interaction, une à 42 kD et une autre un peu plus bas. Il est envisageable que la rangée plus basse corresponde à une isoforme de Tal-1 plus courte (~37-40 kD) et due à un épissage alternatif du gène *tal-1*, qui mène à l'obtention des isoformes de 42 kD et 22 kD en majorité, mais qui peut également donner des versions légèrement plus courtes que ces isoformes majoritaires, tel qu'expliqué à la section 1.3.4. Une interaction avec le récepteur tronqué est visible lorsque le récepteur est dans un état basal, non activé. Par contre, en activant le récepteur via la phosphorylation par Erk1, nous observons une forte augmentation de l'interaction entre ABC $\beta$  et Tal-1. Il semble donc que ces observations confirment les études de criblage stipulant que Tal-1 peut interagir avec ABC $\beta$ . Ensuite, nous avons utilisé les constructions ABC $\beta$  dont certaines sérines avaient été mutées de façon à les rendre non-phosphorylables. Il est intéressant de remarquer que lorsque le récepteur ne peut être phosphorylé sur ces différentes sérines, l'interaction avec Tal-1 demeure beaucoup moins forte comparativement à lorsque le récepteur est activé par Erk1, en particulier lorsque les sérines 94 et 106 sont substituées. Néanmoins, Tal-1 est capable d'interagir avec les mutants, ce qui suggère que Tal-1 est capable d'interagir avec le récepteur non-phosphorylé, mais que l'activation du récepteur par Erk1 favorise fortement le recrutement de Tal-1 à ABC $\beta$ .

Pour approfondir l'implication des sérines 94 et 106 dans la relation entre Tal-1 et ER $\beta$ , nous avons utilisé le plasmide d'expression du mutant ponctuel pCMX-ER $\beta$ S94,106A pour des essais luciférase. La sérine 106 est connue comme impliquée dans l'activation d'ER $\beta$  par les MAPK et le recrutement de coactivateur (37). Les MAPK peuvent par contre cibler d'autres sites, par exemple la sérine 124. Ceci explique pourquoi à la **figure 10** le mutant ER $\beta$ S94,106A est quand même un activé par RasV12, quoique cette activation soit moins importante que celle normalement observée sur ER $\beta$  sauvage (**figure 7A**). Le mutant ER $\beta$ S94,106A peut répondre au ligand, puisque le domaine AF-2 n'est pas modifié. Les

résultats obtenus à la **figure 10** démontrent que Tal-1 est capable d'inhiber la réponse au ligand, tel qu'attendu puisqu'il inhibait la réponse hormonale d'ER $\beta$  sauvage. Pour la réponse à la signalisation induite par RasV12, il est possible de noter une diminution pour ce mutant ponctuel, mais celle-ci reflète probablement la diminution de l'activité basale par l'expression de Tal-1. En effet, en comparant les niveaux d'activation de ce mutant avec ceux observés avec le récepteur sauvage, on trouve que le mutant est déficient à répondre à RasV12 puisque le niveau d'activité passe de 3 fois à environ 1,4 fois. Néanmoins, le fait que Tal-1 réussisse à inhiber l'activité basale de ce mutant ponctuel suggère que la présence des sérines 94 et 106 n'est pas nécessaire à l'action répressive de Tal-1 sur l'activité transcriptionnelle d'ER $\beta$ .

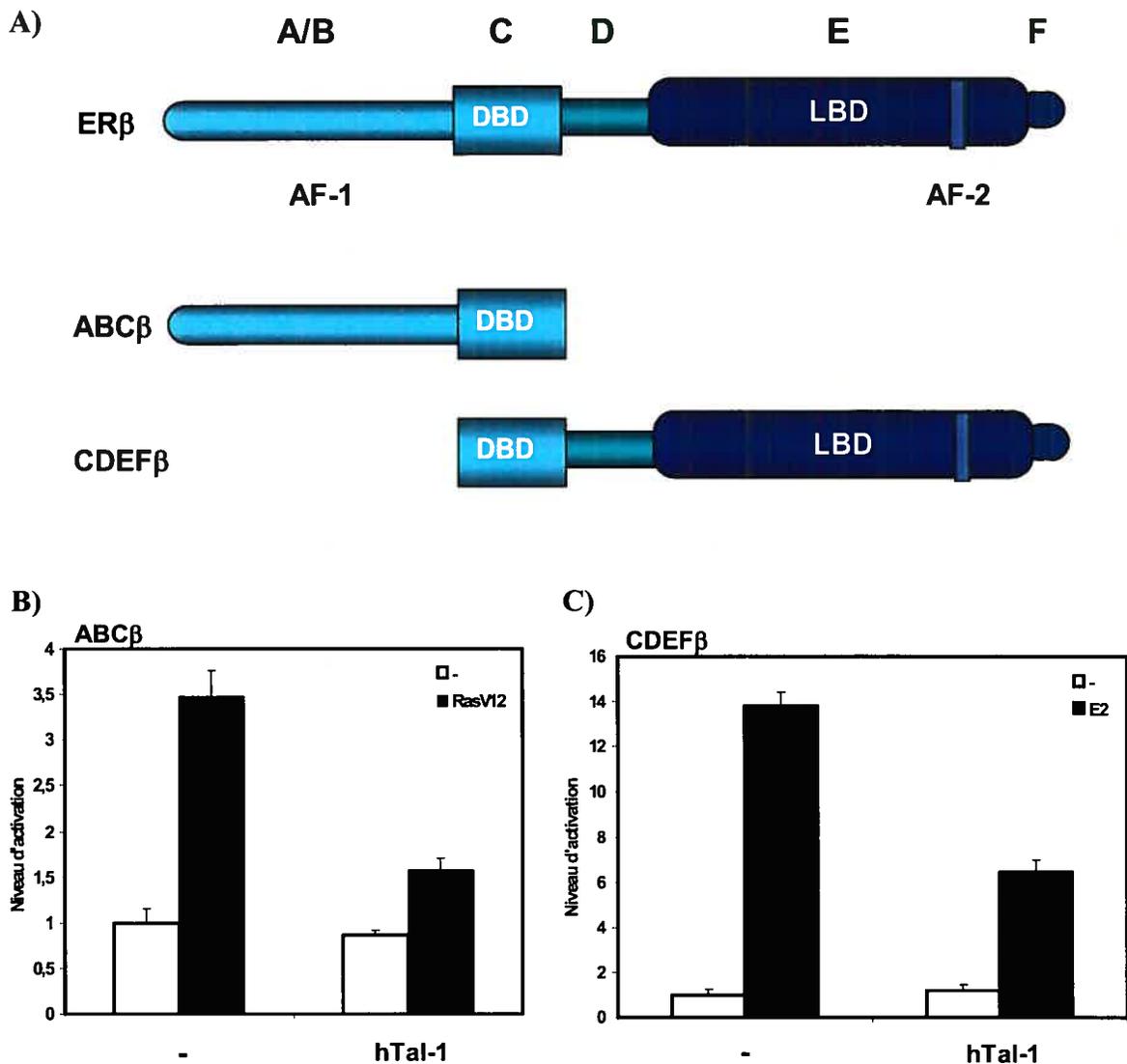
Connaissant un peu mieux l'implication des différentes régions d'ER $\beta$  dans sa relation avec Tal-1, nous avons voulu déterminer quelles composantes de Tal-1 étaient nécessaires pour son recrutement à ER $\beta$ . À cet effet, nous avons construit des versions tronquées de Tal-1, soit de la région N-terminale par digestion avec les enzymes de restriction adéquates et de la région C-terminale par amplification PCR (**figure 11**). Il est à noter que les sérines aux positions S122 et S172, démontrées comme des cibles phosphorylables par Erk1 et AMPc respectivement (161;166;167), ne sont présentes que dans la version sauvage de Tal-1, elles ne sont donc pas incluses dans la version N-terminale, ni dans la version C-terminale. Nous avons évalué l'interaction entre ER $\beta$  et les formes de Tal-1 dans un contexte cellulaire, soit en utilisant la méthode de double hybride dans des cellules HEK-293. Les constructions de Tal-1 ont été sous clonées dans le vecteur d'expression pCMX-VP16. La séquence d'ER $\beta$  a été sous clonées dans le vecteur d'expression pCMX-Gal. En cotransfectant les cellules HEK-293 avec ces constructions et avec le vecteur d'expression du gène rapporteur de la luciférase couplé à l'élément de réponse de Gal, soit UAS, la force d'interaction entre les deux protéines peut être mesurée par des essais luciférase.

La protéine de fusion Gal-ER $\beta$  seule a la capacité de lier l'élément de réponse UAS et d'induire la transcription du gène de la luciférase. Par contre, s'il y a interaction avec la protéine de fusion VP16-Tal1 ou VP16-Tal-1-Cterm ou VP16-Tal1-Nterm, les protéines Gal et VP16 seront à proximité, ce qui aura pour effet d'augmenter l'activité transcriptionnelle de Gal. Concrètement, une augmentation de l'activité transcriptionnelle

de Gal résulte en une interaction avec la protéine VP16 consécutive à une interaction entre les protéines ER $\beta$  et Tal-1.

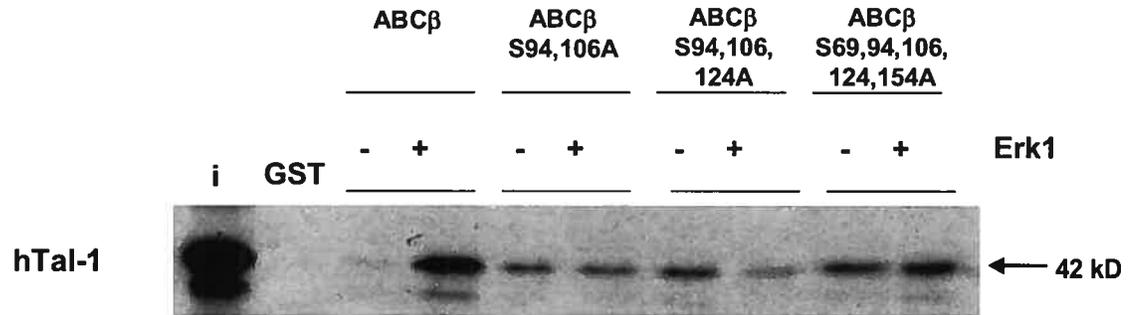
De plus, rappelons que nous avons constaté à la **figure 9** que l'activation d'ER $\beta$  par la phosphorylation induite *in vitro* par Erk1 augmentait l'interaction entre ABC-ER $\beta$  et Tal-1. Afin de mieux comprendre les conditions qui régulent l'interaction entre ER $\beta$  et Tal-1, nous avons observé les effets de l'activation du récepteur par la liaison au ligand seule ou en combinaison à l'activation de la voie Erk1 sur le recrutement de Tal-1 à ER $\beta$ . Ainsi, les cellules HEK-293 ont été cotransfectées avec les plasmides d'expression des protéines de fusion décrites plus haut et l'élément de réponse UAS couplé au gène rapporteur de la luciférase, en ajoutant ou non les plasmides d'expression pCMX-Mekk1 et pCMX-Erk1. Le plasmide d'expression pCMX-Mekk1 est utilisé afin de rendre Erk1 actif et ainsi de permettre l'activation de l'AF-1 de ER $\beta$ . Les résultats de ces expériences de double hybride sont montrés à la **figure 12**. L'activité transcriptionnelle de la protéine de fusion Gal-ER $\beta$  est favorisée via l'activation par le ligand seul, ou en combinaison avec l'activation par la voie de Erk1, ce qui valide la protéine de fusion puisqu'elle est fonctionnelle. Lorsque les cellules HEK-293 sont cotransfectées avec le plasmide d'expression de la protéine de fusion VP16-Tal-1, l'activité basale de transcription est augmentée, suggérant qu'il y a interaction entre ER $\beta$  et Tal-1 sauvage même lorsque le récepteur est dans un état basal non-activé. Ce résultat confirme ce qui avait été obtenu par les essais de 'pull down' entre ABC $\beta$  et Tal-1 (**figure 9**). De façon intéressante, l'activation du récepteur par la liaison au ligand augmente significativement l'interaction entre ER $\beta$  et Tal-1. Donc un état activé du récepteur par liaison au ligand serait plus favorable au recrutement de Tal-1.

Aussi, en combinant le traitement à l'estrogène et l'activation du récepteur par Erk1, cette interaction est encore plus favorisée qu'avec le ligand seul. Il semble que la double activation du récepteur amène un recrutement favorisé de Tal-1, suggérant que ce dernier a une plus forte affinité lorsqu'ER $\beta$  est dans une conformation active. Un autre point à soulever est que la phosphorylation de Erk1 peut également affecter Tal-1, au niveau de son résidu S122, en comparaison avec les essais de 'pull down' effectués, où seul ER $\beta$  était phosphorylé par Erk. L'augmentation de l'interaction est favorisée par l'état activé d'ER $\beta$ , mais possiblement aussi par l'état activé de Tal-1, puisqu'il peut lui aussi être phosphorylé et activé par Erk1.



**Figure 8: Les effets de Tal-1 sur ER $\beta$  sont AF-1-dépendant et AF-2-dépendant**

A. Représentation schématique des constructions tronquées d'ER $\beta$ . pCMX-ABC $\beta$  a été créé par une digestion du vecteur sauvage avec les enzymes de restriction appropriées suivie d'une auto-ligation du vecteur. Le vecteur pCMX-CDEF $\beta$  a été obtenu par la génération de fragments par PCR. B. Les cellules HEK-293 ont été cotransfectées transitoirement avec le vecteur du gène rapporteur ERE-Tk-luc, le plasmide d'expression pCMX-ABC $\beta$  et avec ou sans les plasmides d'expression de Tal-1 et de RasV12. C. Les cellules HEK-293 ont été cotransfectées transitoirement avec le vecteur du gène rapporteur ERE-Tk-luc, le plasmide d'expression pCMX-CDEF $\beta$  et avec ou sans le plasmide d'expression de Tal-1. Les cellules sont transfectées pendant six heures et ensuite traitées ou non avec 10 nM de 17  $\beta$ -estradiol (E2) pendant 16 heures. Les valeurs de luciférase ont été normalisées à partir de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase, puis exprimées en niveau d'activation.

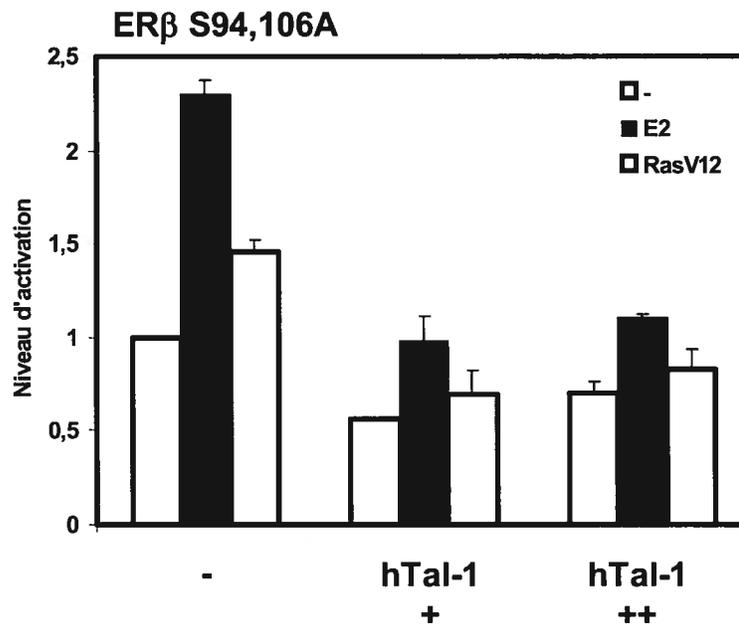


**Figure 9 : Tal-1 interagit avec la région N-terminale d'ER $\beta$  lorsque le récepteur n'est pas activé, cette interaction étant favorisée lorsque le récepteur est phosphorylé par Erk1.**

Essais de 'pull down' déterminant l'interaction *in vitro* de Tal-1 et ER $\beta$ . Des protéines de fusion sont produites afin d'obtenir la région N-terminale de ER $\beta$  couplée à un étiquette GST. Différents mutants pour différents sites de phosphorylation de ABC $\beta$  sont fusionnés à la GST. Ces protéines de fusion sont phosphorylées dans une réaction *in vitro* de 30 minutes impliquant la MAPK Erk1. La protéine Tal-1 est obtenue par traduction *in vitro* dans des érythrocytes et est marquée au  $^{35}\text{S}$  par incorporation dans les méthionines de la protéine lors de sa production. Les deux protéines d'intérêt sont mises en contact puis les extraits sont lavés, dénaturés et la moitié (15 $\mu\text{L}$ ) est mise sur gel d'acrylamide. Ces gels sont exposés afin de capturer le signal du  $^{35}\text{S}$ . Le premier puit à gauche correspond à 5 $\mu\text{L}$  d'input de Tal-1 marqué. Le second puit sert de contrôle négatif puisque Tal-1 a été mis en contact avec la protéine/étiquette GST seule.

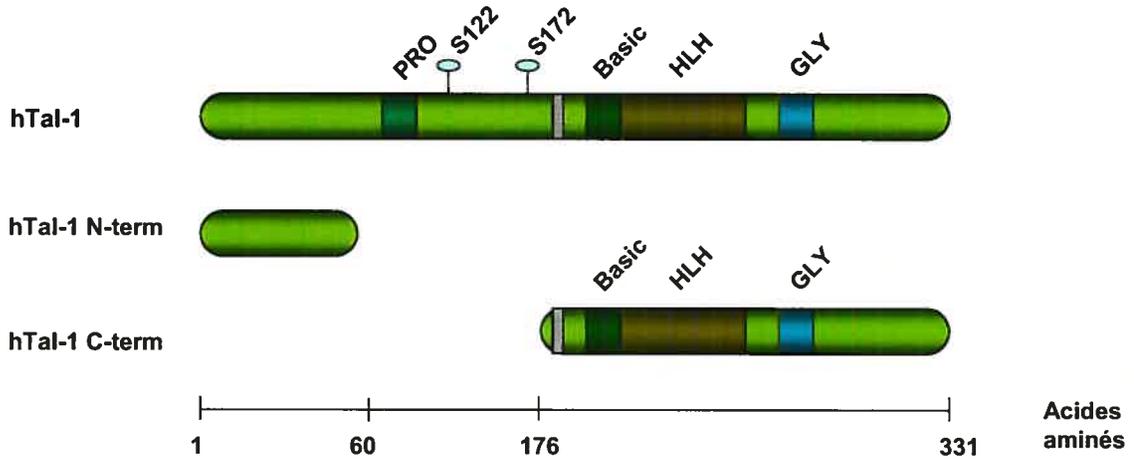
Pour partiellement répondre à cette observation, nous avons utilisé les versions tronquées de Tal-1. Il semble que ni la version N-terminale, ni la version C-terminale n'ait la capacité d'interagir avec ER $\beta$ . Le fait que le domaine bHLH soit présent sur la version C-terminale et qu'il n'y ait aucune interaction suggère que ce motif est peut-être important pour l'interaction, mais qu'il n'est pas suffisant pour que celle-ci soit possible. D'une façon similaire, rien dans la version N-terminale n'est suffisant pour que Tal-1 soit recruté à ER $\beta$ . Le fait d'avoir un récepteur activé par l'estrogène ou doublement activé par l'estrogène et Erk1 ne permet pas une interaction avec ces formes tronquées de Tal-1. Ceci nous porte à vouloir déterminer ce qui manque dans ces versions pour qu'il y ait interaction. Trois éléments peuvent être impliqués, soit le domaine riche en prolines, la sérine 122 et la sérine 172. Ces éléments sont tous uniquement retrouvés sur Tal-1 sauvage et sont donc des sujets déterminants pour l'interaction. C'est probablement l'absence d'un ou de plusieurs de ces

éléments qui rend l'interaction entre ER $\beta$  et les formes tronquées de Tal-1 (constructions N-terminale ou C-terminale) impossible.



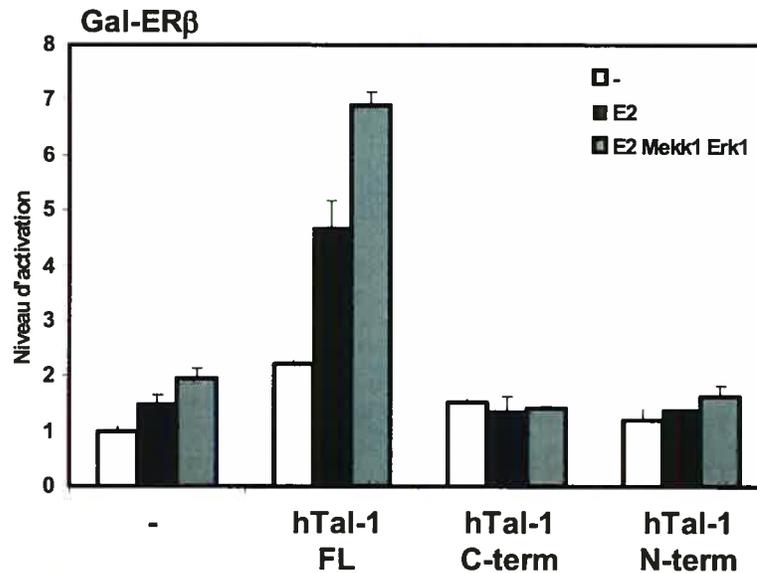
**Figure 10 : La mutation des sérines 94 et 106 sur le domaine AF-1 n'affecte pas la capacité de Tal-1 à inhiber la réponse hormonale d'ER $\beta$ .**

Les cellules HEK-293 sont cotransfectées transitoirement avec le vecteur du gène rapporteur ERE-Tk-luc, le plasmide d'expression du gène ER $\beta$ S94,106A (muté pour les sérines 94 et 106) et avec ou sans le plasmide d'expression de Tal-1 et de RasV12. Les cellules sont transfectées pendant six heures et ensuite traitées ou non avec 10 nM de 17  $\beta$ -estradiol (E2) pendant 16 heures. Deux concentrations de Tal-1 sont utilisées, soit 100ng (+), représentant un rapport ER $\beta$ :Tal-1 de 1:1, et 300 ng (++), représentant un rapport ER $\beta$ :Tal-1 de 1:3. Les valeurs de luciférase ont été normalisées à partir de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase, puis exprimées en niveau d'activation.



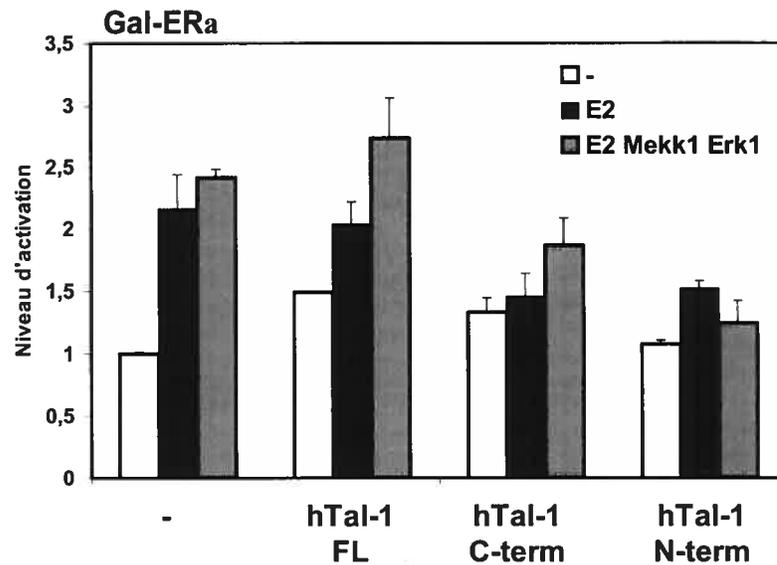
**Figure 11 : Représentation schématique des constructions tronquées de hTal-1.**

La construction N-terminale a été obtenue par digestion enzymatique de pCMX-Tal-1, puis remplissage avec fragments Klenow et ligation. La construction C-terminale a été obtenue par la génération de fragment PCR. La protéine tronquée C-term débute à un codon de départ présent au 176<sup>e</sup> acide aminé de la séquence de Tal-1 sauvage.



**Figure 12 : L'interaction entre Tal-1 et ERβ est favorisée par le traitement à l'estrogène seul et en combinaison avec la cotransfection des cellules avec Mekk1 et Erk1.**

Expériences de double hybride. Des cellules HEK-293 sont cotransfectées avec les plasmides d'expression pCMX-Gal-ERβ et pCMX-VP16-Tal-1 ou pCMX-VP16-Tal1-N-term ou pCMX-VP16-Tal1-Cterm. Les cellules sont cotransfectées ou non avec les plasmides d'expression pCMX-Mekk1 et pCMX-Erk1. Les cellules sont transfectées pendant six heures et ensuite traitées ou non avec 10 nM de 17 β-estradiol (E2) pendant 16 heures. Les valeurs de luciférase ont été normalisées à partir de l'activité de la β-galactosidase, puis exprimées en niveau d'activation.



**Figure 13 : L'interaction entre Tal-1 et ER $\alpha$  est favorisée par le traitement à l'estrogène seul et en combinaison avec la cotransfection des cellules avec Mekk1 et Erk1, mais est moins forte qu'entre Tal-1 et ER $\beta$ .**

Expériences de double hybride. Des cellules HEK-293 sont cotransfectées avec les plasmides d'expression pCMX-Gal-ER $\alpha$  et pCMX-VP16-Tal-1 ou pCMX-VP16-Tal1-N-term ou pCMX-VP16-Tal1-Cterm. Les cellules sont cotransfectées ou non avec les plasmides d'expression pCMX-Mekk1 et pCMX-Erk1. Les cellules sont transfectées pendant six heures et ensuite traitées ou non avec 10nM de 17  $\beta$ -estradiol (E2) pendant 16 heures. Les valeurs de luciférase ont été normalisées à partir de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase, puis exprimées en niveau d'activation.

Comme nous avons observés des différences dans la régulation d'ER $\alpha$  par Tal-1 en comparaison à ER $\beta$  (**figure 7**), nous avons voulu déterminer si l'interaction entre ER $\alpha$  et Tal-1 pouvait elle aussi être différemment influencée. Des essais de double hybride ont donc été effectués selon les mêmes conditions utilisées avec pCMX-Gal-ER $\beta$ , mais en utilisant le plasmide d'expression pCMX-Gal-ER $\alpha$ . La **figure 13** met en évidence les observations recueillies. Tout d'abord, la protéine de fusion Gal-ER $\alpha$  répond à l'activation par la liaison au ligand, validant cette construction. Par contre, l'activation par Erk1 ne semble pas affecter de façon significative la réponse hormonale d'ER $\alpha$ . La cotransfection des cellules HEK-293 avec le plasmide d'expression pCMX-VP16-Tal-1 a pour effet d'augmenter l'activité transcriptionnelle basale, ce qui suggère une interaction entre ER $\alpha$  et Tal-1. Cependant l'amplitude de l'interaction entre ER $\beta$  et Tal-1 apparaît plus importante que celle avec ER $\alpha$  (**figures 12 et 13**).

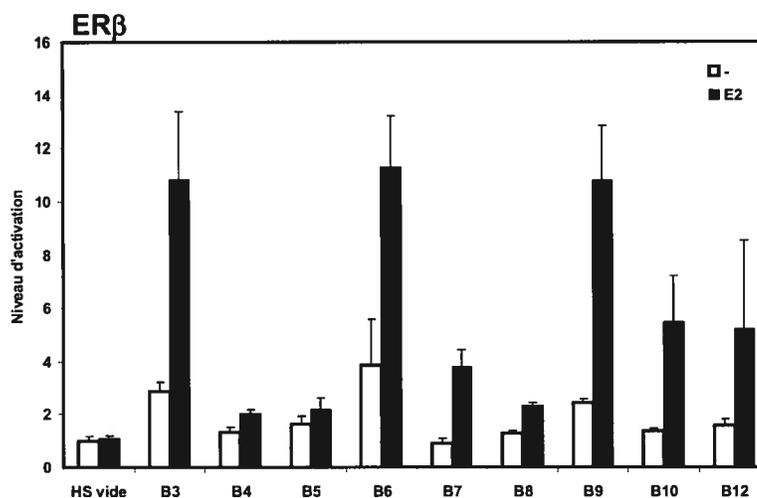
Le traitement à l'estrogène ne semble pas augmenter le recrutement de Tal-1 à ER $\alpha$ , ce qui diffère des observations obtenues avec ER $\beta$ . Le traitement à l'estrogène combiné à l'activation de Erk1 ne semble pas non plus influencer l'interaction de façon significative. La légère augmentation observée dans ce cas par rapport à ER $\alpha$  seul peut être attribuable à l'augmentation du recrutement de Tal-1 à ER $\alpha$  dans un état basal non-activé. Ainsi, même si le ER $\alpha$  est activé, que ce soit via son AF-2 ou via les deux AFs, l'interaction avec Tal-1 ne semble pas être améliorée comparativement à lorsque le récepteur est dans un état inactif. Il existe donc des différences importantes dans la modulation de l'interaction entre les isoformes d'ER et Tal-1. Ces différences pourraient être expliquées par des différences structurales entre ces deux isoformes, notamment dans le domaine AF-1, ce qui supporterait une différence d'affinité de Tal-1 pour chacune des isoformes.

Avec les résultats obtenus sur la régulation d'ER $\beta$  par Tal-1 et la modulation de leur interaction, nous nous sommes interrogés à savoir quels étaient les impacts biologiques de cette interaction. Plus précisément, nous voulions évaluer l'effet de cette interaction sur la transcription de gènes cibles d'ER $\beta$ . Afin de répondre à cette question, nous avons généré une lignée cellulaire exprimant ER $\beta$  de façon stable, pour pouvoir évaluer l'impact de la présence de Tal-1 sur les gènes cibles de cette isoforme. Les modèles cellulaires présentement disponibles, tels que les MCF-7 ou les MDA-MB-468, expriment de façon endogène les deux isoformes de ER, rendant impossible la distinction des effets dus à une ou l'autre des isoformes. Nous avons choisi d'utiliser des cellules Hs-578t de glande mammaire saine qui n'expriment aucune des isoformes des ERs, mais qui par contre expriment Tal-1 de façon endogène (résultat non présenté). Ce modèle nous fournit donc un environnement cellulaire intéressant puisqu'il permet de mettre nos résultats obtenus jusqu'ici en contexte avec la coexpression d'ER $\beta$  et Tal-1 observée dans les cellules de cancers du sein MCF-7 et MDA-MB-468. Les cellules Hs-578t ont donc été cotransfectées avec le plasmide d'expression pCMX-ER $\beta$  et le plasmide d'expression pcDNA3.1neo contenant la résistance à la néomycine. Une sélection a été faite de manière à isoler les clones possédant la résistance à l'antibiotique. En parallèle, des cellules ont été transfectées stablement avec les plasmides d'expression pCMX-ER $\alpha$  ou pCMX-ER $\beta$ S94,106A toujours en combinaison avec pcDNA3.1neo. La lignée cellulaire stable pour ER $\alpha$  sera utilisée à des fins de comparaison pour discerner les effets de chacune des isoformes d'ER. De plus, le mutant ER $\beta$ S94,106A est utilisé dans l'intention d'évaluer l'importance des sérines 94 et

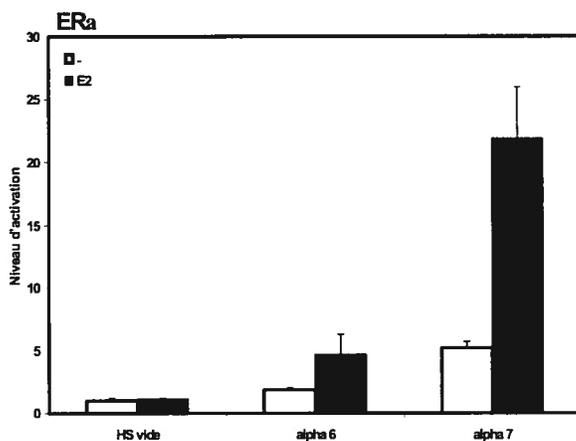
106 sur la régulation d'ER $\beta$  par Tal-1, sur leur interaction et sur l'implication de ces résidus dans la régulation de la transcription des gènes cibles.

La **figure 14** montre les activités transcriptionnelles de certains clones obtenus à ce jour qui sont en cours de validation. Ces résultats proviennent d'essais luciférase effectués sur différents clones Hs-578t sélectionnés pour leur expression d'ER $\beta$ , ER $\alpha$  ou ER $\beta$ S94,106A. Ces clones ont été transfectés transitoirement avec le vecteur d'expression du gène rapporteur de la luciférase couplé à un élément de réponse ERE. Les cellules ont été transfectées pendant six heures et ensuite traitées ou non à l'estrogène pendant 16 heures. L'observation d'une activité transcriptionnelle basale plus élevée que celle retrouvée dans des cellules Hs-578t contrôles suggère l'expression d'ER dans ces cellules. De plus, l'augmentation de l'activation transcriptionnelle suite au traitement à l'estrogène démontre qu'il y a une réponse hormonale et que le récepteur exprimé stablement est fonctionnel. D'autres étapes de validation de ces clones sont prévues, telle que la validation de la présence de l'ARNm de ER dans ces clones par expériences de type RT-PCR, ainsi que la vérification de la présence de la protéine ER par immunobuvardage de type western sur des extraits cellulaires de ces clones. Une fois que ces clones seront validés, des expériences de RT-PCR sont envisagées afin de déterminer les effets de la relation entre ER $\beta$  et Tal-1 présentée dans ce travail sur les gènes cibles et les fonctions physiologiques d'ER $\beta$ .

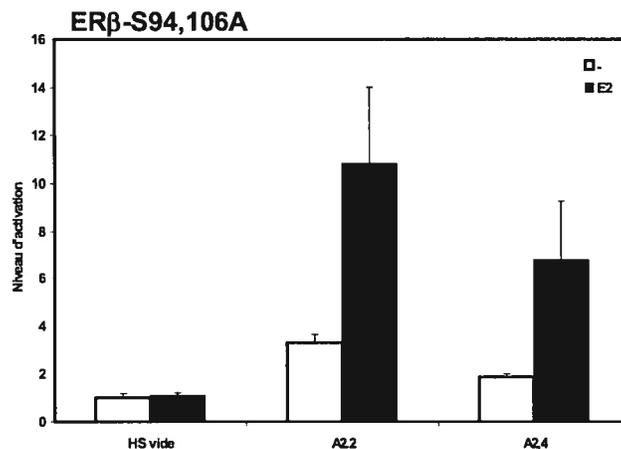
A)



B)



C)



**Figure 14 : Réponse à l'hormone estrogène de plusieurs clones de cellules Hs-578t exprimant stablement ER $\beta$ , ER $\alpha$  ou ER $\beta$  S94,106A.**

Essais luciférase. Les cellules Hs-578t de transfectants stables isolés suite à une sélection à la néomycine et exprimant ER $\beta$  (A), ER $\alpha$  (B) ou le mutant ER $\beta$  S94,106A (C), sont transfectées avec le vecteur d'expression du gène rapporteur de la luciférine couplé à un ERE. Les cellules sont transfectées pendant six heures et ensuite traitées ou non avec 10nM de 17  $\beta$ -estradiol (E2) pendant 16 heures. Les valeurs de luciférase ont été normalisées à partir de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase, puis exprimées en niveau d'activation.

## 4 DISCUSSION

Au cours de cette étude, nous voulions déterminer l'impact du facteur de transcription Tal-1 sur l'activation d'ER $\beta$  par ses deux domaines d'activation, soit la réponse de l'AF-2 à la liaison du ligand et la réponse de l'AF-1 à l'activation des MAPK. Des études de criblage effectuées au laboratoire avaient mis en évidence une interaction entre la protéine Tal-1 et la région N-terminale d'ER $\beta$ .

Il y a très peu d'études qui portent sur la possibilité d'une interaction entre ER et Tal-1, ainsi que sur l'impact biologique de celle-ci. D'un point de vue fonctionnel, les ERs et Tal-1 semblent avoir des rôles opposés au sein de l'hématopoïèse. En effet, les ERs sont capables d'arrêter ou de retarder la différenciation érythroïde, si leurs niveaux d'expression le permettent (212). Il semble que ce soit surtout leur surexpression qui mène à ce résultat. De plus, l'activation d'ER par son ligand inhibe l'expression de plusieurs gènes normalement induits lors des stades tardifs de différenciation. De son côté, Tal-1 est un acteur nécessaire et crucial dans la différenciation définitive des précurseurs hématopoïétiques pour former les différentes lignées cellulaires hématopoïétiques. Ainsi, alors qu'ER retarde ou arrête la différenciation hématopoïétique s'il est suffisamment exprimé, Tal-1 la favorise, ce qui suggère des fonctions physiologiques respectives opposées dans l'hématopoïèse.

Toutefois, ces études se rapportent à un contexte hématopoïétique. L'étude présentée dans ce travail révèle la coexpression d'ER $\beta$  et de Tal-1 dans des lignées de tumeurs du sein (**figure 5**). À ce jour, l'expression de Tal-1 n'avait pas été étudiée dans le tissu mammaire (129). La présence de Tal-1 dans ces lignées mammaires cancéreuses soulève des questions concernant son implication dans ces tissus. Au laboratoire, nous avons récemment observé l'expression de Tal-1 dans une lignée de cellules de glande mammaire saine, soit les Hs-578t. Il serait nécessaire de vérifier dans le tissu mammaire sain si les niveaux d'expression de Tal-1 sont différents de ceux retrouvés dans les lignées de cancers du sein MCF-7 et MDA-MB-468. De cette façon, nous pourrions déterminer si l'expression de Tal-1 dans les lignées de cancers du sein est due à son expression normale dans ce tissu ou bien si cette expression est dérégulée, entraînant des conséquences au niveau de la signalisation intracellulaire.

Les modèles cellulaires présentement disponibles de cellules cancéreuses du sein expriment généralement les deux isoformes d'ER. Comme il en a été question dans ce travail, des différences structurales entre les deux isoformes suggèrent des mécanismes de régulation différents. Ainsi, comme nous voulions déterminer l'effet de Tal-1 sur chacune des isoformes, nous nous sommes tournés vers un modèle cellulaire n'exprimant aucune des isoformes, soit la lignée HEK-293. Par des essais de cotransfection dans ces cellules, il nous a été possible d'observer d'une manière spécifique les effets de Tal-1 sur chacune des isoformes.

Plus particulièrement, nous voulions évaluer l'effet de Tal-1 sur les deux mécanismes d'activation d'ER $\beta$ , soit la liaison à son ligand et la phosphorylation de son AF-1. Plusieurs voies de signalisation peuvent mener à l'activation des ERs en absence de leur ligand. Ces voies sont entre autres celles de PI-3K/AKT, des MAPKs, de p38, de la PKC et de la PKA. En effet, il a été démontré que ces voies peuvent activer de façon ligand-indépendante les ERs (226). L'action de ces voies sur les ERs se situe surtout au niveau de l'AF-1, où elles permettent de phosphoryler les sérines des sites consensus, ce qui favorise l'interaction avec des coactivateurs et ainsi l'activation de la transcription de gènes cibles (38). Afin d'imiter ce mécanisme d'activation pour ER $\beta$ , nous avons utilisé un mutant constitutif de l'oncogène Ras, soit RasV12, qui a la capacité d'activer la cascade de signalisation des MAPK de façon constitutive, et ainsi permettre la phosphorylation de sites sur l'AF-1 de ER $\beta$  (37;77). Donc, en traitant les cellules avec le 17  $\beta$ -estradiol (E2) ou en les cotransfectant avec RasV12, il nous a été possible de favoriser respectivement l'activation de l'AF-2 ou de l'AF-1 d'ER $\beta$ .

Grâce aux essais luciférase effectués, nous avons pu déterminer que l'expression de Tal-1 affecte la réponse hormonale d'ER $\beta$ , mais également sa réponse au mutant constitutif RasV12 (**figure 7A**). Par ces expériences, nous avons démontré que Tal-1 a un effet sur l'activité transcriptionnelle d'ER $\beta$  et que cet effet est de nature répressive. L'expression de Tal-1 a la propriété d'inhiber les deux domaines d'activations d'ER $\beta$ , soit l'AF-1 et l'AF-2. Cette habilité apparente à inhiber l'activation d'ER $\beta$  pour les deux fonctions activatrices concernées (AF-1 ou AF-2) suggère une interaction de Tal-1 avec chacune des AFs. Dans la littérature, des exemples appuient ce type de double mécanisme, où certaines protéines corégulatrices connues pour interagir avec l'AF-2 des ERs sont également capables

d'interagir avec l'AF-1 et de permettre de réguler la transactivation de ce domaine. C'est notamment le cas du coactivateur SRC-1, qui peut à la fois interagir avec le domaine C-terminal et le domaine N-terminal du récepteur ER $\beta$  (37;106;107). Suite à cette double action, plusieurs groupes ont suggéré une fonction de pontage pour les AFs des ERs, résultant en une activité transcriptionnelle du récepteur (37;106;107;227-229). Cette coopération aurait la capacité d'augmenter le recrutement de protéines corégulatrices.

Afin d'éclaircir le mécanisme d'inhibition utilisé par Tal-1, nous avons voulu déterminer si l'une des deux fonctions activatrices était nécessaire pour exercer ses effets sur ER $\beta$  et si nous étions en présence d'une coopération entre les AFs, permettant l'inhibition par Tal-1. Des essais de luciférase impliquant des constructions tronquées d'ER $\beta$  ont permis d'observer que l'inhibition de la réponse à la signalisation induite par RasV12 requiert la région AF-1 et que l'inhibition de la réponse hormonale d'ER $\beta$  par Tal-1 requiert l'AF-2 (**figures 8B et 8C**). Ces différents résultats montrent que l'action de Tal-1 sur ER $\beta$  est AF-1-dépendant et AF-2-dépendant. Ces observations appuient un modèle de mécanisme d'inhibition mutuellement exclusif d'ER $\beta$  par Tal-1, suggérant que Tal-1 aurait la capacité d'interagir avec le domaine N-terminal d'ER $\beta$  et de l'inhiber, tout comme il pourrait interagir avec le domaine C-terminal d'ER $\beta$  et l'inhiber.

Étant donné les différences structurales entre les deux isoformes d'ER, nous avons voulu savoir si les effets de Tal-1 sur ER $\beta$  étaient comparables pour ER $\alpha$ . Des essais luciférase nous ont permis de constater qu'il y a des différences entre la régulation des isoformes par Tal-1 (**figure 7A et 7B**). Tal-1 a la capacité d'inhiber la réponse hormonale des deux isoformes, mais cette inhibition est plus importante avec ER $\beta$  qu'avec ER $\alpha$ . Ceci suggère une certaine spécificité d'action selon les isoformes. Il est possible que la réponse au ligand d'ER $\alpha$  soit moins affectée par Tal-1 à cause de différences structurales dans cette isoforme.

Tal-1 semble incapable d'affecter la réponse d'ER $\alpha$  à l'activation de l'AF-1 par RasV12, par opposition aux observations avec ER $\beta$ . Étant donné que les deux isoformes de ER n'ont que 15% de similarité pour leur domaine AF-1, il est raisonnable de penser que le mécanisme d'inhibition de Tal-1 sur l'AF- est plus efficace pour ER $\beta$  parce qu'il implique des sites particuliers à l'isoforme  $\beta$ , et que l'absence de ces sites sur l'isoforme  $\alpha$  rend Tal-1 incapable d'exercer son inhibition sur cette région.

Ayant déterminé que Tal-1 inhibe la réponse hormonale et la réponse à l'activation par les MAPK de ER $\beta$ , ce d'une façon particulière à cette isoforme, nous nous sommes intéressés à savoir de quelle façon physique Tal-1 médiait ces effets. Comme l'étude initiale de criblage a été effectuée avec la région N-terminale d'ER $\beta$  comme appât, nous avons confirmé ces résultats par des essais de type 'pull down' en utilisant le domaine N-terminal d'ER $\beta$ . Plusieurs sites de phosphorylation sont situés sur ce domaine, dont certains sont ciblés par la cascade de signalisation des MAPK. De plus, l'état phosphorylé de certains de ces sites a été démontré comme étant important pour le recrutement de protéines corégulatrices, notamment le coactivateur SRC-1. En effet, ce dernier est plus fortement recruté lorsque le domaine AF-1 de ER $\beta$  est phosphorylé par les MAPK (37). Nous avons voulu reproduire cet effet et déterminer si le recrutement de Tal-1 à ER $\beta$  pouvait être modulé par la phosphorylation de sites sur le domaine AF-1 du récepteur. Pour générer cet état activé du récepteur, une phosphorylation *in vitro* a été effectuée via l'utilisation de la MAPK Erk1, favorisant ainsi la phosphorylation de sites sur l'AF-1 d'ER $\beta$ . Afin d'évaluer l'implication de certains sites de phosphorylation connus, quelques mutants ponctuels seuls ou combinés ont été utilisés, soient ABC $\beta$ -S94,106A, ABC $\beta$ -S94,106,124A et ABC $\beta$ -S69,94,106,124,154A. Les résidus sérines dans ces constructions sont rendus non-phosphorylables en les substituant par des résidus alanine.

Les résultats obtenus avec les essais 'pull down' confirment l'étude de criblage faite avec ABC $\beta$ , soit qu'il y a recrutement de Tal-1 au domaine N-terminal de ER $\beta$  (**figure 9**). De plus, il est observé que la phosphorylation de l'AF-1 d'ER $\beta$  par Erk1 favorise l'interaction entre ER $\beta$  et Tal-1. Tout comme d'autres protéines corégulatrices, telle que SRC-1, il semble donc que l'activation du domaine AF-1 d'ER $\beta$  permette un meilleur recrutement de Tal-1. Cette augmentation du recrutement de Tal-1 est perdue lorsque les sites de phosphorylation S94 et S106 en particulier sont mutés. Par contre, l'interaction entre ER $\beta$  et Tal-1 en absence de phosphorylation est tout de même possible. Ceci suggère que l'activation du récepteur via la phosphorylation de son AF-1 par Erk1 favorise fortement l'interaction entre ER $\beta$  et Tal-1, mais que cette phosphorylation n'est pas nécessaire au recrutement basal de Tal-1 au domaine N-terminal d'ER $\beta$ .

Dans cette optique, nous avons examiné l'implication potentielle des résidus S94 et S106 sur l'AF-1 d'ER $\beta$  dans le mécanisme d'inhibition de ce domaine par Tal-1, ces sites étant

reconnus pour être ciblés par la signalisation des MAPK et ainsi favoriser le recrutement de protéines corégulatrices à ER $\beta$  (37;224). Par conséquent, nous avons utilisé une construction d'ER $\beta$  dont les sérines 94 et 106 ont été substituées par des résidus alanine (S94,106A), les rendant non-phosphorylables. Des essais luciférase ont révélé qu'alors que la réponse hormonale du mutant ER $\beta$ S94,106A semble être inhibée par la présence de Tal1, la réponse suite à l'activation par RasV12 est beaucoup moins affectée en comparaison avec ER $\beta$  sauvage (**figures 7A et 10**). Cette observation est sans doute attribuable à la capacité plus faible du mutant S94,106A à répondre à l'activation des MAPK par RasV12.

Cependant, la légère diminution de cette réponse suggère également un rôle potentiel d'autres sites de régulation de l'activité AF-1. En réalité, les sérines 94 et 106 ne sont pas les seules à être présentes sur ER $\beta$  et à être ciblées par la cascade de signalisation des MAPK. Ainsi, il est concevable que Tal-1 requière la présence de sites additionnels pour pouvoir exercer ses effets sur ER $\beta$ . L'utilisation d'autres mutants ponctuels seuls ou combinés d'ER $\beta$  permettraient de déterminer si ces autres sites sont importants pour les effets médiés par Tal-1 sur ER $\beta$ .

Comme Tal-1 interagit avec ER $\beta$  et par conséquent régule son activité transcriptionnelle, nous avons étudié comment cette interaction était modulée. Nous avons déjà certaines indications, suite aux essais de 'pull down', qui suggéraient qu'une conformation active de ER $\beta$  suite à l'activation par les MAPK était favorable au recrutement de Tal-1. Nous avons voulu transporter notre étude à un niveau cellulaire, via l'utilisation de cellules en culture et d'essais de type double hybride. Par ces expériences d'interaction protéine-protéine, nous avons voulu déterminer si une conformation active du récepteur suite à la liaison au ligand pourrait aussi favoriser le recrutement de Tal-1, dans la mesure où le récepteur activé par les MAPK recrutait davantage Tal-1 lors des essais 'pull down'.

Les résultats obtenus montrent qu'en effet, l'activation d'ER $\beta$  par la liaison de son ligand naturel augmente son interaction avec Tal-1 (**figure 12**). Ces résultats appuient notre hypothèse qu'un récepteur activé est dans une conformation qui favorise le recrutement de Tal-1. Nous suggérons donc que l'activation du récepteur via la liaison de son ligand tout comme via sa phosphorylation permet cette augmentation du recrutement de Tal-1. De plus, nous avons voulu évaluer si dans le cas du recrutement de Tal-1 un effet additif était

observable lorsque les deux AFs d'ER $\beta$  étaient activées. En combinant le traitement à l'estrogène et l'activation par Erk1, nous obtenons une interaction encore plus forte que lorsqu'une seule des fonctions activatrices est activée. Ceci suggère qu'une activation additive s'opère entre les deux AFs de ER $\beta$ , comme certains groupes l'avaient précédemment suggéré (37;106;107;227-229), favorisant davantage le recrutement de Tal1.

Comme Tal-1 est une protéine qui possède plusieurs domaines fonctionnels, nous avons conçu différentes constructions de Tal-1 dans le but de déterminer quels étaient les domaines impliqués dans son recrutement par ER $\beta$ . Ainsi, nous avons utilisé une construction avec le domaine C-terminal, contenant le domaine bHLH, pour voir si ce domaine est suffisant pour l'interaction entre ER $\beta$  et Tal-1. Selon la littérature, le domaine bHLH est souvent impliqué dans des interactions de type protéine-protéine. Différents facteurs possédant des motifs bHLH conservés interagissent ensembles via ce domaine. De plus, nous avons construit une protéine contenant seulement le domaine N-terminal de Tal1, afin de discriminer cette partie de Tal-1.

Nos expériences de double hybride (**figure 12**) ont démontré que le domaine N-terminal de Tal-1 n'est pas suffisant pour l'interaction entre ER $\beta$  et Tal-1. Également, il semble que la portion C-terminale de Tal-1 soit elle aussi insuffisante pour permettre le recrutement de Tal-1 à ER $\beta$ , malgré la présence du domaine bHLH. Dans nos expériences, seule la protéine Tal-1 entière est capable d'interaction avec ER $\beta$ . Cependant, il est possible que le domaine riche en proline ou que les sérines aux positions S122 et S172 identifiées en amont de la région C-terminale de Tal-1 soient importants pour le recrutement de Tal-1. Ainsi, peut-être que Tal-1 requiert ces composantes afin d'adopter une conformation adéquate permettant l'interaction avec ER $\beta$ . Il serait nécessaire de générer une construction de Tal-1 où le domaine riche en proline serait absent, dans le but de mieux évaluer l'implication de ce domaine dans le recrutement de Tal-1 par ER $\beta$ . Quant aux résidus sérines S122 et S172, ils pourraient permettre à Tal-1 d'être activé par une signalisation des MAPKs ou de l'AMPc. Ces sites peuvent être favorables ou nécessaires au recrutement de Tal-1 par ER $\beta$ . Les résultats de la **figure 12** suggèrent effectivement un rôle potentiel de ces deux résidus en réponse à l'activation par les MAPKs qui semble donc intervenir dans le recrutement à ER $\beta$ . Afin de discerner le rôle de ces sites de phosphorylation, des constructions mutées par la technique de PCR pourraient être utilisées dans des études de double hybride avec ER $\beta$ .

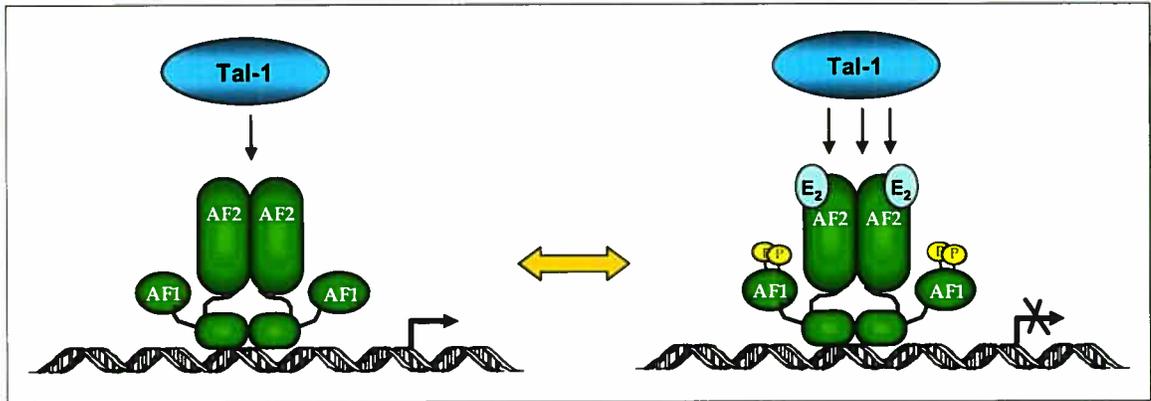
Ainsi, l'importance relative de ces sites pour le recrutement de Tal-1 pourrait être déterminée.

À des fins de comparaison, le même type d'études double hybride a été fait avec ER $\alpha$ . Ces essais nous ont permis de constater que même si l'interaction entre ER $\alpha$  et Tal-1 s'est avérée possible, celle-ci n'est pas favorisée lorsque le récepteur est activé par la liaison à son ligand, contrairement à ce qui est observé avec ER $\beta$ . De plus, le niveau d'activation obtenu suite à la combinaison du traitement à l'estrogène avec l'activation par Erk1 n'est pas significativement affecté en présence de Tal-1. Il semble donc que l'activation de l'AF-1 et/ou de l'AF-2 d'ER $\alpha$  ne favorise pas un recrutement efficace de Tal-1. Ceci constitue une différence marquée entre les deux isoformes des ERs. Il est possible que Tal-1 reconnaisse des sites communs sur les deux isoformes des ERs, mais que l'absence d'autres sites importants sur l'isoforme  $\alpha$  l'empêche d'être recruté d'une façon plus importante. Cette interaction basale et plus faible de Tal-1 avec l'isoforme  $\alpha$  pourrait expliquer pourquoi Tal-1 semble avoir moins d'effet sur l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  par rapport à ce qui est observé avec ER $\beta$ , comme l'ont montré nos essais de luciférase (**figure 7**). Les déterminants structuraux responsables de cette apparente différence dans l'habilité d'ER $\alpha$  et ER $\beta$  à s'associer avec Tal-1 restent encore à être déterminés, mais avec la faible homologie entre les deux récepteurs au niveau de l'AF-1, cette région est fortement considérée pour moduler l'interaction avec Tal-1.

Nous proposons donc un modèle où le facteur de transcription Tal-1 est associé à ER $\beta$ , dans lequel cette association est favorisée lorsque le récepteur est dans un état activé, via l'activation de son domaine AF-1 ou de son domaine AF-2 (**figure 15**). Dans le cas où les deux AFs sont activées, le recrutement de Tal-1 par ER $\beta$  est favorisé d'une façon additive, probablement dû à la coopération des deux AFs. La conséquence du recrutement de Tal-1 par ER $\beta$  est une répression de la réponse hormonale du récepteur et de sa réponse à l'activation de l'AF-1 induite par la cascade de signalisation des MAPK. Il reste cependant à élucider les détails mécanistiques de cette répression, afin de compléter le modèle d'interaction-régulation entre ER $\beta$  et Tal-1 décrit dans ce travail.

L'idée qu'un ER activé, donc avec une activité transcriptionnelle augmentée, favorise le recrutement d'un corépresseur tel que Tal-1, donc qui indirectement favorise une

diminution de son activité transcriptionnelle, constitue une sorte de paradoxe. Cette hypothèse pourrait être supportée par des études récentes de type ChIP (immunoprécipitation de la chromatine) sur les stades de transcription d'ER $\alpha$ , qui ont suggéré un modèle impliquant la notion de cycle transcriptionnel (230;231). En effet, selon ce modèle, il semble exister une horloge transcriptionnelle constituée de trois cycles, soit un non-productif et deux productifs. La séquence des protéines recrutées peut différer d'un cycle à l'autre. À la fin de chaque cycle, il y a recrutement de complexes comprenant des HDAC et des corépresseurs, dirigeant le récepteur vers la dégradation par le protéasome. Il y aurait des variations subtiles dans les étapes menant à la transcription de différents gènes. Ces vagues transcriptionnelles permettraient à la cellule de continuellement adapter le niveau de transcription d'un gène en réponse à différentes situations et ce à travers la durée de l'activation transcriptionnelle. En accord avec ce modèle, Tal-1 pourrait être recruté par ER $\beta$  à la fin d'un de ces cycles de transcription, même lorsque le récepteur est dans un état d'activation transcriptionnelle, favorisant le passage au cycle de transcription suivant.



**Figure 15 : Modèle préliminaire de la relation entre ER $\beta$  et Tal-1.**

Tal-1 pourrait interagir avec le domaine N-terminal et avec le domaine C-terminal d'ER $\beta$  dans un mode mutuellement exclusif. Il interagit avec le récepteur lorsque celui-ci est inactif, mais n'inhibe pas l'activité basale du récepteur. Le recrutement de Tal-1 est augmenté lorsque le récepteur est activé par la signalisation des MAPK ou par la liaison à l'estrogène. Lorsque le récepteur est activé sur ses deux AFs, il y a un recrutement additif de Tal-1. Dans un état activé, ER $\beta$  voit sa réponse hormonale et sa réponse à la signalisation des MAPK inhibées par la présence de Tal-1.

#### 4.1 PERSPECTIVES

Étant donné le rôle majeur de Tal-1 dans l'hématopoïèse, son expression dans le tissu mammaire tumoral est inattendue. Il serait intéressant de vérifier sa capacité à interagir avec ses partenaires habituels, tels que les protéines-E, d'autres facteurs bHLH de classe A ou les protéines LMO, afin de voir si les mécanismes d'action de Tal-1 normalement retrouvés dans l'hématopoïèse sont également en cause dans le tissu mammaire tumoral. Vu la nouveauté de la découverte de son expression dans ce tissu, il est difficile d'en déterminer l'impact biologique *a priori*. L'interaction de Tal-1 et ER $\beta$  ainsi que ses effets sur l'activité transcriptionnelle d'ER $\beta$  démontrés dans ce travail permettent de suggérer un rôle potentiel pour Tal-1 dans les cellules de cancers du sein ER-positives, telles que les MCF-7 et les MDA-MB-468 : celui d'inhiber l'activité transcriptionnelle d'ER $\beta$ .

Il existe plusieurs alternatives pour expliquer comment Tal-1 pourrait inhiber ER $\beta$ , menant à une répression de l'activité transcriptionnelle du récepteur. La liaison de Tal-1 pourrait masquer certains sites de reconnaissance de protéines coactivatrices sur ER $\beta$ , ne permettant pas à ces protéines d'être recrutées à ER $\beta$  et de permettre une augmentation de l'activité transcriptionnelle du récepteur. D'un autre côté, Tal-1 peut être impliqué dans le recrutement de complexes de protéines corépressives, de sorte que son recrutement sur ER $\beta$  mène à la répression de l'activité transcriptionnelle du récepteur par ces protéines. Dans un cas ou dans l'autre, il serait intéressant de vérifier si Tal-1 est capable d'interagir avec certaines de ces protéines corégulatrices, afin de valider ou d'infirmer un mécanisme d'action possible impliquant le recrutement de complexes protéiques par Tal-1. Dans ce but, des expériences d'immunoprécipitation de protéines permettraient de déterminer si effectivement Tal-1 peut interagir avec certaines protéines corégulatrices.

Aussi, il se peut que le recrutement de Tal-1 induise une conformation du récepteur moins favorable à son activation par le ligand ou par la phosphorylation. Afin de mieux examiner cette option, il serait important de déterminer le ou les sites exacts d'interaction de Tal-1 sur ER $\beta$ . Nous savons qu'il a la possibilité de lier la région N-terminale, comme nous l'avons déterminé par les essais de 'pull down' (**figure 9**), mais il est fort probable qu'il puisse également interagir avec le domaine C-terminal, comme l'ont suggéré nos essais luciférase impliquant cette portion du récepteur (**figure 8C**). En sachant où peut se lier

Tal1, nous pourrions connaître quelle région est affectée par sa liaison et ainsi évaluer l'effet du recrutement de Tal-1 sur la conformation du récepteur.

Il est également possible que les effets inhibiteurs de Tal-1 impliquent la modulation de la phosphorylation de l'AF-1 d'ER $\beta$ . Nous avons vu que certains résidus sérines phosphorylés sont favorables au recrutement de Tal-1 à ER $\beta$  (**figure 9**). Une fois recruté, il est possible que la présence de Tal-1 régule la phosphorylation du récepteur, que ce soit par interaction directe avec ces sites ou bien en empêchant certaines protéines effectrices, par exemple des protéines de la voie des MAPK, de phosphoryler ces sites. En affectant la phosphorylation de l'AF-1 d'ER $\beta$ , Tal-1 régulerait négativement l'activité transcriptionnelle du récepteur. Afin d'évaluer cette hypothèse, une étude plus approfondie des sites de phosphorylation sur l'AF-1 d'ER $\beta$  serait nécessaire. Par exemple, des essais luciférase avec des mutants de substitution pourraient être effectués pour déterminer le rôle des sites ciblés dans la modulation de l'activité transcriptionnelle d'ER $\beta$  par Tal-1. Aussi, des essais de phosphorylation *in vitro* avec ou sans la présence de Tal-1, en utilisant des anticorps phosphospécifiques, permettraient d'évaluer l'état de phosphorylation du récepteur en présence de Tal-1.

De plus, il serait important de déterminer les domaines de Tal-1 essentiels à l'interaction avec ER $\beta$ . Pour ce faire, différentes constructions de Tal-1 devront être réalisées, comprenant ou non le domaine riche en proline et les sérines 122 et 172. Il serait intéressant de muter ces sérines par méthode PCR afin d'apprécier l'importance relative de phosphorylations sur ces sites dans le recrutement de Tal-1 à ER $\beta$ . Des expériences de double hybride avec ces constructions permettraient de déterminer l'implication de ces éléments dans le recrutement de Tal-1 à ER $\beta$ .

Nos études ont porté sur un modèle de cellules de rein, les HEK-293. Étant donné que nous avons trouvé la coexpression de Tal-1 et d'ER $\beta$  dans des cellules de cancers du sein, il serait intéressant de transposer nos résultats dans un modèle cellulaire plus adéquat, dans le but de déterminer l'importance biologique d'une telle observation. À cet effet, nous sommes présentement en train de développer une lignée cellulaire exprimant déjà Tal-1 de façon endogène et dont des transfectants stables d'ER $\beta$  sont en voie d'obtention. Le développement de cette lignée servira à étudier la relation entre Tal-1 et ER $\beta$  dans un

contexte de cellules mammaires et d'évaluer l'effet de cette interaction sur l'expression des gènes cibles d'ER $\beta$ .

De plus, l'obtention de cette lignée nous permettra d'évaluer l'impact de Tal-1 sur les effets prolifératifs normalement induits par ER $\beta$ . Des expériences de prolifération cellulaire en utilisant l'essai MTT (incorporation de sels de Tetrazolium sur la lignée cellulaire Hs-578t-ER $\beta$ , en présence ou en absence de Tal-1, permettront de déterminer si les actions répressives de Tal-1 sur l'activité transcriptionnelle d'ER $\beta$  affectent également les fonctions physiologiques d'ER $\beta$  sur le cycle cellulaire. Dans l'optique où Tal-1 inhiberait la prolifération cellulaire induite par ER $\beta$ , un rôle potentiel de Tal-1 à titre de suppresseur de tumeur pourrait être envisagé. En effet, si Tal-1 avait la capacité d'inhiber la prolifération cellulaire induite par ER $\beta$  dans des cellules saines, son expression dans des cellulaires mammaires métastatiques telles que les MDA-MB-468 pourrait permettre la répression de la prolifération des cellules cancéreuses et ainsi contrer en partie les effets tumoraux d'ER $\beta$  dans ces tissus. Ceci constituerait une nouvelle fonction physiologique pour Tal-1 et pourrait ouvrir la porte au développement d'éventuelles cibles pharmacologiques dans la lutte contre le cancer du sein.

## 5 **BIBLIOGRAPHIE**

## Reference List

1. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC 2002 Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 346:340-352
2. Scallen TJ, Noland BJ, Gavey KL, Bass NM, Ockner RK, Chanderbhan R, Vahouny GV 1985 Sterol carrier protein 2 and fatty acid-binding protein. Separate and distinct physiological functions. *J Biol Chem* 260:4733-4739
3. Matsumine H, Hirato K, Yanaihara T, Tamada T, Yoshida M 1986 Aromatization by skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 63:717-720
4. Miller WR 1991 Aromatase activity in breast tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39:783-790
5. Naftolin F, Ryan KJ, Davies IJ, Reddy VV, Flores F, Petro Z, Kuhn M, White RJ, Takaoka Y, Wolin L 1975 The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog Horm Res* 31:295-319
6. Brodie A, Inkster S, Yue W 2001 Aromatase expression in the human male. *Mol Cell Endocrinol* 178:23-28
7. Fraser IS, Baird DT 1974 Blood production and ovarian secretion rates of estradiol-17 beta and estrone in women with dysfunctional uterine bleeding. *J Clin Endocrinol Metab* 39:564-570
8. Flood C, Pratt JH, Longcope C 1976 The metabolic clearance and blood production rates of estriol in normal, non-pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 42:1-8
9. Anderson DC 1974 Sex-hormone-binding globulin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 3:69-96
10. Hewitt SC, Korach KS 2003 Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction* 125:143-149
11. Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW 1990 Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 11:177-199
12. Couse JF, Korach KS 1999 Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine Reviews* 20:358-417
13. Risma KA, Clay CM, Nett TM, Wagner T, Yun J, Nilson JH 1995 Targeted overexpression of luteinizing hormone in transgenic mice leads to infertility, polycystic ovaries, and ovarian tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1322-1326
14. Kregge JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson J, Smithies O 1998 Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:15677-15682

15. Naftolin F 1994 Brain aromatization of androgens. *J Reprod Med* 39:257-261
16. Garcia-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, Azcoitia I, Chowen JA 1999 Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol* 40:574-584
17. Karas RH, Patterson BL, Mendelsohn ME 1994 Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation* 89:1943-1950
18. Venkov CD, Rankin AB, Vaughan DE 1996 Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation* 94:727-733
19. Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK, Jo I 1999 Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* 263:257-262
20. Hosli E, Ruhl W, Hosli L 2000 Histochemical and electrophysiological evidence for estrogen receptors on cultured astrocytes: colocalization with cholinergic receptors. *Int J Dev Neurosci* 18:101-111
21. Mong JA, Glaser E, McCarthy MM 1999 Gonadal steroids promote glial differentiation and alter neuronal morphology in the developing hypothalamus in a regionally specific manner. *J Neurosci* 19:1464-1472
22. Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, van Dyck CH, Sano M, Doody R, Koss E, Pfeiffer E, Jin S, Gamst A, Grundman M, Thomas R, Thal LJ 2000 Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *Alzheimer's Disease Cooperative Study. JAMA* 283:1007-1015
23. Walsh BW 2001 The effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators on cardiovascular risk factors. *Ann N Y Acad Sci* 949:163-167
24. Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC 1991 Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6613-6617
25. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL 1988 Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 241:84-86
26. Lufkin EG, Wahner HW, O'Fallon WM, Hodgson SF, Kotowicz MA, Lane AW, Judd HL, Caplan RH, Riggs BL 1992 Treatment of postmenopausal osteoporosis with transdermal estrogen. *Ann Intern Med* 117:1-9
27. Lindsay R, Hart DM, Forrest C, Baird C 1980 Prevention of spinal osteoporosis in oophorectomised women. *Lancet* 2:1151-1154
28. Yue W, Santen RJ, Wang JP, Hamilton CJ, Demers LM 1999 Aromatase within the breast. *Endocr Relat Cancer* 6:157-164

29. Calle EE, Miracle-McMahill HL, Thun MJ, Heath CW, Jr. 1995 Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 87:517-523
30. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson J-Å 1997 Human estrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82:4258-4265
31. Wilkinson HA, Dahllund J, Liu H, Yudkovitz J, Cai SJ, Nilsson S, Schaeffer JM, Mitra SW 2002 Identification and characterization of a functionally distinct form of human estrogen receptor beta. *Endocrinology* 143:1558-1561
32. Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P 1989 The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59:477-487
33. Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB 1998 Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5998-6003
34. Laudet V 1997 Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *Journal of Molecular Endocrinology* 19:207-226
35. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW 1999 Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews* 20:321-344
36. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG 1997 A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature (London)* 387:733-736
37. Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V 1999 Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor  $\beta$  through phosphorylation of activation function AF-1. *Molecular Cell* 3:513-519
38. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P 1995 Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270:1491-1494
39. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS 1997 Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER- $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER- $\alpha$ -knockout mouse. *Endocrinology* 138:4613-4621
40. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG 1997 Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  form heterodimers on DNA. *Journal of Biological Chemistry* 272:19858-19862
41. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M 1998 The complete primary structure of human estrogen receptor  $\beta$  (Her- $\beta$ ) and

its heterodimerization with ER  $\alpha$  in vivo and in vitro. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 243:122-126

42. Pettersson K, Grandien K, Kuiper GGJM, Gustafsson J-Å 1997 Mouse estrogen receptor  $\beta$  forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor  $\alpha$ . *Molecular Endocrinology* 11:1486-1496
43. Tremblay GB, Tremblay A, Labrie F, Giguère V 1999 Dominant Activity of Activation Function 1 (AF-1) and Differential Stoichiometric Requirements for AF-1 and -2 in the Estrogen Receptor  $\alpha$ - $\beta$  Heterodimeric Complex. *Molecular and Cellular Biology* 19:1919-1927
44. Couse JF, Korach KS 1999 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* 20:358-417
45. Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, Hodgins J, Shaul PW, Thoren P, Smithies O, Gustafsson JA, Mendelsohn ME 2002 Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science* 295:505-508
46. Ogawa S, Chester AE, Hewitt SC, Walker VR, Gustafsson JA, Smithies O, Korach KS, Pfaff DW 2000 From the cover: abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14737-14741
47. Simpson ER, Davis SR 2000 Another role highlighted for estrogens in the male: sexual behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14038-14040
48. Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS 1999 Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 286:2328-2331
49. Parker MG, Arbuckle N, Dauvois S, Danielian P, White R 1993 Structure and function of the estrogen receptor. *Ann N Y Acad Sci* 684:119-126
50. Gaub M-P, Bellard M, Scheuer I, Chambon P, Sassone-Corsi P 1990 Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the Fos-Jun complex. *Cell* 63:1267-1276
51. Umayahara Y, Kawamori R, Watada H, Imano E, Iwama N, Morishima T, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Kamada T 1994 Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J Biol Chem* 269:16433-16442
52. Webb P, Nguyen P, Valentine C, Lopez GN, Kwok GR, McInerney E, Katzenellenbogen BS, Enmark E, Gustafsson JA, Nilsson S, Kushner PJ 1999 The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol* 13:1672-1685

53. Jakacka M, Ito M, Weiss J, Chien PY, Gehm BD, Jameson JL 2001 Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway. *J Biol Chem* 276:13615-13621
54. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, Webb P 2000 Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:311-317
55. Geum D, Sun W, Paik SK, Lee CC, Kim K 1997 Estrogen-induced cyclin D1 and D3 gene expressions during mouse uterine cell proliferation in vivo: differential induction mechanism of cyclin D1 and D3. *Mol Reprod Dev* 46:450-458
56. Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, Dauvois S, Parker MG, Truss M, Beato M, Sica V, Bresciani F, Weisz A 1996 17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene* 12:2315-2324
57. Rosenfeld MG, Glass CK 2001 Coregulator Codes of Transcriptional Regulation by Nuclear Receptors. *J Biol Chem* 276:36865-36868
58. Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW, McDonnell DP 1994 Human estrogen receptor transcriptional capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Molecular Endocrinology* 8:21-30
59. Hall JM, McDonnell DP 1999 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* 140:5566-5578
60. Hall JM, Couse JF, Korach KS 2001 The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276:36869-36872
61. Smith CL 1998 Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol Reprod* 58:627-632
62. Ignar-Trowbridge DM, Nelson KG, Bidwell MC, Curtis SW, Washburn TF, McLachlan JA, Korach KS 1992 Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4658-4662
63. Ignar-Trowbridge DM, Pimentel M, Teng CT, Korach KS, McLachlan JA 1995 Cross talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling systems. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7:35-38
64. Curtis SW, Washburn T, Sewall C, DiAugustine R, Lindzey J, Couse JF, Korach KS 1996 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* 93:12626-12630

65. Shao D, Lazar MA 1999 Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *Journal of Clinical Investigation* 103:1617-1618
66. Kato SS 2001 Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer* 8:3-9
67. Chen D, Riedl T, Washbrook E, Pace PE, Coombes RC, Egly JM, Ali S 2000 Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIID and participation of CDK7. *Mol Cell* 6:127-137
68. Henrich LM, Smith JA, Kitt D, Errington TM, Nguyen B, Traish AM, Lannigan DA 2003 Extracellular signal-regulated kinase 7, a regulator of hormone-dependent estrogen receptor destruction. *Mol Cell Biol* 23:5979-5988
69. Ignar-Trowbridge DM, Teng CT, Ross KA, Parker MG, Korach KS, McLachlan JA 1993 Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element. *Molecular Endocrinology* 7:992-998
70. Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS 1994 Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry* 269:4458-4466
71. Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ 1999 Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem* 274:22296-22302
72. Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC 1994 Serine 167 is the major estradiol-induced phosphorylation site on the human estrogen receptor  
1. *Mol Endocrinol* 8:1208-1214
73. Lin A, Frost J, Deng T, Smeal T, al Alawi N, Kikkawa U, Hunter T, Brenner D, Karin M 1992 Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell* 70:777-789
74. Luscher B, Christenson E, Litchfield DW, Krebs EG, Eisenman RN 1990 Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. *Nature* 344:517-522
75. Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC 1995 Phosphorylation of the human estrogen receptor by mitogen-activated protein kinase and casein kinase II: consequence on DNA binding. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55:163-172
76. Edelman AM, Blumenthal DK, Krebs EG 1987 Protein serine/threonine kinases. *Annu Rev Biochem* 56:567-613
77. Lee H, Bai W 2002 Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol* 22:5835-5845

78. Tremblay A, Giguere V 2001 Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 77:19-27
79. Driggers PH, Segars JH, Rubino DM 2001 The proto-oncoprotein Brx activates estrogen receptor beta by a p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 276:46792-46797
80. Coleman KM, Dutertre M, El Gharbawy A, Rowan BG, Weigel NL, Smith CL 2003 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* 278:12834-12845
81. Paik S, Hartmann DP, Dickson RB, Lippman ME 1994 Antiestrogen resistance in ER positive breast cancer cells. *Breast Cancer Research & Treatment* 31:301-7
82. Wakeling AE 1993 Are breast tumours resistant to tamoxifen also resistant to pure antioestrogens? *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 47:107-114
83. Webb P, Lopez GN, Uht RM, Kushner PJ 1995 Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol* 9:443-456
84. Philips A, Teyssier C, Galtier F, Rivier-Covas C, Rey JM, Rochefort H, Chalbos D 1998 FRA-1 expression level modulates regulation of activator protein-1 activity by estradiol in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 12:973-985
85. Goldman PS, Tran VK, Goodman RH 1997 The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation. *Recent Prog Horm Res* 52:103-119
86. Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB 1997 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* 11:693-705
87. Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzl T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, Del-Rio AL, Ricote M, Ngo S, Gemsch J, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Glass CK, Rosenfeld MG, Rose DW 1998 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* 95:2920-2925
88. Paech K, Webb P, Kuiper GGJM, Nilsson S, Gustafsson J-Å, Kushner PJ, Scanlan TS 1997 Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites. *Science* 277:1508-1510
89. Jakacka M, Ito M, Martinson F, Ishikawa T, Lee EJ, Jameson JL 2002 An estrogen receptor (ER)alpha deoxyribonucleic acid-binding domain knock-in mutation provides evidence for nonclassical ER pathway signaling in vivo. *Mol Endocrinol* 16:2188-2201

90. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O 1993 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* 90:11162-11166
91. Mendelsohn ME 2000 Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean? *Circ Res* 87:956-960
92. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK 2000 Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407:538-541
93. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC 2001 Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104:719-730
94. Wu C 1997 Chromatin remodeling and the control of gene expression. *J Biol Chem* 272:28171-28174
95. Wade PA, Wolffe AP 1999 Transcriptional regulation: SWItching circuitry. *Curr Biol* 9:R221-R224
96. Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR 1999 Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284:2174-2177
97. Koh SS, Chen D, Lee YH, Stallcup MR 2001 Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem* 276:1089-1098
98. Xu J, Li Q 2003 Review of the in Vivo Functions of the p160 Steroid Receptor Coactivator Family. *Mol Endocrinol* 17:1681-1692
99. Kurokawa R, Kalafus D, Ogliaastro M-H, Kioussi C, Xu L, Torchia J, Rosenfeld MG, Glass CK 1998 Differential use of CREB binding protein-coactivator complexes. *Science* 279:700-703
100. Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK, Rosenfeld MG 1997 The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature (London)* 387:677-684
101. McInerney EM, Rose DW, Flynn SE, Westin S, Mullen TM, Kronen A, Inostroza J, Torchia J, Nolte RT, Assa-Munt N, Milburn MV, Glass CK, Rosenfeld MG 1998 Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes & Development* 12:3357-3368

102. Heery DM, Hoare S, Hussain S, Parker MG, Sheppard H 2001 Core LXXLL motif sequences in CREB-binding protein, SRC1, and RIP140 define affinity and selectivity for steroid and retinoid receptors. *J Biol Chem* 276:6695-6702
103. Mak HY, Hoare S, Henttu PM, Parker MG 1999 Molecular determinants of the estrogen receptor-coactivator interface. *Molecular & Cellular Biology* 19:3895-3903
104. Brzozowski AM, Pike ACW, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström L, Greene GL, Gustafsson J-Å, Carlquist M 1997 Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature (London)* 389:753-758
105. Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL 1998 The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95:927-937
106. Webb P, Nguyen P, Shinsako J, Anderson C, Feng W, Nguyen MP, Chen D, Huang S-M, Subramanian S, McNerney EM, Katzenellenbogen BS, Stallcup MR, Kushner PJ 1998 Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Molecular Endocrinology* 12:1605-1618
107. Onate SA, Boonyaratanakornkit V, Spencer TE, Tsai SY, Tsai MJ, Edwards DP, O'Malley BW 1998 The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem* 273:12101-12108
108. Yang X-J, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y 1996 A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature (London)* 382:319-324
109. Vo N, Goodman RH 2001 CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 276:13505-13508
110. Chen H, Lin RJ, Xie W, Wilpitz D, Evans RM 1999 Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* 98:675-686
111. Ait-Si-Ali S, Carlisi D, Ramirez S, Upegui-Gonzalez LC, Duquet A, Robin P, Rudkin B, Harel-Bellan A, Trouche D 1999 Phosphorylation by p44 MAP Kinase/ERK1 stimulates CBP histone acetyl transferase activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 262:157-162
112. Kozus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McNerney EM, Mullen T-M, Glass CK, Rosenfeld MG 1998 Transcription factor-specific requirements of coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279:703-707
113. Thompson JS, Ling X, Grunstein M 1994 Histone H3 amino terminus is required for telomeric and silent mating locus repression in yeast. *Nature* 369:245-247

114. Hecht A, Laroche T, Strahl-Bolsinger S, Gasser SM, Grunstein M 1995 Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 80:583-592
115. Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL 1996 A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272:408-411
116. Alland L, Muhle R, Hou H, Potes J, Chin L, Schreiber N, DePinho RA 1997 Role For N-CoR and Histone Deacetylase In Sin3-Mediated Transcriptional Repression. *Nature* 387:49-55
117. Heinzl T, Lavinsky RM, Mullen TM, Soderstrom M, Laherty CD, Torchia J, Yang WM, Brard G, Ngo SD, Davie JR, Seto E, Eisenman RN, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG 1997 A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature (London)* 387:43-48
118. Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL, Evans RM 1997 Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3a, and histone deacetylase. *Cell* 89:373-380
119. Zhang X, Jeyakumar M, Petukhov S, Baghi MK 1998 A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor. *Molecular Endocrinology* 12:513-524
120. Sanchez M, Tremblay A. Growth factor receptor signaling to estrogen receptors in hormone-dependent cancers. *molecular genetics of cancer* , 149-185. 2005.
121. Jordan VC, Gapstur S, Morrow M 2001 Selective estrogen receptor modulation and reduction in risk of breast cancer, osteoporosis, and coronary heart disease. *J Natl Cancer Inst* 93:1449-1457
122. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J, Daly M, Wieand S, Tan-Chiu E, Ford L, Wolmark N 1998 Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 90:1371-1388
123. Ingle JN, Suman VJ 2003 Aromatase inhibitors versus tamoxifen for management of postmenopausal breast cancer in the advanced disease and neoadjuvant settings. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86:313-319
124. Berry M, Metzger D, Chambon P 1990 Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *European Molecular Biology Organization Journal* 9:2811-2818
125. Barsalou A, Gao W, Anghel SI, Carrière J, Mader S 1998 Estrogen response elements can mediate agonist activity of anti-estrogens in human endometrial Ishikawa cells. *Journal of Biological Chemistry* 273:17138-17146

126. Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguère V 1997 Cloning, chromosomal localization and functional analysis of the murine estrogen receptor  $\beta$ . *Molecular Endocrinology* 11:353-365
127. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS 2006 Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366:2-16
128. Pearce ST, Jordan VC 2004 The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 50:3-22
129. Thellenberg-Karlsson C, Lindstrom S, Malmer B, Wiklund F, Augustsson-Balter K, Adami HO, Stattin P, Nilsson M, Dahlgren K, Gustafsson JA, Gronberg H 2006 Estrogen receptor beta polymorphism is associated with prostate cancer risk. *Clin Cancer Res* 12:1936-1941
130. Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B 2001 Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 61:632-640
131. Kallianpur AR, Jordan JE, Brandt SJ 1994 The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood* 83:1200-1208
132. Murre C, McCaw PS, Baltimore D 1989 A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56:777-783
133. Hsu HL, Cheng JT, Chen Q, Baer R 1991 Enhancer-binding activity of the tal-1 oncoprotein in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* 11:3037-3042
134. Hsu HL, Huang L, Tsan JT, Funk W, Wright WE, Hu JS, Kingston RE, Baer R 1994 Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* 14:1256-1265
135. Bernard O, Lecointe N, Jonveaux P, Souyri M, Mauchauffe M, Berger R, Larsen CJ, Mathieu-Mahul D 1991 Two site-specific deletions and t(1;14) translocation restricted to human T-cell acute leukemias disrupt the 5' part of the tal-1 gene. *Oncogene* 6:1477-1488
136. Bernard O, Guglielmi P, Jonveaux P, Cherif D, Gisselbrecht S, Mauchauffe M, Berger R, Larsen CJ, Mathieu-Mahul D 1990 Two distinct mechanisms for the SCL gene activation in the t(1;14) translocation of T-cell leukemias. *Genes Chromosomes Cancer* 1:194-208
137. Pulford K, Lecointe N, Leroy-Viard K, Jones M, Mathieu-Mahul D, Mason DY 1995 Expression of TAL-1 proteins in human tissues. *Blood* 85:675-684

138. Cheng JT, Cobb MH, Baer R 1993 Phosphorylation of the TAL1 oncoprotein by the extracellular-signal-regulated protein kinase ERK1. *Mol Cell Biol* 13:801-808
139. Elwood NJ, Cook WD, Metcalf D, Begley CG 1993 SCL, the gene implicated in human T-cell leukaemia, is oncogenic in a murine T-lymphocyte cell line. *Oncogene* 8:3093-3101
140. Xia Y, Brown L, Yang CY, Tsan JT, Siciliano MJ, Espinosa R, III, Le Beau MM, Baer RJ 1991 TAL2, a helix-loop-helix gene activated by the (7;9)(q34;q32) translocation in human T-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11416-11420
141. Cleary ML, Mellentin JD, Spies J, Smith SD 1988 Chromosomal translocation involving the beta T cell receptor gene in acute leukemia. *J Exp Med* 167:682-687
142. Begley CG, Aplan PD, Denning SM, Haynes BF, Waldmann TA, Kirsch IR 1989 The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:10128-10132
143. Begley CG, Aplan PD, Davey MP, Nakahara K, Tchorz K, Kurtzberg J, Hershfield MS, Haynes BF, Cohen DI, Waldmann TA, . 1989 Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2031-2035
144. Green AR, Salvaris E, Begley CG 1991 Erythroid expression of the 'helix-loop-helix' gene, SCL. *Oncogene* 6:475-479
145. Green AR, Lints T, Visvader J, Harvey R, Begley CG 1992 SCL is coexpressed with GATA-1 in hemopoietic cells but is also expressed in developing brain. *Oncogene* 7:653-660
146. Mouthon MA, Bernard O, Mitjavila MT, Romeo PH, Vainchenker W, Mathieu-Mahul D 1993 Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood* 81:647-655
147. Hwang LY, Siegelman M, Davis L, Oppenheimer-Marks N, Baer R 1993 Expression of the TAL1 proto-oncogene in cultured endothelial cells and blood vessels of the spleen. *Oncogene* 8:3043-3046
148. Silver L, Palis J 1997 Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis. *Blood* 89:1154-1164
149. Labastie MC, Cortes F, Romeo PH, Dulac C, Peault B 1998 Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo. *Blood* 92:3624-3635
150. Elefanty AG, Begley CG, Hartley L, Papaevangeliou B, Robb L 1999 SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues. *Blood* 94:3754-3763

151. Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G 1999 Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126:5073-5084
152. Drake CJ, Fleming PA 2000 Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood* 95:1671-1679
153. Drake CJ, Brandt SJ, Trusk TC, Little CD 1997 TAL1/SCL is expressed in endothelial progenitor cells/angioblasts and defines a dorsal-to-ventral gradient of vasculogenesis. *Dev Biol* 192:17-30
154. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL 1995 The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:35-71
155. Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, . 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544.
156. Olson EN, Klein WH. 1994. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev* 8:1-8.
157. Shivdasani RA, Orkin SH 1996 The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* 87:4025-4039
158. Robb L, Lyons I, Li R, Hartley L, Kontgen F, Harvey RP, Metcalf D, Begley CG 1995 Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the *scl* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7075-7079
159. Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH 1995 Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein *tal-1/SCL*. *Nature* 373:432-434
160. Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH 1996 The T cell leukemia oncoprotein *SCL/tal-1* is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86:47-57
161. Robb L, Elwood NJ, Elefanty AG, Kontgen F, Li R, Barnett LD, Begley CG 1996 The *scl* gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J* 15:4123-4129
162. Hall MA, Curtis DJ, Metcalf D, Elefanty AG, Sourris K, Robb L, Gothert JR, Jane SM, Begley CG 2003 The critical regulator of embryonic hematopoiesis, *SCL*, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:992-997
163. Endoh M, Ogawa M, Orkin S, Nishikawa S 2002 *SCL/tal-1*-dependent process determines a competence to select the definitive hematopoietic lineage prior to endothelial differentiation. *EMBO J* 21:6700-6708

164. Orkin SH, Porcher C, Fujiwara Y, Visvader J, Wang LC 1999 Intersections between blood cell development and leukemia genes. *Cancer Res* 59:1784s-1787s
165. Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H 1998 Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125:1747-1757
166. Faloon P, Arentson E, Kazarov A, Deng CX, Porcher C, Orkin S, Choi K 2000 Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development* 127:1931-1941
167. Robertson SM, Kennedy M, Shannon JM, Keller G 2000 A transitional stage in the commitment of mesoderm to hematopoiesis requiring the transcription factor SCL/tal-1. *Development* 127:2447-2459
168. Chung YS, Zhang WJ, Arentson E, Kingsley PD, Palis J, Choi K 2002 Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development* 129:5511-5520
169. Lecuyer E, Hoang T 2004 SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp Hematol* 32:11-24
170. Cheng JT, Hsu HL, Hwang LY, Baer R 1993 Products of the TAL1 oncogene: basic helix-loop-helix proteins phosphorylated at serine residues. *Oncogene* 8:677-683
171. Tang T, Prasad KS, Koury MJ, Brandt SJ 1999 Mitogen-activated protein kinase mediates erythropoietin-induced phosphorylation of the TAL1/SCL transcription factor in murine proerythroblasts. *Biochem J* 343 Pt 3:615-620
172. Tang T, Arbiser JL, Brandt SJ 2002 Phosphorylation by mitogen-activated protein kinase mediates the hypoxia-induced turnover of the TAL1/SCL transcription factor in endothelial cells. *J Biol Chem* 277:18365-18372
173. Sanchez-Garcia I, Rabbitts TH 1994 Transcriptional activation by TAL1 and FUS-CHOP proteins expressed in acute malignancies as a result of chromosomal abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7869-7873
174. Wadman IA, Hsu HL, Cobb MH, Baer R 1994 The MAP kinase phosphorylation site of TAL1 occurs within a transcriptional activation domain. *Oncogene* 9:3713-3716
175. Prasad KS, Jordan JE, Koury MJ, Bondurant MC, Brandt SJ 1995 Erythropoietin stimulates transcription of the TAL1/SCL gene and phosphorylation of its protein products. *J Biol Chem* 270:11603-11611
176. Prasad KS, Brandt SJ 1997 Target-dependent effect of phosphorylation on the DNA binding activity of the TAL1/SCL oncoprotein. *J Biol Chem* 272:11457-11462

177. Mahajan MA, Park ST, Sun XH 1996 Association of a novel GTP binding protein, DRG, with TAL oncogenic proteins. *Oncogene* 12:2343-2350
178. Zhao XF, Aplan PD 1998 SCL binds the human homologue of DRG in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1448:109-114
179. Chiba T, Nagata Y, Kishi A, Sakamaki K, Miyajima A, Yamamoto M, Engel JD, Todokoro K 1993 Induction of erythroid-specific gene expression in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11593-11597
180. Tanigawa T, Elwood N, Metcalf D, Cary D, DeLuca E, Nicola NA, Begley CG 1993 The SCL gene product is regulated by and differentially regulates cytokine responses during myeloid leukemic cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7864-7868
181. Calkhoven CF, Muller C, Martin R, Krosch G, Pietsch H, Hoang T, Leutz A 2003 Translational control of SCL-isoform expression in hematopoietic lineage choice. *Genes Dev* 17:959-964
182. Begley CG, Green AR 1999 The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. *Blood* 93:2760-2770
183. Chen Q, Cheng JT, Tasi LH, Schneider N, Buchanan G, Carroll A, Crist W, Ozanne B, Siciliano MJ, Baer R 1990 The tal gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein. *EMBO J* 9:415-424
184. Finger LR, Kagan J, Christopher G, Kurtzberg J, Hershfield MS, Nowell PC, Croce CM 1989 Involvement of the TCL5 gene on human chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5039-5043
185. Aplan PD, Lombardi DP, Ginsberg AM, Cossman J, Bertness VL, Kirsch IR 1990 Disruption of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity. *Science* 250:1426-1429
186. Brown L, Cheng JT, Chen Q, Siciliano MJ, Crist W, Buchanan G, Baer R 1990 Site-specific recombination of the tal-1 gene is a common occurrence in human T cell leukemia. *EMBO J* 9:3343-3351
187. Chen Q, Yang CY, Tsan JT, Xia Y, Ragab AH, Peiper SC, Carroll A, Baer R 1990 Coding sequences of the tal-1 gene are disrupted by chromosome translocation in human T cell leukemia. *J Exp Med* 172:1403-1408
188. Herblot S, Steff AM, Hugo P, Aplan PD, Hoang T 2000 SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol* 1:138-144
189. Brown L, Cheng JT, Chen Q, Siciliano MJ, Crist W, Buchanan G, Baer R 1990 Site-specific recombination of the tal-1 gene is a common occurrence in human T cell leukemia. *EMBO J* 9:3343-3351

190. Aplan PD, Lombardi DP, Reaman GH, Sather HN, Hammond GD, Kirsch IR 1992 Involvement of the putative hematopoietic transcription factor SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 79:1327-1333
191. Bash RO, Hall S, Timmons CF, Crist WM, Amylon M, Smith RG, Baer R 1995 Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A pediatric oncology group study. *Blood* 86:666-676
192. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, Behm FG, Pui CH, Downing JR, Gilliland DG, Lander ES, Golub TR, Look AT 2002 Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 1:75-87
193. Robb L, Rasko JE, Bath ML, Strasser A, Begley CG 1995 scl, a gene frequently activated in human T cell leukaemia, does not induce lymphomas in transgenic mice. *Oncogene* 10:205-209
194. Larson RC, Lavenir I, Larson TA, Baer R, Warren AJ, Wadman I, Nottage K, Rabbitts TH 1996 Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tall alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J* 15:1021-1027
195. Condorelli GL, Facchiano F, Valtieri M, Proietti E, Vitelli L, Lulli V, Huebner K, Peschle C, Croce CM 1996 T-cell-directed TAL-1 expression induces T-cell malignancies in transgenic mice. *Cancer Res* 56:5113-5119
196. Kelliher MA, Seldin DC, Leder P 1996 Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase IIalpha. *EMBO J* 15:5160-5166
197. Chervinsky DS, Zhao XF, Lam DH, Ellsworth M, Gross KW, Aplan PD 1999 Disordered T-cell development and T-cell malignancies in SCL LMO1 double-transgenic mice: parallels with E2A-deficient mice. *Mol Cell Biol* 19:5025-5035
198. Curtis D.J. The CD2-scl transgene alters the phenotype and frequency of T-lymphomas in N-ras transgenic or p53 deficient mice. Robb L., Strasser A., Begley CG, editors. *Oncogene* [15], 2975-2983. 1997.
199. O'Neil J, Billa M, Oikemus S, Kelliher M 2001 The DNA binding activity of TAL-1 is not required to induce leukemia/lymphoma in mice. *Oncogene* 20:3897-3905
200. Rabbitts TH 1998 LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes. *Genes Dev* 12:2651-2657
201. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint BG, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le

- Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M 2003 LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415-419
202. Valge-Archer VE, Osada H, Warren AJ, Forster A, Li J, Baer R, Rabbitts TH 1994 The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8617-8621
203. Wadman I, Li J, Bash RO, Forster A, Osada H, Rabbitts TH, Baer R 1994 Specific in vivo association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. *EMBO J* 13:4831-4839
204. Brady G, Billia F, Knox J, Hoang T, Kirsch IR, Voura EB, Hawley RG, Cumming R, Buchwald M, Siminovitch K 1995 Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells. *Curr Biol* 5:909-922
205. Dong WF, Billia F, Atkins HL, Iscove NN, Minden MD 1996 Expression of rhombotin 2 in normal and leukaemic haemopoietic cells. *Br J Haematol* 93:280-286
206. Delassus S, Titley I, Enver T 1999 Functional and molecular analysis of hematopoietic progenitors derived from the aorta-gonad-mesonephros region of the mouse embryo. *Blood* 94:1495-1503
207. Manaia A, Lemarchandel V, Klaine M, Max-Audit I, Romeo P, Dieterlen-Lievre F, Godin I 2000 Lmo2 and GATA-3 associated expression in intraembryonic hemogenic sites. *Development* 127:643-653
208. Herblot S, Aplan PD, Hoang T 2002 Gradient of E2A activity in B-cell development. *Mol Cell Biol* 22:886-900
209. Engel I. The function of E- and Id proteins in lymphocyte development. Murre C, editor. *Nat Rev Immunol* [1], 193-199. 2001.
210. Goardon N, Schuh A, Hajar I, Ma X, Jouault H, Dzierzak E, Romeo PH, Maouche-Chretien L 2002 Ectopic expression of TAL-1 protein in Ly-6E.1-htal-1 transgenic mice induces defects in B- and T-lymphoid differentiation. *Blood* 100:491-500
211. Bain G, Engel I, Robanus Maandag EC, te Riele HP, Volland JR, Sharp LL, Chun J, Huey B, Pinkel D, Murre C 1997 E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* 17:4782-4791
212. Yan W, Young AZ, Soares VC, Kelley R, Benezra R, Zhuang Y 1997 High incidence of T-cell tumors in E2A-null mice and E2A/Id1 double-knockout mice. *Mol Cell Biol* 17:7317-7327
213. Murre C. Role of helix-loop-helix proteins in lymphocyte development. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* [64], 39-44. 1999.

214. Bernard M, Delabesse E, Novault S, Hermine O, Macintyre EA 1998 Antiapoptotic effect of ectopic TAL1/SCL expression in a human leukemic T-cell line. *Cancer Res* 58:2680-2687
215. Park ST, Nolan GP, Sun XH 1999 Growth inhibition and apoptosis due to restoration of E2A activity in T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med* 189:501-508
216. Mellentin JD, Smith SD, Cleary ML 1989 lyl-1, a novel gene altered by chromosomal translocation in T cell leukemia, codes for a protein with a helix-loop-helix DNA binding motif. *Cell* 58:77-83
217. Chen Q, Yang CY, Tsan JT, Xia Y, Ragab AH, Peiper SC, Carroll A, Baer R 1990 Coding sequences of the tal-1 gene are disrupted by chromosome translocation in human T cell leukemia. *J Exp Med* 172:1403-1408
218. Wang J, Jani-Sait SN, Escalon EA, Carroll AJ, de Jong PJ, Kirsch IR, Aplan PD 2000 The t(14;21)(q11.2;q22) chromosomal translocation associated with T-cell acute lymphoblastic leukemia activates the BHLHB1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3497-3502
219. von Lindern M, Boer L, Wessely O, Parker M, Beug H 1998 The transactivation domain AF-2 but not the DNA-binding domain of the estrogen receptor is required to inhibit differentiation of avian erythroid progenitors. *Mol Endocrinol* 12:263-277
220. Sasaki K, Ito T 1981 Effects of estrogen and progesterone on the spleen of the mouse: a light and electron microscopic study. *Arch Histol Jpn* 44:203-213
221. Landshman N, Bleiberg I 1979 Effect of estradiol on erythropoiesis and megakaryocytopoiesis in mice. *Isr J Med Sci* 15:140-146
222. Schroeder C, Gibson L, Nordstrom C, Beug H 1993 The estrogen receptor cooperates with the TGF alpha receptor (c-erbB) in regulation of chicken erythroid progenitor self-renewal. *EMBO J* 12:951-960
223. Blobel GA, Sieff CA, Orkin SH 1995 Ligand-dependent repression of the erythroid transcription factor GATA-1 by the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 15:3147-3153
224. St Laurent V, Sanchez M, Charbonneau C, Tremblay A 2005 Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94:23-37
225. Giguère V, Shago M, Zirngibl R, Tate P, Rossant J, Varmuza S 1990 Identification of a novel isoform of the retinoic acid receptor  $\gamma$  expressed in the mouse embryo. *Molecular & Cellular Biology* 10:2335-2340
226. Driggers PH, Segars JH 2002 Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. *Trends Endocrinol Metab* 13:422-427

227. Benecke A, Chambon P, Gronemeyer H 2000 Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep* 1:151-157
228. Kobayashi Y, Kitamoto T, Masuhiro Y, Watanabe M, Kase T, Metzger D, Yanagisawa J, Kato S 2000 p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J Biol Chem* 275:15645-15651
229. McInerney EM, Tsai M-J, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS 1996 Analysis of estrogen receptor transcriptional enhancement by a nuclear hormone receptor coactivator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:10069-10073
230. Laganier J, Deblois G, Lefebvre C, Bataille AR, Robert F, Giguere V 2005 From the Cover: Location analysis of estrogen receptor alpha target promoters reveals that FOXA1 defines a domain of the estrogen response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11651-11656
231. Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F 2003 Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115:751-763